Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau

Jonas Ogien

▶ **To cite this version:**

Jonas Ogien. Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. ⟨NNT : 2017SACLO011⟩. ⟨tel-01683099⟩

HAL Id: tel-01683099

https://pastel.hal.science/tel-01683099v1

Submitted on 12 Jan 2018

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.

HAL Authorization

université PARIS-SACLAY

2017SACLO011

Thèse de doctorat

INSTITUT d'OPTIQUE GRADUATE SCHOOL ParisTech

Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'Institut d'Optique Graduate School

École doctorale n°575 Electrical, optical, bio-physics and engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat: Physique

Thèse soutenue à Palaiseau, le 30 novembre 2017, par

Jonas Ogien

Composition du Jury :

Christophe Gorecki Directeur de recherche, Institut FEMTO-ST	Rapporteur, président
Paul Montgomery Directeur de recherche, Laboratoire ICube	Rapporteur
Audrey Bowden Professeure associée, Stanford Biomedical Optics Group	Examinateur
Kate Grieve Ingénieure, Institut de la Vision	Examinateur
Frédéric Pain Maître de conférences, Laboratoire IMNC	Examinateur
Arnaud Dubois Professeur, Laboratoire Charles Fabry	Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mon directeur de thèse, Arnaud Dubois, pour m'avoir proposé ce sujet et pour son remarquable encadrement au cours de ces trois années. J'aimerais exprimer ma gratitude à son égard pour sa disponibilité, ses conseils et l'autonomie qu'il m'a accordée au cours de cette thèse.

Je remercie Christophe Gorecki et Paul Montgomery d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit. Je remercie également les autres membres du jury, Audrey Bowden, Kate Grieve et Frédéric Pain.

Ce fut un plaisir de travailler au sein du groupe Biophotonique du laboratoire Charles Fabry. J'aimerais remercier en particulier Karen Perronet et Julien Moreau pour leur bienveillance et leur disponibilité.

Je remercie aussi Antoine Federici pour son aide au début de ma thèse, et l'ensemble des doctorants avec qui j'ai eu le plaisir de passer du temps et d'avoir des conversations enrichissantes : Alexandra, Aurore, Flavie, Nathalie, Jean-François, Frédéric, Zhor, Paul, et l'inénarrable Mitradeep.

Je souhaiterais exprimer ma plus profonde gratitude aux bureaux d'étude mécanique et optique et au service électronique de l'Institut d'Optique, en particulier à André Guilbaud et André Villing, sans lesquels une importante partie des travaux présentés dans ce manuscrit n'auraient pas pu être faite. C'était de plus toujours un vrai plaisir de passer du temps avec vous.

Plusieurs stagiaires m'ont assisté au cours de cette thèse. Je remercie particulièrement Grégoire pour son travail remarquable, ainsi qu'Annie et Estelle.

Je remercie également Frédéric Pain, Juliette et Haleh de l'IMNC pour leur collaboration, qui je l'espère se poursuivra.

Je remercie l'ensemble des enseignants chercheurs de l'Institut d'Optique avec qui j'ai eu l'occasion de travailler dans le cadre des mon activité de chargé de TD : Nathalie Westbrook, Henri Benisty, Matthieu Boffety, François Goudail, Hervé Sauer, Yvan Sortais, ainsi que les autres chargés de TD que j'ai eu l'occasion de côtoyer.

Je remercie également Audrey Bowden de m'avoir accueilli durant deux mois à l'université Stanford, au sein du *Stanford Biomedical Optics group*. Je remercie l'ensemble du groupe et les personnes qui ont rendu ce projet possible, en particulier François Goudail pour sa collaboration, et le *France-Stanford Center for Interdisciplinary Studies* pour m'avoir octroyé une bourse de *visiting student researcher*. Je tiens aussi à remercier Isabelle Collignon pour son accueil chaleureux à Stanford, ainsi que Jon et Doris Landes pour leur aide et leur bienveillance durant mon séjour.

Je souhaite également exprimer ma reconnaissance envers la Fondation d'entreprise SILAB-Jean Paufique pour m'avoir sélectionné en tant que 9ème lauréat de la fondation. Je remercie l'ensemble du jury d'avoir choisi mon projet, et je remercie Jean Paufique pour

son implication dans la recherche scientifique. C'est toujours un plaisir d'aller à Brive-la-Gaillarde, et j'espère que j'aurais encore de nombreuses occasions de passer à SILAB.

Je félicite Anaïs Barut et David Siret pour le succès de leur start-up Damae Medical, et je tiens à remercier chaleureusement les membres de cette entreprise qui m'ont permis d'entrer en contact avec les instituts au sein desquels j'ai pu imager des échantillons biologiques, et qui m'ont apporté une aide inestimable sur de nombreux aspects techniques. Merci à Hicham, Mélanie, Arthur et Katie, et un remerciement spécial à Olivier, pour avoir toujours accepté de passer du temps pour m'aider au cours de ces trois années, de l'alignement optique au déménagement d'armoire. J'espère que notre collaboration va continuer à porter ses fruits à présent que je vous rejoins dans cette aventure.

Je souhaiterais par ailleurs remercier l'ensemble des enseignants qui m'ont amené à aller jusqu'à un doctorat par leurs encouragements et leurs conseils. Je remercie en particulier Mathieu Hébert et Thierry Lépine de l'IOGS St Étienne, et Jannick Rolland de l'université de Rochester.

Finalement, sur un plan plus personnel, je souhaiterais remercier tous les amis qui m'ont accompagné au cours de ces trois années, ainsi que les musiciens avec qui j'ai eu la chance de travailler.

Mes derniers remerciements vont à l'ensemble de ma famille pour son soutien et sa bienveillance inconditionnelle. Je remercie en particulier mes parents, mon frère Gabriel, et ma compagne Julie qui a mis au monde le plus beau des bébés au cours de ma thèse. Oscar, j'espère que tu n'auras pas été traumatisé par tes premiers mois de vie passés avec un papa thésard. Je te remercie finalement pour le bonheur que tu m'apportes quotidiennement.

Sommaire

Remerciements iii

Introduction générale 1

1 La microscopie optique pour l'imagerie des tissus biologiques 3
1.1 Introduction . . . 3
1.2 Interaction tissu-lumière . . . 4
1.2.1 Interaction entre la lumière et une particule unique . . . 5
1.2.2 Interaction entre la lumière et un ensemble de particules . . . 8
1.3 La microscopie pour le diagnostic médical . . . 13
1.3.1 Pratiques . . . 13
1.3.2 Besoins . . . 14
1.4 Techniques de microscopie pour l'imagerie en profondeur dans les tissus . . . 16
1.4.1 La microscopie à feuille de lumière . . . 17
1.4.2 La microscopie non linéaire . . . 18
1.4.3 La microscopie confocale . . . 19
1.5 Conclusion . . . 21

2 La Microscopie par Cohérence Optique 23
2.1 Introduction . . . 23
2.2 La tomographie par cohérence optique (OCT) . . . 24
2.2.1 Principe . . . 24
2.2.2 Interférences à deux ondes en OCT. . . . 26
2.2.3 Implémentations . . . 28
2.2.3.1 Domaine temporel (TD-OCT) . . . 28
2.2.3.2 Domaine fréquentiel (FD-OCT) . . . 29
2.2.3.2.1 Domaine spectral (SD-OCT) . . . 30
2.2.3.2.2 Source balayée (SS-OCT) . . . 31
2.3 La microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM) . . . 33
2.3.1 Cadre théorique . . . 34
2.3.1.1 Interférences en FF-OCM . . . 34
2.3.1.2 Interférométrie à décalage de phase . . . 40
2.3.1.2.1 Imagerie tomographique . . . 40
2.3.1.2.2 Imagerie topographique . . . 45
2.3.2 Caractéristiques . . . 48
2.3.2.1 Résolution spatiale . . . 48
2.3.2.2 Sensibilité . . . 50

2.3.2.3 Résolution temporelle . . . 52
2.3.3 Limitations . . . 53
2.3.3.1 Dispersion . . . 53
2.3.3.2 Séparation des plans . . . 56
2.3.3.3 Fond incohérent . . . 56
2.3.3.4 Vitesse . . . 57
2.3.4 Montage : caractéristiques des composants . . . 58
2.3.4.1 Éclairage . . . 58
2.3.4.2 Caméra . . . 60
2.3.4.3 Optiques . . . 63
2.3.4.4 Mécanique . . . 64
2.4 Applications pour l'imagerie médicale . . . 65
2.4.1 Applications et industriels . . . 66
2.4.2 Concurrence . . . 67
2.5 Conclusion . . . 69

3 Développement d'un système FF-OCM compact à éclairage LED pour l'imagerie non invasive de la peau *in vivo* 71
3.1 Introduction : état de l'art en imagerie FF-OCM *in vivo* . . . 71
3.2 Montage de microscopie par cohérence optique simple et compact . . . 73
3.2.1 Méthode pour l'imagerie 3D . . . 74
3.2.2 Correction de la dispersion : optimisation pour l'imagerie de la peau 77
3.2.3 Conception mécanique . . . 78
3.2.4 Choix des composants . . . 81
3.2.5 Exemples d'images . . . 83
3.3 Microscopie par cohérence optique plein champ haute résolution à éclairage LED . . . 85
3.3.1 Les sources d'éclairage en FF-OCM . . . 89
3.3.1.1 Lampes halogènes . . . 89
3.3.1.2 Lampes à arc . . . 89
3.3.1.3 Sources fluorescentes . . . 90
3.3.1.4 LED . . . 90
3.3.2 Montage expérimental pour la comparaison halogène-LED . . . 91
3.3.2.1 Eclairage . . . 93
3.3.2.1.1 Lampe halogène . . . 93
3.3.2.1.2 LED . . . 94
3.3.2.2 Méthode de caractérisation . . . 95
3.3.2.2.1 Résolution axiale . . . 95
3.3.2.2.2 Résolution latérale . . . 96
3.3.2.2.3 Résolution temporelle . . . 97
3.3.2.2.4 Sensibilité . . . 97
3.3.2.3 Comparaison halogène-led . . . 97
3.3.2.3.1 Caractéristiques . . . 97
3.3.2.3.2 Images d'échantillons biologiques . . . 99
3.4 Améliorations du montage : vers l'imagerie de la peau *in vivo* . . . 103
3.4.1 Vitesse d'acquisition et artefacts en FF-OCM . . . 103
3.4.2 Solutions retenues pour l'imagerie à haute vitesse . . . 105

3.4.2.1 Éclairage . . . 105
3.4.2.2 Acquisition . . . 106
3.4.3 Amélioration de la sensibilité . . . 107
3.4.4 Schéma de démodulation et mécanique associée . . . 109
3.4.5 Montage et caractéristiques . . . 111
3.4.6 Exemples d'images . . . 113
3.5 Conclusion . . . 115

4 Nouvelles sources de contraste en microscopie par cohérence optique 117
4.1 Introduction . . . 117
4.2 Imagerie du flux sanguin . . . 119
4.2.1 Introduction . . . 119
4.2.2 Signal OCT d'un échantillon dynamique . . . 120
4.2.3 État de l'art des techniques d'imagerie du flux sanguin en OCT conventionnel . . . 123
4.2.3.1 Effet Doppler . . . 123
4.2.3.2 OCT-A en régime de décorrélation . . . 124
4.2.4 L'angiographie en FF-OCM . . . 126
4.2.4.1 Montage expérimental . . . 127
4.2.4.2 Signal interférométrique . . . 128
4.2.4.2.1 Dynamic FF-OCM-A . . . 128
4.2.4.2.2 Fourier-Domain FF-OCM-A . . . 130
4.2.4.3 Mesures de phase . . . 132
4.2.4.4 Mesures d'amplitude . . . 133
4.2.4.4.1 Speckle variance FF-OCM . . . 133
4.2.4.4.2 SV-FF-OCM : Caractérisation de la gamme de vitesses détectables . . . 135
4.2.4.4.3 Mesures quantitatives . . . 136
4.2.5 Conclusion . . . 139
4.3 Imagerie polarimétrique à contraste optimisé . . . 140
4.3.1 Introduction . . . 140
4.3.2 FF-OCM en lumière polarisée . . . 141
4.3.2.1 Théorie et formalisme de Jones . . . 141
4.3.2.2 FF-OCM polarimétrique (PS-FF-OCM) . . . 143
4.3.3 Optimisation du contraste pour un scénario « cible/fond » . . . 145
4.3.3.1 Principe . . . 145
4.3.3.2 Application au PS-FF-OCM . . . 147
4.3.4 PS-FF-OCM à contraste polarimétrique optimisé : Travail expérimental . . . 148
4.3.4.1 Montage expérimental . . . 148
4.3.4.1.1 Montage de FF-OCM à Stanford . . . 148
4.3.4.1.2 Adaptation du montage pour l'imagerie polarimétrique . . . 150
4.3.4.2 Imagerie à contraste optimisé . . . 153
4.3.5 Conclusion et pistes de développement . . . 156
4.4 Conclusion . . . 158

5 Microscopie par cohérence optique confocale à éclairage « ligne » 161
5.1 Introduction . . . 161
5.2 Principe . . . 162
5.3 Développement d'un montage de LC-OCM . . . 165
5.3.1 Montage expérimental . . . 165
5.3.1.1 Caractéristiques . . . 166
5.3.1.2 Exemples d'images et comparaison à la FF-OCM . . . 168
5.3.1.3 SV-LC-OCM . . . 169
5.4 Conclusion . . . 171

Conclusion générale 173

A Microscopie optique 177
A.1 Optique du microscope . . . 179
A.2 Objectifs, résolution et aberrations . . . 181
A.3 Éclairage . . . 189

B Interférences à deux ondes 195
B.1 Lumière monochromatique . . . 195
B.2 Lumière polychromatique . . . 196

C Exemples d'applications de l'OCT 201

D Logiciel développé pour le système de FF-OCM 205

Bibliographie 209

Liste de publications 223

Introduction générale

Dès la fin du XVI^{e} siècle, des scientifiques entreprennent de développer des instruments permettant de voir les astres au-delà des capacités de l'œil humain. Ainsi, en 1610, Galilée est déjà capable d'observer des astres quatre fois plus petit que la Terre, situés à plus de 600 millions de kilomètres de celle-ci. Cependant, il est en même temps impossible aux scientifiques d'observer ne serait-ce que quelques millimètres à l'intérieur de leur propre corps (situé pourtant bien plus près d'eux) sans avoir recours à la chirurgie, c'est-à-dire ouvrir le corps pour pouvoir l'observer de l'intérieur. Ce n'est que trois siècles plus tard, en 1895, que la première image d'une partie du corps située sous la surface de la peau est obtenue de manière *non-invasive*, au moyen de rayons X. C'est l'acte de naissance de l'imagerie médicale, discipline qui ne cessera de se développer au cours du XX^{e} siècle, avec le développement du premier système d'imagerie par scintigraphie en 1949 (imagerie de la radiation d'éléments radioactifs introduits dans le corps), du premier système moderne d'échographie en 1962 (imagerie par ultrasons) et du premier système d'IRM (imagerie par résonance magnétique nucléaire) en 1980.

Ces quatre méthodes (rayons X, scintigraphie, échographie, IRM) sont encore aujourd'hui généralement les seules utilisées quotidiennement dans les services d'imagerie des centres de soins, et spontanément associées à l'imagerie médicale. Alors que l'imagerie non-médicale se fonde quasi-exclusivement sur la lumière, ce n'est le cas d'aucune de ces méthodes, la surface du corps diffusant et absorbant la lumière de telle manière que les méthodes d'imagerie optique conventionnelles ne peuvent pas être utilisées pour l'imager en profondeur. L'imagerie optique est ainsi dans les hôpitaux généralement limitée à l'étude en microscopie d'échantillons prélevés. Cependant, depuis le début des années 1990, les progrès de l'optique ont permis de développer des méthodes d'imagerie médicale fondées sur la lumière, et ces techniques d'imagerie médicale optiques ne cessent de se développer.

Si la majeure partie de ces méthodes n'est cependant pas encore couramment utilisée sur des patients dans les hôpitaux, une méthode d'imagerie médicale optique a été adoptée de manière spectaculairement rapide par les praticiens : la tomographie par cohérence optique, ou OCT pour *optical coherence tomography* en anglais. En seulement quelques années suivant son invention en 1990, elle s'est imposée comme méthode de référence pour l'imagerie des couches de la rétine, si bien qu'aujourd'hui, de nombreux cabinets d'ophtalmologie sont pourvus d'un système OCT. Forte de ce succès, cette méthode n'a cessé de se développer techniquement et de se diversifier au-delà de l'ophtalmologie. C'est dans cette logique de développement de l'OCT que s'inscrit notre projet, qui s'intéresse à l'amélioration d'une implémentation technique associant OCT et microscopie, la microscopie par cohérence optique plein champ, avec pour objectif de développer son utilisation dans le domaine de la dermatologie.

Ce manuscrit décrit les travaux réalisés dans le cadre de ce projet au cours de ma thèse, effectuée au Laboratoire Charles Fabry d'Octobre 2014 à Novembre 2017. Il s'articule en cinq chapitres. Un premier chapitre présente la microscopie optique pour l'imagerie des tissus, en proposant un cadre théorique à l'interaction tissu-lumière, puis en présentant l'utilisation de la microscopie dans le domaine médical et en introduisant quelques développements techniques du microscope permettant d'imager les tissus en profondeur.

Le second chapitre présente la microscopie par cohérence optique, en introduisant tout d'abord le principe de l'OCT et ses implémentations, avant de présenter plus précisément l'implémentation associant OCT et microscopie, et en particulier la microscopie par cohérence optique plein champ. Une étude théorique de cette méthode est menée, ainsi qu'un examen des caractéristiques fondamentales des éléments d'un système de microscopie par cohérence optique plein champ. Les applications de la microscopie par cohérence optique sont finalement présentées, notamment dans le domaine de la dermatologie.

Le troisième chapitre présente le dispositif de microscopie par cohérence optique plein champ conçu et réalisé dans le but de proposer un outil simple et compact permettant l'imagerie de la peau *in vivo*, en utilisant un éclairage par diode électroluminescente (LED). Le dispositif est présenté techniquement, le choix de l'utilisation de LED et les performances associées sont détaillés, et la problématique de l'imagerie de la peau *in vivo* est présentée, ainsi que les solutions apportées pour la rendre possible.

Le quatrième chapitre s'intéresse à l'introduction de nouvelles sources de contraste particulièrement intéressantes en dermatologie à la microscopie par cohérence optique plein champ. Une première partie présente l'implémentation de méthodes d'imagerie du flux sanguin, après avoir présenté la théorie de ces méthodes et un état de l'art sur l'imagerie du flux sanguin en OCT. Une seconde partie présente le principe et les applications de la microscopie par cohérence optique en lumière polarisée, et introduit une méthode permettant d'optimiser le contraste polarimétrique entre deux zones. Un nouveau montage en lumière polarisée est introduit et les résultats de la méthode d'optimisation du contraste obtenus sur celui-ci sont présentés.

Le dernier chapitre présente une nouvelle implémentation de microscopie par cohérence optique, la microscopie par cohérence optique confocale à éclairage « ligne ». Inspirée de la microscopie par cohérence optique plein champ elle vise à apporter des solutions aux limitations de cette méthode. Ce chapitre revient sur la conception et la réalisation technique d'un dispositif pour cette méthode, après en avoir présenté les principes et les avantages par rapport à la microscopie par cohérence optique plein champ.

Chapitre 1

La microscopie optique pour l'imagerie des tissus biologiques

1.1 Introduction

Dès l'Antiquité, des cristaux sont volontairement polis par l'homme, avec pour but probable de servir d'éléments optiques grossissants. Les historiens conviennent que la « lentille » la plus ancienne retrouvée à ce jour, la lentille de Nimrud (un disque de cristal de roche grossièrement poli datant probablement du VIII^{e} siècle av. J.-C., retrouvé en Assyrie, dans le nord de l'actuel Irak), servait probablement de loupe rudimentaire [1]. Ainsi, l'utilisation première de l'instrumentation optique a été de permettre à l'homme de voir des éléments trop petits pour être visibles par l'œil. La microscopie, du Grec micro- (μικρός , petit), et -scope (σκοπέω , observer), constitue donc la branche de l'optique dont l'objectif est identique à celui qui a mené à la naissance même de l'instrumentation optique !

L'un des premiers instruments a avoir été désigné comme un « microscope », développé par Antoni van Leeuwenhoek dans les années 1660, ne comportait d'ailleurs qu'une unique lentille, et était donc fondamentalement un système identique aux lentilles grossissantes de l'Antiquité, la différence essentielle avec celles-ci résidant dans la qualité du matériau et du polissage de Leeuwenhoek (que ses contemporains eux mêmes auront du mal à égaler). Ce microscope fut très rapidement utilisé pour l'observation des milieux biologiques, et suite aux découvertes retentissantes qui furent faites par Leeuwenhoek (protozoaires, spermatozoïdes, cellules sanguines[1]...) [2], c'est quasi-uniquement pour cette application que furent utilisées les microscopes par la suite, scellant le lien entre microscopie et imagerie du vivant.

Il est à noter que le microscope de Leuweenhoek, s'il fut le plus réputé, n'est pas analogue aux microscopes modernes, constitués de plus d'une lentille. La paternité du microscope à plusieurs lentilles n'est pas clairement établie, mais la qualité du microscope à trois lentilles développé par Robert Hooke, dont les résultats furent présentés dans l'ouvrage *Micrographia* en 1665 [3], en fait probablement le premier microscope composé utilisé en tant que véritable outil scientifique. Cependant, la faible qualité des optiques de l'époque fit que la qualité d'imagerie du microscope composé était généralement moins bonne que celle du « microscope » à lentille simple, et ce dernier continua d'être le plus répandu parmi

1. Leeuwenhoek ira jusqu'à imager des capillaires sanguins au travers de tissus biologiques relativement transparents (têtard, aile de chauve souris...), probablement le premier exemple d'imagerie non-invasive en profondeur dans les tissus biologiques !

FIGURE 1.1 – Réplique du microscope de Leeuwenhoek.

les scientifiques. Il fallut attendre les travaux de Joseph Jackson Lister sur la correction des aberrations des lentilles de microscope (1830) [4] ainsi que ceux de Carl Zeiss, Otto Schott et Ernst Abbe, qui travaillèrent conjointement à la fin du XIX^{e} siècle à comprendre, améliorer, et construire des microscopes, pour finalement aboutir à la version du microscope que l'on connait aujourd'hui.

Les travaux présentés dans ce manuscrit se fondant en grande partie sur un développement technique de la microscopie (la microscopie interferométrique à faible longueur de cohérence), ce chapitre propose une présentation générale de la microscopie moderne, en abordant les applications de la microscopie dans le domaine du diagnostic médical (prolongement logique de l'orientation de la microscopie vers l'imagerie des milieux biologiques présentées au cours de cette introduction, et qui constitue la motivation de nos travaux), ainsi que les techniques d'imagerie médicale fondées sur la microscopie optique. Mais avant toute chose, pour observer un échantillon au microscope, il faut l'éclairer. La première partie de ce chapitre aborde l'interaction entre les milieux biologiques et la lumière.

1.2 Interaction tissu-lumière

Que cherche-t-on à « imager » lorsqu'on place un échantillon sous un microscope ? A priori, une information (localisée spatialement) extraite de la lumière ayant interagi avec l'échantillon et de ce fait contenant une information concernant les propriétés de l'échantillon à cet endroit de l'espace. Cette observation soulève plusieurs interrogations : Quelle information est extraite de la lumière ? Comment la lumière interagit-elle avec l'échantillon ? Quelle sont les propriétés de l'échantillon qui peuvent être « contenues » dans la lumière ?

Afin de répondre à ces questions, nous allons tout d'abord revenir sur la nature de la lumière, puis nous intéresser à l'interaction de la lumière avec une particule unique, avant de généraliser à un grand nombre de particules, constituant un milieu biologique. Nous nous intéresserons en particulier aux phénomènes de diffusion, d'absorption et de diffraction, en considérant tout d'abord un échantillon très fin puis un échantillon épais.

1.2.1 Interaction entre la lumière et une particule unique

La lumière peut être modélisée par une onde électromagnétique, autrement dit une oscillation couplée du champ électrique et du champ magnétique. On représente généralement une onde lumineuse uniquement par son champ électrique, oscillant dans le temps et dans la direction de propagation de l'onde. Une onde plane (se propageant dans une unique direction) et monochromatique (ayant une unique longueur d'onde) peut ainsi être représentée de la manière suivante :

$$\vec{E}(\vec{r},t) = \Re[\vec{E_0}\, e^{(\mathrm{i}\vec{k}\,\vec{r}-\mathrm{i}\omega t)}], \tag{1.1}$$

avec $\vec{r}$ la variable d'espace, t la variable temporelle, $\vec{k}$ le vecteur d'onde, de norme $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ et ayant la direction de propagation de l'onde, et $\omega = \frac{2\pi c}{\lambda}$, où c correspond à la vitesse de la lumière dans le vide, et λ la longueur d'onde dans le milieu dans lequel l'onde se propage.

Lorsque le rôle de la polarisation peut être négligé, il est inutile de considérer que le champ E est vectoriel, et on peut considérer que les ondes sont scalaires. Par ailleurs, on peut omettre la dépendance temporelle en $e^{-\mathrm{i}\omega t}$, et considérer l'amplitude complexe de l'onde. Ainsi, l'onde lumineuse (plane et monochromatique) sera représentée par :

$$E(\vec{r}) = E_0\, e^{\mathrm{i}\vec{k}\,\vec{r}}. \tag{1.2}$$

Notons que, pour une onde quelconque E, lorsqu'on place un capteur photosensible en un point $\vec{r_0}$, on mesure une grandeur proportionnelle à l'intensité de l'onde en ce point, c'est à dire au module carré de son champ, $I(\vec{r_0}) = \left|E(\vec{r_0})\right|^2$. C'est donc toujours cette information qui est récupérée lorsqu'on utilise l'œil ou une caméra standard, et c'est donc l'intensité qui doit contenir des informations sur l'échantillon pour pouvoir l'imager.

Lorsqu'on illumine une particule par une onde plane monochromatique comme définie plus haut, une partie de la puissance de cette onde va être cédée à la particule, qui va alors soit l'absorber (absorption de l'onde incidente), soit rayonner un champ secondaire (diffusion de l'onde incidente). Pour n'importe quelle particule, l'amplitude complexe du champ diffusé en champ lointain peut être mise sous la forme :

$$E_s(\vec{u},r) = S(\vec{u})\frac{e^{\mathrm{i}k_0 r}}{r}E_0, \tag{1.3}$$

avec r la distance du champ à la particule à la position considérée, et $\vec{u}$ la direction considérée. Cette onde diffusée est (en champ lointain) une onde sphérique, dont l'amplitude dépend de la direction $\vec{u}$ selon la grandeur $S(\vec{u})$, appelée amplitude de diffusion. La figure 1.2 illustre l'illumination d'une particule par une onde plane.

Afin de quantifier la puissance cédée par l'onde incidente à la particule, on définit la section efficace d'extinction, σ_{ext} telle que le produit $\sigma_{ext} I_{inc}$, avec I_{inc} la puissance par unité de surface de l'onde incidente, soit égale à la puissance totale absorbée et diffusée dans tout l'espace par la particule. De la même manière, on peut définir les section efficaces d'absorption σ_a et de diffusion σ_s (et on aura logiquement $\sigma_{ext} = \sigma_a + \sigma_s$).

Après interaction avec la particule, il y a donc deux champs superposés : le champ E, se propageant toujours dans la même direction, mais atténué d'une certaine quantité représentée par σ_a, et le champ diffusée E_s. Celui-ci se propage dans tout l'espace mais avec une amplitude dépendant de la direction $\vec{u}$ selon une fonction de phase $p(\vec{u},\vec{u_i})$, donnant la

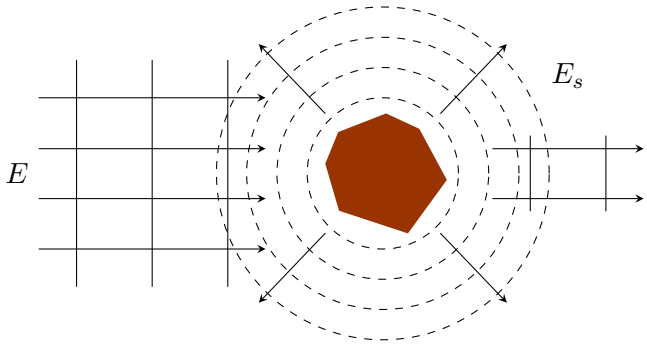

FIGURE 1.2 – Schéma de l'illumination d'une particule par une onde plane. Trait plein : onde plane incidente (champ E) avant et après interaction avec la particule (perte de puissance par diffusion et absorption après interaction). Pointillé : onde diffusée (champ E_s).

fraction de la puissance de l'onde incidente (dans la direction $\vec{u_i}$) diffusée dans la direction $\vec{u}$ (liée à la dépendance angulaire de $S(\vec{u})$), et dont la puissance est représentée par σ_s. Ce sont donc ces trois quantités σ_a, σ_s et $p(\vec{u}, \vec{u_i})$, qui sont propres à la particules et qui constituent l'information « contenue » dans la lumière après interaction avec la particule, et dont l'influence sur l'intensité I mesurée sur un capteur récupérant cette lumière après interaction pourra différencier cette particule d'une autre dans une image.

Gustav Mie a développé en 1908 [5] une théorie rigoureuse de la diffusion électromagnétique par une particule sphérique, permettant de déterminer le champ diffusé (et donc σ_a, σ_s et $p(\vec{u}, \vec{u_i})$) en fonction de paramètres physiques et quantifiables : le rayon de la particule R, son indice optique n_p, l'indice optique du milieu l'environnant n_m, et la longueur d'onde λ de la lumière incidente. Les sections efficaces d'absorption et de diffusion dépendent en particulier de deux paramètres :

— un paramètre de taille : $x = \frac{2\pi n_m R}{\lambda}$,
— le rapport des indices de réfraction : $m = \frac{n_p}{n_m}$,

La figure 1.3 représente par exemple l'efficacité d'extinction (la section efficace d'extinction normalisée par la section de la particule πR^2) en fonction du paramètre de taille.

La théorie de Mie distingue trois principaux régimes de diffusion :

— La diffusion de Rayleigh [2], correspondant au cas $R \ll \lambda$. Dans ce régime, les particules diffusent la lumière de manière isotrope (sans direction privilégiée), et la puissance de l'onde diffusée est proportionnelle à $\frac{1}{\lambda^4}$.
— La diffusion de Mie, correspondant au cas $R \simeq \lambda$. Dans ce régime, le champ est diffusé préférentiellement vers l'avant (dans le même sens que l'onde incidente).
— La diffusion géométrique, correspondant au cas $R \gg \lambda$. Dans ce régime, la particule peut être considérée comme une lentille boule d'indice n_p, et les lois de l'optique géométrique s'appliquent aux rayons lumineux éclairant la particule (en particulier la réfraction et la réflexion).

La figure 1.4 représente la façon dont la lumière est typiquement diffusée dans les trois régimes, en représentant les fonctions de phase de trois particules d'indice $n_p = 1.5$, ayant

2. Nommée ainsi d'après Lord Rayleigh, qui en fit la découverte en 1871, avant que Mie ne développe sa théorie plus générale l'incluant comme un cas particulier.

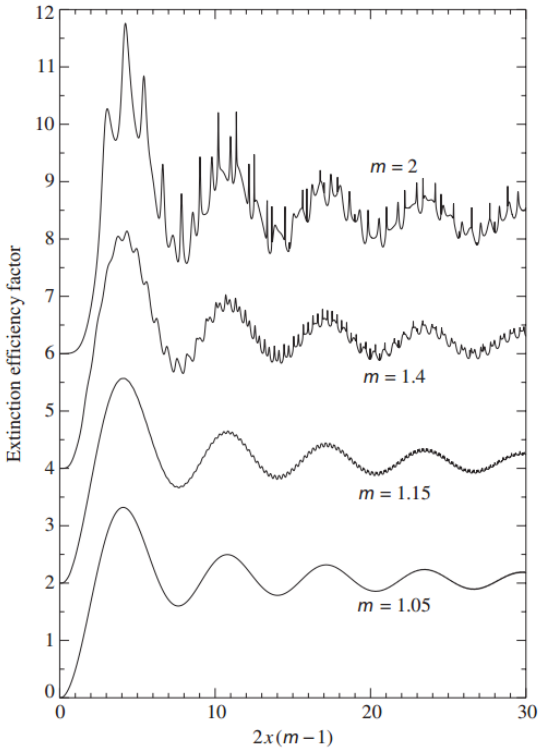

FIGURE 1.3 – Efficacité d'extinction d'une particule caractérisée par x et m selon la théorie de Mie. L'échelle verticale s'applique à la courbe m = 1.05, les autres courbes sont successivement décalées de deux unités vers le haut [6].

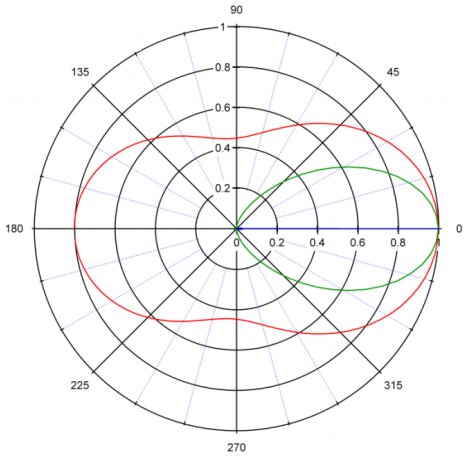

FIGURE 1.4 – Fonctions de phase typique pour les trois régimes de diffusion : diffusion de Rayleigh (rouge), diffusion de Mie (vert) et diffusion géométrique (bleu) [7].

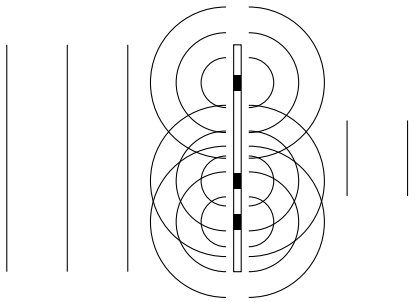

FIGURE 1.5 – Schéma de la réponse d'un échantillon mince constitué de multiples particules à une onde plane monochromatique.

des rayons $R = 0.05\,\mu m, 0.25\,\mu m$ *et* $5\,\mu m$, immergées dans de l'eau ($n_m = 1.33$), éclairée dans la direction $\vec{u_i} = (0,0)$ à la longueur d'onde $\lambda = 800\,nm$.

1.2.2 Interaction entre la lumière et un ensemble de particules

Cas d'un échantillon mince.

Considérons tout d'abord un échantillon mince (que l'on peut considérer comme un plan (x,y)) composé d'un grand nombre de particules diffusantes, de rayons et d'indices différents, situées à des positions (x,y) différentes. Lorsqu'on éclaire cet échantillon par une onde plane monochromatique, chaque particule absorbe et diffuse une partie de la lumière. En « sortie » de l'échantillon, on observe donc la superposition de l'onde plane initiale dont l'amplitude est modulée spatialement en fonction des particules rencontrées et de leur section efficace d'absorption, et de la superposition d'une multitude d'ondes sphériques diffusées (selon l'équation 1.3), avec pour chaque particule une fonction de phase et une section efficace de diffusion différente. La figure 1.5 représente schématiquement la situation. Il est à noter que cette situation est la situation la plus courante en microscopie conventionnelle, où les objets à imager (en particulier les tissus) sont généralement amincis pour constituer des échantillons les moins épais possible.

Dans cette situation, la superposition des différentes ondes résulte en un phénomène d'interférences. Ceci correspond à une situation de diffraction de l'onde plane incidente par les particules contenues dans l'échantillon : l'amplitude de l'onde résultant de la superposition de toutes les ondes diffusées (et de la partie de l'onde plane incidente conservée après passage dans l'échantillon) varie en fonction de la direction selon la répartition des particules dans l'échantillon (dans certaines directions, la lumière interfère de manière constructive, et dans d'autres, de manière destructive).

Sans entrer dans les détails de la diffraction, donnons juste une idée du lien entre la répartition des particules et les directions dans laquelle la lumière est diffractée (interfère constructivement). Considérons la répartition spatiale $O(x,y)$ de l'amplitude lumineuse *juste après* passage dans l'échantillon. Comme tout objet, il est possible de la décomposer en série de Fourier :

$$O(x,y) = \iint_{\Re^2} \omega(u,v) e^{2i\pi(ux+vy)}\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v. \tag{1.4}$$

N'importe quel échantillon mince peut ainsi être considéré comme ayant optiquement l'effet d'une somme d'une infinité de mires sinusoïdales, dans toutes les directions possibles et

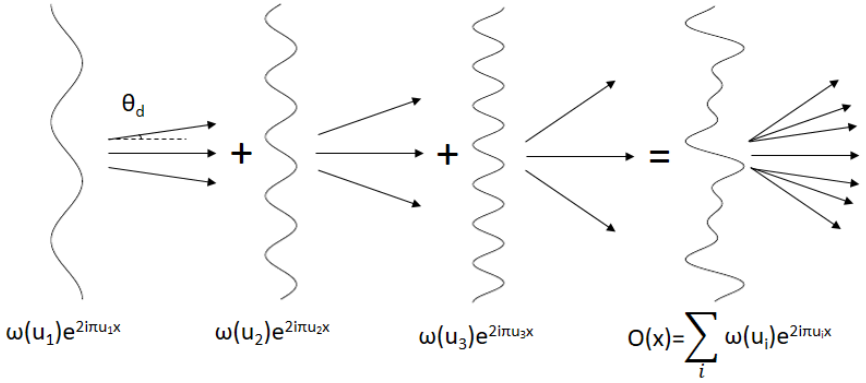

FIGURE 1.6 – Diffraction de l'onde incidente par un échantillon vu comme la somme de mires sinusoïdales.

ayant toutes les fréquences possibles [8]. Or un résultat connu de la diffraction est qu'une mire sinusoïdale diffracte la lumière uniquement dans deux directions, symétrique autour de la direction transmise, et dont l'angle est d'autant plus grand que la fréquence de la mire est élevée [3]. L'angle de diffraction θ_d est donné par la formule des réseaux (diffraction uniquement dans les ordres ± 1 dans le cas de mires sinusoïdales) :

$$n_d \sin(\theta_d) = n_i \sin(\theta_i) \pm \lambda f_s \tag{1.5}$$

$$\theta_d = \pm \arcsin\left(\frac{\lambda f_s}{n_2}\right), \tag{1.6}$$

avec θ_i la direction de l'onde incidente (ici $\theta_i = 0$), n_i l'indice du milieu dans lequel se propage l'onde incidente ($n_i = 1$ si l'on considère une propagation dans l'air), n_d l'indice du milieu dans lequel se propage l'onde diffractée (à priori, l'indice de l'échantillon) et f_s la fréquence de la mire sinusoïdale, correspondant à une fréquence spatiale de l'échantillon. Le résultat de la diffraction par l'échantillon est ainsi lié aux fréquences spatiales qu'il contient (des particules très proches l'une de l'autre correspondent à une fréquence spatiale élevée), et à la superposition des ondes diffractées pour chaque fréquence spatiale, comme présentée à la figure 1.6.

Un résultat remarquable de cette analyse est que la direction de la lumière après passage par l'échantillon est liée à la finesse des structures de l'échantillon : plus elles sont fines, plus la lumière qu'elles ont diffusé sera conservé uniquement pour des angles élevés par rapport à la direction de l'onde incidente. On parle ainsi du *spectre angulaire* de la lumière diffractée, chaque angle correspondant à une fréquence spatiale contenue dans l'échantillon.

Cas d'un échantillon épais.

Un échantillon épais peut être vu comme une superposition d'échantillons minces, formant finalement un échantillon en trois dimensions. Pour chaque couche de l'échantillon épais, les résultats présentés précédemment restent valables (l'onde plane éclairant

3. Ce résultat prend en compte que chaque point de la mire donne naissance à une onde parfaitement sphérique, ce qui correspondrait à des particules en régime de diffusion proche de celui de Rayleigh. Cependant le résultat reste valable dans le cas de régimes de diffusion différents si l'échantillon est composé d'un grand nombre de particules. Les différences de régimes se traduiront juste par une modification de la grandeur $\omega(u, v)$ par rapport au cas précédent.

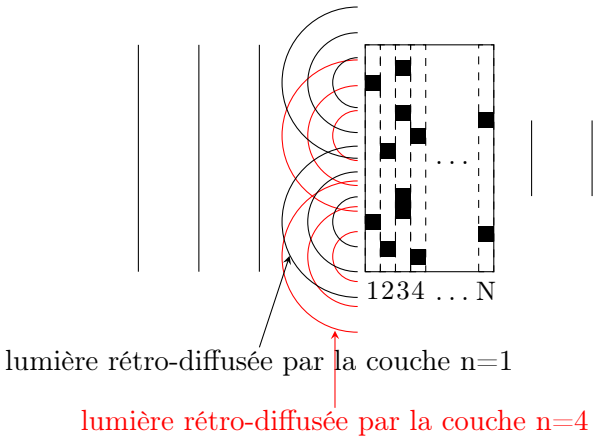

FIGURE 1.7 – Schéma de la réponse d'un échantillon épais constitué de N couches (n=1. . .N) à une onde plane monochromatique.

la couche voyant cependant sa puissance réduite en fonction de la puissance qu'elle a cédée au cours de la traversée jusqu'à cette couche). Cependant, chaque couche n est éclairée non seulement par l'onde plane incidente, mais aussi par toutes les ondes diffusées par les couches inférieures (1 à $n-1$, voir figure 1.7), qui créent à nouveau un phénomène de diffusion en éclairant les particules de la couche n. Finalement, nous sommes confrontés à un phénomène de diffusion multiple (exponentielle à mesure que la lumière pénètre dans l'échantillon) extrêmement difficile à mettre en équation.

Afin de caractériser ce phénomène de diffusion multiple, il est plus aisé d'adopter une représentation corpusculaire (photons) de la lumière pour s'intéresser à son interaction avec les particules. On peut alors distinguer trois catégories de photons en sortie de l'échantillon :

— les photons balistiques : ce sont ceux correspondant à des photons non diffusés ou diffusés une seule fois. Il s'agit de l'ensemble des photons considérés lorsque nous nous intéressions à un échantillon mince. Comme expliqué précédemment, ces photons contiennent une information quant aux propriétés de la particule qui les a diffusés, mais aussi quant à sa position. Ce sont ces photons là qu'il faut récupérer pour imager pertinemment un échantillon.
— les photons serpentiles : il s'agit des photons diffusés plus d'une fois, mais dont la trajectoire s'éloigne peu de la trajectoire qu'ils auraient eue s'ils avaient été balistiques.
— les photons multi-diffusés : ces photons sont ceux ayant été diffusés par de nombreuses particules, si bien que leur direction est aléatoire et qu'ils ont, en sortant de l'échantillon, parcouru une distance beaucoup plus longue qu'un photon balistique sortant de l'échantillon dans la même direction.

Afin de caractériser la diffusion multiple d'un point de vue macroscopique, on peut définir une grandeur statistique, le libre parcours moyen de diffusion, noté l_s, correspondant à la distance moyenne entre deux évènements de diffusion successifs. On peut alors montrer que l'intensité I_{bal} de l'ensemble des photons balistiques à une profondeur z dans

l'échantillon vaut [4]

$$I_{bal}(z) = I_0 e^{-\frac{z}{l_s}} \tag{1.7}$$

avec I_0 l'intensité lumineuse incidente sur l'échantillon.

On peut alors distinguer deux régimes principaux, liés à l'épaisseur L de l'échantillon :

— Régime de diffusion simple : $L \leq l_s$. Dans ce régime, la majeure partie des photons subit uniquement un à deux évènements de diffusion, la majorité des photons seront balistiques ou serpentiles, et l'échantillon pourra être pertinemment imagé en profondeur.

— Régime de diffusion multiple : $L \gg l_s$. Dans ce régime, tous les photons sont multi-diffusés. L'échantillon ne peut être imagé optiquement (en tout cas de manière conventionnelle).

Dans les tissus biologique, on a typiquement $l_s \simeq 100\,\mu m$ pour un éclairage dans le visible ou proche infrarouge. Au-delà de cette profondeur, il est alors difficile d'imager optiquement les tissus.

Notons que l'on peut définir de la même manière un libre parcours moyen d'absorption, l_a, correspondant à la distance parcourue en moyenne par un photon avant d'être absorbé. La décroissance de l'intensité des photons balistiques est alors caractérisée par l'équation suivante (en négligeant cette fois les pertes par diffusion) :

$$I_{bal}(z) = I_0 e^{-\frac{z}{l_a}}. \tag{1.8}$$

Cette équation est connue comme la loi d'atténuation de Beer-Lambert. Dans le contexte de l'imagerie des tissus biologiques, il existe une plage de longueurs d'onde, appelée fenêtre thérapeutique, pour laquelle le libre parcours moyen d'absorption vaut quelques millimètres en considérant les constituants généralement présents dans les tissus, en particulier l'eau (constituant le composant majeur des tissus biologiques), la mélanine (pigment présents dans la peau), les protéines, l'hémoglobine (protéine présente dans le sang) et l'oxyhémoglobine (oxygène fixé à l'hémoglobine). Cette plage de longueurs d'onde s'étend de $\sim 600\,nm$ à $\sim 1300\,nm$ (voir figure 1.8). En utilisant une longueur d'onde d'illumination dans cette gamme spectrale, l'absorption ne sera donc pas limitante par rapport à la diffusion, qui elle restreint la possibilité d'imager optiquement en profondeur les tissus biologiques à une centaine de microns.

Notons que les échantillons biologiques vivants non préparés ont en général de grandes épaisseur (souvent macroscopiques), de sorte que toute la lumière est absorbée en « sortie » de l'échantillon. Dans ce cas la lumière qui pourra être exploitée pour l'imagerie sera la lumière *rétrodiffusée* (voir figure 1.7), qui peut contenir des informations pertinentes jusqu'à une profondeur l_s pour des méthodes d'imagerie exploitant les photons ballistiques et l_a pour des méthodes d'imagerie exploitant des photons multi-diffusés. Définissons alors la grandeur $R_{rd}(x, y, z)$, donnant la proportion de l'intensité lumineuse incidente rétrodiffusée au point (x, y, z) dans l'échantillon. Comme expliqué précédemment, cette grandeur dépend de la taille de la particule, de son indice et de l'indice qui l'entoure au point (x, y, z). Afin d'imager l'échantillon tridimensionnel, une méthode sera donc de reconstituer $R_{rd}(x, y, z)$.

Dans le cadre de l'imagerie de la peau humaine basée sur les photons ballistiques, la lumière rétrodiffusée peut contenir des informations pertinentes jusqu'à des profondeurs

4. On néglige la perte d'intensité par absorption dans cette formule.

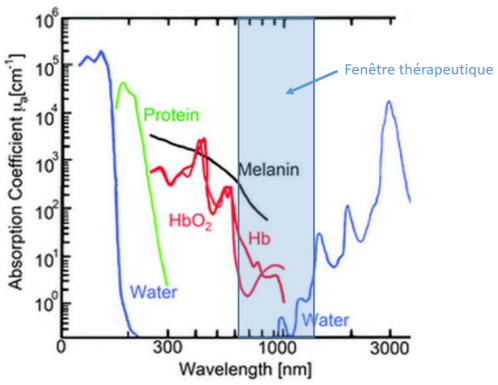

FIGURE 1.8 – Spectres d'absorption des principaux composants des tissus biologiques : eau, mélanine, protéine, hémoglobine (Hb),oxyhémoglobine (HbO_2). La grandeur donnée en fonction de la longueur d'onde correspond au coefficient d'absorption $\mu_a = \frac{1}{l_a}$ [9].

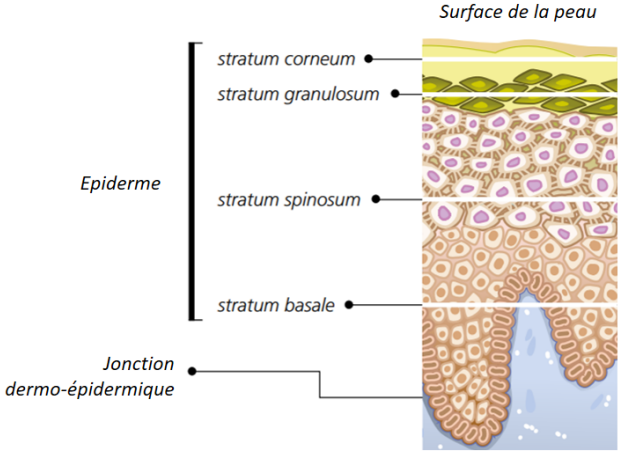

FIGURE 1.9 – Structure de l'épiderme dans la peau humaine. Modifié de http ://www.vivascope.de.

entre $\sim$ 100 μm et $\sim$ 1 mm selon la méthode d'imagerie utilisée. Il convient de rappeler ici que la peau humaine est constituée de trois couches : l'épiderme (couche superficielle), le derme (couche intermédiaire) et l'hypoderme (couche profonde). La profondeur de pénétration des méthodes d'imagerie optique permet uniquement d'imager l'épiderme, et dans certains cas une partie du derme (l'épaisseur de l'épiderme dépendant de nombreux facteurs [10]). L'épiderme est lui même constitué de différentes couches : la couche cornée (*stratum corneum*), la couche granuleuse (*stratum granulosum*), la couche épineuse (*stratum spinosum*) et la couche basale (*stratum basale*). Entre l'épiderme et le derme se trouve la jonction dermo-épidermique. Ce sont ainsi généralement ces différentes couches qui pourront être imagées pertinemment par des méthodes d'imagerie optique. La figure 1.9 présente un schéma de la structure de ces différentes couches dans la peau.

1.3 La microscopie pour le diagnostic médical

1.3.1 Pratiques

Dès les débuts de la microscopie dans le courant du XVII^{e} siècle, des médecins se sont intéressés à son utilisation dans le diagnostic de maladies par l'observation de structures microscopiques et en tant qu'outil d'assistance à la chirurgie. Citons les publications de Borellus (1653) [11], et surtout de Malpighi (1666) [12]. Cependant, cet intérêt était marginal en comparaison de celui que la microscopie suscita dans le domaine de la botanique ou de la zoologie. Les grands représentants de l'*anatomie pathologique* (la discipline de la médecine s'intéressant à l'observation des modifications morphologiques causées par les maladies, aussi appelée anatomo-pathologie [5]) des XVII^{e} et XVIII^{e} siècle considéraient en effet le microscope comme un outil superflu, possiblement en raison du fait que de nombreux microscopes étaient alors conçus par des amateurs (à l'exemple de Leeuwenhoek) [6]. Ce ne sera qu'à partir des travaux de Marie François Xavier Bichat (1800) [13] que le microscope sera progressivement accepté dans le milieu médical, et deviendra finalement un outil incontournable suite aux travaux de Rudolf Virchow dans le courant du XIX^{e} siècle, mettant en évidence l'importance de l'étude des effets des maladies à l'échelle microscopique. La branche de l'anatomo-pathologie s'intéressant spécialement à des observations faites au microscope s'appelle l'*histopathologie*, le terme d'*histologie* faisant référence à l'anatomie microscopique, soit l'étude des tissus à l'échelle microscopique.

Afin d'observer les tissus sous un microscope, plusieurs étapes sont nécessaires. Il faut tout d'abord prélever le tissu. La méthode de prélèvement la plus courante est la *biopsie*, consistant à prélever un morceau de tissu à un endroit précis. Le prélèvement peut se faire de différentes manières, mais est en général un acte relativement anodin pour les praticiens, sauf pour certains prélèvements dans des zones difficiles d'accès. Pour le patient cependant, la biopsie peut être douloureuse, et laisser des cicatrices incommodantes. La biopsie doit ensuite être traitée de manière à pouvoir être conservée au cours du temps dans des conditions les plus proches de l'état *in vivo* (l'observation n'étant généralement pas effectuée au moment du prélèvement). Le traitement de conservation habituel consiste à déshydrater le tissu puis le plonger dans un conservateur qui va remplacer l'eau précédemment présente et fixer le tissu. Le tissu est ensuite inclu dans un bloc de paraffine. Le bloc de paraffine contenant le tissu est ensuite coupé en très fines tranches (habituellement de 2 à 25 μm) à l'aide d'un microtome. Ces tranches (correspondant à des échantillons minces tels que décrits à la section 1.2.2) sont placées sur des lames de verre et peuvent ensuite être observées à l'aide d'un microscope conventionnel. Ces tranches sont couramment appelées « coupes histologiques », car l'étude histologique se fait à partir de celles-ci. Des colorants se fixant à certains composants cellulaires sont ensuite appliqués sur ces échantillons avant observation afin de mieux distinguer leurs structures, et d'en optimiser le contraste.

Ce processus est relativement long et complexe, et un patient nécessitant un diagnostic histopathologique reçoit généralement les résultats de son analyse après une quinzaine de jours. Ce délai peut être particulièrement anxiogène, notamment car les examens histologiques sont le plus souvent requis dans le cas de suspicion de cancer.

Nous nous intéresserons au cours de nos travaux plus spécifiquement au diagnostic histopathologique du cancer de la peau, un des types de cancer les plus courants. Un cancer

5. Aujourd'hui souvent abrégé en « anapath » chez les professionnels de la santé.

6. Le premier atlas d'anatomie pathologique, publié en 1799, ne comprend aucune illustration d'après une observation au microscope.

détecté sur trois est un cancer de la peau, et il ne cesse de se développer : on dénombre trois millions de nouveau cas par an uniquement aux Etats-Unis, et selon l'Organisation mondiale de la Santé, on prévoit que deux tiers des Australiens seront diagnostiqués d'un cancer de la peau avant leurs 70 ans.

On distinguera deux grands types de tumeurs :

1. les carcinomes. Généralement assez grands (de 1 à quelques centimètres), ils constituent le cancer de la peau le plus commun ($\sim 95\%$ des cas). Ces tumeurs se manifestent de façon très visible à la surface de la peau, et apparaissent généralement au niveau du visage et du cou, résultant en une identification rapide. Cependant, même si l'identification est plus tardive, le pronostic vital n'est qu'exceptionnellement engagé, dans des cas très particuliers. En général, le carcinome est rapidement extrait (parfois même sans passer par un diagnostic histopathologique), et le risque de récidive est assez faible. Par ailleurs, le risque de métastase (migration de la tumeur vers un tissu sain distant) est exceptionnel. Le carcinome ne représente ainsi qu'environ 5% des décès liés au cancer de la peau.
2. les mélanomes. Ils constituent la plus dangereuse forme de cancer de la peau ($\sim 95\%$ des décès liés au cancer de la peau sont dus à un mélanome), mais aussi la plus rare ($\sim$ 5% des cas). Ils sont souvent indiscernables d'un grain de beauté bénin au niveau de la surface de la peau, mais peuvent avoir des très larges ramifications en profondeur dans la peau, et peuvent ainsi se développer sans être détectés : un mélanome sur trois n'est ainsi pas détecté à un stade précoce. A un stade avancé, les mélanomes entrainent des métastases et il est très difficile, voire impossible, de les guérir. La figure 1.10 représente ainsi le taux de survie à 5 ans en fonction du stade auquel le mélanome est détecté. En parallèle est représenté le coût moyen annuel de traitement d'un patient en fonction du stade du mélanome duquel il est atteint. L'importance du diagnostic précoce du mélanome est ainsi mise en évidence, mais la difficulté de détection de ce type de cancer, due en partie au fait qu'il est impossible d'effectuer des biopsies systématiques des grains de beauté, rend la tâche complexe.

Ajoutons qu'en plus du diagnostic, une partie du travail des anatomo-pathologistes consiste, suite à l'ablation d'une tumeur, à vérifier si celle-ci a bien été totalement extraite, à partir de coupes histologiques de la tumeur. L'anatomo-pathologiste doit alors savoir déterminer les limites de la tumeur, appelées *limites d'exérèse*.

1.3.2 Besoins

Le diagnostic de certitude d'une tumeur ne peut reposer que sur l'examen histologique suite à une biopsie, et le choix d'effectuer une biopsie repose entièrement sur l'analyse visuelle de la surface de la peau (parfois effectuée à l'aide d'une loupe, et très rarement d'un microscope, l'un ou l'autre étant appelé dans ce contexte *dermatoscope*) et l'expérience du praticien (le *dermatologue*, médecin spécialiste de la peau). Ainsi, 60% des anomalies présentant une suspicion de cancer de la peau qui sont biopsiées se révèlent être bénignes.

Actuellement, les dermatologues expriment le besoin d'un outil d'aide au diagnostic qui permettrait de diminuer le nombre de biopsies inutiles tout en permettant un diagnostic plus précoce des tumeurs, en fournissant un premier diagnostic plus fiable que le simple diagnostic visuel, se basant sur des images se rapprochant au plus des coupes histologiques. Les travaux effectués durant cette thèse ont pour but de participer au développement d'un tel outil. Celui-ci doit vérifier plusieurs conditions :

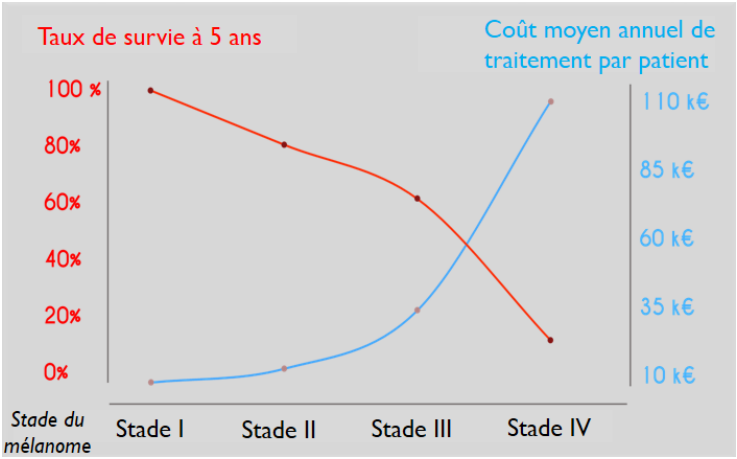

FIGURE 1.10 – Taux de survie à 5 ans et coût moyen annuel de traitement d'un patient atteint d'un mélanome, en fonction du stade du mélanome. Modifié de Technavio.com.

— **Pouvoir être utilisé sur les patients *in vivo*.** En effet l'objectif de cet outil est d'éviter à avoir à extraire le tissu pour l'analyser.
— **Fournir des images en temps réel.** Un outil dont les temps d'acquisition sont trop longs n'est concrètement généralement pas utilisé, car le processus devient trop contraignant si de nombreuses analyses doivent être menées.
— **Être non invasif.** L'objectif étant d'éviter les biopsies, on souhaite éviter toute incision dans la peau du patient, afin d'avoir un instrument facilement utilisable et pouvant mener rapidement de nombreuses analyses. De la même manière, on ne souhaite pas devoir injecter des agents de contraste dans la peau du patient avant analyse.
— **Être non ionisant.** L'utilité de l'instrument devient discutable si la balance bénéfice/risque est moins bonne que pour la méthode de diagnostic visuel actuelle. Si l'utilisation de l'instrument entraine un développement du risque de cancer, il ne sera probablement pas utilisé en tant qu'assistance quotidienne au diagnostic par les dermatologues.
— **Être compact.** L'encombrement de l'instrument doit être limité de sorte à ce qu'il puisse être utilisé en routine par les praticiens, et qu'il puisse être utilisé pour analyser n'importe quelle zone du corps.
— **Fournir des images de qualité histologique.** Le but étant de fournir des images similaires à des coupes histologiques, il est nécessaire que l'instrument ait une résolution similaire à celle des microscopes actuellement utilisés en histopathologie, typiquement $1\,\mu m \times 1\,\mu m \times 1\,\mu m$. Il est aussi nécessaire que les structures de la peau présentent un contraste assez bon pour pouvoir les distinguer clairement, comme dans une coupe histologique.
— **Fournir des images en profondeur dans les tissus.** C'est un point fondamental. En effet, tous les points précédents peuvent plus ou moins être vérifiés par un dermatoscope. Cependant, les coupes histologiques sont faites en profondeur dans la peau, à des niveaux où les indices de développement des tumeurs sont bien plus clairs qu'en surface. On considérera comme objectif de pénétration de pouvoir visualiser clairement la jonction dermo-épidermique, situé typiquement entre 150 μm

et 200 μm en profondeur, qui est une zone importante dans l'analyse histopathologique, certaines tumeurs se formant à ce niveau, et rarement plus en profondeur.

L'ensemble de ces points pourrait être vérifié par une méthode d'imagerie optique, c'est à dire un microscope qui pourrait fournir des images en profondeur dans les tissus, sans que ceux-ci aient besoin d'être préparés. Avant de s'intéresser à la méthode que nous avons retenue pour développer un tel microscope, intéressons nous à la manière dont on peut modifier un microscope afin qu'il puisse obtenir des images des tissus en profondeur.

1.4 Techniques de microscopie pour l'imagerie en profondeur dans les tissus

Lorsqu'une coupe histologique est réalisée, l'objectif est d'obtenir à partir d'un tissu (constituant un échantillon épais) un échantillon mince correspondant à une tranche de tissu à une épaisseur donnée, de sorte que, lorsqu'on place cet échantillon dans un microscope conventionnel, on image uniquement les photons ballistiques provenant de la tranche de tissu nous intéressant, permettant d'en former une image pertinente. Une étude relativement exhaustive du microscope conventionnel (en particulier du microscope conventionnel en reflexion, permettant d'imager la lumière rétro-diffusée) est présentée en annexe A. Celle-ci introduit de nombreux résultats fondamentaux de la microscopie auxquels nous nous référerons régulièrement au cours de ce manuscrit.

Comme vu précédemment, si l'on observe un échantillon épais avec un microscope conventionnel, il y a superposition des photons ballistiques provenant de toutes les profondeurs de l'échantillon et des photons multi-diffusés par les différentes couches, si bien qu'il est impossible d'imager l'échantillon en profondeur.

Cependant, il y a bien des photons ballistiques provenant de toutes les couches (infiniment fines, au sens défini par la figure 1.7) de l'échantillon, jusqu'à une certaine profondeur passée laquelle la diffusion (ou l'absorption) est trop importante par rapport à la diffusion simple. L'imagerie se fondant sur les photons ballistiques (imagerie conventionnelle) sera toujours limitée en profondeur par ces phénomènes. Cependant, jusqu'à cette profondeur, il est possible d'imager les tissus si l'on parvient à isoler les photons ballistiques revenant d'une couche de l'échantillon, la situation devenant alors équivalente à la situation où une coupe histologique est observée avec un microscope conventionnel (au détail près de la lumière perdue par diffusion dans les couches précédentes). Afin d'imager un tissu en profondeur en utilisant un microscope, il faut donc pouvoir isoler les photons ballistiques provenant d'une position donnée (pas nécessairement toute une couche comme en microscopie conventionnelle, si l'on peut récupérer les photons ballistiques en un unique point par exemple, on peut ensuite mettre en place une procédure de balayage pour imager toute une couche).

Pour ce faire, plusieurs méthodes ont été développées. Notons aussi qu'il existe des méthodes d'imagerie en profondeur exploitant les photons multi-diffusés, capable ainsi d'imager au-delà du libre parcours moyen de diffusion. Citons la tomographie optique diffuse (DOT, *diffuse optical tomography*) [14], l'imagerie photo-acoustique [15] et l'imagerie acousto-optique [16]. Cependant ces méthodes s'éloignent beaucoup de la microscopie conventionnelle, et nous ne nous y intéresserons pas ici.

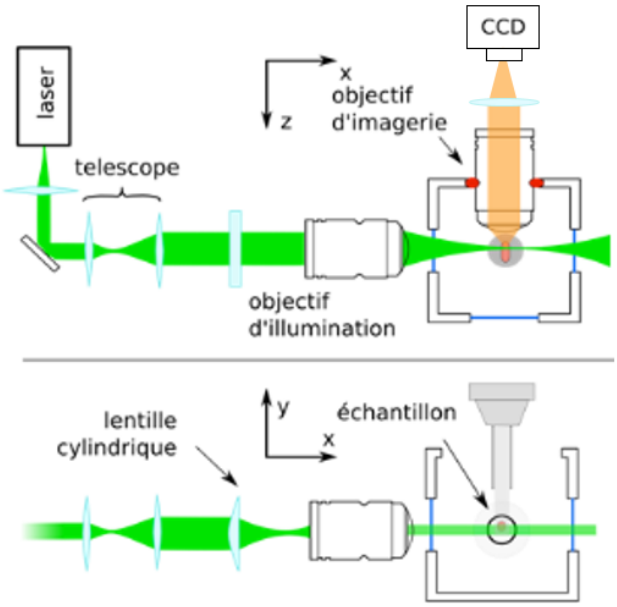

FIGURE 1.11 – Schéma d'un montage de microscopie à feuille de lumière. Modifié de http ://www.ip3d.fr.

1.4.1 La microscopie à feuille de lumière

Cette méthode, proposée en 2004 [17], se fonde sur le fait que si l'on parvient à n'éclairer qu'une couche d'un échantillon épais en profondeur, alors en observant l'échantillon avec un microscope conventionnel, seule cette couche sera imagée. Au lieu d'éclairer l'échantillon épais dans la direction de l'axe optique du microscope (comme en microscopie conventionnelle), cette méthode se fonde ainsi sur un éclairage orthogonal à cette direction.

La source d'éclairage est généralement un laser. Notons que cette méthode a jusqu'à maintenant toujours été utilisée en fluorescence (éclairement avec un laser à une longueur d'onde, mesure de la lumière renvoyée par l'échantillon à une autre longueur d'onde). Le faisceau laser est collimaté, agrandi, puis passe au travers d'une lentille cylindrique pour former une ligne. Cette ligne est ensuite focalisée par un objectif de microscope au niveau de la couche de l'échantillon à imager. Si la profondeur de champ de l'objectif est assez grande par rapport à la taille de l'échantillon à observer, l'échantillon est finalement éclairé par un plan de lumière (une « feuille de lumière », d'où le nom de la méthode[7], dont l'épaisseur correspond à la résolution *latérale* de l'objectif utilisé (c'est donc la résolution *latérale* de l'objectif d'illumination qui fixe la résolution *axiale* de cette méthode). Orthogonalement à ce plan, un microscope conventionnel récupère les photons diffusés (en fluorescence) par l'échantillon dans le plan de la feuille de lumière, et forme ainsi une image à la profondeur déterminée par la position de la feuille de lumière. Le fonctionnement de ce type de microscopie en profondeur est illustré à la figure 1.11.

Ce schéma d'illumination limite cependant l'utilisation de cette méthode à l'imagerie de petits échantillons (quelques dizaines de microns à quelques millimètres) : il faut pouvoir illuminer l'échantillon de côté, sans que la lumière (d'illumination) soit perdue par diffusion

7. Notons que cette méthode est connue sous de nombreuses appellations différentes : LSM, LSFM, SPIM, OPFOS... faisant toutes référence à des implémentations techniques légèrement différentes de la même méthode.

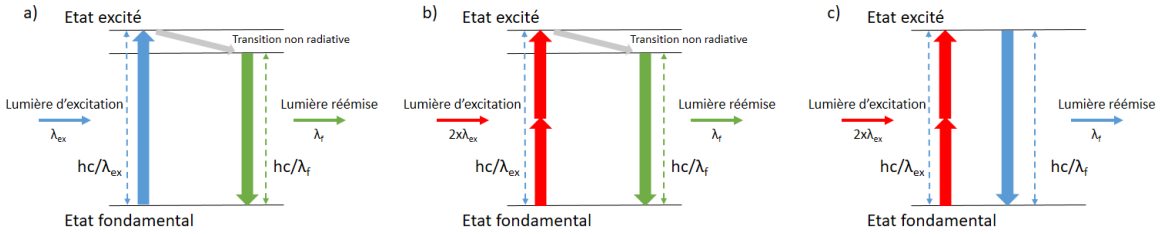

FIGURE 1.12 – Diagrammes de Jablonski illustrant a) la fluorescence linéaire (« conventionnelle »), b) la fluorescence non linéaire, ici fluorescence excitée à deux photons, et c) la génération de seconde harmonique.

ou absorption au niveau de la zone que l'on veut imager. Cette technique n'est ainsi pas adaptée à l'imagerie dans un contexte clinique, cependant, elle présente de nombreuses qualités pour une utilisation dans les domaines de la biologie cellulaire et de la biologie du développement.

1.4.2 La microscopie non linéaire

La microscopie non linéaire, proposée en 1990 [18], est une technique analogue à la microscopie en fluorescence conventionnelle, mais ne s'intéressant qu'à certains mécanismes de réémission de la lumière (pouvant être la fluorescence, mais pas uniquement) ayant lieu uniquement lorsque l'intensité de la lumière incidente est très élevée.

Afin de comprendre cette méthode, revenons rapidement sur le concept de la microscopie en fluorescence. Lorsqu'on éclaire un échantillon fluorescent à une certaine longueur d'onde, les électrons des atomes de l'échantillon passent à un état excité en absorbant l'énergie (les photons) de la lumière incidente (lié à la longueur d'onde de la lumière λ par $E_{ex} = \frac{hc}{\lambda_{ex}}$, avec h la constante de Planck et c la vitesse de la lumière), puis reviennent à leur état fondamental, en libérant une énergie $E_f = \frac{hc}{\lambda_f}$, et donc en émettant de la lumière à la longueur d'onde λ_f. Etant donné qu'une certaine quantité d'énergie (relativement faible) est perdue dans des processus non-radiatifs (n'émettant pas de lumière) entre l'absorption d'un photon d'excitation et l'émission d'un photon de fluorescence, E_f est plus faible que E_{ex}, et ainsi la lumière émise par fluorescence a une longueur d'onde plus élevée. La figure 1.12.a résume ce phénomène sous la forme d'un diagramme appelé *diagramme de Jablonski*. Notons que la lumière incidente doit avoir la « bonne » énergie correspondant à une transition dans les niveaux électroniques de l'atome pour que la fluorescence puisse avoir lieu.

La microscopie non linéaire se base sur une situation où la lumière d'excitation a une énergie égale à la moitié de l'énergie nécessaire à l'excitation des électrons. Il faut ainsi que l'atome absorbe simultanément *deux photons* pour que l'émission de lumière (pouvant être due à un phénomène de fluorescence, mais aussi à un phénomène de *génération de seconde harmonique*, se faisant sans transition non radiative) puisse avoir lieu, comme schématisé sur les figures 1.12.b et 1.12.c [8].

Ce phénomène étant relativement rare, il n'a concrètement lieu que lorsque l'intensité de la lumière d'excitation est élevée, maximisant les chances que ce phénomène survienne.

8. Il est aussi possible d'avoir des cas d'aborption à trois photons, voire plus : on parle aussi de *microscopie de fluorescence multi-photonique* et de *génération de troisième harmonique*.

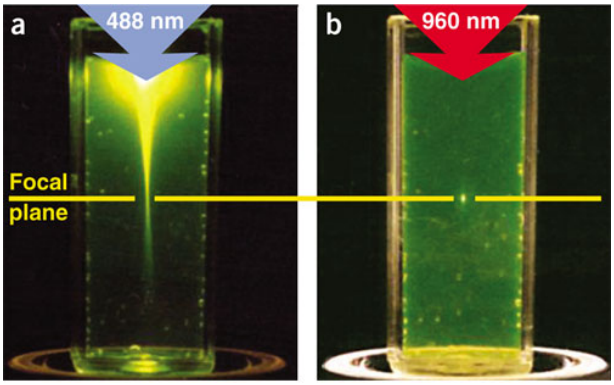

FIGURE 1.13 – a) Excitation d'un échantillon de fluoresceine en fluorescence linéaire, à la longueur d'onde d'excitation 488 nm. b) Même échantillon, éclairé à la longueur d'onde d'excitation $960nm(\sim 2\times 488nm)$: fluorescence non linéaire, excitée à deux photons. Dans les deux cas, l'objectif de microscope utilisé a une ouverture numérique de 0.16. [19]

Ainsi, en éclairant un échantillon avec une telle lumière d'excitation, la fluorescence (ou la génération de seconde harmonique) n'aura lieu que là où le faisceau d'illumination est le plus concentré (focalisé), et on récupérera les photons réémis provenant uniquement de cette zone. La figure 1.13 illustre la zone fluorescente pour un même échantillon éclairé à une longueur d'onde correspondant à la fluorescence conventionnelle (a.) et à deux fois cette longueur d'onde (b.), correspondant à un cas d'absorption à deux photons. On remarque que l'intensité du faisceau d'excitation va avoir une influence sur la résolution de cette méthode.

Ainsi, en microscopie non linéaire il est nécessaire d'avoir un éclairage focalisé sur la zone que l'on souhaite imager en profondeur. Cette focalisation est faite par le même objectif de microscope que celui servant à imager l'échantillon, et la focalisation du faisceau d'excitation se fait donc seulement en un point (voir figure 1.13.b). On image donc un seul point à la fois dans cette méthode de microscopie. Afin de pouvoir imager toute une coupe, il faut balayer l'échantillon ou le faisceau incident puis reconstituer la coupe à partir des images des différentes points.

Cette méthode, comme la microscopie à feuille de lumière, n'est actuellement pas utilisée couramment dans un contexte clinique. Cependant, l'intérêt de son utilisation dans ce contexte est un important sujet d'étude, et elle pourrait se révéler une méthode utile pour certaines applications.

1.4.3 La microscopie confocale

Proposée en 1957 [20], la microscopie confocale constitue la première méthode de microscopie en profondeur dans les tissus. En microscopie confocale, l'échantillon est éclairé par un faisceau de lumière focalisé, tout comme en microscopie non linéaire. Dans le cas où la microscopie confocale est utilisée en fluorescence , l'éclairage est celui présenté à la figure 1.13.a. Comme on le voit sur cette figure, l'échantillon est éclairé sur une grande profondeur, et de la lumière est rétrodiffusée sur toute cette profondeur. Cependant, seul le point de l'échantillon situé à la distance focale de l'objectif (en considérant un objectif corrigé à l'infini) est effectivement conjugué avec le capteur du microscope. Les autres parties de l'échantillon (en profondeur) sont aussi vues par le capteur, mais au niveau de

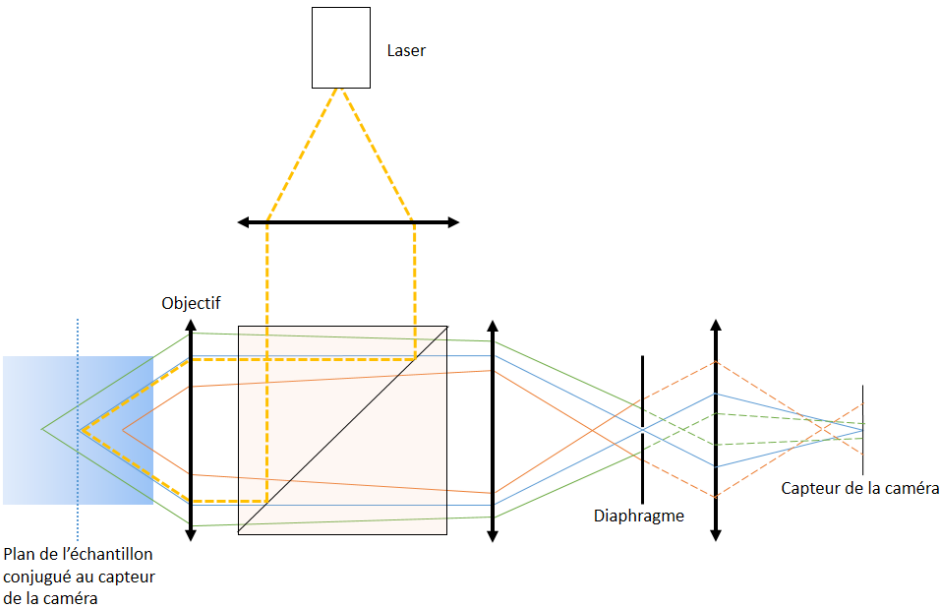

FIGURE 1.14 – Schéma de principe de la microscopie confocale. Les rayons en pointillés correspondent aux rayons provenant de zones de l'échantillon non conjuguées au plan du capteur de la caméra et coupés par le diaphragme.

celui-ci, leur image est défocalisée. La superposition de toutes les images défocalisées des différents points éclairés de l'échantillon « brouille » totalement l'image focalisée du point de l'échantillon à la distance focale de l'objectif.

L'idée de la microscopie confocale est de conserver sur le capteur uniquement la lumière effectivement focalisée sur celui-ci, correspondant à la lumière revenant uniquement d'un point dans l'échantillon, et permettant ainsi d'imager ce point de l'échantillon situé en profondeur. Pour ce faire, on peut simplement placer un diaphragme conjugué avec le plan focal de l'objectif, dont le diamètre est de l'ordre de grandeur de celui de la tache d'Airy correspondant à l'image d'un point de l'échantillon dans le plan du diaphragme. Ainsi, l'immense majorité de la lumière défocalisée est coupée par le diaphragme, mais toute la lumière provenant du point conjugué au diaphragme est conservée[9] : on parle de *filtrage confocal* de la lumière. En focalisant ensuite la lumière sur un capteur, on image un unique point en profondeur dans l'échantillon[10]. Ce principe de fonctionnement du microscope confocal est illustré sur la figure 1.14.

Comme la microscopie non-linéaire, la microscopie confocale est une méthode permettant d'imager un seul point à la fois dans l'échantillon, et il est donc nécessaire d'utiliser des procédures de balayage pour effectuer des coupes dans les échantillons.

Notons que l'on peut montrer que la PSF[11] (latérale) d'un microscope confocal correspond au carré de la PSF du même microscope sans filtrage confocal [21], la résolution latérale du microscope confocal est donc légèrement meilleure que celle du microscope

9. Si le diaphragme est plus petit que la tache d'Airy, ou coupe legèrement plus de lumière défocalisée, mais on perd aussi de la lumière provenant du point que l'on souhaite imager, et on ne gagne certainement pas en résolution : toute la lumière « contenue » dans la tache d'Airy provient d'un seul et même voxel de résolution coté échantillon.

10. Notons que le capteur lui même peut faire office de diaphragme s'il a une taille appropriée.

11. Point spread function, voir définition à l'annexe A

conventionnel utilisant un objectif identique. La résolution axiale du microscope confocal vaut quant à elle la profondeur de champ de l'objectif utilisé. Notons cependant que, comme présentée à la figure A.11, la PSF axiale d'un objectif de microscope présente de nombreux lobes, si bien que même si la profondeur de champ peut être très faible par l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique, de la lumière est en fait récupérée au-delà de cette profondeur de champ, et en pratique la résolution axiale du microscope confocal n'est pas assez bonne pour pouvoir représenter des images en *coupe verticale* (dans la direction axiale). On utilisera donc uniquement le microscope confocal pour produire des images en coupe *en face*, la géométrie habituelle d'acquisition en microscopie.

Contrairement aux deux méthodes précédentes, la microscopie confocale est aujourd'hui largement utilisée dans un contexte clinique, et par les dermatologues en particulier. Le microscope confocal jouit en effet de l'avantage de pouvoir être utilisé directement sur n'importe quel tissu sans préparation, et d'une mise en place plus simple que les deux autres méthodes. Cependant, le fait de ne pouvoir imager que des coupes en face constitue une limitation de cette méthode, de même que la nécessaire utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique, rendant cette méthode très sensible aux aberrations introduites par l'échantillon, limitant ainsi la profondeur de pénétration accessible avec une bonne qualité d'imagerie [12]. Par ailleurs le coût élevé des instruments de microscopie confocale (de l'ordre de 100.000 €) en limite encore la diffusion dans les hôpitaux.

1.5 Conclusion

L'imagerie optique peut apporter des informations fondamentales sur la structure des tissus biologiques. En mesurant l'intensité lumineuse en fonction de la position dans l'échantillon, on forme une image où l'intensité est liée à la taille des particules ainsi qu'au rapport entre leur indice et celui du milieu qui les entoure, donnant une information morphologique sur les tissus imagés. En considérant un échantillon de tissu biologique mince, l'instrument adapté pour visualiser des structures au niveau cellulaire est le microscope, dont les deux caractéristiques fondamentales sont le champ d'observation et la résolution, liée à l'ouverture numérique de l'objectif de microscope utilisé, indiquant la taille de la zone qui pourra être visualisée, ainsi que la taille des structures les plus fines qui pourront être discernées.

Le microscope est aujourd'hui un instrument indispensable en anatomie pathologique, en particulier dans le domaine du diagnostic du cancer de la peau, où un diagnostic de certitude ne peut être apporté qu'à partir d'un examen histologique, c'est à dire d'une observation au microscope d'un tissu suspect suite à une biopsie, nécessaire pour pouvoir former des coupes minces du tissus, analysées par la suite en microscopie. Ce processus est long, complexe, et anxiogène pour les patients, si bien qu'aujourd'hui, les dermatologues expriment le besoin de nouveaux instruments permettant d'obtenir une qualité d'imagerie histologique sans avoir besoin d'effectuer de biopsie.

Des techniques de microscopie peuvent effectivement imager des échantillons épais, en utilisant le fait que des photons ballistiques (les photons apportant une information pertinente sur l'échantillon) peuvent être récupérés même lorsqu'ils sont rétrodiffusés en profondeur dans l'échantillon, tant qu'ils ne proviennent pas d'une profondeur trop grande par rapport à la distance de libre parcours moyen de diffusion (ou d'absorption) de l'échan-

12. Cette profondeur est de surcroît limitée par le fait que certains photons ne provenant pas du point que l'on souhaite imager (photons multi-diffusés ou photons ballistiques provenant d'autres points éclairés) passent malgré tout par le diaphragme.

tillon. Ces techniques permettant d'isoler les photons ballistiques pour former des images en profondeur dans les tissus incluent la microscopie à feuille de lumière, la microscopie non linéaire et la microscopie confocale. Aujourd'hui, la microscopie confocale est la technique la plus couramment utilisée dans un contexte clinique.

Nous nous proposons à présent d'étudier une nouvelle méthode de microscopie permettant d'imager les tissus en profondeur, se fondant sur des techniques d'interférométrie : la microscopie par cohérence optique.

Chapitre 2

La Microscopie par Cohérence Optique

2.1 Introduction

La microscopie par cohérence optique (ou OCM, pour *optical coherence microscopy* en Anglais) se fonde sur une technique de filtrage interférométrique de la lumière rétrodiffusée par l'échantillon afin de pouvoir l'imager en profondeur. Avant de rentrer dans les détails de cette technique, notons qu'elle a d'abord été implémentée sur des systèmes d'imagerie à résolution (latérale) moins élevée que des microscopes, sous le nom de tomographie par cohérence optique (ou OCT, pour *optical coherence tomography*), dont le concept a été introduit pour la première fois en 1987 sous le nom d'OCDR (pour *optical coherence domain reflectometry*) [22], puis d'OCT pour son application en imagerie biomédicale [23]. L'OCM est une branche de l'OCT proposant une méthode d'imagerie en profondeur se fondant sur la même technique, mais à résolution microscopique. Cependant, notons bien que l'immense majorité des systèmes OCT utilisés actuellement ne sont pas des systèmes OCM, la moindre résolution des systèmes OCT étant tout à fait adaptée à de très nombreuses applications.

La figure 2.1 représente graphiquement les résolutions latérales et profondeurs de pénétration typiques de l'OCT et de l'OCM, ainsi que de la microscopie confocale et de l'échographie [1].

L'OCT constitue ainsi un intermédiaire entre la microscopie confocale et les méthodes d'imagerie médicale *conventionnelles*, en particulier l'échographie, la mieux résolue de ces méthodes. En effet, si l'OCT présente une résolution moins bonne que la microscopie confocale, elle présente aussi une profondeur de pénétration plus élevée, car le filtrage interferométrique de l'OCT est plus efficace que le filtrage confocal et permet d'imager des échantillons en profondeur même lorsque très peu de photons ballistiques sont récupérés. Notons que l'OCM combine quant à elle la résolution de la microscopie confocale et la profondeur de pénétration de l'OCT.

Afin de comprendre la technique de l'OCT (et de l'OCM), ce chapitre se propose de revenir sur le principe des interférences à deux ondes, à la base de l'OCT, puis de présenter les implémentations et applications communes de l'OCT, avant de s'intéresser en particulier à l'OCM, et de présenter en détail l'implémentation de l'OCM au cœur des travaux de cette

1. On ne considère pas ici les méthodes de microscopie présentées précédemment basées sur la fluorescence, fondamentalement assez différentes, et difficilement implémentables sur des échantillons tout à fait identiques à ceux considérés en microscopie confocale ou OCT.

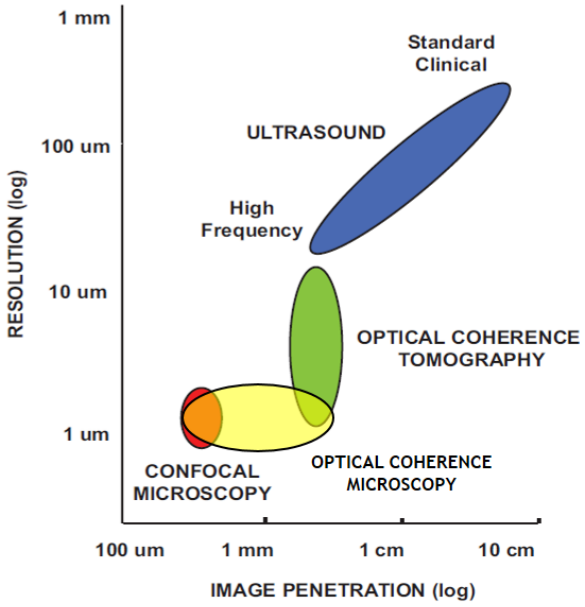

FIGURE 2.1 – Diagramme représentant les résolutions latérales et profondeurs de pénétration typiques de la microscopie confocale, l'OCT, l'échographie et l'OCM [24].

thèse : la microscopie par cohérence optique plein champ (ou FF-OCM pour *full-field optical coherence microscopy*). Cependant, avant tout cela, on se propose de présenter le principe général sur lequel repose l'OCT, tout comme les principes des méthodes de microscopie en profondeur dans les tissus ont été présentés précédemment.

2.2 La tomographie par cohérence optique (OCT)

2.2.1 Principe

L'OCT repose sur le principe que des photons à l'origine d'interférences peuvent être isolés. Les systèmes d'OCT sont donc des interféromètres [2], au sein desquels la lumière est divisée en deux faisceaux : l'un illumine l'échantillon (en OCT conventionnelle, de manière analogue à l'éclairage en microscopie confocale) tandis que l'autre est réfléchi par une *surface de référence*. Ces deux faisceaux sont recombinés, et focalisés sur un capteur. Celui-ci mesure d'une part la somme de l'intensité de la lumière réfléchie par la surface de référence et de l'intensité de la lumière intégrée sur toute la profondeur de champ de l'« objectif » utilisé [3] (en admettant qu'un filtrage confocal est fait par le capteur, sans quoi il mesure aussi de la lumière provenant d'autres parties de l'échantillon), et d'autre part, par dessus ce signal (constituant un « fond »), un état d'interférence, correspondant à l'interférence entre la surface de référence et des structures rétro-diffusantes dans l'échantillon. Le fond peut alors être extrait de manière à récupérer uniquement l'information sur l'état d'interférence, à partir de laquelle on peut se ramener à une information sur les structures ayant

2. De type Michelson dans l'immense majorité des cas.

3. Le terme objectif se réfère au système optique collectant la lumière rétrodiffusée par l'échantillon, en OCT, de manière générale il ne s'agit pas d'objectifs de microscopes, ce terme faisant référence à des objectif d'ouverture assez importantes pour atteindre une résolution micrométrique.

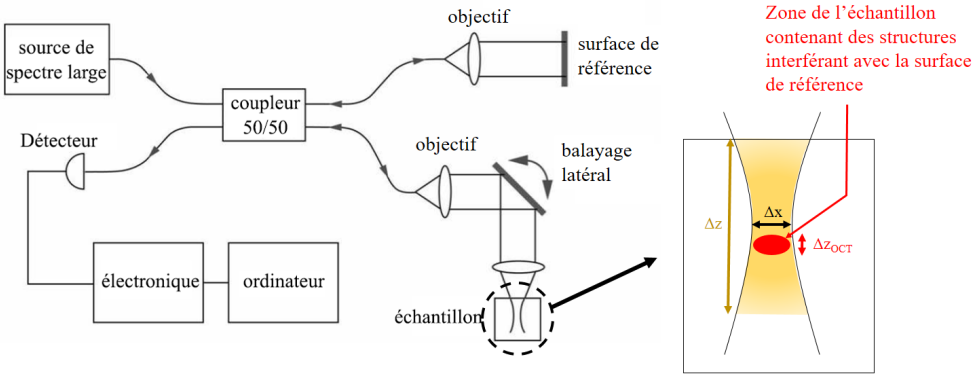

FIGURE 2.2 – Schéma de principe de l'OCT. Δz_{OCT} correspond à la résolution axiale du système OCT. Δx (resp. Δz) correspond à la résolution latérale (resp. axiale) de l'objectif utilisé (voir annexe A). Modifié de [25].

interféré avec la surface de référence, et ainsi former une image de ces structures.

Des interférences ne pouvant être mesurées que pour les structures rétro-diffusantes dont la différence de marche avec la surface de référence est inférieure à la *longueur de cohérence* de la lumière, l'information extraite du signal interférométrique concerne une zone de l'échantillon d'étendue axiale liée à la longueur de cohérence de la source : en OCT, la résolution axiale est ainsi fixée par la longueur de cohérence de la source. La largeur de la longueur de cohérence étant inversement proportionnelle à la largeur du spectre de la source, plus le spectre de la source sera large, meilleure sera la résolution axiale du système OCT[4]. Le terme de *cohérence* se réfère ici à la cohérence *temporelle*, liée à l'étendue spectrale de la lumière (par opposition à la cohérence spatiale, présentée à l'annexe A, liée à l'étendue angulaire de la lumière).

La résolution latérale d'un système OCT est quant à elle liée à l'ouverture numérique de l'objectif utilisé (selon l'équation A.14, ou λ correspond alors à la longueur d'onde *moyenne* de la lumière). Le principe de l'OCT est illustré à la figure 2.2, en considérant un interféromètre de Michelson à fibres optiques (interféromètre très couramment utilisé en OCT).

En microscopie confocale, la résolution axiale est liée à l'ouverture numérique des objectifs utilisés, et il est indispensable d'utiliser des objectifs à grande ouverture numérique. En OCT, la résolution axiale est indépendante des objectifs, et uniquement liée au spectre de la lumière utilisée. Ainsi, les résolutions latérales et axiales sont découplées et des objectifs à très faible ouverture numérique peuvent être utilisés tout en conservant une très grande résolution axiale. Ceci peut permettre d'éviter une trop grande influence des aberrations introduites par l'échantillon, et participe à la grande profondeur de pénétration de l'OCT, en plus du fait que les mesures interférométriques sont très sensibles. Par ailleurs, le filtrage interférométrique est bien plus selectif que le filtrage confocale (voir figure 2.3), résultant en une résolution axiale effectivement assez bonne pour pouvoir représenter des images en coupes verticales[5].

4. Notons qu'il faut aussi que la réponse spectrale du capteur soit assez large pour pouvoir détecter tout le spectre de la source, sans quoi la résolution est limitée par la largeur de la réponse spectrale du capteur.

5. Comme on le verra, le schéma d'acquisition de l'OCT est aussi particulièrement adapté à l'imagerie en coupe verticale, et de plus, la résolution latérale est souvent bien moins bonne que la résolution axiale

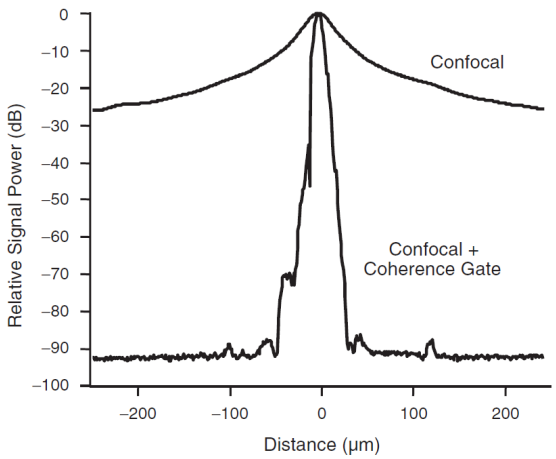

FIGURE 2.3 – PSF axiale d'un microscope confocal comparée à celle d'un système OCT utilisant un objectif d'ouverture numérique identique. L'échelle logarithmique met en évidence la sélectivité accrue du système OCT, bien que les largeurs des deux PSF soient relativement proches l'une de l'autre [26].

Par analogie avec l'échographie, une technique produisant aussi des coupes verticales, on utilise parfois les termes suivants pour se référer aux images produites en OCT :

1. A-scan : Profil 1D axial de l'échantillon (une ligne verticale dans une image d'un échantillon en coupe verticale).
2. B-scan : Profil 2D axial de l'échantillon (coupe verticale, concaténation d'un certain nombre de A-scans). En OCT conventionnelle, un balayage latéral du faisceau d'éclairage est nécessaire pour obtenir un B-scan.
3. C-scan : Profil 2D en face de l'échantillon. En OCT conventionnelle, un C-scan est souvent obtenu après obtention de multiples B-scans pour obtenir une image 3D, puis recoupe dans cette image 3D pour obtenir une coupe en face.
4. M-scan : A-scan obtenu à une position en fonction du temps (moins courant que les autres types d'images en OCT).

Tout comme la microscopie confocale, l'OCT est aujourd'hui couramment utilisée dans un contexte clinique. Le domaine où cette technique s'est imposée de manière spectaculairement rapide parmi les praticiens est l'ophtalmologie, domaine dans lequel aucune méthode ne permettait de visualiser les couches de la rétine de manière non invasive avant l'introduction de l'OCT. Aujourd'hui, il est courant pour un ophtalmologue d'être muni d'un système OCT, même sans travailler dans un contexte hospitalier.

Malgré son introduction dans le domaine de la recherche il y a à peine trente ans, l'OCT représente aujourd'hui un marché de plus d'un milliard de dollars, avec près de quarante entreprises produisant des sytèmes OCT dans le monde.

2.2.2 Interférences à deux ondes en OCT.

Comme on l'a vu, l'OCT repose sur un filtrage interférométrique. Afin de donner un cadre théorique à l'OCT, il convient donc de revenir sur la manière dont fonctionne un in-

du fait de l'utilisation d'objectif faiblement ouvert, ajoutant à l'intérêt de représenter des coupes verticales plutôt que des coupes en face.

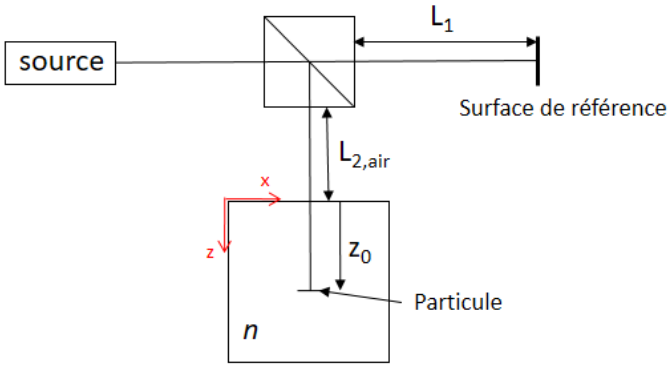

FIGURE 2.4 – Définition des grandeurs utiles pour un cas simple où l'échantillon que l'on veut imager en OCT est une particule dans un milieu d'indice n.

terféromètre. L'annexe B présente des résultats fondamentaux d'interférométrie en lumière monochromatique ainsi qu'en lumière polychromatique, en considérant un interféromètre de Michelson, le plus couramment utilisé en OCT.

En OCT, une des surfaces dans un bras de l'interféromètre est remplacée par un échantillon. Le bras dans lequel se trouve l'échantillon sera alors appelé *bras objet*, tandis que le bras contenant une surface réfléchissante (la surface de référence) sera appelé *bras de référence*. La lumière revenant de l'échantillon n'est pas caractérisée par un coefficient de réflexion, mais par la grandeur $R_{rd}(x, y, z)$, donnant la proportion de l'intensité lumineuse incidente rétrodiffusée au point (x, y, z) dans l'échantillon, définie à la section 1.2.2, et même plus précisément de la proportion de $R_{rd}(x, y, z)$ récupérée par l'objectif, que l'on notera $R'_{rd}(x, y, z)$.

Considérons tout d'abord un cas très simple, représenté à la figure 2.4. l'échantillon est une particule, localisée à la position (x_0, y_0, z_0) dans un milieu d'indice n, et caractérisée par un coefficient de réflexion $R_{particule}$. Le faisceau d'éclairage est centré sur la position (x_0, y_0), et l'intensité mesurée par le capteur est finalement donnée par (voir équation B.21) :

$$I_{OCT} = \frac{I_0}{4}\left(R_{ref} + R_{particule} + 2\sqrt{R_{ref}R_{particule}}\gamma(\delta)\,\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta)\right), \tag{2.1}$$

δ correspond à la différence de marche entre la particule et la surface de référence, et R_{ref} correspond au coefficient de réfexion en intensité de la surface de référence . En dehors de l'échantillon, tout l'interféromètre est considéré dans l'air. On a ainsi, en utilisant les grandeurs définies à la figure 2.4, $\delta = 2\left[(L_1 - L_{2,air}) - n\,z_0\right]$.

À partir de cette équation, on voit qu'il est possible de mesurer $R_{particule}$ en mesurant l'amplitude du termes d'interférence, proportionnelle à $\sqrt{R_{particule}}$, tant que la différence de marche entre la particule et la surface de référence est « inclue » dans $\gamma(\delta)$. Ceci illustre le filtrage interférométrique de l'OCT : après isolation et démodulation du terme d'interférence, on obtient uniquement une information pour la partie de l'échantillon inclue dans $\gamma(\delta)$. Ainsi, la résolution axiale du système est donnée par la FWHM [6] de $\gamma(\delta)$, que l'on notera Δz_{OCT}. Le voxel de résolution du système OCT est ainsi donné par $\Delta x \times \Delta y \times \Delta z_{OCT}$, avec $\Delta x = \Delta y$ la résolution latérale de l'objectif utilisé (voire annexe A).

6. Largeur à mi-hauteur, *full width at half maximum* en Anglais.

Considérons à présent le cas d'un échantillon quelconque caractérisée par $R'_{rd}(x,y,z)$. Comme évoqué précédemment, en plus des interférences, le capteur intègre la lumière provenant de toute la profondeur de champ de l'objectif (en considérant un filtrage confocal), soit de tout le voxel de résolution de l'objectif. Ainsi le terme r_2^2 dans l'équation B.21, correspondant à la proportion d'intensité lumineuse revenant du bras défini maintenant comme le bras objet, va prendre la valeur (approximative) $\iiint_V R'_{rd}(x,y,z)\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y\,\mathrm{d}z$, avec V le voxel de résolution de l'objectif $\Delta x \times \Delta y \times \Delta z$, considéré autour du point de focalisation de l'objectif (voire annexe A). On pourra noter ce terme R_{incoh}, la majeure partie de la lumière considérée dans ce terme n'interférant pas et étant ainsi de la lumière incohérente (temporellement) [7].

Par ailleurs, les interférences résultent de la somme des effets de toutes les structures contenues dans l'échantillon et inclues dans le voxel de résolution du système OCT. Le terme d'interférence s'écrit ainsi approximativement $2\sqrt{R_{ref}} \iiint_{V_{OCT}} \sqrt{R'_{rd}(x,y,z)}\,\gamma(\delta(z))\,\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta(z))\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y\,\mathrm{d}z$, avec V_{OCT} le voxel de résolution du système OCT $\Delta x \times \Delta y \times \Delta z_{OCT}$, considéré autour de la position de la différence de marche nulle.

Finalement l'intensité mesurée par le capteur d'un système OCT est donnée par

$$I_{OCT} = \frac{I_0}{4}\left(R_{incoh} + R_{ref} + 2\sqrt{R_{ref}}\left[\iiint_{V_{OCT}} \sqrt{R'_{rd}(x,y,z)}\,\gamma(\delta(z))\,\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta(z))\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y\,\mathrm{d}z\right]\right). \tag{2.2}$$

Notons bien que dans cette formule, V_{OCT} est une fonction de la position de la différence de marche nulle, que l'on peut noter Z_0, telle que $2\left[(L_1 - L_{2,air}) - n\,Z_0\right] = 0$, ainsi que de la position (X,Y) de focalisation du faisceau d'illumination.

2.2.3 Implémentations

2.2.3.1 Domaine temporel (TD-OCT)

Cette implémentation correspond à l'utilisation d'un montage tout à fait identique à celui considéré dans la partie précédente, et qui nous a permis d'établir l'équation 2.2. Cette méthode s'explique facilement à partir de cette équation. Comme on peut le voir, il est possible à partir de I_{OCT} de mesurer $\iiint_{V_{OCT}} \sqrt{R'_{rd}(x,y,z)}$. En trouvant un moyen de considérer n'importe quel volume V_{OCT} dans l'échantillon, il est alors possible de reconstituer une image (en 3D) de l'échantillon.

Il est possible de « contrôler » V_{OCT} en jouant sur la position de focalisation (X,Y) du faisceau de focalisation et sur la position de la différence de marche nulle, $Z_0 = \frac{(L_1 - L_{2,air})}{n}$. En jouant sur (X,Y) en maintenant Z_0 fixe on obtient une image en coupe en face, en jouant sur Z_0 à (X,Y) fixé on obtient un A-scan. Notons que jouer sur Z_0 peut être fait simplement en jouant sur L_1 ou $L_{2,air}$, c'est à dire en balayant la surface de référence, ou en balayant l'échantillon selon z, ou encore en balayant tout l'interféromètre selon z. Si

7. Attention cependant, dans certains cas particuliers où des objectifs à grande ouverture numérique sont utilisés, les voxels de résolution du système OCT et de l'objectif peuvent être assez proches, et la lumière considérée dans le terme n'est plus majoritairement incohérente.

l'on balaie la surface de référence, il est important de ne pas quitter le voxel de résolution de l'objectif, sans quoi la surface de référence n'est plus « vue ».

En pratique, c'est le plus souvent la surface de référence qui est balayée, en maintenant tout le reste fixe et en utilisant des objectifs avec une assez longue profondeur de champ. Il est en effet aisé d'extraire l'amplitude du terme d'interférence à partir d'un signal variant selon z, le terme en cosinus variant dans cette direction. Ainsi, en OCT en domaine temporel (ou TD-OCT pour *time domain OCT* en Anglais), des A-scans sont obtenus, et des B-scans peuvent être obtenus en déplaçant le faisceau dans la direction x ou y entre chaque A-scan. Des images 3D peuvent être obtenues en déplaçant le faisceau dans la direction y ou x entre chaque B-scan. Des C-scans peuvent être obtenus en recoupant les images 3D.

Le TD-OCT est la première méthode d'OCT à avoir été développée. Notons que pour une implémentation plus aisée en contexte clinique, des interferomètres à fibres optiques, très compacts, ont rapidement été utilisés dans les systèmes OCT, et constituent aujourd'hui la norme dans les systèmes OCT. La résolution des premiers systèmes de TD-OCT était typiquement de 15 μm $\times$ 15 μm (latérale $\times$ axiale), en utilisant une diode superluminescente (SLD) comme source d'éclairage [23], et des objectifs assez peu ouverts pour maximiser la profondeur sondée en balayant la surface de référence. L'utilisation de plusieurs SLD a permis d'atteindre une résolution axiale de l'ordre de $3\mu m$ [27], et l'utilisation de laser a impulsion ultra-brèves (de l'ordre de la femtoseconde, permettant d'avoir un spectre très large) et de lasers supercontinuum (utilisant des fibres à cristal photonique) ont permis d'atteindre une résolution axiale de l'ordre de $1\mu m$, voire moins [28]. La vitesse d'acquisition typique en TD-OCT, lié à la vitesse d'acquisition du capteur et du temps nécessaire au balayage axial est de quelques centaines de A-scans par seconde [29]. Notons que l'obtention d'un C-scan de $\sim 500 \times 500$ points nécessite ainsi ~ 15 minutes, un temps très long dans le domaine de l'imagerie médicale.

Cependant, des méthodes relativement complexe utilisant des modulateurs de phase RSOD (*rapid scanning optical delay*) ont permis de multiplier la vitesse d'acquisition par ~ 10 [30] en TD-OCT, mais globalement le développement des systèmes de TD-OCT est aujourd'hui quasiment arrêté, du fait de l'émergence d'une nouvelle implémentation de l'OCT ayant de nombreux avantages : l'OCT dans le domaine fréquentiel.

Malgré tout, remarquons que la résolution latérale en TD-OCT peut être largement améliorée si l'on n'utilise plus un balayage de la surface de référence mais de l'échantillon, ou encore si l'on déplace les objectifs en même temps que l'on déplace la surface de référence (technique appelée *refocalisation dynamique*). Ainsi la résolution latérale en TD-OCT peut être très élevée, ce qui constitue un avantage majeur de cette technique, auquel nous reviendrons, l'OCM étant généralement effectué dans le domaine temporel (et constituant l'un des seuls domaines de développement du TD-OCT aujourd'hui).

2.2.3.2 Domaine fréquentiel (FD-OCT)

L'immense majorité des systèmes cliniques d'OCT commercialisés aujourd'hui, et étudiés par les chercheurs sont des systèmes d'OCT dans le domaine fréquentiel (ou FD-OCT pour *frequency domain OCT* en Anglais). Bien que nos travaux ne concernent pas cette implémentation, il est important de l'évoquer du fait de l'importance de son utilisation aujourd'hui. Cette implémentation, proposée quelques années après l'introduction du TD-OCT [31] se fonde sur le fait que les états d'interférences dépendent de la différence de marche entre les deux surfaces de l'interféromètre, mais aussi de la longueur d'onde (voir équation B.10). On distingue deux générations de systèmes FD-OCT : l'OCT dans le do-

maine spectral (SD-OCT pour *spectral domain OCT* en Anglais) et l'OCT à source balayée (SS-OCT pour *swept source OCT* en Anglais)

2.2.3.2.1 Domaine spectral (SD-OCT)

L'état d'interférences dépendant de la longueur d'onde, l'idée du SD-OCT est de ne plus mesurer l'intensité directement en utilisant un capteur intégrant toutes les longueurs d'onde comme on a considéré à la section B.2, mais d'utiliser un spectromètre, c'est à dire d'envoyer la lumière en sortie de l'interféromètre au travers d'un réseau de manière à isoler les longueurs d'onde et les mesurer individuellement à l'aide d'un capteur linéaire.

Pour chaque longueur d'onde, l'intensité mesurée est celle donnée par l'équation B.10, mais en prenant en compte qu'un échantillon est placé dans un des deux bras. Étant donné qu'on se place dans un cas monochromatique, la longueur de cohérence est très élevée et on intègre les différences de marche entre les structures contenues dans l'échantillon et la surface de référence sur toute la profondeur de champ de l'objectif utilisé :

$$I_{SD-OCT}(\sigma) = \frac{I_0}{4}\left(R_{ref} + \iiint_V R'_{rd}(x,y,z)\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y\,\mathrm{d}z + 2\sqrt{R_{ref}}\left[\iiint_V \sqrt{R'_{rd}(x,y,z)}\cos\left(2\pi\sigma\delta(z)\right)\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y\,\mathrm{d}z\right]\right). \quad (2.3)$$

Considérons uniquement le terme entre crochets dans cette équation (terme d'interférence, à un facteur près), et simplifions le en négligeant l'intégration selon x et y (on considère un faisceau « ponctuel », et on se place à une position (x, y) donnée). De plus, δ étant une fonction de z, effectuons un changement de variable $z \leftrightarrow \delta$:

$$I_{SD-OCT,int}(\sigma) = \int_{-\Delta z}^{\Delta z} \sqrt{R'_{rd}(\delta)}\cos\left(2\pi\sigma\delta\right)\,\mathrm{d}\delta \quad (2.4)$$

En utilisant des arguments de parité vus précédemment, on a ainsi :

$$I_{SD-OCT,int}(\sigma) = \int_{-\Delta z}^{\Delta z} \sqrt{R'_{rd}(\delta)}e^{2\mathrm{i}\pi\sigma\delta}\,\mathrm{d}\delta \quad (2.5)$$

Considérons le cas où $\Delta z \to \infty$, correspondant à une ouverture numérique tendant vers 0, dans l'objectif d'expliciter la méthode sans entrer dans des subtilités calculatoires. On a alors :

$$I_{SD-OCT,int}(\sigma) = \int_{-\infty}^{+\infty} \sqrt{R'_{rd}(\delta)}e^{2\mathrm{i}\pi\sigma\delta}\,\mathrm{d}\delta \quad (2.6)$$

$$I_{SD-OCT,int}(\sigma) = TF\left[\sqrt{R'_{rd}(\delta)}\right](\sigma). \quad (2.7)$$

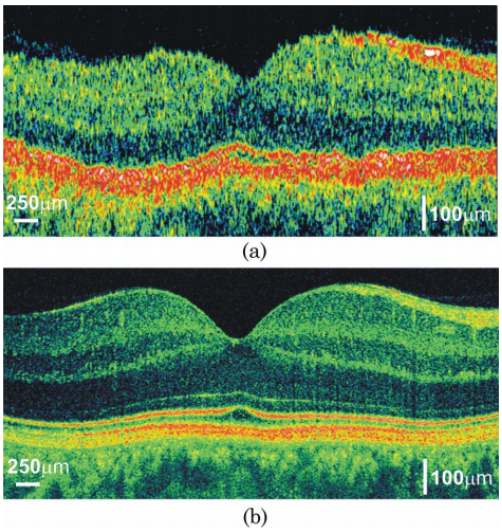

FIGURE 2.5 – Comparaison d'images en coupe verticale de rétine saine *in vivo* : a) TD-OCT, image obtenue avec un système commercial Zeiss OCT 3 Stratus (vitesse : 400 A scans/s). b) FD-OCT, image obtenue avec un système de laboratoire (vitesse : 30.000 A-scans/s) [33].

Ainsi, la transformée de Fourier de $I_{SD-OCT,int}(\lambda)$ permet de se ramener à $\sqrt{R'_{rd}(\delta)} = \sqrt{R'_{rd}(z)}$, avec z prenant toutes les valeurs possibles dans un intervalle défini par l'inverse du pas du spectromètre (et en pratique, dans la profondeur de champ de l'objectif), c'est à dire de produire un A-scan de l'échantillon.

En SD-OCT, il est donc possible d'obtenir des A-scans sans avoir besoin d'un balayage de la différence de marche dans l'interféromètre. Cette technique permet d'augmenter grandement la vitesse d'acquisition. De plus, il a été montré que le SD-OCT permet d'avoir un gain en sensibilité par rapport au TD-OCT du fait que même les photons rétrodiffusés en dehors du volume de cohérence contribuent au signal [32].

La figure 2.5 présente deux images de rétines (saines), l'une obtenue sur un montage de TD-OCT, l'autre sur un montage de FD-OCT, mettant en évidence le gain en sensibilité de la méthode fréquentielle.

L'utilisation de caméra linéaires CMOS à haute vitesse à permis d'atteindre des vitesses typiques de 120.000 A-scans par seconde en FD-OCT [33], 30 fois plus élevées que celle des implémentations les plus développées de TD-OCT, et 300 fois plus élevées que celles des systèmes typiques de TD-OCT.

Notons que la résolution axiale est identique entre un système de TD-OCT et de FD-OCT si la même source est utilisée [8]. Les sources évoquées précédemment sont donc aussi utilisables en FD-OCT pour atteindre de hautes résolutions axiales.

2.2.3.2.2 Source balayée (SS-OCT)

Cette implémentation, aussi appelée OFDI (pour *optical Fourier domain imaging*), constitue la deuxième génération des systèmes FD-OCT, introduite deux ans après le SD-OCT [34]. Elle est fondée sur exactement le même principe que le SD-OCT, mais sa

8. En considérant que la réponse spectrale du capteur (en TD-OCT) ou le spectromètre (en FD-OCT) ne soit pas limitant par rapport au spectre de la source.

particularité réside dans le fait qu'on n'utilise pas un spectromètre pour isoler les longueurs d'onde, mais une source monochromatique dont la longueur d'onde est balayée au cours du temps. L'équation de l'intensité mesurée sur le capteur en SS-OCT peut donc s'écrire :

$$I_{SS-OCT,int}(t) = \int_{-\infty}^{+\infty} \sqrt{R'_{rd}(\delta)} e^{2i\pi\sigma(t)\delta} \, \mathrm{d}\delta \tag{2.8}$$

$$I_{SS-OCT,int}(t) = TF\left[\sqrt{R'_{rd}(\delta)}\right](t). \tag{2.9}$$

L'intensité est ainsi mesurée au cours du temps sur un capteur ponctuel, et un A-scan est obtenu à partir d'une transformée de Fourier de ce signal variant temporellement.

Un capteur ponctuel peut atteindre des vitesses d'acquisition extrêmement rapides, si bien que l'acquisition d'un A-scan est encore plus rapide qu'en SD-OCT. La limitation en vitesse de la SS-OCT est liée à la vitesse de balayage en longueur d'onde de la source. De nombreuses améliorations ont été développées pour maximiser cette vitesse. Aujourd'hui, l'utilisation de lasers FDML (*Fourier-domain mode locking*) présente de nombreux avantages et permet d'atteindre des vitesses d'acquisition jusqu'à 370.000 A-scans par seconde [35].

Ainsi, une grande partie des systèmes OCT commercialisés actuellement sont des systèmes de SS-OCT. Notons cependant que malgré leurs nombreux avantages, ils nécessitent malgré tout des sources complexes et chères. Par ailleurs, l'étendue axiale (le « champ d'observation » dans la direction axiale) des coupes obtenues en SS-OCT (et plus généralement en FD-OCT) est liée à la profondeur de champ des objectifs utilisés. Ainsi, si l'on désire avoir une coupe d'un échantillon sur une grande profondeur (ce qui est souvent le cas en imagerie médicale), il est nécessaire d'utiliser des objectifs peu ouverts, ou détriment de la résolution latérale du système.

L'annexe C présente des exemples d'applications de l'OCT en contexte clinique. Aujourd'hui, un des grands domaines de développement de l'OCT est la dermatologie. Cependant, les dermatologues nécessitent des images à très hautes résolution (à l'image de la microscopie confocale), souvent difficiles à atteindre en OCT conventionnelle, et nécessitant le développement de nouvelles méthodes. Nos travaux portent sur une telle méthode d'imagerie OCT à très haute résolution pour l'imagerie dermatologique : la microscopie par cohérence optique.

Avant d'entrer dans les détails de cette méthode, notons finalement que l'OCT est aussi parfois utilisée dans des domaines autres que l'imagerie médicale, en particulier dans la recherche en biologie du développement ou en ingénierie des tissus, et sur d'autres échantillons que des tissus biologiques, en particulier dans l'étude d'œuvres d'art ou en recherche sur les matériaux papiers.

2.3 La microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM)

L'OCM repose sur les mêmes principes que l'OCT, les systèmes d'OCM étant des systèmes d'OCT dont les objectifs ont des ouvertures numériques assez grandes pour avoir une résolution latérale de l'ordre du micron, similaire à celle d'un microscope conventionnel. Pour des applications où une qualité d'imagerie histologique est nécessaire, l'utilisation de systèmes OCM est indispensable pour se rapprocher au mieux des images obtenues en histologie conventionnelle, avec un microscope conventionnel.

L'OCM peut ainsi être implémentée sur un système TD-OCT ou FD-OCT, cependant comme on l'a vu précédemment, l'utilisation d'objectifs à grandes ouvertures numériques limite l'étendue axiale des coupes obtenues en FD-OCT. Malgré tout, une faible étendue axiale n'empêche pas d'obtenir des coupes en face autour de la position de focalisation de l'objectif utilisé. L'OCM a ainsi été implémenté en FD-OCT de cette manière [36], cependant, les avantages du FD-OCT par rapport au TD-OCT sont fortement réduits : le FD-OCT n'a pas une meilleure sensibilité que le TD-OCT pour l'imagerie d'une coupe en face [37], et en FD-OCT, pour obtenir une image en face, il sera toujours nécessaire d'obtenir une image 3D (sur une profondeur faible) et de la recouper, tandis qu'un système TD-OCT peut produire une image en coupe à une profondeur donnée en maintenant la surface de référence fixe et en utilisant un modulateur de phase dans le bras de référence[38]. Les vitesses d'acquisition peuvent ainsi être plus rapides pour l'OCM dans le domaine temporel, limitées uniquement par la vitesses maximale du balayage du faisceau dans les deux directions (x, y) pour reconstituer l'image en face.

Si des images en coupe verticale sont voulues, en FD-OCM il est nécessaire d'utiliser des méthodes différentes de celles utilisées en FD-OCT conventionnelle. Il est par exemple possible d'obtenir des coupes de faible étendue axiale à différentes profondeurs et de les recombiner (on parle souvent de *stitching*, couture en Anglais) [9]. L'obtention des coupes à différentes profondeurs peuvent être obtenues par refocalisation du faisceau d'éclairage (technique nommée *Gabor-domain OCM* [43]), ou par l'utilisation de plusieurs faisceaux focalisés à des profondeurs différentes [44]. En TD-OCT par contre, comme on l'avait vu, le balayage axial présent peut permettre de s'affranchir de la nécessité d'une grande profondeur de champ, et des images en coupe verticale ayant une résolution microscopique peuvent ainsi être obtenues en TD-OCM exactement de la même manière que des images en coupe verticale en TD-OCT [45]. Cependant, la vitesse d'acquisition est alors limitée, comme en TD-OCT, par la vitesse de refocalisation et de la translation mécanique de la surface de référence. Des méthodes pour maximiser la vitesse du TD-OCM en coupe verticale ont été développées, par l'utilisation de miroirs MEMS [46] ou de fibres focalisant simultanément à différentes positions dans l'échantillon [47], mais le TD-OCM à haute vitesse en imagerie en coupe verticale, et encore plus en imagerie 3D, reste compliqué à implémenter.

L'imagerie en face reste ainsi la plus appropriée à l'OCM, et l'acquisition dans le domaine temporel, si elle est aujourd'hui largement négligée en OCT, reste en OCM une méthode aussi efficace, voire plus, que l'acquisition dans le domaine fréquentiel si des coupes en face sont désirées. Pour l'imagerie de coupes verticales ou l'imagerie 3D, l'acquisition

9. D'autres méthodes existent pour augmenter l'étendue axiale, comme l'utilisation de faisceaux de Bessel [39], de masques de phase [40], de modulateur acousto-optiques [41], ou par des approches numériques de reconstruction inspirées de l'holographie [42], mais elles sont relativement marginalement utilisées.

dans le domaine temporel est aussi plus simple à implémenter que celle dans le domaine fréquentiel, mais souffre de sa vitesse d'acquisition.

Une des limitations de la vitesse d'acquisition du TD-OCM est la nécessité d'un balayage latéral dans les deux directions (x, y) couplé à une refocalisation dynamique. Afin de s'affranchir du balayage latéral, une stratégie, proposée pour la première fois en 1998 [48], consiste à paralléliser l'éclairage et la détection, autrement dit à éclairer tout le champ au lieu d'éclairer un unique point, et utiliser un capteur en deux dimensions (autrement dit, une caméra). De cette manière, on image en parallèle un ensemble de points de l'échantillon au lieu de les imager individuellement par un balayage du faisceau, et il est alors possible d'obtenir des images en face sans balayage, et directement des images 3D par refocalisation dynamique. Du fait de l'éclairage de tout le champ que l'on souhaite imager, cette implémentation de l'OCM est appelée OCM plein champ, ou *full-field OCM* en Anglais (FF-OCM). On la retrouve aussi souvent sous le nom d'OCT plein champ (ou FF-OCT pour *full-field optical coherence tomography*), bien qu'il s'agisse toujours d'une méthode d'OCM [10]. On peut voir la FF-OCM comme une méthode de microscopie conventionnelle (où l'on éclaire toujours tout le champ des échantillons à observer, généralement avec un éclairage de Köhler, voir annexe A.3) qui aurait la capacité d'imager les échantillons en profondeur.

La FF-OCM peut être vue comme une adaptation de la technique d'interférométrie cohérente à balayage (ou CSI pour *coherence scanning interferometry* en Anglais) à l'imagerie d'échantillons biologiques. Des montages de CSI de résolution microscopique, fondamentalement identiques à ceux utilisés en FF-OCM, ont été conçus dès la fin des années 1980 [50, 51], mais jusqu'à l'introduction de la FF-OCM, la CSI était quasi-uniquement développée pour des application de caractérisation de matériaux (mesures topographiques des surfaces) [52, 53].

C'est à la FF-OCM que nous allons à présent nous intéresser, et c'est cette implémentation de l'OCM qui constitue le socle de nos travaux.

2.3.1 Cadre théorique

2.3.1.1 Interférences en FF-OCM

Contrairement à l'OCT conventionnelle, les montages de FF-OCM n'utilisent habituellement pas de fibres optiques, du fait que l'utilisation de celles-ci est intrinsèquement liée à une imagerie point par point. Nous considérerons donc comme montage FF-OCM de référence un interféromètre de Michelson en espace libre, avec un objectif *de microscope* dans chacun des bras. Un tel interféromètre est appelé *interféromètre de Linnik*. Notons qu'il est nécessaire de placer un objectif non seulement dans le bras objet pour avoir une haute résolution latérale, mais aussi dans le bras de référence du fait de l'éclairage spatialement incohérent [11] (les rayons interférant devant être issus du même point de la source et donc avoir suivi exactement le même parcours dans les deux bras de l'interféromètre). Le fait de placer un objectif dans le bras de référence permet également de compenser la *dispersion* introduite par l'objectif dans le bras objet (la même épaisseur de verre ne serait sinon pas traversée par les deux faisceaux interférant, résultant en des problèmes que nous

10. Le terme FF-OCM se réfère à une méthode d'OCM dans le domaine temporel, mais notons que des implémentations de FD-OCM (SS-OCM) avec un éclairage « plein champ » ont aussi été étudiées [49].

11. Un éclairage spatialement incohérent est nécessaire pour avoir une bonne qualité d'image en microscopie en éclairage plein champ, voir annexe A.

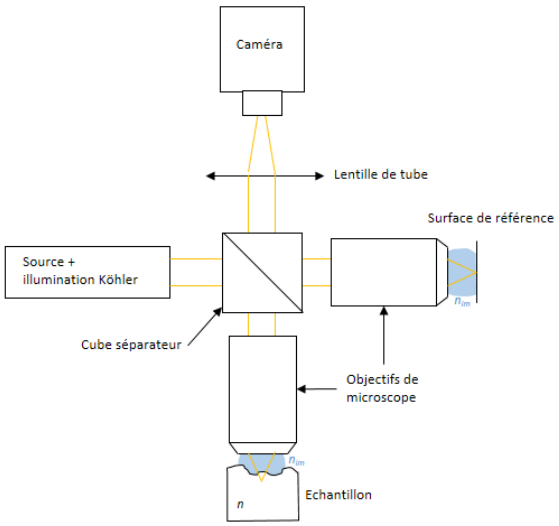

FIGURE 2.6 – Schéma d'un montage de FF-OCM utilisant un interféromètre de Linnik et des objectifs de microscope à immersion.

évoquerons plus loin).

Cet interféromètre est représenté en figure 2.6, en considérant des objectifs de microscope ne travaillant pas nécessairement dans l'air mais pouvant avoir un milieu d'immersion d'indice n_{im} (voir annexe A). Bien que ce montage soit le plus couramment utilisé en FF-OCM, il existe aussi d'autres montages que nous évoquerons plus loin.

Notons que ce montage est équivalent au montage de la figure A.16, mais avec un objectif de microscope supplémentaire. Cela met en évidence qu'il est relativement aisé de construire un montage de FF-OCM à partir d'un microscope en réflexion conventionnel.

En FF-OCM, tout se passe comme si l'on avait plusieurs systèmes de TD-OCT en parallèle, et finalement, l'intensité mesurée au niveau du capteur de la caméra est la suivante :

$$I_{FF-OCM}(X',Y') = \frac{I_0}{4}\left(R_{incoh} + R_{ref} + 2\sqrt{R_{ref}}\left[\iiint_{V_{OCT}(X,Y,Z_0)} \sqrt{R'_{rd}(x,y,z)}\,\gamma(\delta(z))\,\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta(z))\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y\,\mathrm{d}z \right] \right). \quad (2.10)$$

Cette formule est identique à celle présentée précédemment pour le TD-OCT (équation 2.2), à la différence près qu'on obtient une distribution d'intensité en deux dimensions sur le capteur, chaque point (X',Y') du capteur correspondant à un volume V_{OCT} différent, centré en $(X,Y,Z_0) = (\frac{X'}{G},\frac{Y'}{G},Z_0)$ au niveau de l'échantillon, avec G le grandissement du microscope formé par le système FF-OCM (voir équation A.1), et Z_0 la position de la différence de marche nulle entre les deux bras.

On peut ainsi voir un système FF-OCM comme une multitude de systèmes de TD-OCM en parallèle, à une différence près : en FF-OCM, il ne peut pas y avoir de filtrage confocal, la détection « plein champ » impliquant de récupérer la lumière provenant de tous les points du champ simultanément. Ainsi, bien qu'en OCM la part de R_{incoh} dans

la formule précédente devrait être très faible du fait de la proximité entre le voxel de résolution de l'objectif et celui du système OCT (voir partie 2.2.2), en FF-OCM, chaque « détecteur » (en fait, chaque pixel de la caméra) récupère de la lumière provenant de toutes les « couches » de l'échantillons du fait de l'absence de filtrage confocal, et la part de R_{incoh} est en fait très importante.

Afin de manipuler l'équation 2.10 plus aisément, nous pouvons la simplifier en considérant que le résultat de l'intégrale (terme entre crochets) est en fait équivalent à ce qui serait mesuré pour une distribution de particules unique dans le plan (X, Y), ayant toutes une certaine position Z (et donc une certaine différence de marche δ_{ech} avec le bras de référence) et un certain ratio d'intensité rétro-diffusée et récupérée par l'objectif de microscope R_{ech}, ces particules uniques (« effectives ») représentant le résultat de l'effet de l'ensemble des particule contenue dans les différents volumes V_{OCT} sondés simultanément (aux différentes positions (X, Y)). Dans la suite, on notera par ailleurs $I_{FF-OCM} = I$. L'équation devient alors similaire à l'équation 2.1 :

$$I(X', Y') = \frac{I_0}{4}\left(R_{incoh} + R_{ref} + 2\sqrt{R_{ref}}\sqrt{R_{ech}(X, Y)}\gamma(\delta_{ech})\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta_{ech})\right). \tag{2.11}$$

On utilisera aussi la forme plus compacte suivante :

$$I(X', Y') = \overline{I} + A(X, Y)M(\delta_{ech}), \tag{2.12}$$

avec $\overline{I} = \frac{I_0}{4}(R_{incoh} + R_{ref})$, $A(X, Y) = \frac{I_0}{2}\sqrt{R_{ref}}\sqrt{R_{ech}(X, Y)}$ et $M(\delta_{ech}) = \gamma(\delta_{ech})\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta_{ech})$. Notons que $A(X, Y)M(\delta_{ech})$ constitue le *terme d'interférences* de I. L'amplitude de ce terme est A tandis que sa phase est $\Phi = 2\pi\overline{\sigma}\delta_{ech}$.

La différence de marche δ_{ech} est liée à la position Z de la particule unique effective considérée pour la position (X, Y) (dépendant elle-même de la distribution de particules contenues dans le volume V_{OCT} sondé à la position (X, Y)). Pour une particule effective donnée et selon les grandeurs définies à la figure 2.7, on a :

$$\delta_{ech} = 2\left(\left[n_{im}(d - Z) + Zn\right] - n_{im}d\right) \tag{2.13}$$

$$\delta_{ech} = 2Z(n - n_{im}). \tag{2.14}$$

Comme expliqué précédemment, le volume V_{OCT} sondé est centré en (X, Y, Z_0) avec Z_0 la position de la différence de marche nulle. Dans la formule précédente, la différence de marche n'est nulle que si $Z = 0$ (on sonde la surface de l'échantillon, ce qui a peu d'intérêt), ou $n = n_{im}$ (cas particulier). Pour pouvoir sonder la position axiale que l'on souhaite, la seule variable que l'on va pouvoir ajuster est l'épaisseur du milieu d'indice n_{im} traversé dans le bras objet [12], en modifiant la position axiale de l'échantillon ou en modifiant la position de l'objectif du bras objet (il faut alors modifier la position de l'objectif et de la surface de référence d'une quantité équivalente pour ne pas affecter l'épaisseur d'air traversée avant les objectifs). Ces deux cas sont formellement identiques, et en prenant en compte un déplacement (de l'objectif ou de l'échantillon) Δz, *compté positivement quand l'échantillon se rapproche de l'objectif* (voir figure 2.7), la différence de marche s'écrit alors :

12. On pourrait aussi jouer sur la différence d'épaisseur d'air traversée entre les deux bras (avant d'entrer dans les objectifs), mais cette méthode pose des problèmes de dispersion que nous évoquerons plus loin.

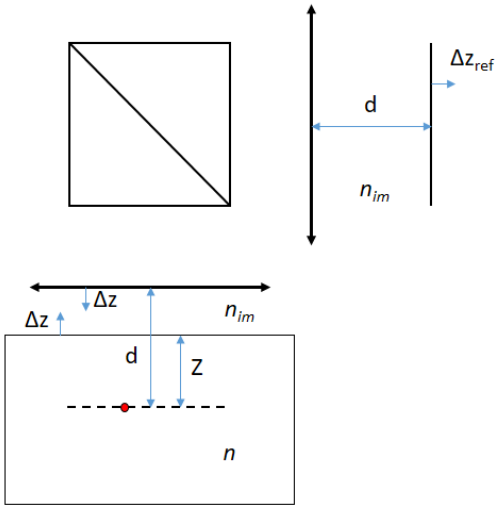

FIGURE 2.7 – Définition des grandeurs utiles pour le calcul de la différence de marche entre une particule unique effective à une position (X, Y) donnée et la surface de référence.

$$\delta_{ech} = 2\left(\left[n_{im}(d - Z - \Delta z) + Zn\right] - n_{im}d\right) \tag{2.15}$$

$$\delta_{ech} = 2(Z(n - n_{im}) - \Delta z n_{im}). \tag{2.16}$$

Ainsi, pour n'importe quel Z, il existe une valeur de Δz telle que la différence de marche entre la particule en Z et la surface de référence est nulle, donnée par :

$$\Delta z = Z\left(\frac{n}{n_{im}} - 1\right). \tag{2.17}$$

Pour sonder une profondeur Z dans l'échantillon, il faut donc physiquement déplacer l'échantillon ou l'objectif d'une quantité $Z + Z\left(\frac{n}{n_{im}} - 1\right) = Z\left(\frac{n}{n_{im}}\right)$ en prenant comme origine la surface de l'échantillon, lorsque celle-ci est à la différence de marche nulle avec la surface de référence (à une distance d de l'objectif du bras objet).

Ce raisonnement a été fait pour une particule effective unique. Afin de donner une formule pour δ_{ech} dépendant du champ, il convient de réécrire la différence de marche sous une forme légèrement différente. En effet, quelle que soit la position considérée dans le champ, la même épaisseur de milieu d'indice n_{im} est traversée entre l'objectif du bras objet et l'échantillon. Afin de prendre cela en compte, nous allons considérer une épaisseur e, indépendante du champ, correspondant à la profondeur à laquelle l'objectif vient sonder l'échantillon. Pour chaque point du champ, on a alors un Z différent qui pourra s'écrire $Z(X, Y) = e + \delta e(X, Y)$. La différence de marche s'écrit alors :

$$\delta_{ech}(X, Y) = 2\left(\left[n_{im}(d - e - \Delta z) + (e + \delta e(X, Y))n\right] - n_{im}d\right) \tag{2.18}$$

$$\delta_{ech}(X, Y) = 2(e(n - n_{im}) + \delta e(X, Y)n - \Delta z n_{im}). \tag{2.19}$$

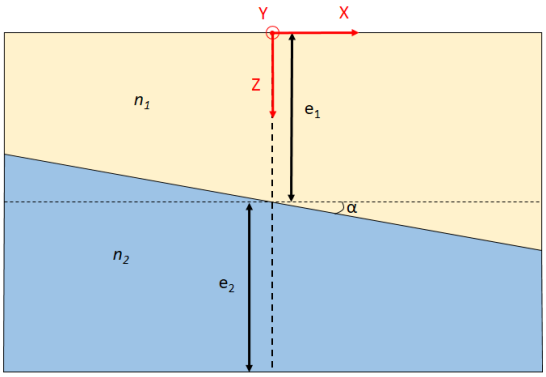

FIGURE 2.8 – Schéma de l'échantillon considéré pour illustrer le cas des interférences en FF-OCM.

Notons qu'en toute rigueur, e est une fonction du champ si la surface de l'échantillon et la surface de référence ne font pas un angle identique avec l'axe optique (considéré à 90° sur la figure 2.7).

Afin d'illustrer le cas des interférences en FF-OCM, considérons un échantillon simple, constitué de deux couches d'indices n_1 et n_2, avec une interface entre les deux couches faisant un certain angle α avec la surface de l'échantillon, considérée plate (tout comme la surface de référence). Cet échantillon est illustré sur la figure 2.8.

Considérons que l'on veut sonder l'interface entre les deux couches. On s'enfonce donc dans l'échantillon d'une quantité $e_1\left(\frac{n_1}{n_{im}}\right)$. La différence de marche en fonction du champ vaut alors $\delta_{ech}(X,Y) = 2\delta e_1(X,Y)n_1$.

On s'intéresse simplement à une interface, $\delta e(X,Y)$ est donc une fonction linéaire selon X, s'annulant en $X = 0$: $\delta e_1(X,Y) = K\,X$, avec $K = \tan(\alpha)$.

L'interférogramme mesuré sur la caméra s'écrit donc :

$$I(X',Y') = \overline{I} + A\,\gamma(2n_1\tan(\alpha)X)\,\cos(4\pi\overline{\sigma}n_1\tan(\alpha)X), \tag{2.20}$$

A étant une constante, étant donné que l'on s'intéresse à une interface entre deux milieux, de coefficient de réflexion fixe [13].

Comme expliqué précédemment, γ est fixé par la largeur spectrale de la source. Comme on le voit, c'est cette fonction qui va déterminer sur quelle zone on observe des franges d'interférences (associées au terme $\cos(4\pi\overline{\sigma}n_1\tan(\alpha)X)$). La figure 2.9 représente schématiquement cette zone en représentant la « délimitation » des interférences due à la fonction γ, considérée gaussienne dans ce schéma, en 3 dimensions.

Finalement, l'allure de l'interférogramme mesuré par la caméra est représentée sur la figure 2.10 (simulation numérique). La source est considérée comme ayant un spectre gaussien (en σ), γ est donc aussi une gaussienne (la transformée de Fourier d'une fonction gaussienne étant une fonction gaussienne).

Dans cet interférogramme, notons bien qu'une frange correspond à un déplacement axial de $\frac{1}{2\overline{\sigma}n_1} = \frac{\overline{\lambda}}{2n_1}$ par rapport à la différence de marche nulle. Les franges sont plus « resserrées » si α augmente. Le nombre de franges, quant à lui, dépend uniquement de

13. $R_{ech} = \left(\frac{n_1-n_2}{n_1+n_2}\right)^2$ en considérant un éclairage en incidence normale.

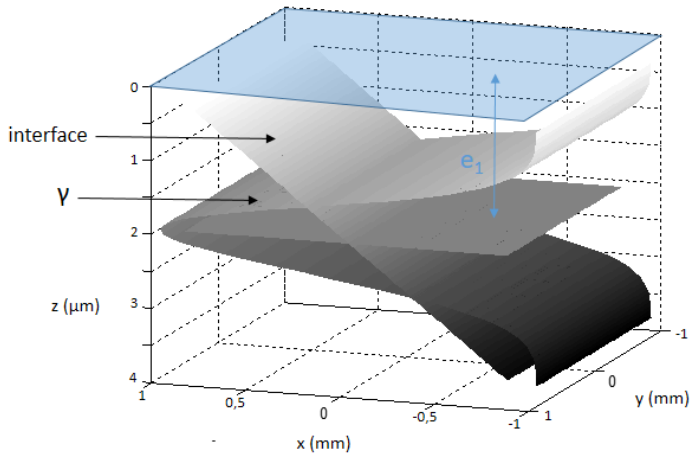

FIGURE 2.9 – Schéma de la fonction γ délimitant la zone dans laquelle on mesure des franges d'interférences, à l'interface entre les deux couches de l'échantillon considéré.

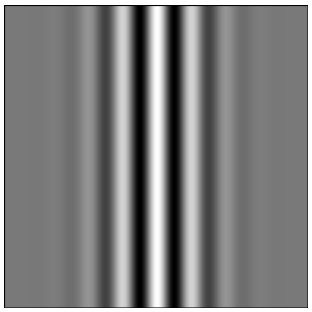

FIGURE 2.10 – Allure de l'interférogramme mesuré sur la caméra à l'interface entre les deux couches de l'échantillon (simulation numérique).

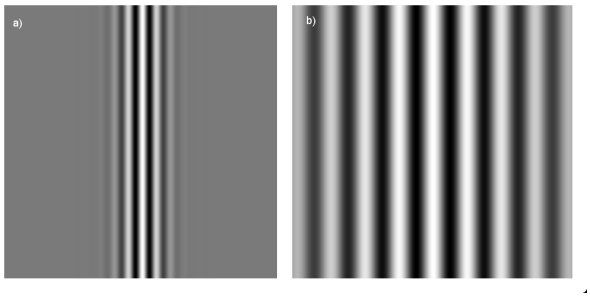

FIGURE 2.11 – Allures des interférogrammes mesurés sur la caméra à l'interface entre les deux couches de l'échantillon, pour a) une interface pour laquelle α est supérieur au cas de la figure 2.10, la source ayant un spectre identique et b) une source dont le spectre est plus fin qu'au cas de la figure 2.10, α étant identique (simulations numériques).

la largeur de γ , et donc de la largeur spectrale de la source. La figure 2.11 représente un cas où α est augmenté par rapport au cas de la figure 2.10, ainsi qu'un cas où le spectre de la source est plus fin qu'à la figure 2.10, résultant en une augmentation du nombre de franges.

Notons finalement que si l'on veut balayer l'intégralité de l'échantillon en profondeur, il faudra déplacer axialement l'objet ou l'objectif d'une quantité $e_1\left(\frac{n_1}{n_{im}}\right) + e_2\left(\frac{n_2}{n_{im}}\right)$.

2.3.1.2 Interférométrie à décalage de phase

2.3.1.2.1 Imagerie tomographique

Après l'acquisition d'images *interférométriques* par la caméra d'un système FF-OCM, il convient maintenant de s'intéresser à la façon dont une image *tomographique*, représentant l'échantillon, va pouvoir être extraite des informations interférométriques.

La grandeur donnant accès à une image tomographique en face de l'échantillon autour d'une position de la différence de marche nulle Z_0 donnée est $R_{ech}(X,Y)$. Cette information est contenue dans le terme $A(X,Y) \propto \sqrt{R_{ech}(X,Y)}$, qui constitue l'amplitude du terme d'interférences (l'« enveloppe » des franges d'interférences) de l'intensité mesurée par la caméra.

La technique la plus courante pour extraire ce terme en FF-OCM (on parle de *démodulation*, sachant qu'on veut finalement obtenir une information sur l'enveloppe des franges d'interférences) est d'utiliser une méthode d'*interférométrie à décalage de phase*, qui consiste à acquérir un certain nombre d'images interférométriques dont on décale volontairement la phase d'une image à l'autre, puis de les recombiner selon un certain algorithme permettant de mesurer uniquement $A(X,Y)$.

Le décalage de phase est généralement fait en modifiant la position de la surface de référence. Comme on le verra, les décalages de phase nécessaires impliquent des décalages sur des distances très faibles n'imposant pas de refocalisation dynamique. Modifier la position de la surface de référence d'une quantité Δz_{ref} implique une modification de la différence de marche entre les deux bras, qui devient alors :

$$\delta'_{ech} = \delta_{ech}(X,Y) + 2n_{im}\Delta z_{ref}, \tag{2.21}$$

en comptant Δz_{ref} positivement lorsque la surface de référence s'éloigne de l'objectif de référence (voir figure 2.7).

L'intensité mesurée par la caméra devient alors :

$$I(X',Y') = \overline{I} + A(X,Y)\,\gamma(\delta'_{ech}(X,Y))\,\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta'_{ech}(X,Y)) \tag{2.22}$$

$$I(X',Y') = \overline{I} + A(X,Y)\,\gamma(\delta'_{ech}(X,Y))\,\cos\left([2\pi\overline{\sigma}\delta_{ech}(X,Y)] + [4\pi\overline{\sigma}n_{im}\Delta z_{ref}]\right) \tag{2.23}$$

$$I(X',Y') = \overline{I} + A(X,Y)\,\gamma(\delta'_{ech}(X,Y))\,\cos\left(\Phi(X,Y) + \phi\right), \tag{2.24}$$

ϕ constituant ainsi le décalage de phase introduit par le décalage de la surface de référence.

L'algorithme le plus couramment utilisé en FF-OCM est l'algorithme de Wyant [54], qui exploite quatre images interférométriques $I_{k=1,2,3,4}$, entre lesquelles la phase est incrémentée de $\frac{\pi}{2}$: $\phi_{k=1,2,3,4} = (k-1)\frac{\pi}{2}$. Notons que cette incrémentation correspond à un décalage de la surface de référence de $\frac{\overline{\lambda}}{8n_{im}}$, soit une très faible distance, λ étant en général de l'ordre d'un micron et n_{im} étant généralement compris entre 1 et 1.5.

On montre alors qu'on a [14]

$$R_{ech}(X,Y) \propto (I_1(X',Y') - I_3(X',Y'))^2 + (I_2(X',Y') - I_4(X',Y'))^2 \tag{2.25}$$

La figure 2.12 illustre le processus de démodulation par décalage de phase à partir de l'exemple de l'échantillon étudié à la partie 2.3.1.1. On se référera à cette méthode de démodulation sous l'appellation « démodulation pas à pas », du fait qu'on utilise des images obtenues successivement à chaque « pas » de la surface de référence.

Il est cependant techniquement compliqué de déplacer la surface de référence précisemment sur des distances de l'ordre de quelques fractions de la longueur d'onde centrale d'éclairage, en particulier à haute cadence. En pratique, la phase introduite ne sera donc pas toujours de $\frac{\pi}{2}$, entrainant des erreurs de démodulation et affectant la qualité des images.

Des algorithmes ont ainsi été développés pour être insensibles aux erreurs de phase. Afin de ne pas affecter la vitesse d'acquisition des images tomographiques en utilisant des algorithmes nécessitant de nombreuses images interférométriques, on retiendra principalement deux algorithmes insensibles aux erreurs de phase nécessitant peu d'images interférométriques [15] :

1. L'algorithme de Carré [55], nécessitant seulement 4 images, tout comme l'algorithme conventionnel, mais dont le calcul est plus compliqué.

$$R_{ech} \propto [3(I_2 - I_3) - (I_1 - I_4)][(I_2 - I_3) + (I_1 - I_4)] + [(I_2 + I_3) - (I_1 + I_4)]^2. \tag{2.26}$$

2. L'algorithme de Larkin [56], nécessitant une image de plus (sans erreur de phase, cette image de plus est associée à un décalage de phase $\phi_5 = 2\pi$), mais dont le calcul est aussi simple que celui de l'algorithme conventionnel.

$$R_{ech} \propto (I_2 - I_4)^2 + (I_1 - I_3)(I_3 - I_5). \tag{2.27}$$

14. En toute rigueur, cet algorithme ne donne pas exactement $R_{ech}(X,Y)$: formellement, il extrait $R_{ech}(X,Y)\gamma(\delta_{ech}(X,Y))^2$. Cependant, en raison de la variation relativement rapide de γ en lumière blanche, le terme $A(X,Y)\,\gamma(\delta_{ech}(X,Y))^2$ qui devrait être extrait par l'algorithme varie d'une image à l'autre, du fait de la variation de $\delta_{ech}(X,Y)$. Ainsi, une grandeur légèrement différente de $A(X,Y)\,\gamma(\delta_{ech}(X,Y))^2$ est extraite. Cependant dans un échantillon biologique, on peut généralement finalement considérer que l'algorithme donne un résultat simplement proportionnel à $R_{ech}(X,Y)$, comme présenté dans l'equation 2.25.

15. Pour des raisons de lisibilité, on ne notera plus la dépendance des termes en (X,Y) et (X',Y') dans les équations qui suivent.

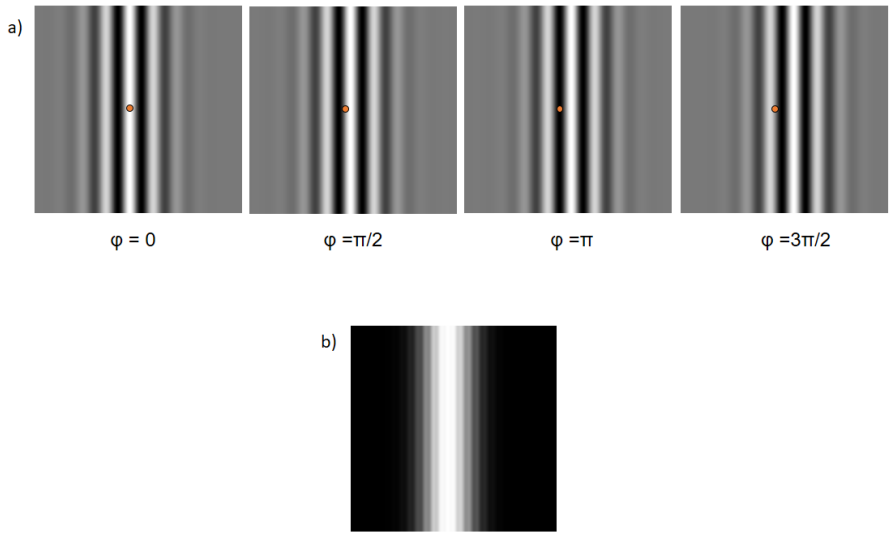

FIGURE 2.12 – a) Allure des quatre images interférométriques décalées en phase mesurées par la caméra, avec un point de référence, à la même position dans les quatre images, et b) résultat de l'algorithme de Wyant appliqué sur ces quatre images.

La figure 2.13 représente la démodulation pas à pas de l'échantillon considéré à la partie 2.3.1.1 en considérant les trois algorithmes (Wyant, Carré, Larkin) pour un cas sans erreur de phase et un cas avec un déphasage de $\frac{\pi}{4}$ à la place de $\frac{\pi}{2}$ entre les images interférométriques.

Une autre stratégie pour limiter les erreurs de phases consiste à remplacer le mouvement « pas à pas » de la surface de référence par un mouvement sinusoïdale, qui reste robuste à haute cadence. Dans ce cas, l'intensité mesurée par la caméra peut alors s'écrire, en fonction du temps :

$$I(X',Y',t) = \overline{I} + A(X,Y)\,\gamma(\delta'_{ech}(X,Y,t))\,\cos\left(\Phi(X,Y) + \psi\sin(2\pi\frac{t}{T} + \theta)\right), \qquad (2.28)$$

avec ψ l'amplitude de la variation de la position de la surface de référence, T sa période et θ son décalage à l'origine.

En démodulation pas à pas, l'intensité était indépendante du temps. En démodulation sinusoïdale, la dépendance temporelle implique de bien prendre en compte la façon dont les images sont acquises par la caméra : celle-ci intègre l'intensité incidente sur son capteur durant un certain temps T_{int}, son temps d'intégration. Une image acquise par la caméra pour une intensité variant en fonction du temps correspond donc à :

$$E(X',Y') = \eta\int_0^{T_{int}} I(X',Y',t)\mathrm{dt}, \qquad (2.29)$$

avec η l'efficacité quantique du capteur (efficacité de la conversion des photons en électrons).

Dans le cas de la démodulation sinusoïdale, on peut montrer qu'en sélectionnant un bon couple de valeur (ψ,θ) et en acquérant 4 images sur une période d'oscillation de la

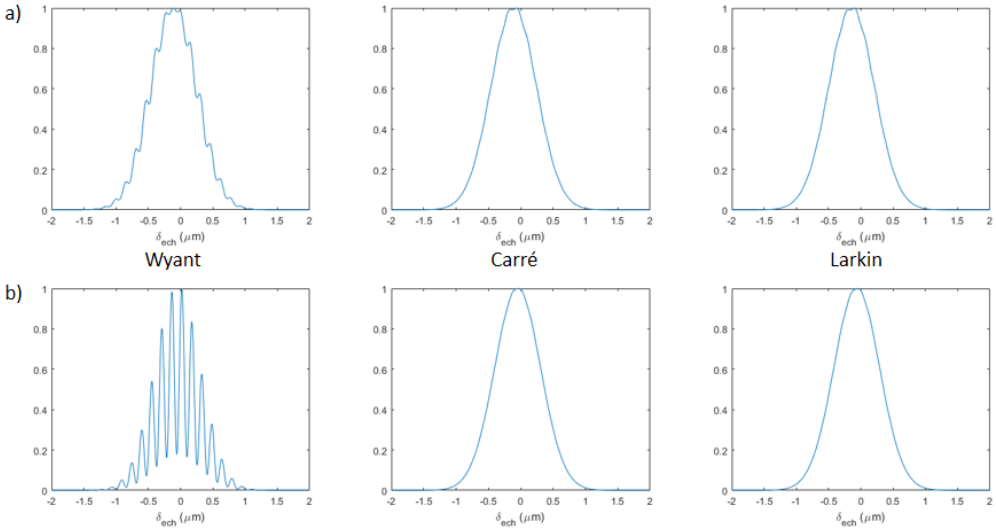

FIGURE 2.13 – Allure des enveloppes démodulées (en coupe) avec les trois algorithmes de Wyant, Carré et Larkin pour a) un déphasage de $\frac{\pi}{2}$ entre chaque image interférométriques et b) un déphasage de $\frac{\pi}{4}$.

surface de référence [16], on peut alors extraire R_{ech} selon l'algorithme suivant :

$$R_{ech} \propto (E_1 - E_2)^2 + (E_3 - E_4)^2. \tag{2.30}$$

La figure 2.14 représente le mouvement de la surface de référence au cours du temps ainsi que les périodes d'acquisition des différentes images par la caméra.

Il a été montré que le couple $(\psi, \theta) = (2.45, 0.96)$ permet une bonne démodulation du signal interférométrique. Cependant un autre couple de valeur très intéressant est le couple $(\psi, \theta) = \left(2.073, \frac{\pi}{4}\right)$ [57], qui permet aussi une bonne démodulation par l'algorithme présenté, mais entraîne $E_1 = E_3$, ce qui assure que la démodulation est bonne même si l'image considérée comme étant E_1 n'est pas celle qui a été acquise entre $t = 0$ et $t = \frac{T}{4}$. En pratique cette démodulation efficace quelle que soit l'image considérée comme « initiale » est très utile.

La démodulation n'est cependant pas aussi bonne en démodulation sinusoïdale qu'en démodulation pas à pas. La figure 2.15 représente la démodulation obtenue pour l'échantillon considérée à la partie 2.3.1.1.

Il est à noter que dans le cas des échantillons biologiques, une démodulation pas tout à fait parfaite n'affecte globalement pas la qualité des images, si bien que la démodulation sinusoïdale donne des résultats aussi bons que la démodulation pas à pas, et l'utilisation d'algorithmes corrigeant les erreurs de pas n'est pas absolument fondamentales. Des algorithmes de démodulation à deux images ont même été utilisés en FF-OCM pour l'imagerie d'échantillons biologiques en donnant des images correctes. L'algorithme de démodulation à deux images soustrait simplement deux images déphasées de π, ce qui résulte en une suppression du terme $\overline{I}$, mais pas en une extraction de l'enveloppe des franges : il y a donc toujours des franges résiduelles, mais celle-ci sont finalement très peu perceptibles dans un

16. On a alors $E_{k=1,2,3,4} = \eta \int_{(k-1)\frac{T}{4}}^{k\frac{T}{4}} I(X', Y', t)\mathrm{d}t$.

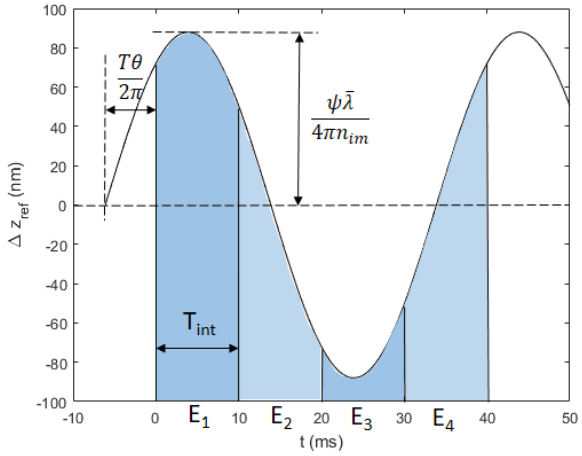

FIGURE 2.14 – Déplacement Δz_{ref} de la surface de référence en fonction du temps pour une demodulation sinusoïdale, et périodes d'acquisition des images par la caméra. On considère une source de longueur d'onde centrale 600 nm, un objectif à immersion dans l'eau, une période d'oscillation de 40 ms et le couple de valeurs $(\psi, \theta) = (2.45, 0.96)$.

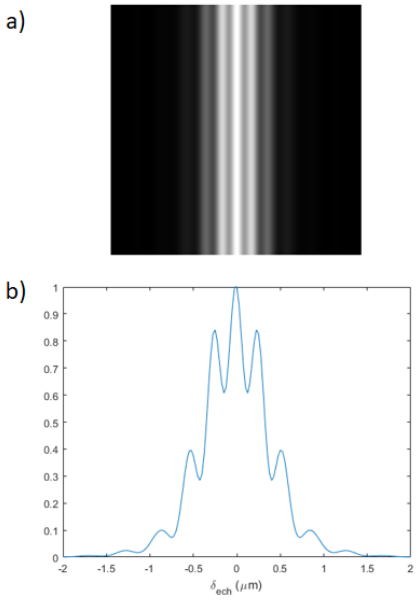

FIGURE 2.15 – a) Allure d'une image en face démodulée sinusoïdalement et b) coupe dans cette image.

échantillon biologique. L'intérêt de cette technique est d'augmenter la vitesse d'acquisition des images tomographiques.

Si l'on souhaite obtenir une image 3D d'un échantillon, la marche à suivre est en général la suivante : se placer à une position dans l'échantillon en déplaçant l'échantillon ou les objectifs, déplacer la surface de référence (pas à pas ou sinusoïdal) pour obtenir plusieurs images interférométriques, appliquer l'algorithme pour obtenir une image tomographique, puis répéter le processus en se plaçant un peu plus en profondeur dans l'échantillon, et ainsi de suite jusqu'à avoir une pile d'images tomographiques formant une image 3D de l'échantillon.

La figure 2.16 représente une coupe verticale reconstitué à partir d'une acquisition 3D de l'échantillon simple considéré dans la partie 2.3.1.1 [17]. Une remarque importante est qu'on retrouve, pour une interface, la fonction γ^2 dans la direction axiale. Contrairement aux cas des images en face, sa largeur est toujours la même dans la direction axiale : en prenant en compte une ligne dans l'image en coupe verticale (un A-scan), on considère un unique point à la position (X, Y) dans l'échantillon. Si la position axiale de l'interface associée à ce point est Z, sa différence de marche est donnée par l'équation 2.16. L'interférogramme obtenue dans la direction axiale s'écrit donc :

$$I(\Delta z) = \overline{I} + A\,\gamma(2(Z(n - n_{im}) - \Delta z n_{im}))\,\cos(4\pi\overline{\sigma}[(Z(n - n_{im}) - \Delta z n_{im})]). \qquad (2.31)$$

On voit ainsi que pour tout point, la mesure de l'amplitude donne dans la direction axiale la fonction γ [18], centré au niveau de la position de l'interface (Z) et de largeur indépendante du point considéré (affectée cependant par la valeur de n_{im}). Notons aussi que, dans la direction axiale, une frange d'interférence correspond à un déplacement Δz de :

$$i = \frac{\overline{\lambda}}{2n_{im}}. \qquad (2.32)$$

2.3.1.2.2 Imagerie topographique

Si c'est l'imagerie de l'amplitude du terme d'interférence qui nous intéresse en imagerie tomographique, il est aussi possible à partir des images interférométriques obtenues en FF-OCM d'extraire la phase Φ du terme d'interférence, simplement en combinant les images interférométriques selon un algorithme différent. Tous les algorithmes extrayant l'amplitude ont un algorithme associé extrayant la phase [58]. Cependant, la phase varie bien plus rapidement que l'amplitude, et des erreurs de décalage de phase entre les images interférométriques affectent les mesures de phase bien plus que les mesures d'amplitude. Par ailleurs, la phase est plus compliqué à mesurer précisémment en lumière blanche qu'en lumière monochromatique, et des algorithmes adaptés à l'imagerie en lumière blanche doivent être utilisés, d'autant qu'on utilise souvent l'imagerie de phase pour avoir une information extrêmement précise (justement du fait de la variation rapide de la phase) en particulier pour les mesures *topographiques*, c'est à dire les mesures de surfaces d'échantillons (et d'interface entre des couches dans un échantillon structuré). Cependant, comme on l'a évoqué

17. Ainsi, en OCT conventionnelle, une image en face (C-scan) est obtenue à partir d'une recoupe dans une image 3D, tandis qu'en FF-OCM, ce sont les images en coupe verticale (B-scan) qui sont obtenues à partir de recoupe dans les images 3D.

18. Et les algorithmes donnant le carré de l'amplitude pour être proportionnel à R_{ech}, ceux ci donnent γ^2

FIGURE 2.16 – Allure d'une image en coupe verticale de l'échantillon de la partie 2.3.1.1 (simulation numérique). On néglige la perte de lumière due à la traversée des couches de l'échantillon, ainsi que les problèmes de dispersion.

précédemment, la FF-OCM se base sur le même principe que la CSI, qui est une technique dont la principale application est l'imagerie topographique, et qui s'intéresse ainsi à l'extraction de la phase plutôt que de l'amplitude du termes d'interférences. L'étude de l'imagerie topographique en FF-OCM revient ainsi simplement à appliquer les méthodes de mesures de la phase développée en CSI, les montages de FF-OCM et de CSI étant fondamentalement identiques.

Des algorithmes insensibles aux erreurs de phase pour obtenir des images topographiques avec un grand degré de précision ont ainsi été développés en CSI. On retiendra deux algorithmes qui ont été prouvés robustes aux erreurs de phase et fonctionnant en lumière blanche sans nécessiter d'opérations supplémentaires après avoir obtenu le résultat de l'algorithme, en dehors du dépliement de la phase, de toute façon toujours nécessaire lorsqu'on image la phase [58] :

1. L'algorithme de Larkin [56], l'algorithme de démodulation de phase associé à celui déjà vu en démodulation d'amplitude :

$$\Phi = \arctan\left(\frac{\sqrt{4(I_2 - I_4)^2 - (I_1 - I_5)^2}}{-I_1 + 2I_3 - I_5}\right). \tag{2.33}$$

2. L'algorithme de Hariharan [59], nécessitant aussi 5 images, mais dont l'implémentation est plus simple que l'algorithme de Larkin :

$$\Phi = \arctan\left(\frac{2(I_2 - I_4)}{-I_1 + 2I_3 - I_5}\right). \tag{2.34}$$

La démodulation sinusoïdale, n'introduisant pas d'erreurs de phase, peut aussi être envisagée pour les mesures topographiques. La version de l'algorithme sinusoïdal pour la démodulation de la phase est le suivant [60] :

$$\Phi = \arctan\left(\frac{E_1 - E_2 - E_3 + E_4}{E_1 - E_2 + E_3 - E_4}\right). \tag{2.35}$$

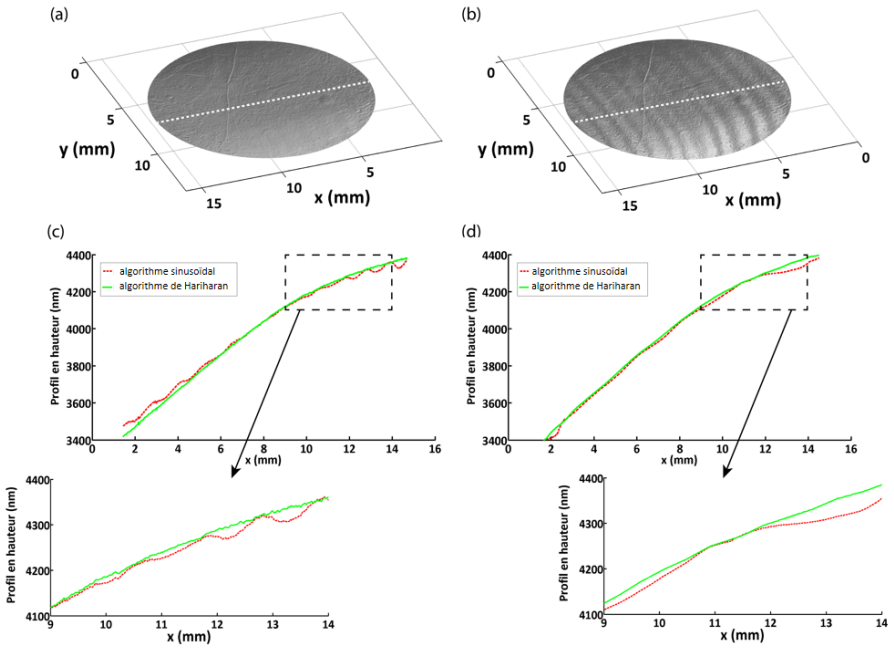

FIGURE 2.17 – Image topographique d'un miroir plan, en utilisant a) l'algorithme de Hariharan et b) l'algorithme sinusoïdal. En c) et d), les coupes dans les directions indiquées en a) et b), mesurées (c) et simulées numériquement (d).

Nous l'avons testée sur un montage de FF-OCM grand champ développé au Laboratoire Charles Fabry par Antoine Federici [61]. La figure 2.17 représente l'image topographique d'un miroir obtenue en utilisant l'algorithme sinusoïdal et l'algorithme de Hariharan, ainsi que des coupes dans cette image topographique, et des coupes simulées numériquement en connaissant la forme de la surface du miroir que l'on souhaite mesurer. Il est clair que l'algorithme sinusoïdal n'extrait pas assez bien la phase pour pouvoir être utilisé en imagerie topographique en lumière blanche. On observe des oscillations résiduelles constituant des artefacts significatifs en topographie. On remarque d'ailleurs que ces franges résiduelles sont moins significatives en simulation numérique, ce qui laisse supposer qu'il y a malgré tout de légères erreurs de phase lorsqu'on utilise l'algorithme sinusoïdal en pratique.

L'algorithme de Hariharan, par sa simplicité et son efficacité, peut ainsi être considéré comme l'algorithme de référence pour l'imagerie topographique en FF-OCM. La figure 2.18 représente par exemple l'image topographique 3D d'un échantillon structuré composé de différentes couches, obtenue sur le montage cité précédemment, en utilisant l'algorithme de Hariharan. Des structures de 100 nm ont pur être imagées, et la plus petite variation de hauteur mesurable est de 1 nm.

Notons finalement que toutes les techniques de topographie en lumière blanche n'utilisent pas des mesures de phase. Une technique ayant été prouvé très efficace [62] se fonde sur des mesures d'amplitude : comme on l'a vu, l'amplitude démodulée pour une interface correspondra, dans la direction axiale, à la fonction γ, centrée au niveau de la position réelle de l'interface. En effectuant un balayage de l'échantillon dans la direction axiale et en localisant les pics de l'amplitude démodulée, on mesure donc la position de l'interface avec une grande précision. Il est cependant nécessaire de récupérer beaucoup de points dans la direction axiale pour avoir une évaluation précise de la position de l'interface.

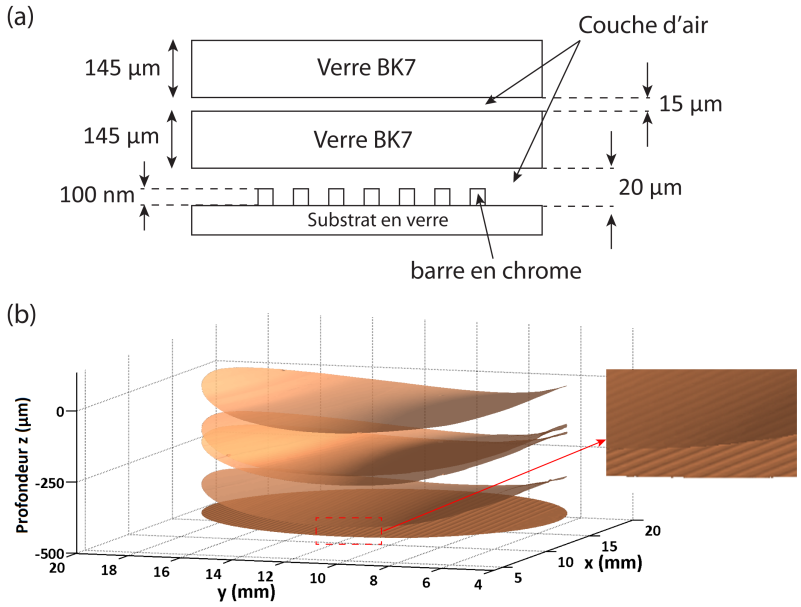

FIGURE 2.18 – a) Echantillon multicouches structuré considéré et b) image topographique 3D de l'échantillon obtenue avec l'algorithme de Hariharan.

Afin d'augmenter encore la précision des mesures, il est aussi possible de combiner cette méthode avec des mesures de phase [56].

2.3.2 Caractéristiques

2.3.2.1 Résolution spatiale

La résolution spatiale d'un système FF-OCM est déterminée par les dimensions du volume de l'échantillon duquel est rétrodiffusée de la lumière cohérente, étant à l'origine d'interférences, et pouvant ainsi être imagé. Ce volume est analogue au volume V_{OCT} évoqué à la partie 2.2.2 pour l'OCT conventionnelle.

Dans le cadre de la FF-OCM, plusieurs volumes sont imagées en parallèle pour former une image, de la même manière qu'en microscopie conventionnelle. La PSF latérale d'un système FF-OCM est donnée par le carré de la tache d'Airy, définie en annexe A.2 [63]. La résolution latérale du système peut alors être vue comme le diamètre de la PSF (équation A.14) ou la FWHM de la PSF. On considèrera généralement la résolution latérale d'un système FF-OCM comme étant la FWHM de la PSF. Celle-ci est alors donnée par la formule suivante :

$$\Delta x_{FF-OCM} \sim \frac{0.43\overline{\lambda}}{NA}, \tag{2.36}$$

avec NA l'ouverture numérique des objectifs utilisés dans le système FF-OCM (voir annexe A.2).

La résolution axiale d'un système FF-OCM est, pour des objectifs à faible ouverture numérique, équivalente à celle d'un système OCT, Δz_{OCT}. Elle est généralement donnée par la FWHM de la PSF axiale du système, soit par la FWHM de la fonction γ^2 (le carré de la transformée de Fourier du spectre de la source, au carré). Le fait que γ^2 corresponde à la PSF axiale du système a été évoquée à la partie 2.3.1.2 : on y a vu que l'image d'un point

au niveau d'une interface était, dans la direction axiale (selon un A-scan) la fonction γ^2. Cependant, la largeur de γ^2 dépend de la variable en fonction de laquelle on la considère : si l'on considère la PSF axiale en fonction du décalage Δz de l'échantillon par rapport à l'objectif permettant d'imager l'échantillon en profondeur, la PSF est alors donnée par $\gamma^2(\Delta z n_{im})$. Elle est alors dépendante de l'indice d'immersion des objectifs, et sa FWHM sera meilleure (plus faible) pour des indices élevés. Si l'on considère le volume réel dans l'échantillon dont est rétrodiffusée la lumière cohérente, il faut alors considérer la PSF axiale en fonction de Z (la position réelle d'un point dans l'échantillon), avec $Z = \Delta z \left(\frac{n_{im}}{n}\right)$, et ainsi la PSF est donnée par $\gamma^2(Zn)$. Sa FWHM dépend alors de l'indice de l'échantillon, et sera meilleure pour des échantillons dont les indices sont élevés. Cette définition de la résolution axiale est la plus « physique » car elle représente effectivement le volume de cohérence imagé dans l'échantillon. Cependant elle implique que la résolution axiale d'un système FF-OCM dépend de l'échantillon imagé, ce qui pose problème lorsqu'on souhaite donner des caractéristiques générales d'un système. On préfèrera donc définir la résolution axiale d'un système comme la FWHM de $\gamma^2(\Delta z n_{im})$, prenant en compte l'immersion (une des caractéristiques du système). Une forme analytique de cette FWHM est alors, en considérant une source gaussienne en σ de longueur d'onde centrale $\overline{\lambda}$ et de largeur spectrale $\Delta\lambda$:

$$\Delta z_{FF-OCM} = \frac{2\ln 2}{n_{im}\pi}\left(\frac{\overline{\lambda}^2}{\Delta\lambda}\right). \tag{2.37}$$

Un bon usage est de préciser dans quel milieu on considère la résolution axiale. On donne aussi parfois la résolution axiale dans l'air (en considérant $n_{im} = 1$) en tant que référence, en général pour comparer des systèmes.

Notons que la résolution axiale est parfois donnée sans considérer γ^2 mais simplement γ (l'enveloppe des franges d'interférences, sans considérer l'algorithme de démodulation). On notera que pour un même système, la résolution axiale peut être très différente si l'on considère la FWHM de γ dans l'air ou la FWHM de γ^2 dans un milieu biologique !

Ajoutons finalement que si des objectifs à grandes ouvertures numériques sont utilisés, la résolution axiale ne dépend plus que du spectre de la source, mais aussi de l'ouverture numérique des objectifs. En effet, à haute ouverture numérique, on est dans un régime où $\Delta z \sim \Delta z_{OCT}$, et les effets de cohérence et d'ouverture numérique se combinent. $M(\delta_{ech})$ ne s'écrit alors plus $\int_0^{+\infty} S(\sigma)\cos(2\pi\sigma\delta_{ech})\mathrm{d}\sigma$, mais on a [63] :

$$M(\delta_{ech}) = \frac{1}{2\sin^2\theta_{d,max}}\int_0^{+\infty} S(\sigma)\int_0^{\theta_{d,max}} \cos(2\pi\sigma\delta_{ech}\cos\theta)\,\cos\theta\sin\theta\mathrm{d}\theta\mathrm{d}\sigma, \tag{2.38}$$

avec $\theta_{d,max}$ défini à l'annexe A.2.

Il n'existe à notre connaissance pas de forme analytique de la FWHM de l'enveloppe de $M(\delta_{ech})$ définie ci dessus. La figure 2.19 représente cependant un résultat numérique donnant la résolution axiale d'un système FF-OCM de source donnée, en fonction de l'ouverture des objectifs utilisés. On y distingue deux régimes, l'un donné par l'equation 2.37, pour les faibles ouvertures numériques, la résolution axiale dépendant alors uniquement du spectre de la source, et l'un donné par l'équation A.15, pour les hautes ouvertures numériques, la résolution axiale dépendant alors de la profondeur de champ des objectifs.

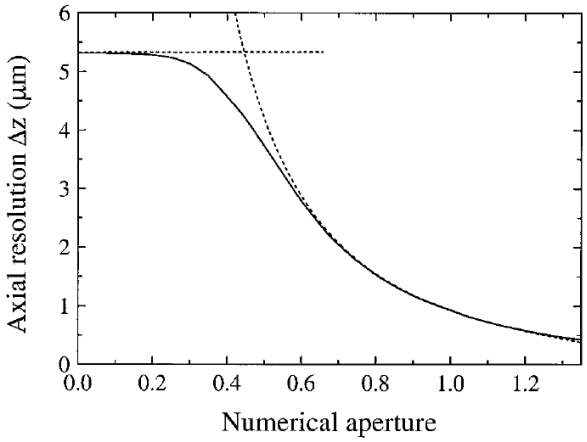

FIGURE 2.19 – Simulation numérique de la résolution axiale (dans l'eau, $n = 1.33$) d'un système FF-OCM dont la source a un spectre gaussien, centré en $\overline{\lambda} = 840\,nm$, de longueur de cohérence $20\,\mu m$ [63].

Notons aussi que la période des franges d'interférences (l'interfrange) est affecté d'un facteur β lorsque des grandes ouvertures numériques sont utilisées, donné par [64] :

$$\beta = \frac{2}{1 + \cos(\arcsin NA)}. \tag{2.39}$$

On a vu à la partie 2.3.1.2 que l'interfrange valait, en fonction de Δz, $i = \frac{\overline{\lambda}}{2n_{im}}$. En prenant en compte l'ouverture numérique, on a alors :

$$i = \frac{\overline{\lambda}\beta}{2n_{im}}. \tag{2.40}$$

Finalement, il est important de noter que la résolution spatiale évoquée ici peut ne pas correspondre à la résolution spatiale effective des images finalement présentées. En effet, afin de pouvoir observer dans les images des détails dont le niveau est proche du bruit en même temps que des structures fortement rétrodiffusantes, une compression non linéaire (typiquement logarithmique) est généralement appliquée aux images obtenues en FF-OCM avant de les afficher. Cette compression entraîne une perte en résolution latérale dans les images.

2.3.2.2 Sensibilité

La *sensibilité* d'un système FF-OCM correspond à la valeur de R_{ech} la plus faible que peut mesurer le système. Du fait de l'atténuation de R_{ech} en profondeur dans l'échantillon en raison de la diffusion et l'absorption, la sensibilité donne non seulement une information sur la possibilité ou non d'imager un échantillon en fonction de l'intensité de la lumière qu'il rétrodiffuse, mais aussi sur la profondeur de pénétration du système FF-OCM. Un système ayant une grande sensibilité produira des images tomographiques peu bruitées, jusqu'à une grande profondeur dans les échantillons.

La détection en FF-OCM se fonde sur l'interférométrie à décalage de phase. Un échantillon ne pourra être imagé que si le décalage de phase d'une image interférométrique à

l'autre est effectivement perçu par la caméra (en tant que décalage en intensité au niveau des franges d'interférences).

Une caméra ne peut percevoir qu'un certain nombre de niveaux d'intensité. Si la variation d'intensité liée au décalage de phase d'une image à l'autre est inférieure au pas entre deux niveaux d'intensité successifs que peut percevoir la caméra, alors le décalage de phase n'est pas « vu », et l'échantillon ne peut pas être imagé.

On comprend donc que la sensibilité va dépendre principalement de deux paramètres : le contraste des franges (l'amplitude de la variation d'intensité du signal interférométrique lorsqu'on introduit un décalage de phase) et le pas en intensité entre deux niveaux du capteur de la caméra. Celui-ci est lié au bruit de mesure du nombre d'électrons (la variation du nombre d'électron minimale pour observer une modification pertinente du signal) et au nombre de bits sur lequel est échantillonnée le signal électronique. A priori, le capteur est conçu de telle manière que l'échantillonnage ne soit pas limitant, et la variation électronique la plus faible détectable est donc uniquement liée aux bruits de mesure du système.

Notons que pour une sensibilité maximale, il est nécessaire d'utiliser toute la dynamique du capteur, de manière à ce que les franges d'interférences occupent le plus de niveaux possibles afin qu'une variation d'intensité soit le plus facilement détectable. Autrement dit, les puits d'électrons des pixels doivent être proches de la saturation. On notera ξ_{sat} la profondeur des puits d'électrons des pixels (ou FWC pour *full well capacity* en Anglais).

Pour un capteur travaillant proche de la saturation, le bruit prédominant est le bruit de photons, lié à la nature quantique de la lumière et au fait que le *débit de photons* sur un pixel n'est pas régulier, mais suivent une loi statistique poissonnienne : si en moyenne N photons arrivent sur le pixel durant le temps d'intégration, l'amplitude de fluctuation (l'écart-type) du nombre de photons vaut $\sqrt{N}$. A la limite de saturation, le grand nombre de photons implique donc que ce bruit en généralement prédominant.

En prenant ce bruit en compte, la variation minimale du nombre d'électrons pouvant être associée à une variation effective de la phase dans le terme d'interférence peut être reliée à une variation en terme de ratio d'intensité rétro-diffusée. On montre alors que la valeur de R_{ech} minimale pouvant être détectée vaut [63] :

$$R_{ech,min} = K\frac{(R_{incoh} + R_{ref})^2}{\xi_{sat} R_{ref}} \tag{2.41}$$

avec K un coefficient de proportionnalité lié à l'algorithme considéré pour la démodulation.

Notons que pour limiter le bruit, une technique commune est de sommer (accumuler) des images interférométriques (celles affectées par le bruit de photons) avant d'appliquer l'algorithme. Sommer les images permet de faire ressortir le signal en réduisant le bruit, et en accumulant N_{acc} images interférométriques, la valeur de R_{ech} minimale pouvant être détectée vaut alors :

$$R_{ech,min} = K\frac{(R_{incoh} + R_{ref})^2}{N_{acc}\xi_{sat} R_{ref}} \tag{2.42}$$

On se réfèrera à cette méthode sous le nom d'*accumulation*. De même, on peut limiter le bruit en moyennant spatialement les images en additionnant plusieurs pixels adjacents plutôt que le même pixel sur des images prises successivement. Cette méthode est appelée « binning », mais implique un nombre de pixels « efficaces » diminué, et risque ainsi de diminuer la résolution latérale.

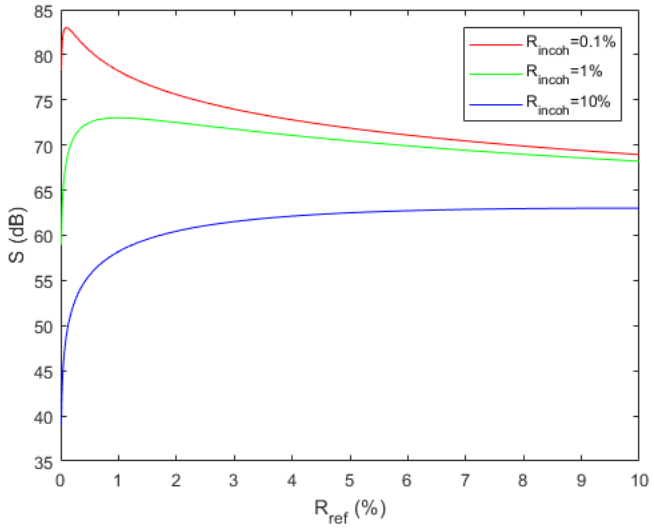

FIGURE 2.20 – Simulation numérique de la sensibilité en fonction de R_{ref}, pour trois valeurs différentes de R_{incoh}, en considérant $\xi_{sat} = 200.000$ électrons et un algorithme de démodulation sinusoïdal.

La sensibilité S du système FF-OCM est définie de la manière suivante :

$$S = -10 \log_{10}(R_{ech,min}). \tag{2.43}$$

Comme prévu, la sensibilité est inversement proportionnelle à la profondeur du puits d'électrons des pixels du capteur (on considère toujours que les images sont obtenues à la limite de saturation du capteur), et au nombre d'images interférométriques accumulées. Il est cependant intéressant de noter qu'en dérivant l'équation 2.42, la valeur maximale de la sensibilité, avec ξ_{sat} et N_{acc} fixés, correspond au cas où $R_{ref} = R_{incoh}$. Ce résultat n'est pas intuitif, notamment du fait qu'en interférométrie on a normalement le meilleur contraste des franges pour $R_{ref} = Rech$. Ce résultat peut être important dans le choix de la surface de référence, et de son coefficient de reflexion, pour maximiser la sensibilité du système. La figure 2.20 représente ainsi la sensibilité en fonction de R_{ref} pour trois valeurs de R_{incoh}. On peut remarquer que plus R_{incoh} plus faible, plus il est fondamental de vérifier la condition $R_{ref} = R_{incoh}$ pour maximiser la sensibilité. Dans le cas du FF-OCM, où R_{incoh} est élevé, la sensibilité reste à peu près maximale pour une assez grande plage de valeurs autour de $R_{ref} = R_{incoh}$, et vérifier précisément la condition $R_{ref} = R_{incoh}$ est moins critique pour maximiser la sensibilité.

Notons finalement que la variation de la sensibilité avec le nombre d'images accumulées est donnée par la formule suivante

$$S = S_0 + 10 \log_{10}(N_{acc}), \tag{2.44}$$

avec S_0 la sensibilité du système sans accumulation.

2.3.2.3 Résolution temporelle

Une caractéristique importante d'un système FF-OCM est sa *résolution temporelle*, autrement dit, l'intervalle temporel entre deux images successives.

En FF-OCM, on peut distinguer deux résolutions temporelles : l'intervalle de temps entre l'acquisition de deux images *interférométriques* successives, et l'intervalle de temps entre l'acquisition de deux images *tomographiques* successives.

Les images interférométriques correspondent aux images « brutes » obtenues par la caméra. Leur résolution temporelle est donc simplement déterminée par le temps d'acquisition T_{acq} d'une image par la caméra (appelé *frame time* en Anglais). Celui-ci est au moins égal au temps d'integration T_{int} (exposure time en Anglais), c'est à dire le temps sur lequel la caméra intégre l'intensité incidente sur son capteur, mais est généralement supérieur, du fait qu'entre chaque image acquise par la caméra, une durée est nécessaire pour stocker l'information récupérée et la transmettre au système en sortie de la caméra (un ordinateur, typiquement). Généralement, plus la caméra compte de pixels, plus long sera le temps d'acquisition par rapport au temps d'intégration. Ceci dit, notons bien que l'information finalement récupérée n'a bien été acquise que durant le temps *d'intégration*.

Les images tomographiques sont obtenues après accumulation de N_{acc} images interférométriques et application d'un algorithme nécessitant N images. L'intervalle entre deux images tomographiques est ainsi donné par :

$$\Delta t_{FF-OCM} = N_{acc} \times N \times T_{acq}. \tag{2.45}$$

La durée d'acquisition d'une image tomographique est donc en général bien plus longue que la durée d'acquisition d'une image par la caméra.

2.3.3 Limitations

2.3.3.1 Dispersion

La dispersion correspond au fait que les indices optiques sont des fonctions de la longueur d'onde. La courbe de dispersion indique l'indice en fonction de la longueur d'onde.

Considérons un interféromètre de Michelson, en lumière blanche, réglé à la différence de marche nulle. Si l'on place une lame de verre dans le bras objet par exemple, on pourra se replacer à la différence de marche nulle en modifiant la position du miroir de référence pour compenser la différence de marche introduite par la lame de verre. Cependant, la lame de verre est caractérisée par une certaine dispersion : chaque longueur d'onde contenue dans le spectre de la source va alors être associée à une différence de marche différente, liée à l'indice du verre à cette longueur d'onde. L'interférogramme va ainsi « s'étaler », la position de la différence de marche nulle étant maintenant différentes pour chaque longueur d'onde. De plus, on va aussi observer une disymétrie de l'interferogramme, les franges associées aux longueurs d'onde plus elevées étant plus larges et celles associées aux longueurs d'onde plus faibles, plus fines. L'étalement de l'interferogramme implique aussi une baisse de contraste des franges du fait que la lumière est moins « concentrée » autour d'une différence de marche nulle donnée. La figure 2.21 illustre ce phénomène.

Cependant, si une lame de verre identique avait été placée dans le bras de référence, chaque longueur d'onde aurait vu la même différence de marche entre les deux bras, et il y aurait eu compensation de la dispersion.

Le phénomène est exactement identique en FF-OCM. La lame de verre placée dans le bras objet évoquée précédemment peut alors être vue comme la partie de l'échantillon dans laquelle on pénètre. Si la courbe de dispersion de l'échantillon n'est pas identique à celle du milieu d'immersion (le milieu toujours traversé dans le bras de référence), la dispersion n'est pas compensée entre les deux bras, et on observe un étalement de l'interférogramme

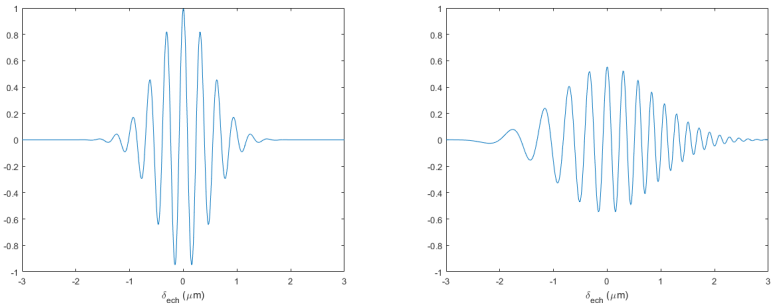

FIGURE 2.21 – Illustration du phénomène de dégradation de l'interférogramme en raison de la dispersion. Interférogrammes dans le cas où a) la dispersion est compensée et b) la dispersion n'est pas compensée.

comme évoqué précédemment. La conséquence de cet étalement est à la fois une perte en résolution axiale (la FWHM de l'interférogramme augmente) et une perte en sensibilité (le contraste des franges diminue).

Il est important de noter que si la *forme* des courbes de dispersion des milieux traversés dans les deux bras est identique, il n'y a pas de problème de dispersion, mêmes si les courbes n'ont pas le même indice moyen : quelle que soit la longueur d'onde, la différence d'indice entre les deux milieux est alors constante, ce qui ajoute juste un terme constant dans la différence de marche entre les deux bras (indépendant de la longueur d'onde), qui peut alors être compensé par un décalage de la surface de réference (avec refocalisation dynamique dans le cas de la FF-OCM). Ceci est illustré sur les figures 2.22.d. et 2.22.e.

La figure 2.22 représente une simulation numérique des interférogrammes obtenus avec un système FF-OCM à immersion dans l'air, imageant la surface d'un échantillon constitué d'eau (pas de problème de dispersion), et pénétrant à une profondeur de $50\mu m$ dans l'échantillon. Un troisième interférogramme correspond au cas d'un système FF-OCM à immersion dans l'eau, pénétrant à une profondeur de $50\mu m$ dans un échantillon dont la courbe de dispersion à la même forme que celle de l'eau, mais d'indice moyen 1.4 au lieu de 1.33. Les courbes de dispersion associées sont présentées.

Comme on le voit la dispersion peut rapidement dégrader la qualité d'imagerie d'un système FF-OCM, et il convient de compenser la dispersion entre les deux bras de l'interféromètre. Ceci peut être fait simplement en considérant des objectifs dont la dispersion du milieu d'immersion se rapproche de celle des échantillons biologiques. Ceux-ci étant généralement composés d'eau, il est courant de simplement utiliser des objectifs à immersion dans l'eau pour compenser la dispersion [65]. Cette compensation n'est évidemment pas parfaite et dépend des échantillons imagés.

Une implémentation plus compliquée consiste à positionner une lame d'un matériau dont l'indice est proche de celui du milieu à imager dans le bras de référence, et de s'arranger pour que l'épaisseur de verre traversée dans le bras de référence compense la dispersion introduite par l'échantillon, en tournant la lame d'une quantité appropriée pour jouer sur l'épaisseur de matériau traversée [66]. Cette méthode est cependant compliquée à implémenter techniquement, notamment du fait qu'il faut compenser dynamiquement la dispersion à mesure que l'on pénètre dans l'échantillon, et comme la méthode précédente, dépend de l'échantillon à imager pour le choix du matériau de la lame. L'intérêt de cette méthode est d'éviter d'utiliser des objectifs à immersion et de pouvoir travailler dans l'air.

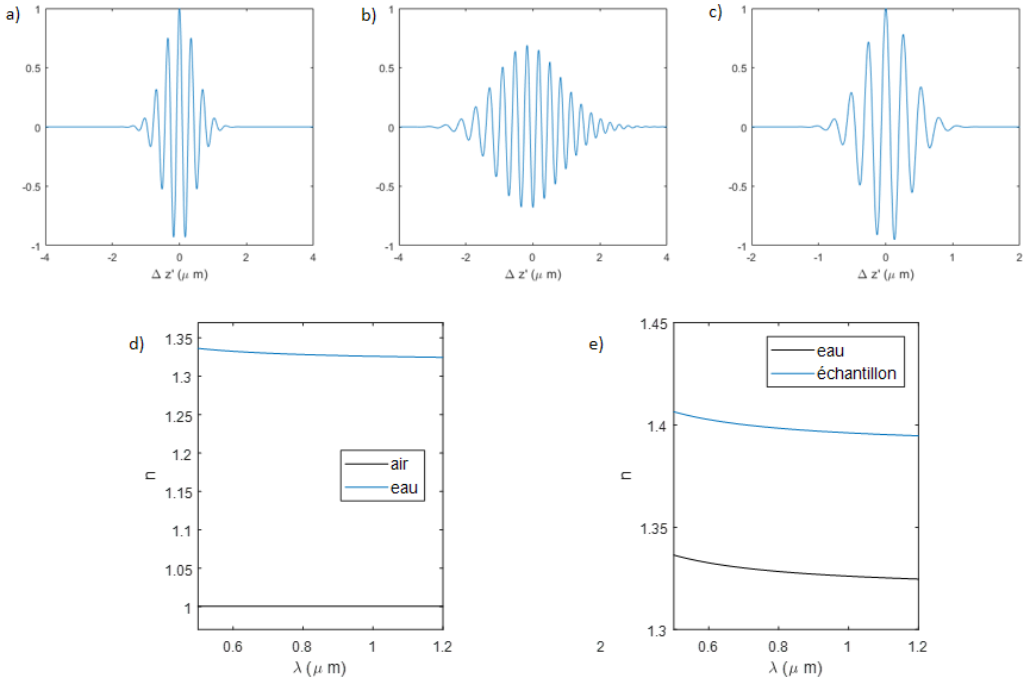

FIGURE 2.22 – Interférogrammes obtenues pour a) l'imagerie d'un point à la surface d'un échantillon constitué d'eau, pour un objectif travaillant dans l'air, b) l'imagerie d'un point situé à $200\mu m$ en profondeur dans un échantillon constitué d'eau, pour un objectif travaillant dans l'air, c) l'imagerie d'un point situé à $200\mu m$ en profondeur dans un échantillon constitué d'un milieu d'indice moyen 1.4, mais dont la courbe de dispersion a la même forme que celle de l'eau, pour un objectif à immersion dans l'eau. Les figures d) et e) indiquent respectivement les courbes de dispersion de l'air et de l'eau (associées aux interférogrammes a) et b)) et les courbes de dispersion de l'eau et du milieu considéré pour l'échantillon dans l'interférogramme c). $\Delta z'$ correspond au Δz introduit précédemment, mais décalé de telle manière à avoir $\Delta z' = 0$ au niveau de la différence de marche nulle ($\Delta z'$ correspond alors au décalage de l'échantillon par rapport à l'objectif à partir de la différence de marche nulle). Dans tous les cas, une source gaussienne (en σ) de longueur d'onde centrale 700 nm et de largeur spectrale 200 nm est considérée. Remarquons que les franges sont plus resserrées (interfrange plus petit) pour le cas c) que pour les cas a) et b) du fait de l'immersion dans l'eau (voir equation 2.32)

.

Notons finalement que les problèmes liés à la dispersion sont plus importants plus le spectre de la source est large [57].

2.3.3.2 Séparation des plans

On a vu que pour sonder une profondeur e dans un échantillon, il fallait déplacer l'échantillon par rapport à l'objectif du bras objet d'une quantité $e\left(\frac{n}{n_{im}}\right)$. De la même manière, si l'on pénètre de e dans l'échantillon, on sonde alors une profondeur $e\left(\frac{n_{im}}{n}\right)$. Cela signifie que le plan de cohérence, correspondant à la position de la différence de marche nulle entre les deux bras, se « décale » d'une quantité $e\left(\frac{n_{im}}{n}-1\right)$ lorsque on pénètre d'une quantité e dans l'échantillon.

Par un simple tracé de rayon (en considérant la figure A.6 et les lois de Descartes en approximation pour des petits angles), on peut montrer qu'en parallèle, la position de focalisation de l'objectif de microscope (le plan de focalisation dans l'échantillon) se déplace d'une quantité $e\left(\frac{n}{n_{im}}-1\right)$.

Le plan de focalisation se retrouve donc, dans la direction axiale, centré à $e\left(\frac{n}{n_{im}}\right)$ tandis que le plan de cohérence est centré à $e\left(\frac{n_{im}}{n}\right)$. Les deux plans sont donc séparés d'une quantité $e\left(\frac{n}{n_{im}}-\frac{n_{im}}{n}\right)$.

Si des objectifs à ouverture numérique assez faible sont utilisés, cette séparation des plans n'a pas d'influence car la profondeur de champ des objectifs est assez grande pour que les franges d'interférences ne soient pas « défocalisées ». Par contre, lorsque des grandes ouvertures numériques sont utilisées, ce décalage peut rapidement entraîner une défocalisation des franges d'interférences, et donc une réduction de leur contraste, soit une diminution de la sensibilité du système FF-OCM. La séparation des plans est par ailleurs plus importante à mesure que l'on pénètre dans l'échantillon, ajoutant un facteur diminuant la sensibilité avec la profondeur, sachant que celle-ci décroit déjà rapidement en raison de la diffusion et de l'absorption.

Notons que la séparation des plans est due à une différence de l'*indice moyen* de l'échantillon et du milieu d'immersion. Si les indices moyens sont identiques, $\left(\frac{n}{n_{im}}-\frac{n_{im}}{n}\right)=0$ et les plans sont confondus quelle que soit la profondeur sondée. La méthode la plus simple pour compenser ce phénomène est donc d'utiliser un milieu d'immersion dont l'indice moyen est égal à celui de l'échantillon à imager. Cette méthode dépend bien sûr de l'échantillon que l'on souhaite imager.

Le phénomène de séparation des plans peut aussi être compensé par une refocalisation dynamique de l'objectif de référence le prenant en compte [67]. Cette méthode peut être complexe à bien implémenter, mais a l'avantage de fonctionner quel que soit l'échantillon à imager.

2.3.3.3 Fond incohérent

Une des limitations majeures de la FF-OCM est l'absence de filtrage confocal. L'OCT conventionnelle atteint des profondeurs de pénétrations supérieures à la microscopie confocale grace à la combinaison d'un filtrage confocal et d'un filtrage interférométrique.

En l'absence de filtrage confocal, la quantité de lumière incohérente incidente sur le capteur est très importante, étant donné que chaque pixel de celui-ci récupère de la lumière provenant de toutes les couches de l'échantillon pour une position latérale donnée, mais

aussi d'une large distribution de positions adjacentes à cette position du fait de l'éclairage plein champ. Cela résulte en un fond incohérent (facteur R_{incoh}) très élevé, qui occupe une grande partie de la dynamique de la FWC des pixels, laissant peu de « place » (i.e. de niveaux électroniques) pour les franges d'interférences (sachant qu'on est limité par la saturation de la FWC), les franges ayant de ce fait un faible contraste.

Ce problème est intrinsèque à la FF-OCM, et il est a priori impossible de s'en affranchir. La sensibilité des systèmes FF-OCM est ainsi largement inférieure aux systèmes d'OCT conventionnels. En imagerie médicale, la sensibilité est un paramètre clé (définissant à la fois la « qualité » des images et la profondeur de pénétration du système), et cette limitation de la FF-OCM est très problématique pour son utilisation dans un contexte clinique.

Une solution pour limiter ce problème est d'utiliser des caméras de très grande FWC, mais il est alors aussi nécessaire d'avoir des sources assez puissantes pour travailler à leur limite de saturation, ce qui est une autre limitation, des sources puissantes incohérentes spatialement n'étant pas faciles à obtenir, et l'utilisation de sources puissantes pouvant endommager les échantillons biologiques. De même, on peut accumuler beaucoup d'images pour augmenter la sensibilité, mais au détriment de la vitesse du système. Sachant que l'évolution de la sensibilité en fonction du nombre d'accumulation est logarithmique (voir équation 2.44), rapidement l'augmentation de N_{acc} n'augmente qu'infimement la sensibilité, et il faut donc accumuler énormément d'images pour atteindre des sensibilités se rapprochant des systèmes OCT conventionnelles. Typiquement, les sensibilités en FF-OCM sont de l'ordre de 70 dB (sans accumulation), et des sensibilités de l'ordre de 90 dB peuvent être atteintes en accumulant une centaines d'images interférométriques [68]. Par comparaison, la sensibilité typique d'un système de SS-OCT est de 120 dB [69].

2.3.3.4 Vitesse

La FF-OCM est souvent vue comme une méthode permettant d'atteindre des hautes vitesses d'acquisition des images tomographiques du fait de l'acquisition d'un très grand nombre de points en parallèle.

Or, si la vitesse d'acquisition des images tomographiques est en effet élevée (encore que le besoin d'accumulation peut réduire considérablement cette vitesse, comme vu précédemment), la vitesse d'acquisition du signal interférométrique est très faible comparé à un système d'OCT conventionnelle.

En effet, en FF-OCM, la durée d'acquisition du signal interférométrique correspond au temps d'intégration du capteur de la caméra. Ce temps est généralement beaucoup plus elevé que le temps d'intégration des capteurs en OCT conventionnelle, où le signal est acquis point à point (ou A-scan par A-scan en FD-OCT) : des capteurs ponctuels (ou linéaire dans le cas du SD-OCT) extrêmement rapide sont alors utilisés pour mesurer le signal interférométrique.

En FF-OCM, le temps d'intégration typique des caméras utilisées est de l'ordre de quelques millisecondes [19] [70] Par comparaison, en OCT conventionnelle, le signal interférométrique est typiquement acquis en quelques microsecondes [71].

Or le signal interférométrique varie très rapidement avec les déplacements axials de l'échantillon ou des objectifs, et si la durée nécessaire pour son acquisition est élevée, il

19. Cette information n'est pas toujours facile à obtenir dans la littérature, où T_{acq} est plus souvent donné, souvent sous une forme fréquentiel, en Hz ou en images par seconde (fps pour *frames per second* en Anglais). Cette information ne reflète cependant pas la véritable durée d'acquisition du signal interférométrique.

existe un risque que des mouvements de l'échantillon aient fait varier le signal durant le temps d'acquisition d'une quantité assez importante pour que le signal soit moyenné à 0. On parle de *brouillage des franges*.

Nous reviendrons plus en détail sur ce phénomène, mais il constitue une limitation majeure de la FF-OCM dans le cadre de l'imagerie d'échantillon en mouvement, et donc globalement de l'imagerie *in vivo*.

Malgré tout, gardons à l'esprit que la FF-OCM reste une des méthodes les plus rapides du point de vue de l'acquisition des images *tomographiques* en face d'échantillons en OCM (voir la partie 2.3.2.3).

2.3.4 Montage : caractéristiques des composants

2.3.4.1 Éclairage

Un paramètre fondamental en FF-OCM est le spectre de la source utilisée, qui doit être le plus large possible pour obtenir la meilleure résolution axiale.

Par ailleurs, du fait que la FF-OCM nécessite un éclairage plein champ, l'éclairage de Köhler, fournissant un éclairage homogène, de champ et de cohérence spatiale contrôlable (voir annexe A.3) constitue la méthode d'éclairage la plus appropriée.

De plus, tout comme en microscopie conventionnelle, un éclairage plein champ nécessite d'éviter d'utiliser des sources spatialement cohérentes, qui entraînent des figures d'interférences parasites (on parle de *cross talk* en Anglais) dans les images, dégradant ainsi sensiblement leur qualité [72, 73]. La suppression de ces interférences parasites a été étudiée en FF-OCM [49, 74, 75], mais l'utilisation de sources spatialement incohérentes est préférable, du fait qu'elles n'introduisent « naturellement » pas d'interférences parasites [76]. De ce fait, une source largement utilisée en FF-OCM est une simple lampe halogène, source aussi couramment utilisée en microscopie conventionnelle (et dont le spectre est assez large pour obtenir une résolution axiale sub-micronique [77]).

Un autre paramètre important de la source d'éclairage sera sa capacité à éclairer l'échantillon avec un flux lumineux assez important [20] pour que la lumière rétrodiffusée par l'échantillon soit, au niveau du capteur de la caméra, assez importante pour pouvoir travailler à la limite de saturation du capteur tout en minimisant son temps d'intégration, afin de maximiser la vitesse d'acquisition.

Le flux lumineux total émis par la source Φ_{tot} est déterminé comme le produit de la luminance L de la source et de son étendue géométrique G_0 :

$$\Phi_{tot} = LG_0. \tag{2.46}$$

L'étendue géométrique G_0 est le produit de la surface d'émission S_0 de la source, de son angle solide [21] d'émission et du carré de l'indice du milieu dans lequel l'émission a lieu. En considérant une émission dans l'air, constante dans un cone d'angle au sommet α, une bonne approximation de l'étendue géométrique est :

20. Devant malgré tout ne pas dépasser un certain seuil pour éviter les problèmes de phototoxicité.
21. L'angle solide peut être vu comme une « étendue angulaire » en trois dimensions. Son unité est le stéradian (str).

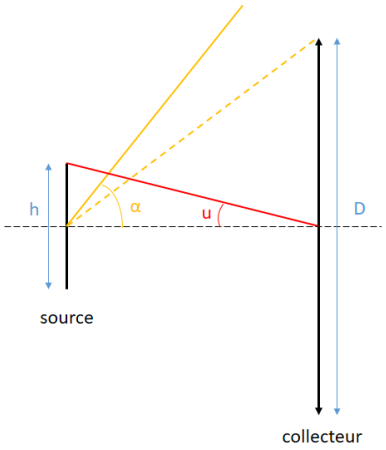

FIGURE 2.23 – Grandeurs utiles pour le calcul de l'étendue géométrique. Le rayon jaune plein correspond à l'angle d'émission de la source, le rayon jaune pointillé correspond à l'angle maximal admis par le collecteur.

$$G_0 = \pi S_0 \sin^2 \alpha \tag{2.47}$$

$$G_0 = \pi \left[\pi \left(\frac{h}{2} \right)^2 \right] \sin^2 \alpha, \tag{2.48}$$

en considérant une source circulaire de diamètre h.

Cependant ce flux n'est généralement pas conservé dans tout le système optique. Seule une fraction du flux est récupérée par le collecteur du système d'éclairage Köhler, et le flux peut aussi être limité par les objectifs de microscope (on considérera que tous les autres éléments du système sont choisis de manière à avoir un diamètre assez grand pour ne pas limiter le flux).

Ainsi le flux lumineux incident au niveau de l'échantillon est donné par [22] :

$$\Phi_{ech} = \frac{1}{2} \min(LG_1, LG_{obj}, LG_0), \tag{2.49}$$

avec G_1 l'étendue géométrique correspondant à la limitation par le collecteur et G_{obj} par les objectifs de microscope. L'étendue géométrique est donnée par le produit de la surface et de l'angle solide d'émission, mais peut aussi être donnée par le produit de la surface éclairée et de l'angle u du rayon principal issue de la source au niveau de la surface (voir figure 2.23). Ainsi, en considérant que la source est placée au niveau de la distance focale f du collecteur, dont le diamètre est D, on a :

$$G_1 = \pi \left[\pi \left(\frac{D}{2} \right)^2 \right] \sin^2 \left(\arcsin \left(\frac{h}{2f} \right) \right). \tag{2.50}$$

Au niveau de l'objectif, l'étendue peut être vue comme le produit de la surface du champ éclairé par l'objectif, de l'angle solide correspondant à l'acceptance angulaire de l'objectif

22. Le facteur $\frac{1}{2}$ est lié au fait que seule la moitié du flux incident atteint l'échantillon en raison de l'utilisation d'un cube séparateur. On néglige par ailleurs les pertes dans les optiques du système.

et du carré de l'indice du milieu dans lequel cette acceptance angulaire est considérée (voir figure A.6). Le produit de l'acceptance angulaire (en angle solide) et du carré l'indice du milieu correspond simplement au carré de l'ouverture numérique, et on a donc :

$$G_{obj} = \pi \left[\pi \left(\frac{FOV}{2} \right)^2 \right] NA^2. \tag{2.51}$$

Le flux incident sur le capteur (qui va déterminer le temps d'intégration nécessaire pour travailler à la limite de saturation du capteur) est finalement donné par :

$$\Phi_{cam} = P \left(\frac{\Phi_{ech}}{2} \right) (R_{incoh} + R_{ref}) \tag{2.52}$$

$$\Phi_{cam} = P \left(\frac{1}{4} \right) (R_{incoh} + R_{ref}) \times \min(LG_1, LG_{obj}, LG_0). \tag{2.53}$$

Avec P la proportion du flux détecté par le capteur en considérant le spectre de la lumière incidente et la réponse spectrale du capteur. Finalement, d'après l'équation 2.46, on a :

$$\Phi_{cam} = P \left(\frac{1}{4} \right) (R_{incoh} + R_{ref}) \left(\frac{\Phi_{tot}}{G_0} \right) \times \min(G_1, G_{obj}, G_0). \tag{2.54}$$

Il est intéressant d'écrire le flux reçu par la caméra sous cette forme, car Φ_{tot} et G_0 sont des grandeurs caractéristiques de la source, plus souvent indiquées dans la documentation des sources que la luminance.

Notons que si l'on souhaite comparer les flux reçus par la caméra pour deux sources différentes, considérées comme toutes les deux limitées par le même élément du système, le ratio des flux est donné par :

$$\frac{\Phi_{cam,1}}{\Phi_{cam,2}} = \frac{P_1}{P_2} \frac{\Phi_{tot,1}}{\Phi_{tot,2}} \frac{G_{0,2}}{G_{0,1}} \tag{2.55}$$

$$\frac{\Phi_{cam,1}}{\Phi_{cam,2}} = \frac{P_1}{P_2} \frac{\Phi_{tot,1}}{\Phi_{tot,2}} \frac{S_{0,2} \sin^2 \alpha_2}{S_{0,1} \sin^2 \alpha_1}. \tag{2.56}$$

2.3.4.2 Caméra

Les caractéristiques de la caméra utilisée dans un montage FF-OCM sont primordiales : en effet, elles influencent tous les paramètres du système, à savoir sa résolution axiale, sa résolution latérale, sa sensibilité et sa vitesse (résolution temporelle).

La résolution axiale du système est déterminée par le spectre « effectif » de la source, détecté par la caméra, correspondant au produit du spectre de la source et de la réponse spectrale de la caméra. Si, par exemple, on utilise une source très large spectralement, mais centrée dans l'infrarouge, et une caméra ayant une réponse spectrale dans le visible, le spectre effectif détecté aura a priori une largeur spectrale très fine, résultant en une très mauvaise résolution axiale, même si la source était très large spectralement.

La résolution latérale du système peut être influencée par la caméra en raison de l'échantillonage spatial du signal effectué par les pixels : la distribution d'intensité $I(X', Y')$ incidente sur le capteur est échantillonnée par ses pixels discrets. Chaque pixel intègre ainsi le

signal provenant d'une zone dans l'échantillon de taille $\frac{c_1}{G} \times \frac{c_2}{G}$, en considérant des pixels rectangulaires de taille $c_1 \times c_2$. Si cette zone est supérieure à $\Delta x \times \Delta y$, tout se passe comme si l'on augmentait la taille de V_{OCT} dans les directions (X, Y), ce qui correspond à une perte de résolution latérale du système [23]. Il est ainsi important que la taille d'un pixel de la caméra corresponde au maximum à la taille de la tache d'Airy dans l'espace du capteur de la caméra ($G\Delta x \times G\Delta x$) pour éviter que l'échantillonnage par la caméra n'implique une perte en résolution latérale. Notons bien qu'il est possible de modifier G pour vérifier cette condition, et pas nécessairement de changer de caméra si ses pixels sont trop grands (G se modifie simplement en changeant de lentille de tube, voir équation A.1).

Le nombre de pixels quant à lui, va déterminer le champ de l'échantillon étant imagé. Si l'on veut pouvoir imager tout le champ accessible par les objectifs de microscope, il est nécessaire d'avoir un capteur de $N_1 \times N_2$ pixels, avec $N_1 = \frac{G \times FOV}{c_1}$ et de même $N_2 = \frac{G \times FOV}{c_2}$.

La sensibilité du système est lié à la profondeur des puits d'électrons (FWC) des pixels ξ_{sat}, comme l'indiquait l'équation 2.42. Ainsi la FWC de la caméra doit être la plus grande possible pour maximiser la sensibilité du système.

Un autre paramètre pouvant influencer la sensibilité du système est le bruit électronique de la caméra. Ce paramètre a été négligé dans l'équation 2.42 car le bruit de photons est généralement prédominant. Cependant, la mesure du nombre d'électrons dans chaque puits d'électrons est « naturellement » bruitée, et même si le bruit de photons était inexistant, la variation minimale détectable par le capteur ne serait pas de 1 électron en raison de ce bruit électronique toujours présent. Le bruit électronique est dû au bruit de lecture (RN pour *readout noise* en Anglais), correspondant aux erreurs électroniques possible sur la lecture de la valeur du nombre de bits pour un puits de photons.

En prenant en compte le bruit de lecture, on peut réécrire l'équation 2.42 sous la forme suivante :

$$R_{ech,min} = K \frac{(R_{incoh} + R_{ref})^2}{R_{ref}} \left(\frac{\xi_{sat} + RN^2}{N_{acc} \xi_{sat}^2} \right). \tag{2.57}$$

Notons que dans la documentation des caméras, la FWC et le bruit de lecture ne sont pas toujours donnés tel quels. On retrouve souvent une valeur notée SNR, correspondant au rapport signal à bruit (ou *signal to noise ratio* en Anglais) de la caméra à la limite de saturation, en prenant en compte un bruit de photon prédominant. Le signal (électronique) vaut donc ξ_{sat} et le bruit sur ce signal (Poissionien) vaut $\sqrt{\xi_{sat}}$. Le rapport signal à bruit vaut ainsi $\frac{\xi_{sat}}{\sqrt{\xi_{sat}}} = \sqrt{\xi_{sat}}$. La valeur SNR est alors généralement donnée sous la forme logarithmique :

$$SNR = 20 \log_{10}(\sqrt{\xi_{sat}}), \tag{2.58}$$

et on retrouve donc ξ_{sat} :

$$\xi_{sat} = 10^{\frac{SNR}{10}}. \tag{2.59}$$

Le bruit de lecture quant à lui est souvent donné par la dynamique de la caméra (souvent noté DNR ou *dynamic range* en Anglais). Celle-ci donne le nombre de niveaux pouvant réellement être perçus par la caméra en prenant en compte le bruit de lecture toujours présent. Elle est donc simplement donnée par le ratio de la FWC sur le bruit de

23. Notons que la situation est différente en OCT conventionnelle, où le filtrage confocal implique qu'augmenter la taille du détecteur augmente simplement R_{incoh} sans affecter la résolution.

lecture[24] Tout comme pour le SNR, la dynamique est généralement donnée sous forme logarithmique :

$$DNR = 20\log_{10}\left(\frac{\xi_{sat}}{RN}\right), \tag{2.60}$$

et on retrouve donc le bruit de lecture :

$$RN = \frac{\xi_{sat}}{10^{\frac{DNR}{20}}}. \tag{2.61}$$

Finalement, la caméra influence la vitesse d'acquisition du système FF-OCM du fait que le temps d'intégration nécessaire pour saturer les pixels est propre à la caméra. Notons E l'irradiance au niveau du capteur de la caméra, donnée par

$$E = \frac{\Phi_{cam}}{\left(\pi\left(\frac{G\times FOV}{2}\right)^2\right)}. \tag{2.62}$$

Le flux reçu par un pixel de la caméra est donné par

$$\Phi_{pixel} = E \times c_1 c_2. \tag{2.63}$$

L'énergie d'un photon valant $\frac{hc}{\overline{\lambda}}$ (avec h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière et en considérant un éclairage monochromatique de longueur d'onde $\overline{\lambda}$ pour éviter les complexifications calculatoires), le nombre de photons *par seconde* reçu par un pixel est de :

$$N_{pixel,photonflux} = \frac{\Phi_{pixel}\overline{\lambda}}{hc}. \tag{2.64}$$

Finalement, le nombre d'électrons remplissant le puits d'électrons du pixel est donné par :

$$N_{pixel,electrons} = \eta N_{pixel,photonflux} T_{int}, \tag{2.65}$$

avec η l'efficacité quantique de la caméra. A la limite de saturation, $N_{pixel,electrons} = \xi_{sat}$, et on a donc :

$$T_{int,sat} = \frac{\xi_{sat}}{\eta N_{pixel,photonflux}}. \tag{2.66}$$

A E fixé, $N_{pixel,photonflux}$ dépend uniquement de la taille $c_1 \times c_2$ des pixels, et ainsi le temps d'intégration est bien une fonction des paramètres de la caméra ξ_{sat}, η et $c_1 \times c_2$:

$$T_{int,sat} = \frac{\xi_{sat} hc\left(\pi\left(\frac{G\times FOV}{2}\right)^2\right)}{\eta\Phi_{cam} c_1 c_2 \overline{\lambda}}. \tag{2.67}$$

Le temps d'acquisition T_{acq} dépend ensuite en plus de la durée nécessaire du stockage et du transfert des données mesurées par tous les pixels, et dépend de la caméra utilisée.

24. Notons que ce ratio définit aussi le nombre de bits minimum devant être utilisés pour l'échantillonage électronique : le nombre de niveaux accessibles pour N_{bits} bits est donné par $2^{N_{bits}}$, et on doit ainsi avoir $\frac{\xi_{sat}}{RN} \leq 2^{N_{bits}}$, soit $N_{bits} \geq log_2\left(\frac{\xi_{sat}}{RN}\right)$.

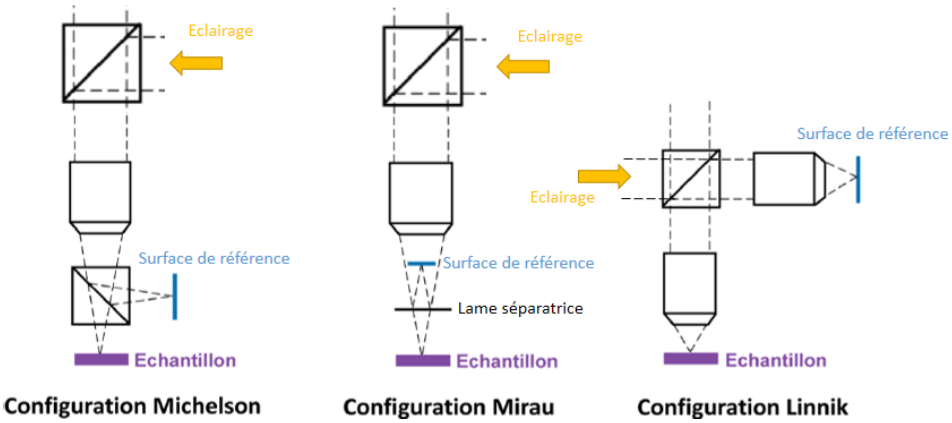

FIGURE 2.24 – Schémas des trois configurations possibles pour les objectifs en FF-OCM. Modifié depuis [7].

2.3.4.3 Optiques

Les optiques fondamentales d'un système FF-OCM sont les objectifs de microscope, fixant la résolution latérale du système et le champ d'observation accessible au niveau de l'échantillon. Les objectifs de microscope sont présentés en détail à l'annexe A.2. Tous les paramètres des objectifs (et de la lentille de tube, et des optiques de l'éclairage Köhler) propres à la microscopie conventionnelle s'appliquent à la FF-OCM.

Notons qu'en FF-OCM, les objectifs de microscope ne sont pas nécessairement utilisés en configuration de Linnik telle qu'elle a été considérée jusqu'à maintenant. Il est aussi possible d'utiliser un unique objectif, placé en amont du cube séparateur (configuration dite de Michelson) [48, 61], ou un unique objectif contenant la surface de référence (configuration dite de Mirau) [78]. La figure 2.24 représente les trois configurations possibles.

La configuration de Linnik reste cependant la plus flexible, du fait que n'importe quel objectif, ayant n'importe quelle immersion, peut être utilisé dans le bras objet du moment qu'un objectif identique est utilisé dans le bras de référence.

En configuration Michelson, il est nécessaire d'utiliser des objectifs ayant une grande distance de travail (et donc ayant généralement des ouvertures numériques faibles) pour pouvoir placer le cube séparateur. En configuration Mirau, des pertes de lumières sont dues à l'obstruction centrale de la surface de référence, et il est nécessaire d'utiliser de grandes ouvertures numériques pour ne pas avoir trop de pertes de lumières (tout en ayant une distance de travail assez grande pour placer la lame séparatrice et la surface de référence, ce qui est une difficulté supplémentaire).

De plus, en configuration Michelson ou Mirau, deux cubes séparateurs (ou lames séparatrices) doivent être utilisés (voir figure 2.24), résultant en des pertes plus importantes qu'en configuration Linnik. Notons finalement que ces deux configurations sont plus difficiles à mettre en œuvre que la configuration Linnik car il n'existe pas d'objectifs commerciaux en configuration Michelson ou Mirau adaptés à la FF-OCM.

Au-delà de la résolution latérale et du champ, il est à noter que les objectifs ont une influence sur la sensibilité du système : du fait de leur utilisation en réflexion, si les optiques dont les objectifs sont constitués réfléchissent une partie de la lumière, cette lumière peut être vu comme participant à l'augmentation de R_{incoh} (tout en diminuant R_{ref} et R_{ech}) et diminue ainsi la sensibilité du système. Un paramètre important des objectifs dans le

cadre de la FF-OCM, et non évoqué dans l'annexe A.2, est donc leur facteur de réflexion en fonction de la longueur d'onde. Ce facteur doit être minimal sur l'ensemble du spectre de la source pour limiter la perte en sensibilité. Autrement dit, les objectifs doivent être traités anti-reflet sur la gamme spectrale utilisée par le système de FF-OCM.

De la même manière, l'autre élément qui est traversé en aller/retour dans le système est le cube séparateur. Ses faces peuvent réflechir la lumière incidente et il est donc nécessaire qu'elles soient traitées anti-reflet sur la gamme spectrale du système, ou plus généralement de trouver un moyen de s'affranchir de leur réflexion.

Ces réflexions sont d'autant plus gênantes qu'elles ont lieu avant le passage de la lumière dans l'échantillon, autrement dit, ce n'est pas la lumière rétrodiffusée qui est réfléchie mais la lumière en sortie du système d'éclairage, beaucoup plus intense que la lumière rétrodiffusée. Même une légère réflexion peut finalement entrainer une augmentation de R_{incoh} significative affectant grandement la sensibilité du système.

Notons que pour les autres optiques du système, il convient de maximiser le facteur de transmission afin de limiter les pertes de lumière au cours de la propagation dans le système. Il convient donc que toutes les optiques du système soient traitées anti-reflet sur la gamme spectrale du système, mais cette contrainte n'est en général pas absolument indispensable par rapport aux performances du système (elle ne pourra affecter que la vitesse d'acquisition en diminuant Φ_{cam}, et mêmes si les optiques ne sont pas traitées anti-reflet, si elles sont adaptées à la gamme spectrale du système FF-OCM, la vitesse ne sera que légèrement affectée).

2.3.4.4 Mécanique

Comme on l'a vu, il est nécessaire d'avoir plusieurs degrés de liberté dans un montage standard de FF-OCM afin de pouvoir sonder les échantillons en profondeur et de démoduler le signal intérférométrique.

Si la taille de l'échantillon le permet, il peut être placé sur une platine de manière à pouvoir contrôler sa position axiale et on peut alors le sonder en profondeur en contrôler cette position, sans jouer sur la position des objectifs. Cette platine peut être manuelle ou contrôlable par un moteur. Il sera par contre nécessaire, pour démoduler de signal de pouvoir contrôler la position de la surface de référence, assez précisément pour pouvoir bien démoduler le signal interférométrique. Au vu des très petites distances qui doivent être contrôlées précisément au niveau du positionnement de la surface de référence, et de la synchronisation nécessaire avec la caméra et l'acquisition des images (voir par exemple figure 2.15) il est nécessaire que celle-ci soit montée sur une platine piézo-électrique (ou PZT pour *piezoelectric transducer* en Anglais), pouvant être contrôlable précisément et synchronisée avec la caméra.

Si la taille de l'échantillon ne lui permet pas d'être placé sur une platine, il est alors nécessaire de contrôler la position axiale des objectifs de microscope. Les déplacements des deux objectifs étant liés pour pouvoir contrôler la position du plan de cohérence (voire de compenser la séparation entre plan de cohérence et de focalisation, voir partie 2.3.3.2), il n'est plus possible de placer les objectifs sur des platines manuelles, mais il est nécessaire d'utiliser des platines motorisées et synchronisées. Dans cette configuration, il y a donc trois degrés de liberté devant être précisément contrôlés et synchronisés : les positions des deux objectifs devant être synchronisées, et la position de la surface de référence par rapport à l'objectif de référence (la surface de référence devant globalement avoir un mouvement lié à celui de l'objectif de référence), devant être synchronisée avec la caméra.

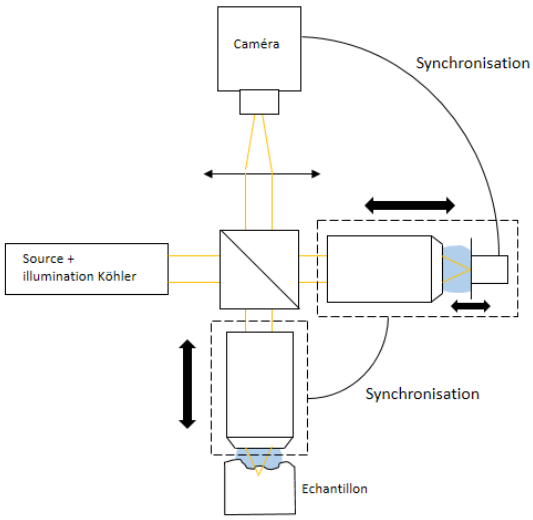

FIGURE 2.25 – Schéma d'un montage de FF-OCM utilisant un interféromètre de Linnik et des objectifs de microscope à immersion, en considérant les degrés de liberté mécaniques et les synchronisations nécessaires à l'acquisition d'images, dans le cas où l'échantillon ne peut pas être déplacé.

La figure 2.25 reprend la figure 2.6 en y ajoutant les degrés de liberté mécaniques et les synchronisations nécessaires.

2.4 Applications pour l'imagerie médicale

Depuis maintenant quelques années, des instruments de microscopie par cohérence optique commencent à être développés par des industriels. Pour l'instant, l'OCM n'est pas encore couramment utilisé dans un contexte clinique, principalement en raison du fait que l'OCM est compliqué à implémenter dans les domaines où l'OCT est actuellement utilisé : en ophtalmologie, l'OCT est principalement utilisé pour l'imagerie de la rétine, et l'utilisation d'objectifs de microscope est quasi-impossible pour cette application, la distance de travail des objectifs devant être assez longue pour traverser l'œil, ce qui est généralement incompatible avec des objectifs d'ouverture numérique assez grande pour avoir une résolution microscopique. De plus, c'est principalement l'imagerie des couches de la rétine qui intéresse les ophtalmologues, nécessitant une bonne résolution axiale mais pas nécessairement une bonne résolution latérale. Il n'y a donc a priori pas un fort besoin de l'OCM dans le domaine de l'ophtalmologie. L'imagerie endoscopique est par ailleurs difficilement conciliable avec l'OCM du fait de la nécessité d'utiliser des objectifs de microscope.

Cependant, l'OCT se développe aujourd'hui de plus en plus dans le domaine de la dermatologie. Dans ce domaine, les sytèmes OCM sont tout à fait appropriés, et sont même plus intéressants que les systèmes d'OCT conventionnels, car leur résolution microscopique leur permet de vérifier l'ensemble des besoins des dermatologues dans le domaine de la détection non-invasive du cancer de la peau (voir section 1.3.2). Autrement dit, l'OCM peut potentiellement fournir aux dermatologues un instrument permettant d'obtenir des images identiques aux images actuellement obtenues par les anatomopathologistes à partir de biopsies dans le cadre du diagnostic du cancer de la peau.

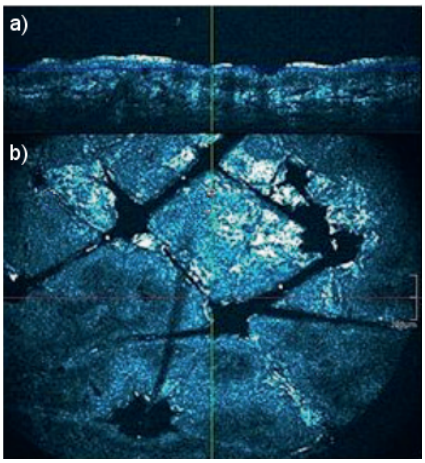

FIGURE 2.26 – Images de peau humaine saine *in vivo* obtenues avec le Skintell (Agfa Healthcare) : a) en coupe verticale et b) en face [80].

2.4.1 Applications et industriels

Aujourd'hui, un seul système d'OCM est effectivement commercialisé pour des applications cliniques, avec l'objectif de fournir en temps réel et *in vivo* des images similaires à celles obtenues à partir de biopsies : le Skintell, développé par Agfa Healthcare. Basé sur une technologie d'OCM appelée *high definition OCT* (HD-OCT), ce système acquiert des images 3D avec une résolution spatiale de 3 μm $\times$ 3 μm (axiale $\times$ latérale) et une profondeur de pénétration allant jusqu'à $\sim$ 200 μm dans la peau. La figure 2.26 présente un exemple d'image de peau humaine *in vivo* en face et en coupe verticale obtenue sur le Skintell. Il a été montré que cet instrument pouvait en particulier aider à la détection du carcinome dans un contexte clinique, cependant, les images obtenues sur ce système sont difficilement interprétables par les praticiens en raisons d'artefacts [79]. De plus, la sonde manuelle dans laquelle le système est intégré est lourde et peu maniable. Finalement, le Skintell n'a pas été un succès commercial, et Agfa Healthcare ne développe plus cet instrument.

Une autre entreprise s'intéressant au développement d'un système OCM est une startup française, Damae Medical. Les instruments développés par Damae Medical ont pour but de permettre un diagnostic précoce du cancer de la peau, et en particulier du mélanome, en fournissant des images de qualité histologique en temps réel et *in vivo*. La technologie sur laquelle se basent ces instruments, brevetée en 2014 par Arnaud Dubois, chercheur au laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique Graduate School, permet d'obtenir des images en coupes verticales avec une résolution spatiale de 1 μm $\times$ 1 μm (axiale $\times$ latérale) et une profondeur de pénétration allant jusqu'à $\sim$ 400 μm. La figure 2.27 présente un exemple d'image de peau humaine *in vivo* obtenue sur le premier instrument développé par Damae Medical, OCTAV. Cet instrument, non portatif, est en phase de tests cliniques. Suite à ceux ci, un instrument basé sur une technologie identique mais intégré dans une sonde manuelle sera a priori commercialisé à la fin de l'année 2018.

Par ailleurs, une entreprise française commercialise actuellement un système de FF-OCM : LLTech. Le but du système développé par LLTech n'est cependant pas de remplacer les biopsies par une imagerie *in vivo*, mais d'imager plus rapidement les biopsies, sans avoir besoin du processus nécessaire pour les imager en microscopie conventionnelle (voir partie

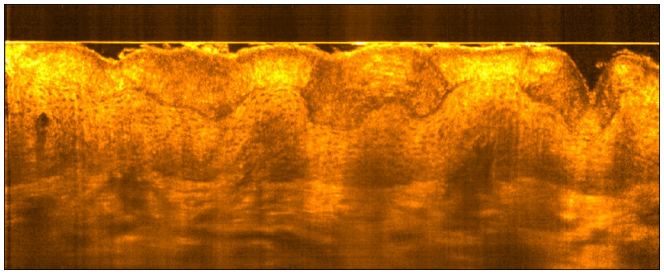

FIGURE 2.27 – Image en coupe verticale de peau humaine saine *in vivo* obtenue avec OCTAV (Damae Medical) [81].

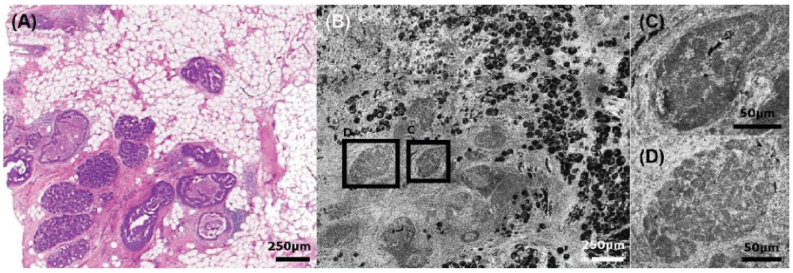

FIGURE 2.28 – Tissu mammaire présentant un carcinome ductal imagé a) en histologie conventionnel et b) avec le Light-CT scanner (LLTech). c) zoom sur un canal anormal et d) zoom sur un lobule [82].

1.3.1), en particulier lorsqu'il est nécessaire d'analyser une biopsie durant une opération (par exemple pour évaluer les marges d'exérèse lors de l'extraction d'une tumeur), où il est alors important d'obtenir rapidement des résultats (imagerie per-opératoire). Notons que cette application, assez particulière, concerne un ensemble de praticiens moins vaste que ceux concernés par les systèmes précédemment présentés, le nombre de biopsies effectuées dans un contexte per-opératoire étant largement inférieur au nombre de biopsies effectuées de manière routinière par les dermatologues. L'instrument développé par LLTech (Light-CT scanner) permet d'obtenir des images 3D avec une résolution spatiale de 1 μm $\times$ 1 μm (axiale $\times$ latérale) et une profondeur de pénétration allant jusqu'à $\sim$ 200 μm. Malgré de nombreux tests cliniques [9], le Light-CT scanner reste appliqué à des fins de recherche. La figure 2.28 présente un exemple d'image obtenue par le Light-CT scanner en test clinique d'imagerie de tissus mammaires, comparée à une image d'un tissu identique en histologie.

2.4.2 Concurrence

Comme on l'a vu à la partie 1.4, l'OCM n'est pas la seule technologie permettant d'imager les tissus en profondeur avec une résolution microscopique. Des systèmes basés sur d'autres technologies ont ainsi été commercialisés afin de fournir des images de qualité histologique aux dermatologues.

Le système le plus largement utilisé aujourd'hui par les dermatologues pour l'aide au diagnostic est un système de microscopie confocale, développé par Mavig : le Vivascope. Ce système permet d'obtenir des images en face *in vivo* à haute résolution latérale (< 1 μm), sur une profondeur jusqu'à $\sim$ 200 μm. La figure 2.29 présente des exemples d'images en face de peau humaine *in vivo* présentant des carcinomes basocellulaires, obtenues avec le

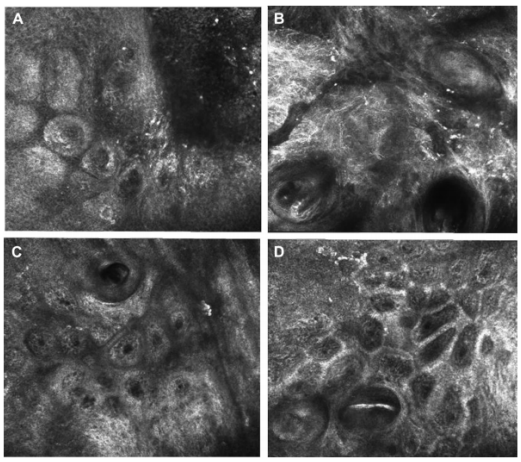

FIGURE 2.29 – Images en face de peau humaine *in vivo* présentant des carcinomes basocellulaires obtenues avec le Vivascope (Mavig) [83].

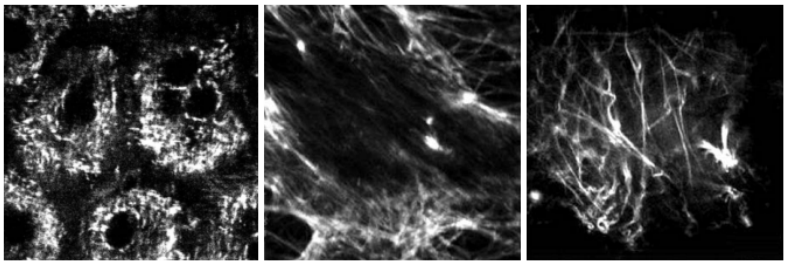

FIGURE 2.30 – Images en face de peau humaine saine *in vivo* obtenues à différentes profondeurs avec le DermaInspect (JenLab) [85].

Vivascope. De nombreuses études cliniques ont mis en évidence l'intérêt de cet instrument pour le diagnostic et le suivi du cancer de la peau [83], si bien qu'aujourd'hui, aux Etats Unis, les actes d'imagerie utilisant cet instrument sont remboursés [84], participant à la large utilisation de la microscopie confocale par les praticiens.

Un système basé sur la microscopie non linéaire est également commercialisé : le DermaInspect, produit par JenLab. Basé sur l'autofluorescence de la peau et la génération de seconde harmonique, il permet d'obtenir des images de qualité histologique de manière non invasive, *in vivo*, avec une résolution spatiale de 2 μm $\times$ 1 μm (axiale $\times$ latérale), mais sur des profondeurs relativement faibles (au maximum $\sim$ 150 μm). Par ailleurs, le champ d'observation du DermaInspect est bien plus faible que ceux des systèmes OCM ou de microscopie confocale ($\sim$ 350 μm). La figure 2.30 présente un exemple d'image de peau humaine *in vivo* en face obtenue avec le DermaInspect. Malgré une technologie permettant d'avoir accès à une imagerie fonctionnelle inaccessible en microscopie confocale ou en OCT [85], le prix élevé de cet instrument, son faible champ et sa faible profondeur de pénétration limitent aujourd'hui sa diffusion.

Notons finalement que l'OCT conventionnelle, même si elle ne permet pas d'atteindre une résolution cellulaire dans la peau, permet de fournir des images intéressantes pour les dermatologues, et bénéficie de toutes les avancées développées à l'origine pour l'ophtalmologie. De ce fait, un système d'OCT conventionnelle a été développé par Michelson

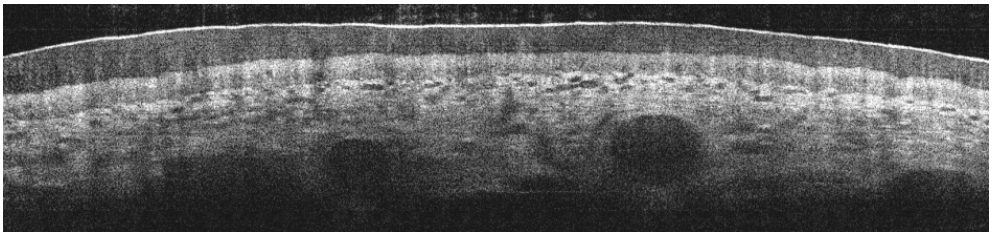

FIGURE 2.31 – Image en coupe verticale de peau humaine saine *in vivo* obtenue avec le Vivosight (Michelson Diagnostics) [87].

Diagnostics spécialement pour la dermatologie : le Vivosight. Ce système, basé sur un système de SD-OCT à plusieurs faisceaux (*multi beam OCT*), présente une grande profondeur de pénétration ($\sim$ 1 mm) et un large champ d'observation ($\sim$ 8 mm), mais sa résolution spatiale est de 5 μm $\times$ 8 μm (axiale $\times$ latérale). Cependant, ce système permet d'apporter une aide au diagnostic du carcinome [86], et est aujourd'hui utilisé dans un contexte clinique bien plus largement que les systèmes d'OCM. Sa résolution n'est cependant pas suffisante pour aider au diagnostic du mélanome à un stade précoce. La figure 2.31 présente un exemple d'image de peau humaine *in vivo* en coupe verticale obtenue sur le Vivosight. Notons aussi qu'une implémentation du Vivosight (Vivosight DX) permet d'obtenir, de manière non-invasive, des images des écoulements sanguins dans la peau.

2.5 Conclusion

En se fondant sur un filtrage interférométrique de la lumière rétrodiffusée par un échantillon, l'OCT a constitué une révolution dans le domaine de l'imagerie médicale optique. En effet, par sa grande sensibilité, l'OCT permet d'imager jusqu'à un millimètre en profondeur dans les tissus, de manière non invasive et sans nécessiter de préparation des tissus, avec une haute résolution axiale. Son implémentation est de plus relativement simple, et facilement compatible avec des systèmes fibrées. Ces qualités ont imposées l'OCT comme une méthode d'imagerie médicale de référence, en particulier dans le domaine de l'ophtalmologie pour l'imagerie des couches de la rétine, en seulement quelques années. Cette adoption de l'OCT par les professionnels de la santé a par ailleurs contribué à un développement technique très rapide de cette méthode, la sensibilité, la vitesse d'acquisition et la résolution des systèmes étant constamment améliorée. En à peine 15 ans, les systèmes OCT sont passés d'acquisition dans le domaine temporel (TD-OCT) à quelques centaines de A-scans par secondes et de résolution axiale d'environ 10 μm à des acquisitions dans le domaine fréquentiel (FD-OCT) en utilisant des sources balayées en longueur d'onde, pouvant atteindre des vitesse de plus de 350.000 A-scans par seconde à des résolutions axiales de l'ordre du micron, avec une sensibilité d'environ 120 dB.

Un défaut de la majorité des systèmes OCT est cependant leur résolution latérale plus faible que leur résolution axiale, lié au fait qu'une large étendue d'imagerie axiale limite la résolution latérale en OCT. Afin de résoudre ce problème, des systèmes OCT utilisant des objectifs de microscope ont été conçus, appelés systèmes OCM, permettant d'obtenir des images à haute résolution axiale et latérale. La vitesse de ces systèmes est généralement lente du fait de l'utilisation de méthodes de refocalisation et d'acquisition point par point. Une méthode d'OCM, appelée microscopie par cohérence optique plein champ

(FF-OCM), permet cependant, par un éclairage et une détection de tout le champ de l'échantillon, de paralléliser la détection et d'obtenir ainsi une image en-face de l'échantillon sans avoir besoin de balayer le faisceau d'éclairage sur l'échantillon. De ce fait, les montages FF-OCM sont simples et très proches des montages de microscopie conventionnels, mais nécessitent cependant des degrés de liberté mécaniques pour la refocalisation et la démodulation du signal interférométrique : en FF-OCM, plusieurs images interférométriques, décalées en phase, de l'ensemble du champ sont obtenues puis recombinées par des algorithmes d'interférométrie à décalage de phase. On peut alors reconstituer des images tomographiques des échantillons, par démodulation de l'amplitude des interférences, ou des images topographique par calcul de la phase des interférences. Des algorithmes appropriés à l'interférométrie en lumière blanche ont été déterminés pour limiter les artefacts lors de la reconstruction des images.

Les résolutions axiales et latérales de la FF-OCM sont donc découplées, et typiquement toutes les deux de l'ordre du micron, en utilisant des objectifs d'ouverture numérique ~ 0.3 et une simple lampe halogène pour l'éclairage. La vitesse d'acquisition d'un système FF-OCM est élevée du fait de la parallélisation de la détection, mais il est à noter que la vitesse d'acquisition du signal interférométrique est $\sim$ 1000 fois plus faible qu'en OCT conventionnelle. Ceci constitue la principale limitation de la FF-OCM, avec une sensibilité faible par rapport à l'OCT conventionnelle du fait de l'absence de filtrage confocale en FF-OCM, directement lié à l'utilisation d'un éclairage plein champ. Notons finalement qu'un élément essentiel d'un système FF-OCM est sa caméra, dont de nombreux paramètres sont cruciaux pour maximiser les performances du système.

Actuellement, l'OCM est principalement développé pour des applications en dermatologie, un domaine dans lequel l'OCT commence a être utilisé et dans lequel l'OCM possède de nombreux avantages par rapport à l'OCT conventionnelle, en particulier le potentiel de produire des images de résolution similaire à des coupes histologiques. Plusieurs industriels commencent ainsi à s'intéresser au développement de systèmes OCM. Dans la suite de ce manuscrit, nous nous intéresserons au développement d'un système FF-OCM compact à très haute résolution pour l'imagerie dermatologique *in vivo*.

Chapitre 3

Développement d'un système FF-OCM compact à éclairage LED pour l'imagerie non invasive de la peau *in vivo*

3.1 Introduction : état de l'art en imagerie FF-OCM *in vivo*

Du fait de la limitation de la FF-OCM en termes de vitesse d'acquisition, l'imagerie *in vivo* est encore peu répandue en FF-OCM. Cependant, de nombreux travaux ont contribué à développer des méthodes permettant d'aller vers l'imagerie *in vivo* en FF-OCM en augmentant la vitesse d'acquisition de cette méthode. On pourra distinguer deux approches différentes pour augmenter cette vitesse :

- les méthodes à décalage de phase instantané (*single shot*), dont l'objectif est d'acquérir simultanément les différentes images nécessaires à la démodulation du signal interférométrique, et ainsi d'avoir une durée d'acquisition des images tomographiques effectivement égale au temps d'intégration de la caméra.
- les méthodes « haute vitesse », correspondant à l'utilisation de sources et de caméras assez performantes pour atteindre des vitesses d'acquisition élevées, en conservant le schéma d'acquisition conventionnel de la FF-OCM.

La plupart des montages *single shot* utilisent des éléments polarisants pour séparer spatialement plusieurs images interférométriques décalées en phase, qui sont ensuite imagées simultanément par plusieurs caméras, ou par une unique caméra si le capteur de celle-ci est assez grand pour imager plusieurs images interférométriques ne se chevauchant pas. Des systèmes *single shot* à quatre images ont été développés [88, 89], ainsi que des systèmes à deux images, utilisant une seule caméra [90] ou deux [91]. Ce dernier utilisait une source ayant une luminance assez importante pour atteindre une vitesse d'acquisition (des images interférométriques et tomographiques du fait de l'acquisition single shot) de 10 μs, permettant d'imager un têtard *in vivo* en mouvement.

Dans ces systèmes utilisant des éléments polarisants, des artefacts peuvent apparaitre si des échantillons modifiant la polarisation (échantillons biréfringents) sont imagés. Ainsi, des systèmes *single shot* en lumière non polarisée ont aussi été developpés, en exploitant la lumière (généralement perdue) transmise au niveau du cube séparateur dans un inter-

féromètre de Linnik [70], en calculant l'image tomographique à partir d'une unique image interférométrique à partir de traitements numériques basés sur la transformée de Riesz [92], ou encore en utilisant un élément de décalage de phase achromatique [93]. Notons que cette dernière implémentation n'était pas réellement instantanée car deux paires d'images étaient utilisées pour la reconstruction, et la durée d'acquisition de l'image tomographique n'était alors pas égale au temps d'intégration des caméras, mais à deux fois le temps d'acquisition des caméras. Cependant, cette méthode a permis d'imager un écoulement de cellules sanguines dans un têtard *in vivo* [93].

L'ensemble de ces méthodes *single shot* peut ainsi acquérir des images assez rapidement pour l'imagerie *in vivo*, cependant leur sensibilité de détection est relativement faible du fait de l'incompatibilité de ces méthodes avec l'accumulation. Leur utilisation se limite donc généralement à l'imagerie d'échantillons faiblement diffusants (tels que le têtard). Par ailleurs, les systèmes *single shot* sont compliqués à ajuster correctement (les différentes images obtenues simultanément devant être parfaitement recalées en position et en intensité), et nécessitent plus d'éléments que les montages conventionnels de FF-OCM, les rendant difficilement compactables.

Les systèmes de FF-OCM *haute vitesse* ne souffrent pas de ces défauts, étant donné que leur conception et leur schéma d'acquisition est identique à celui du FF-OCM conventionnel. En utilisant une caméra CMOS (*complementary metal oxide semiconductor*) haute vitesse, une lampe à arc à Xenon et un algorithme à deux images, des images tomographiques ont pu être acquises à une vitesse de 250 images/s [94], permettant d'imager le segment antérieur d'un œil de rat *in vivo*. En utilisant une caméra CMOS encore plus rapide et toujours un algorithme à deux images, une vitesse de 1500 images/s a été atteinte, avec un schéma d'éclairage cependant complexe [95]. Ce montage a permis d'imager de la peau humaine *in vivo*. Plus récemment, des images de peau humaine *in vivo* ont été obtenues sur un montage de FF-OCM conventionnel éclairé par une lampe halogène à une vitesse de 70 images/s, mais une stabilisation du sujet était nécessaire [96]. Un système FF-OCM basé sur un interféromètre de Mirau et une source fluorescente de haute puissance a aussi été conçu pour l'imagerie *in vivo* [78], et malgré un temps d'acquisition relativement long (230 ms), des images de peau humaine *in vivo* de haute qualité ont été obtenues. Cependant, la configuration Mirau souffre d'un certain nombre de défauts (voir la partie 2.3.4.3). De même un montage de FF-OCM à large champ en configuration Michelson a été développé pour l'imagerie *in vivo* des empreintes digitales internes [97]. La durée d'acquisition était appropriée pour l'imagerie *in vivo*, mais la résolution était limitée du fait de la configuration Michelson.

La majorité de ces systèmes n'ont pas été conçus de telle sorte à pouvoir être utilisés sur des systèmes portatifs, permettant de bénéficier pleinement de la capacité d'imager la peau *in vivo* en fournissant un outil capable d'imager n'importe quelle région d'intérêt de la peau d'un sujet en temps réel. Par ailleurs, la plupart utilisent des sources lumineuses chères et dont l'utilisation peut être compliquée. Nous nous proposons dans ce chapitre de décrire un système FF-OCM adapté à l'imagerie de la peau humaine *in vivo*, assez compact pour être implémentable sur un système portatif, utilisant une source lumineuse LED peu chère et très facile d'utilisation, et basé sur un montage de Linnik, ayant de nombreux avantages.

Ce chapitre sera ainsi scindé en trois parties : tout d'abord le développement du montage de FF-OCM simple et compact adapté à l'imagerie de la peau humaine, puis l'introduction d'un éclairage LED dans ce montage et sa comparaison à l'éclairage par lampe halogène,

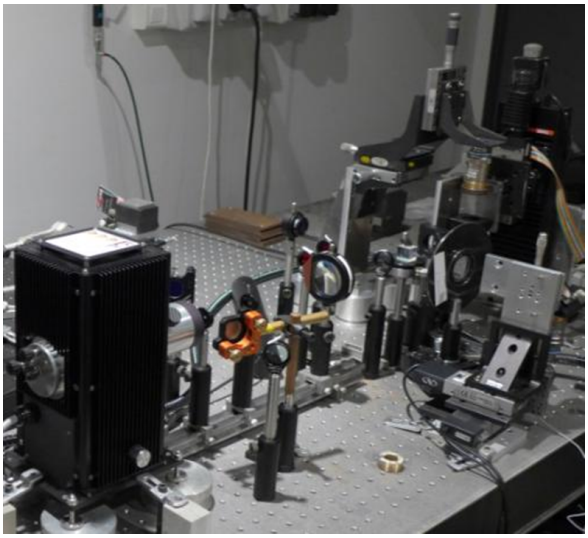

FIGURE 3.1 – Montage FF-OCM construit selon le schéma « conventionnel », avec plusieurs degrés de liberté mécanique (ici motorisés).

conventionnel en FF-OCM, et finalement l'amélioration du montage afin que sa vitesse et sa sensibilité soient suffisantes pour l'imagerie de la peau *in vivo*.

3.2 Montage de microscopie par cohérence optique simple et compact

Avant de s'intéresser au développement d'un montage de FF-OCM adapté à l'imagerie *in vivo*, nous commencerons par nous intéresser au développement d'un montage de FF-OCM simplifié par rapport au montage « conventionnel » présenté à la partie 2.3, nécessitant plusieurs degrés de liberté mécanique et synchronisations entre les éléments, et résultant souvent en des montages complexes difficilement transportables en dehors du laboratoire, tel que le montage représenté à la figure 3.1, développé au Laboratoire Charles Fabry pour l'imagerie FF-OCM à ultra-haute résolution optimisée [77].

Notre objectif est ici de proposer un montage de FF-OCM, en configuration Linnik, se présentant comme un microscope conventionnel, c'est à dire facilement transportable, monté sur une colonne verticale, les échantillons pouvant être placés simplement « sous le microscope » pour être imagés (mais ce microscope peut les imager en profondeur !). Afin que le montage soit aussi simple qu'un microscope conventionnel, on souhaite réduire au maximum le nombre de degrés de liberté mécanique et les synchronisations nécessaires pour l'imagerie.

Si notre système FF-OCM se présente comme un microscope conventionnel, il est aussi nécessaire que l'interféromètre [1] soit assez compact pour ne pas prendre beaucoup plus de place qu'un objectif de microscope unique. Concevoir un interféromètre compact permettrait aussi d'ouvrir la voie au développement de montages de FF-OCM portatifs, permettant potentiellement à un praticien d'imager facilement n'importe quelle partie du corps

1. Le terme *interféromètre* fera toujours référence à la partie {objectifs+cube séparateur+mécanique} du système FF-OCM.

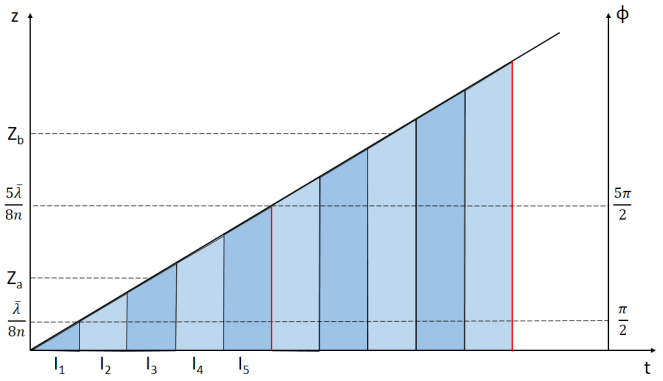

FIGURE 3.2 – Schéma de démodulation linéaire : position axiale à laquelle on image dans l'échantillon (et phase introduite correspondante) et périodes d'acquisition des images par la caméra. Sur cette course de l'interféromètre, 2 images tomographiques ont été acquises, à des profondeurs Z_a et Z_b.

en FF-OCM, ce qui permettrait de bénéficier pleinement des avantages d'un système permettant l'imagerie *in vivo*.

3.2.1 Méthode pour l'imagerie 3D

Commençons par nous intéresser à la méthode retenue pour pouvoir imager des échantillons en profondeur (en 3D) en FF-OCM tout en limitant au maximum le nombre de degrés de liberté mécanique et de synchronisations dans le système.

Si l'on souhaite imager un échantillon en profondeur, comme on l'a vu, il est normalement nécessaire d'avoir un mouvement de l'ensemble {objectif du bras de référence+surface de référence} synchronisé au mouvement de l'objectif du bras objet. Afin de supprimer ce mouvement, nécessitant d'ailleurs une synchronisation complexifiant le montage, une solution est de déplacer axialement *l'ensemble de l'interféromètre*[2]. Notons que si la source n'est pas solidaire de l'interféromètre, l'éclairage se décalera au cours du déplacement axial, cependant, rappelons que la profondeur de pénétration du FF-OCM est de l'ordre de quelques centaines de microns, tandis que l'éclairage est un éclairage plein champ, sur des champs typiquement de l'ordre du millimètre, et généralement spatialement incohérent, si bien qu'il couvre plus que l'acceptance angulaire des objectifs de microscope (voire figure A.8) : ainsi, l'éclairage de l'échantillon ne sera globalement pas influencé par le déplacement axial de l'interféromètre, même si la source reste fixe.

Cette translation axiale de l'ensemble de l'interféromètre permet aussi de démoduler le signal interférométrique : au lieu d'obtenir N images interférométrique correspondant à N positions telles que les interférences sont successivement déphasées de $\frac{\pi}{2}$ (schéma d'acquisition pas à pas vu précédemment), il est possible d'obtenir les N images pendant que l'interféromètre se déplace continument sur une distance correspondant à un déphasage de $\frac{N\pi}{2}$. La figure 3.2 illustre ce principe.

2. Cette solution est par exemple couramment employée en CSI [98]. Notons qu'en FF-OCM, cette solution rend indispensable l'utilisation d'objectifs de microscope corrigés à l'infini, afin que le plan qu'on image avec l'objectif soit toujours conjugué du plan du capteur de la caméra au cours du déplacement axial de l'interféromètre

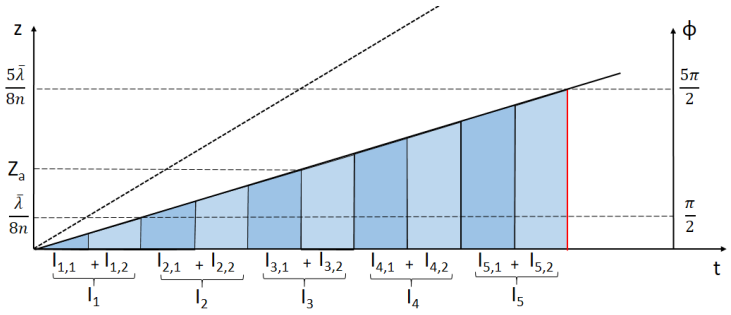

FIGURE 3.3 – Schéma de démodulation linéaire en prenant en compte une accumulation de 2 images ($N_{acc} = 2$), comparé à un cas sans accumulation (pointillé).

On peut alors montrer que les N images acquises avec ce mouvement de la surface de référence sont équivalentes à celles acquises avec un mouvement pas à pas, à la seule différence qu'en toute rigueur l'amplitude des interférences est affectée d'un facteur $\text{sinc}\left(\frac{\pi}{4}\right) \sim 0.9$, où $\text{sinc}(x) = \frac{\sin(x)}{x}$ [58], et le contraste des franges est donc très légèrement réduit. Tous les algorithmes s'appliquant à un schéma de démodulation pas à pas s'appliquent donc au schéma « linéaire ». Notons aussi que l'accumulation est tout à fait possible avec ce schéma : au lieu d'acquérir une image unique sur la période correspondant à un déphasage de $\frac{\pi}{2}$, on acquiert N_{acc} images que l'on somme[3]. La figure 3.3 illustre le principe de l'accumulation en schéma linéaire.

Ainsi, on voit que le même déplacement peut servir à la fois à la démodulation (en schéma linéaire) et à la pénétration dans l'échantillon, tout en ajustant la focalisation au cours de la pénétration dans l'échantillon. En couplant les mouvements de pénétration, démodulation et focalisation, un seul degré de liberté mécanique est nécessaire pour obtenir des images 3D d'un échantillon. Le schéma d'acquisition est donc de déplacer en continu l'interféromètre, d'acquérir des images interférométrique en continu (sur des périodes correspondant à des déphasages de $\frac{\pi}{2}$), puis d'obtenir une images tomographique pour toutes les N images interférométriques, chaque image tomographique étant ainsi plus profonde que la précédente d'une quantité correspondant à un déphasage $\frac{N\pi}{2}$ (soit un déplacement de l'interféromètre d'une quantité $\Delta z = \frac{N\bar{\lambda}}{8n_{im}}$, soit une profondeur $\Delta z\left(\frac{n_{im}}{n}\right) = \frac{N\bar{\lambda}}{8n}$ dans l'échantillon). A partir de ces images tomographiques, on reconstitue une image 3D de l'échantillon. Notons que la quantité $\frac{N\bar{\lambda}}{8n_{im}}$ est généralement largement inférieure à la résolution axiale du système, et l'image 3D de l'échantillon sera donc suréchantillonnée dans la direction axiale. Ce surréchantillonage implique une acquisition plus longue que pour une image 3D où l'écart de profondeur entre les images en face aurait été d'exactement la résolution axiale du système, cependant, ce schéma d'acquisition est nécessairement plus complexe et du temps peut être perdu en raison des temps de positionnement mécaniques des différents éléments d'une image à l'autre. Dans notre schéma d'acquisition, tout est fait en continu si bien que la durée d'acquisition n'est finalement pas nécessairement beaucoup plus longue que pour une acquisition non suréchantillonnée. Par ailleurs, le suréchantillonage permet de moyenner les images 3D dans la direction axiale jusq'à un certain point

3. La vitesse du mouvement de la surface de référence doit donc être réduite d'un facteur N_{acc} pour que toutes les images soient bien acquises en limite de saturation du capteur. Par ailleurs, l'amplitude du terme d'interférences est alors affectée d'un facteur $\text{sinc}\left(\frac{\pi}{4N_{acc}}\right)$, se rapprochant de 1 : la possible perte en sensibilité du schéma linéaire est alors tout à fait négligable.

sans réduire la résolution axiale, ce qui permet finalement d'obtenir des images moins bruitées à haute résolution. Finalement, notons aussi que du fait de ce schéma d'acquisition, le nombre d'images nécessaire pour l'algorithme de reconstruction choisi n'influence pas la durée d'acquisition totale de l'image 3D, toutes les images interférométriques devant de toute façon être déphasées de $\frac{\pi}{2}$. Ce nombre d'images influence donc uniquement l'échantillonage axiale de l'image 3D [4], et tant qu'on ne s'intéresse pas à des situation où la minimisation de Δt_{FF-OCM} est importante, la seule condition sur ce nombre est que l'écart entre deux images tomographiques successives ne soit pas supérieur à la résolution axiale du système, soit $\frac{N\overline{\lambda}}{8n_{im}} \leq \Delta z_{FF-OCM}$ (sans quoi les images 3D serait sous échantillonées dans la direction axiale). On utilisera donc l'algorithme de Larkin, nécessitant 5 images mais démodulant très bien le signal avec un calcul simple.

Notons par ailleurs qu'aucune synchronisation n'est nécessaire : on a déjà vu que la synchronisation entre le mouvement des deux bras est supprimée du fait du mouvement global de l'interféromètre, et par ailleurs toutes les images interférométriques seront déphasées de $\frac{\pi}{2}$ les unes par rapport aux autres quel que soit l'instant auquel la caméra commence l'acquisition, et donc il n'est pas nécessaire de synchroniser la caméra et le mouvement de démodulation.

Finalement, une nouvelle méthode de démodulation inédite en FF-OCM a été développée à partir de ce schéma d'acquisition. Considérons l'acquisition d'une pile d'images interférométriques en schéma linéaire tel que décrit précédemment. Si l'on effectue une coupe verticale dans cette coupe (qui, une fois démodulée, correspondant à un B-scan), les franges d'interférences ont toutes la même période $\frac{\overline{\lambda}}{2n_{im}}$ (voir équation 2.32). Ainsi si l'on considère la transformée de Fourier (2D ou colonne par colonne) de cette image, on observera une fréquence spatiale fortement représentée correspondant à la fréquence des franges d'interférences, contenant le signal qui nous intéresse. En isolant cette fréquence (en ne conservant qu'un des deux pics lui correspondant pour supprimer au passage la variation sinusoïdale du terme d'interférence) dans l'espace de Fourier et en effectuant une transformée de Fourier inverse, on récupère finalement l'amplitude du signal interférométrique. Cette méthode de démodulation classique en traitement du signal n'avait jamais été appliquée au cas de la FF-OCM. La figure 3.4 illustre ce concept de démodulation par une simulation numérique, pour un échantillon similaire à celui évoqué dans la partie 2.3.1.1.

Notons cependant que cette méthode nécessite de conserver l'intégralité de la pile des images interférométriques, soit $N \times N_{acc}$ fois plus d'images que si un algorithme est appliqué au cours de l'acquisition de manière à pouvoir ne conserver que les images tomographiques, résultant en des quantités de données assez importantes, pouvant être compliquées à stocker et à traiter. De ce fait, cette méthode n'a pas été retenue comme la méthode de démodulation de référence dans la suite de nos travaux, où la démodulation par recombinaison d'images a été privilégiée.

Cependant cette méthode, se fondant entièrement sur la transformée de Fourier, un outil mathématique parfaitement maîtrisé et implementable numériquement de manière très efficace, peut dans certains cas s'avérer utile et plus simple que la démodulation conventionneles utilisant des algorithmes de recombinaison d'images. En particulier, le suréchantillonage lié au déphasage de $\frac{\pi}{2}$ entre les images interférométriques n'est pas utile pour ce schéma de démodulation, où la seule condition est que les franges d'interférences soient bien échantillonnées dans la direction axiale. On doit donc avoir au moins deux images interférométrique par période des franges selon le théorème de Nyquist, soit un décalage

4. Et bien sûr toujours Δt_{FF-OCM}.

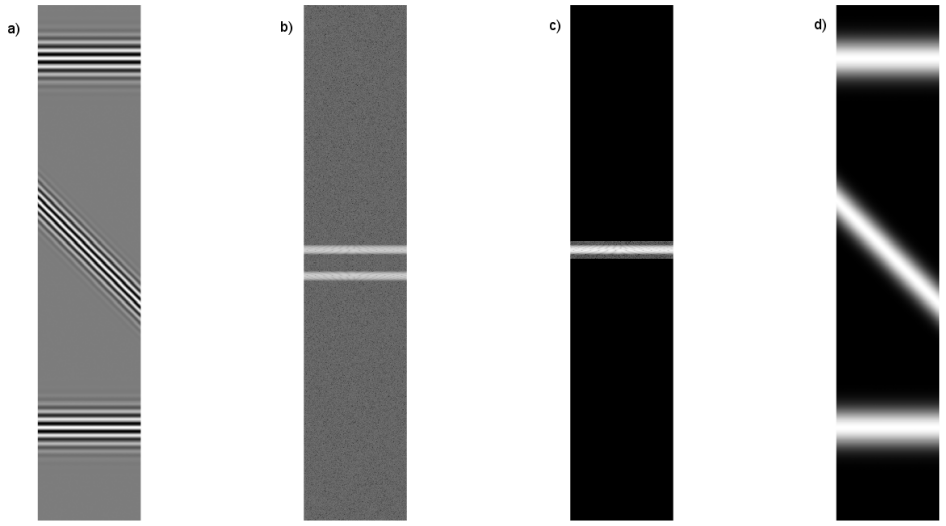

FIGURE 3.4 – Démodulation à partir d'une coupe verticale dans une pile d'images interférométriques, par transformée de Fourier : a) coupe dans la pile d'images interférométriques, b) transformée de Fourier correspondante (colonne par colonne), c) isolation d'un des deux pics correspondant à la fréquence spatiale des interférences, d) transformée de Fourier inverse, démodulation du signal.

maximal de $\frac{\overline{\lambda}}{4n_{im}}$ entre deux images successives, deux fois plus grand que le décalage nécessaire pour un déphasage de $\frac{\pi}{2}$, et pouvant finalement résulter en des acquisitions deux fois plus rapides qu'avec des algorithmes à recombinaison d'images conventionnels.

3.2.2 Correction de la dispersion : optimisation pour l'imagerie de la peau

L'objectif de ce montage est l'imagerie de la peau. Comme on l'a vu, il convient de compenser la dispersion introduite par l'échantillon pour pouvoir l'imager pertinemment. Afin de ne pas complexifier le montage, la compensation de la dispersion se fera par l'utilisation d'objectifs de microscope à immersion. Afin d'être optimisé pour l'imagerie de la peau, le milieu d'immersion devra avoir une courbe de dispersion de forme identique à celle de la peau. Notons de plus que le schéma d'acquisition présenté précédemment entraîne qu'il n'est pas possible de déplacer un bras par rapport à l'autre (tout l'interféromètre restant solidaire). Ainsi, pour éviter le problème de la séparation des plans de cohérence et de focalisation, il est ici nécessaire que les indices moyens du milieu d'immersion et de la peau soient identiques. En d'autres termes, on recherche un milieu d'immersion ayant une courbe de dispersion identique à celle de la peau.

La peau, jusqu'à quelques millimètres en profondeur, se compose de deux couches : l'épiderme et le derme. Les courbes de dispersion de ces deux couches ont été mesurées [99] et sont présentées à la figure 3.5.

L'eau est un milieu d'immersion donnant généralement des résultats corrects pour l'imagerie des milieux biologiques en FF-OCM, cependant, pour une application particulière à l'imagerie de la peau, il est possible de trouver des liquides d'immersion plus appropriés. A partir de leurs courbes de dispersion, de nombreux liquides d'immersion produits par

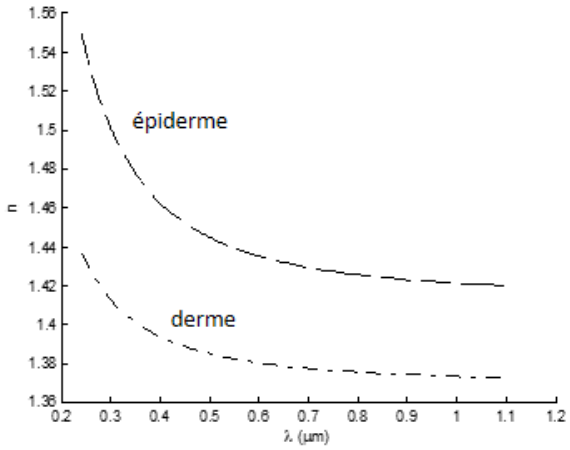

FIGURE 3.5 – Courbes de dispersion mesurées pour l'épiderme et le derme (obtenues à partir de [99]).

la société Cargille, dont les indices moyens se situaient autour de 1.45, ont été testés en simulation numérique afin de déterminer le liquide le plus adapté à l'imagerie de la peau. Ces simulations s'intéressent aux interférogrammes (et en particulier leur largeur) obtenus pour une pénétration dans 200 μm dans l'épiderme et 100 μm dans le derme, que l'on considèrera comme la limite de profondeur de pénétration de la FF-OCM (300 μm sous la surface de la peau). Finalement, le liquide retenu est le liquide Cargille S1050 d'indice 1.4 à 700 nm. La figure 3.6 représente les interférogrammes obtenus dans les conditions énoncées précédemment, pour le liquide retenu, en comparaison à une immersion dans l'eau. Les courbes de dispersion du liquide retenu et de l'eau sont représentées en parallèle des courbes de dispersion de l'épiderme et du derme. Les enveloppes des interférogrammes normalisées par rapport à celle correspondant au liquide retenu sont aussi présentées, on y ajoute celle correspondant à l'air pour référence. Cette figure ne prend pas en compte la séparation des plans, mais elle est bien sûr plus faible pour le liquide retenu du fait de son indice moyen plus proche de celui de la peau.

3.2.3 Conception mécanique

Afin d'avoir l'interféromètre le plus compact possible pour que notre montage puisse s'apparenter à un microscope conventionnel, on se propose de fixer les deux objectifs de microscope nécessaires à la configuration Linnik directement sur le support du cube séparateur. Un objectif est dirigé vers le bas et constitue l'objectif du bras objet, tandis que l'autre objectif est placé dans la direction d'illumination, et constitue l'objectif du bras de référence. Une telle configuration n'est pas beaucoup plus encombrante qu'un cube séparateur sur lequel est fixé un unique objectif de microscope (configuration en microscopie de réflexion conventionnelle).

Cependant, le choix de cette configuration compacte nécessite de développer une solution pour le positionnement de la surface de référence, qui doit être fixée et solidaire de l'objectif du bras de référence afin que ce soit effectivement l'intégralité de l'interféromètre qui soit translaté par le degré de liberté en positionnement axial évoqué à la partie 3.2.1, et afin de ne pas complexifier le montage en ajoutant des degrés de liberté sur le positionnement de la surface de référence, en perdant le gain en compacité acquis par la fixation

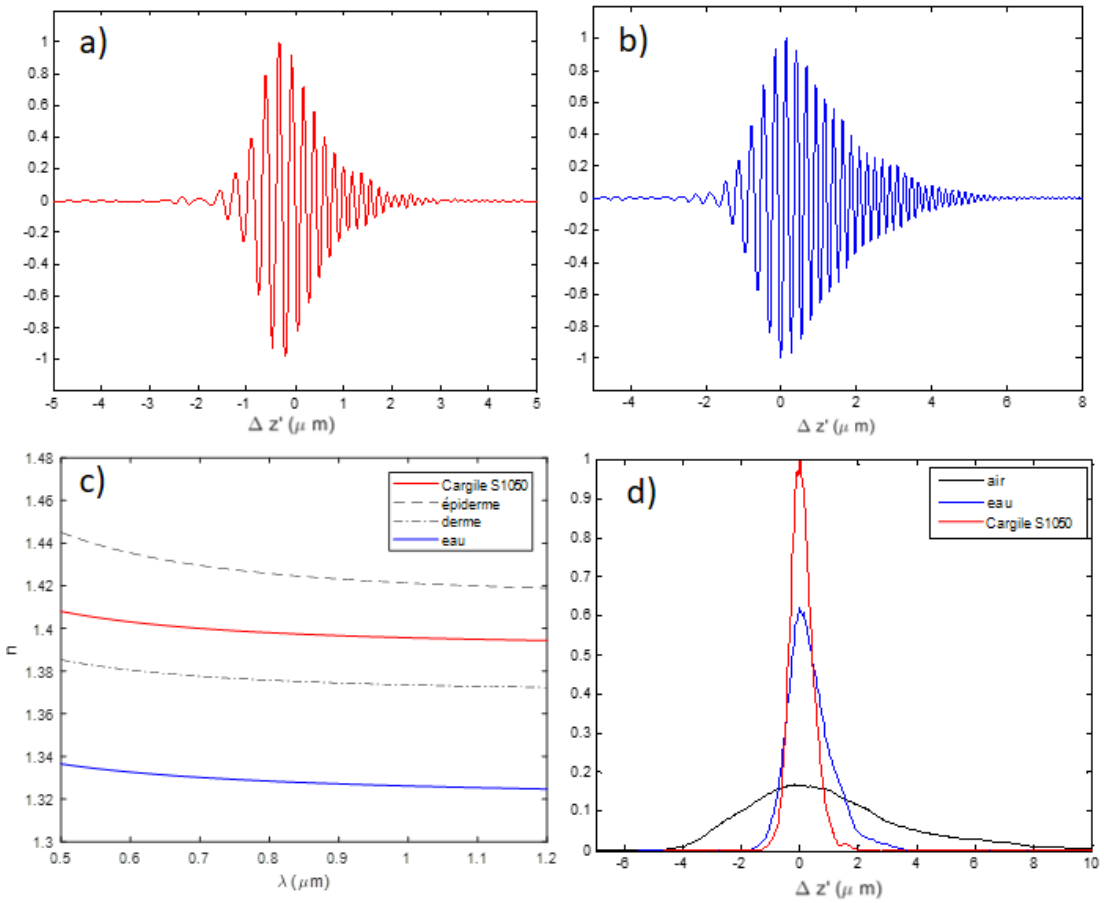

FIGURE 3.6 – Comparaison du liquide d'immersion retenu pour l'imagerie de la peau et d'une immersion à eau pour une imagerie à 300 μm dans la peau, pour une épaisseur de 200 μm d'épiderme et 100 μm de derme (simulations numériques). La source considérée est identique à celle considérée dans la figure 2.22). a) interférogramme obtenu pour une immersion dans le liquide d'immersion retenu (Cargille S1050), b) pour une immersion à eau, c) courbes de dispersion de la peau, de l'eau, et du liquide Cargille S1050, sur la gamme spectrale associée à la source (visible et proche infrarouge) d) enveloppes des interférogrammes normalisées par rapport à celle obtenue pour le liquide Cargille S1050.

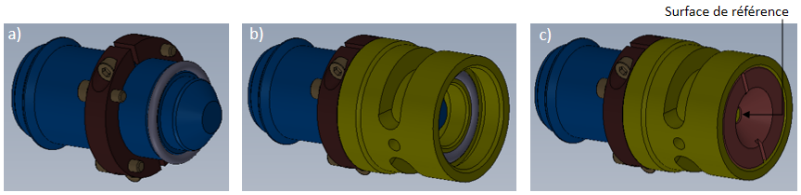

FIGURE 3.7 – Conception des différents éléments nécessaire pour la cuve associée à l'objectif de référence. a) fixations objectif/cuve et joint torique, b) cuve et second joint torique ajoutés, c) écrou sur lequel on fixe la surface de référence.

des deux objectifs au support du cube séparateur.

La solution apportée a été de concevoir et réaliser une cuve pouvant être fixée sur l'objectif de référence, dans laquelle on peut visser un écrou sur lequel la surface de référence est fixée. On peut ainsi jouer sur la position axiale de la surface de référence en vissant plus ou moins l'écrou. Notons qu'il est important que la surface de référence soit fixée à l'écrou de telle manière qu'elle soit plane, sans quoi le plan de cohérence dans les échantillons fera un angle par rapport au plan de focalisation, pouvant poser des problèmes de perte de signal (voir la partie 2.3.3.2). L'utilisation d'une cuve permet aussi de la remplir facilement de liquide d'immersion. Un trou dans la cuve permet de la remplir même lorsque l'écrou est fixé. La figure 3.7 représente les différents éléments de cette cuve (fixations cuve/objectif, joints pour éviter les fuites lorsque la cuve est remplie de liquide d'immersion, cuve, écrou sur lequel la surface de référence peut être fixée), conçus en utilisant le logiciel de conception assistée par ordinateur (CAO) Solidworks.

Du point de vue de l'objectif du bras objet, il serait possible de placer directement l'échantillon sous l'objectif, en plaçant une goutte de liquide entre les deux. Cependant, pour maintenir l'échantillon fixe, dans l'optique de l'imagerie *in vivo* (où les mouvements de l'échantillon sont à limiter au maximum), on se propose de placer une plaque sous l'objectif du bras objet, sur laquelle un trou est percé au niveau de l'objectif, et une lame de verre (une « fenêtre ») de 500 μm est placée dans ce trou. Ainsi, l'échantillon peut être plaqué contre cette lame de verre et maintenu relativement fixe. Cette lame de verre permet ainsi aussi d'indiquer facilement la position de départ de la course de l'interféromètre selon le schéma présenté à la section 3.2.1 : si l'échantillon est plaqué contre la lame, la surface de l'échantillon est ainsi donnée par la position de la « deuxième interface » de la lame de verre (les interfaces étant comptées en partant de l'objectif). Cette lame de verre permet aussi de régler facilement la position des deux objectifs de telle manière que la différence de marche entre les deux bras soit nulle (en surface de l'échantillon), condition toujours présumée jusqu'à maintenant. En effet, sans échantillon, placer les deux objectifs à la différence de marche nulle correspondra à observer des interférences entre la surface de référence et la deuxième interface de la lame de verre (en utilisant une source à spectre large pour ce réglage). Notons que pour compenser la dispersion introduite par cette lame de verre dans le bras objet, il est nécessaire d'introduire une lame de verre identique dans le bras de référence. Étant donné que le coefficient de réflexion d'une interface verre/air est de 3.5% (en considérant que le verre est en silice fondue), coefficient ne dégradant pas la sensibilité en considérant les valeurs de R_{incoh} typiques en FF-OCM (voir figure 2.20), la surface de référence sera simplement la deuxième interface d'une lame de verre identique à celle placée dans le bras objet. De plus utiliser la même surface dans les deux bras entraîne un contraste des franges maximal lorsque qu'on s'intéresse aux interférences entre ces deux

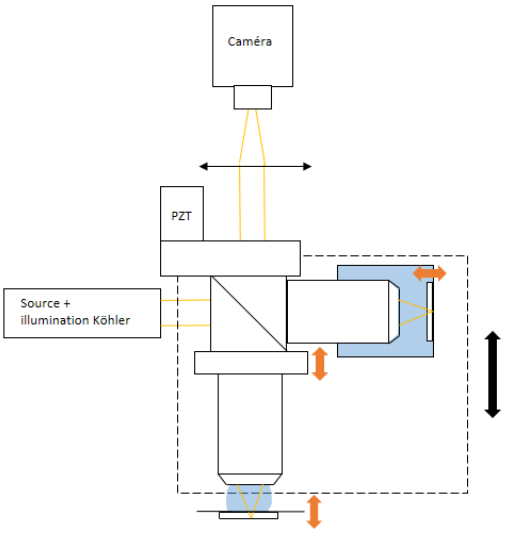

FIGURE 3.8 – Schéma de l'ensemble du montage de FF-OCM conçu, avec les différents degrés de libertés associés. En noir, le degré de liberté nécessaire à l'acquisition, en orange, les degrés de liberté de réglage de l'interféromètre.

surfaces, ce qui facilite la tâche de réglage de la différence de marche nulle.

Notons finalement que, tout comme il était nécessaire de placer un degré de liberté pour le réglage de la position axiale de la surface de référence pour que l'objectif de référence soit bien focalisé sur celle-ci, il est nécessaire de placer un degré de liberté sur la position axiale de la plaque sur laquelle est montée la lame de verre dans le bras objet (via une platine de translation manuelle), pour pouvoir jouer sur la position de l'objectif du bras objet (pour régler la position de la différence de marche nulle) tout en maintenant la lame de verre focalisée, ou permettre de déplacer la surface de l'échantillon si besoin.

Ainsi, l'interféromètre comporte trois degrés de liberté de réglage (surface de référence (lame de verre) via l'écrou de la cuve, objectif de référence, fixé au cube séparateur par un tube réglable, et plaque sur laquelle la lame de verre du bras objet est fixée via une platine de translation manuelle). Mais ceux-ci sont normalement fixés après réglage, et le seul degré de liberté utile pendant une mesure est celui de la totalité de l'interféromètre comme décrit à la partie 3.2.1. Pour assurer ce mouvement axial, l'interféromètre est fixé à un PZT au niveau du cube séparateur. La figure 3.8 représente schématique l'intégralité du système FF-OCM ainsi conçu, avec la mécanique associée. Notons que la voie d'éclairage sera simplement montée sur un rail, tandis que la caméra, la lentille de tube, le PZT et la plaque sur laquelle se trouve la lame de verre du bras objet seront fixés à une colonne via des équerres.

3.2.4 Choix des composants

Afin de construire le montage conçu précédemment, on utilisera tout d'abord un éclairage Köhler à lampe halogène conventionnel, construit précédemment au Laboratoire Charles Fabry. Cet éclairage est relativement volumineux (rail d'environ 50 cm). Notons que du fait des réflexions parasites sur les faces du cubes séparateur (voir partie 2.3.4.3), l'éclairage n'était pas exactement selon l'axe optique des objectifs, pour pouvoir imager une zone de l'échantillon sans être « ébloui » par les taches parasites issues du cube séparateur

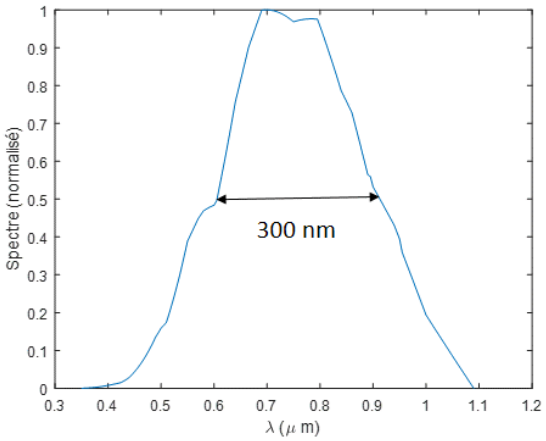

FIGURE 3.9 – Spectre effectif de la lampe halogène vu par la caméra Dalsa 1M15.

La caméra utilisée dans un premier temps est une caméra CCD (charge coupled device) Dalsa 1M15, fonctionnant à 15 images par seconde (non réglable). Le produit de sa réponse spectrale et du spectre de la lampe halogène (spectre d'un corps noir à 3000 K) est donné en figure 3.9. Le spectre effectif a ainsi une longueur d'onde centrale de 750 nm et une largeur spectrale de 300 nm, résultant en une résolution axiale théorique de $\Delta z_{FF-OCM} = 0.6\,\mu m$ (en considérant un indice d'immersion de 1.4). La profondeur des puits de photons des pixels est de 250.000 électrons, avec un bruit de lecture de 78 électrons, donnant une sensibilité théorique (sans accumulation) d'environ 67 dB en considérant $R_{incoh} = 5\%$ et $R_{ref} = 3.5\%$. La lentille de tube utilisé a une focale de 300 mm, donnant pour le système un grandissement $G = 33$. Le capteur de la caméra faisant 14.3 mm × 14.3 mm, le champ vu par la caméra est de 430 μm × 430 μm.

Les objectifs utilisés sont des objectifs Olympus UMPLFLN 20XW (NA=0.5), donnant une résolution latérale théorique de $\Delta x_{FF-OCM} = 0.52\,\mu m$. Les pixels sont carrés, tels que $c_1 \times c_2 = 14\,\mu m \times 14\,\mu m$. Ainsi, on a bien $\frac{c_1}{G} \times \frac{c_2}{G} = 0.42\,\mu m \times 0.42\,\mu m \lesssim \Delta x_{FF-OCM} \times \Delta x_{FF-OCM}$. Le numéro de champ des objectifs est de 26.5, donnant un champ d'observation maximal de 1.3 mm avec ces objectifs de grandissement 20x (voir formule A.3). Le champ est donc limité par le nombre de pixels de la caméra. Notons que ces objectifs sont des objectifs à immersion dans l'eau, n'étant pas conçus pour travailler dans un milieu d'indice 1.4. De même, ils ne sont pas conçus pour travailler en traversant une lame de verre de 500 μm. Leur ouverture numérique étant assez élevée, des aberrations affecteront probablement la résolution latérale du système. Cependant, s'affranchir de ces aberrations nécessiterait de concevoir des objectifs de microscope spécialement pour cette application, ce qui est un travail fastidieux et ne constituant pas un de nos objectifs. De plus l'utilisation d'objectifs à immersion dans l'eau est adaptée si l'on décide d'utiliser le système pour observer d'autres échantillons biologiques que la peau, l'eau étant un milieu d'immersion convenant pour imager la majorité des échantillons biologiques. Par ailleurs, notons que les aberrations introduites n'ont pas d'effet sur la résolution axiale du système [100].

Le PZT utilisé est un PZT adapté aux objectifs de microscope (piezosystem Jena, MIPOS 500) ayant une course de 500 μm.

La figure 3.10 présente une photo de l'interféromètre du système FF-OCM construit,

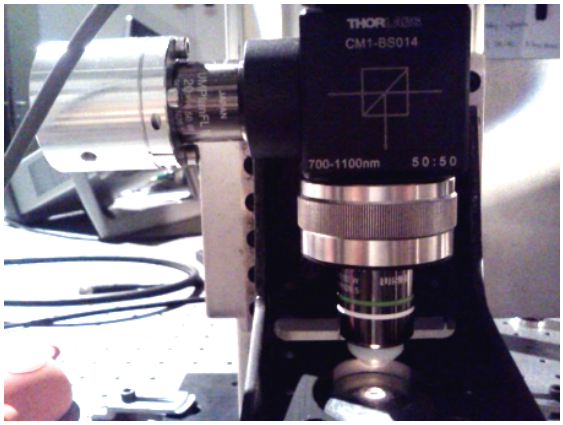

FIGURE 3.10 – Photo de l'interféromètre du système FF-OCM construit.

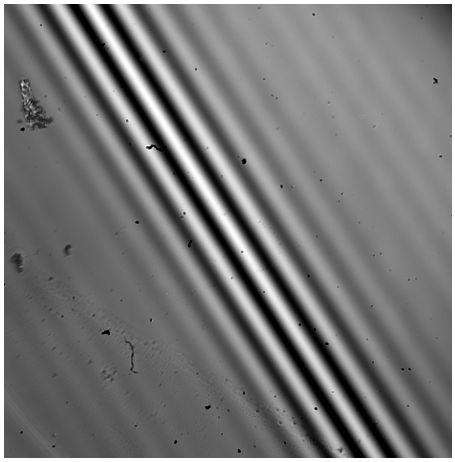

FIGURE 3.11 – Image interférométrique obtenue lorsqu'on sonde la deuxième interface de la lame de verre dans le bras objet.

où l'on peut voir la cuve de l'objectif de référence, le PZT, les outils permettant d'avoir les degrés de liberté de réglage et la plaque portant la lame de verre dans le bras objet.

Afin de piloter le montage, un logiciel a été écrit en langage de programmation C++, en utilisant des librairies OpenCV. Ce logiciel est présenté en annexe D.

3.2.5 Exemples d'images

A partir du montage de FF-OCM conçu et du logiciel associé, des images de différents échantillons ont pu être obtenues. Avant toute chose, la figure 3.11 représente l'allure des franges obtenues lorsqu'on considère les interférences entre les deux lames de verre dans les deux bras. Elles sont semblables aux franges qui avaient été obtenues par simulation numérique à la figure 2.10. Notons que le champ vu par la caméra a été mesuré en utilisant une mire graduée, et est de $400\,\mu m \times 400\,\mu m$, légèrement plus faible que la valeur théorique précédemment estimée.

La figure 3.12.a. présente une image tomographique en face correspondant à l'imagerie de la deuxième interface de la lame de verre dans le bras objet (démodulation des franges

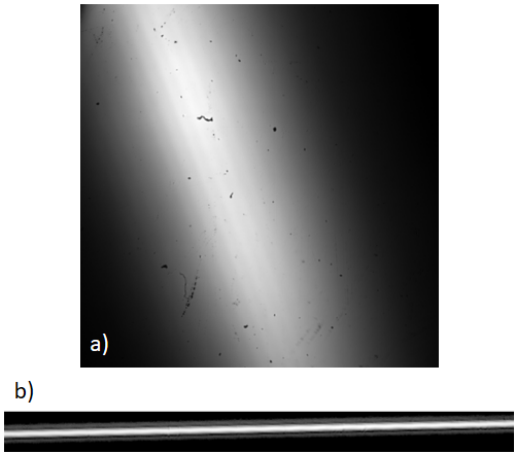

FIGURE 3.12 – a) Image tomographique en face de la deuxième interface de la lame de verre du bras objet et b) coupe verticale dans une image 3D de cette interface.

précédemment présentées), en utilisant un schéma de démodulation linéaire et l'algorithme de Larkin. A nouveau, l'image est très similaire à la simulation numérique présentée en figure 2.12. La figure 3.12.b. représente une coupe verticale obtenue pour l'imagerie de cette même interface.

Le premier échantillon biologique à avoir été testé sur le montage était une grenouille, dont on a imagé la peau du ventre, en utilisant de l'eau comme milieu d'immersion. La figure 3.13 présente deux images en face obtenues à deux profondeurs différentes ($\sim 30\,\mu m$ et $\sim 60\,\mu m$), ainsi qu'une image en coupe verticale, comparé à une image en coupe verticale obtenue en histologie. On observe une résolution cellulaire dans la peau de la grenouille, et on retrouve dans la coupe verticale des structures identifiées en histologie.

Afin de tester le montage sur de la peau humaine, un échantillon de peau saine du cou prélevé lors d'une opération de chirurgie esthétique a été imagé en collaboration avec l'hôpital Saint Louis (Paris). La figure 3.14 présente des images en face de l'échantillon de peau acquises à quatre profondeurs différentes ($\sim 10\,\mu m$, $\sim 30\,\mu m$, $\sim 60\,\mu m$ et $\sim 80\,\mu m$), ainsi que quatre images en coupe verticale. Une résolution cellulaire est atteinte à la fois dans les directions axiale et latérale. L'intégralité de l'épiderme peut être imagée. Ces images montrent le potentiel de ce montage pour l'imagerie de la peau.

Ajoutons finalement qu'en collaboration avec l'Institut de la Vision, des cornées ont pu être imagées sur le montage. Tout comme dans la peau, une résolution cellulaire est atteinte. La figure 3.15 présente une image en face au niveau de l'épithélium cornéen ainsi qu'une image en coupe traversant l'épithélium cornéen.

Nous avons ainsi développé un instrument de FF-OCM sur colonne, compact, utilisant un schéma d'acquisition simple ne nécessitant qu'un unique degré de liberté et aucune synchronisation électrique, permettant d'imager des échantillons biologiques et en particulier la peau humaine en profondeur à une résolution cellulaire. Cependant, ce montage est basé sur une technologie relativement dépassée du point de vue des voies d'imagerie (caméra CCD à 15 images par seconde) et d'éclairage (utilisation d'une lampe halogène). Nous nous proposons à présent de remplacer la lampe halogène utilisée dans ce montage par une simple LED, tout en visant à obtenir une résolution axiale similaire, ce qui n'avait jamais été fait en FF-OCM.

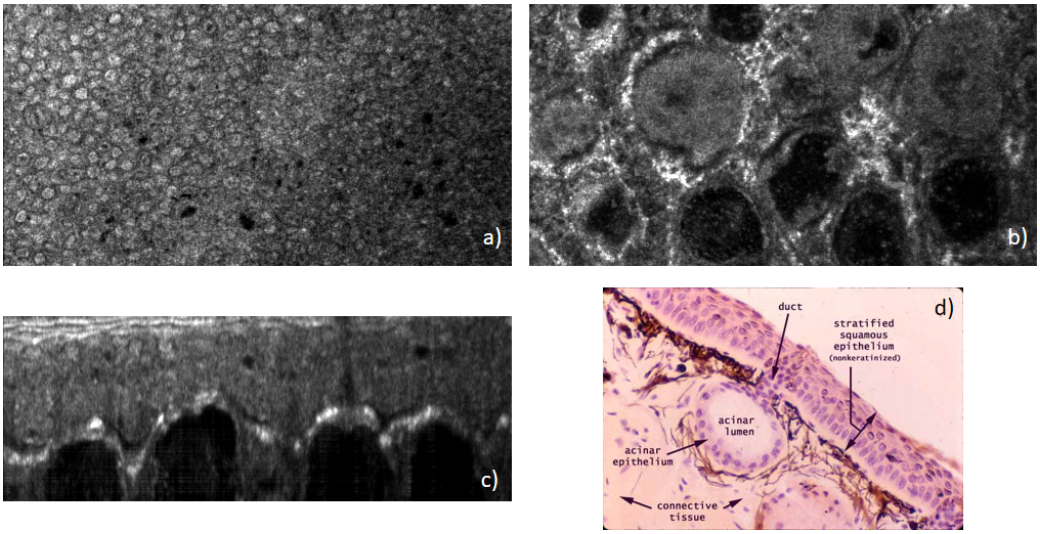

FIGURE 3.13 – Images tomographiques de la peau du ventre de grenouille. a) image en face à 30 μm en profondeur, b) image en face à 60 μm en profondeur, c) image en coupe verticale sur une profondeur de 150 μm, d) image de peau de grenouille en histologie (http ://www.siumed.edu). Champ des images tomographiques en face : 400 μm $\times$ 200 μm.

3.3 Microscopie par cohérence optique plein champ haute résolution à éclairage LED

Au cours du XX^{e} siècle, l'immense majorité des sources de lumière artificielle utilisées en éclairagisme étaient des lampes à incandescence, produisant de la lumière en chauffant un filament de tungstène à l'intérieur d'une ampoule afin qu'il émette de la lumière (principe du rayonnement du corps noir). Cette technologie a été développé à la fin du XIX^{e} siècle, en particulier par Thomas Edison, et fut améliorée en 1959 en ajoutant des gaz halogénés à basse pression dans l'ampoule, afin d'augmenter la durée de vie du filament. Ce type de lampe à incandescence (lampe halogène) constitue encore aujourd'hui la principale source de lumière artificielle utilisée en éclairagisme, très bien adaptée à cette application du fait que la lumière émise par ces lampes est une lumière blanche dont le spectre est proche de celui du soleil (qui constitue aussi un corps noir rayonnant de la lumière).

Cependant, dans ce secteur, on assiste depuis quelques années à un remplacement progressif des lampes halogènes par d'autres sources de lumières, en particulier les diodes électroluminescentes (ou LED pour *light-emitting diode* en Anglais), utilisant des matériaux semi-conducteurs pour produire de la lumière. Le passage à l'éclairage public à LED est ainsi présenté comme une avancée majeure, la totalité de l'éclairage de certaines villes se faisant maintenant par LED.

Une LED est fondamentalement une source quasi-monochromatique, et de ce fait ne semble pas adaptée à des applications nécessitant de la lumière blanche. Cependant l'éclairage par LED présente de nombreuses qualités qui ont poussé les travaux de développement des LED vers le développement de *LED blanches* afin d'être prioritairement utilisées dans des applications d'éclairagisme. En effet, les LED constituent des sources qui ne sont pas excessivement chères, très compactes (le matériau semi-conducteur peut n'avoir une épaisseur que de quelques centaines de microns), consommant peu d'énergie du fait qu'elles ont

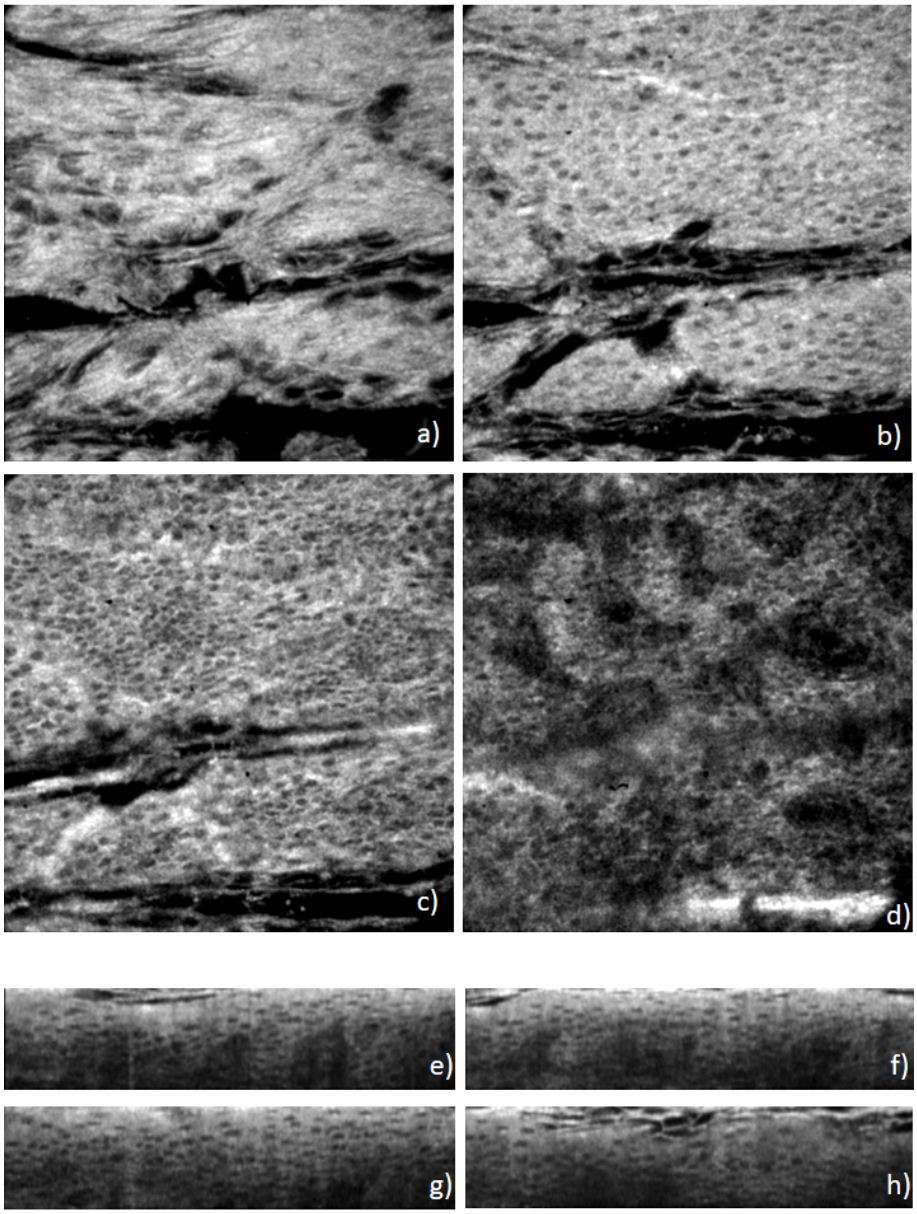

FIGURE 3.14 – Images tomographiques de la peau humaine *ex vivo*. a) image en face à 10 μm en profondeur, b) image en face à 30 μm en profondeur, c) image en face à 60 μm en profondeur, d) image en face à 80 μm en profondeur, e) à h) images en coupe verticale à différentes positions, sur une profondeur de 100 μm. Champ des images en face : 400 μm $\times$ 400 μm.

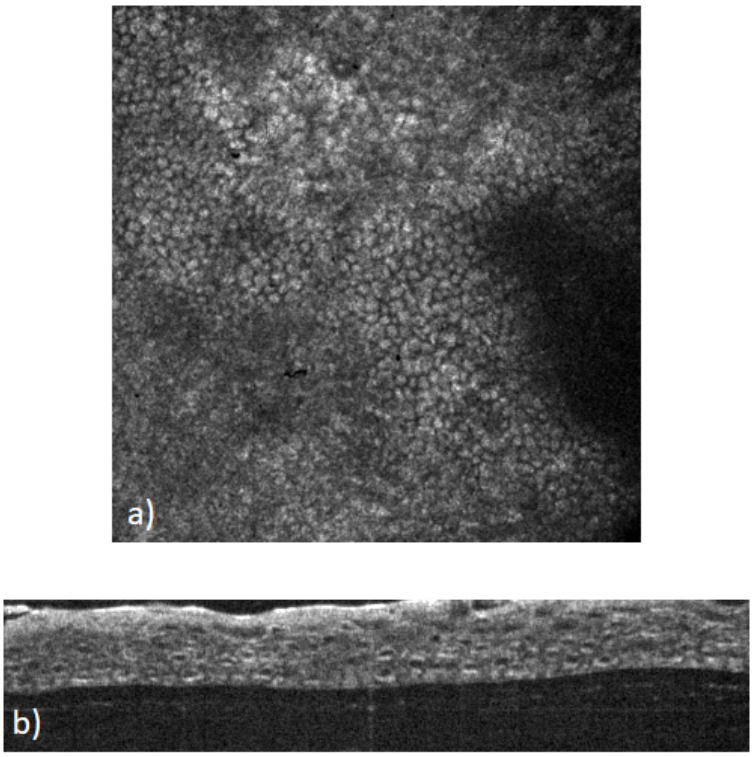

FIGURE 3.15 – Images tomographiques de cornée *ex vivo*. a) image en face au niveau de l'épithélium cornée (champ : 400 μm $\times$ 400 μm), b) image en coupe verticale sur une profondeur de 80 μm ,traversant l'épithélium cornéen.

un très bon rendement énergétique, à savoir que la majeure partie de la puissance utilisée pour leur utilisation est convertie en lumière (elles dissipent peu de chaleur, par exemple), et qu'elles émettent dans un angle solide limité (la majeure partie de la lumière qu'elles émettent peut ainsi être efficacement utilisée). Ainsi les LED ont des temps de vie très longs (une lampe à LED ayant des propriétés d'éclairage similaire à une lampe halogène aura une durée de vie de 10 à 25 ans contre environ 2 ans pour la lampe halogène). Les LED ne requièrent dont pas beaucoup de maintenance, et sont par ailleurs très simples à alimenter. Par ailleurs l'« allumage » d'une LED est instantané à l'application d'un courant électrique, et de même il est possible de moduler l'intensité d'émission d'une LED à très haute fréquence (par modulation du courant appliqué) sans endommager la LED. L'émission des LED lorsque l'alimentation électrique est continue est d'ailleurs très stable au cours du temps. Notons finalement que les LED ne contiennent généralement aucun élément polluant ou dangereux.

Afin de développer des LED blanches, deux méthodes principales existent : combiner la lumière émise par trois LED émettant dans le rouge, le vert et le bleu, ou bien placer un luminophore à la surface d'une LED bleue : la LED excite alors le luminophore, qui réémet de la lumière (par phosphorescence) dans un spectre assez large pour produire de la lumière blanche. Notons que ces deux méthodes nécessitent l'utilisation de LED bleues, qui n'ont commencé à être développées commercialement que durant les années 1990, suite aux travaux de Shuji Nakamura, Isamu Akasaki et Hiroshi Amano (récompensés par un prix Nobel en 2014) pour développer des LED à nitrure de gallium (InGaN).

La première méthode produit cependant une lumière dont le spectre aura trois « pics » pour les trois longueurs d'onde des LED utilisées, et le pilotage des trois LED en parallèle peut s'avérer complexe pour avoir un spectre identique d'un allumage à l'autre, d'autant plus que les LED de différentes couleurs ne vieilissent pas de la même manière et ne réagissent pas de la même manière à des changements de température.

La seconde méthode produit de la lumière dont le spectre sera étalé de manière à peu près « homogène » (gaussienne) autour d'une longueur d'onde déterminée par le fluorophore utilisé. Il est aussi possible de combiner plusieurs luminophores (avec toujours une unique LED) pour atteindre des spectres encore plus larges (le spectre de chaque luminophore étant assez large pour ne pas avoir de pics dans le spectre résultant de la recombinaison). Notons cependant que ces LED blanches présentent généralement un pic dans le bleu associé à l'émission de la LED bleue utilisée, qui n'est pas toujours filtrée. Cette méthode est la plus largement utilisée dans les solutions d'éclairage à LED nécessitant de la lumière blanche.

Remarquons que les propriétés des sources d'éclairage recquises en FF-OCM sont globalement les mêmes qu'en éclairagisme : spectre large (lumière blanche) et éclairage spatialement incohérent (sources étendues émettant dans de larges angles solides). Ainsi, la FF-OCM peut bénéficier des avancées de l'éclairagisme (dont les enjeux sont nombreux, assurant un dynamisme de la recherche dans ce domaine, et des faibles coûts des solutions technologiques si elles sont largement adoptées pour des applications grand public) en termes de sources, et en particulier, le développement des LED blanches peut tout à fait être repris pour développer des systèmes modernes de FF-OCM à LED, qui bénéficieront ainsi de tous les avantages des LED vus précédemment. Notons d'ailleurs que l'utilisation des LED blanches en microscopie conventionnelle est déjà largement répandue.

On se propose ainsi de remplacer la lampe halogène du système précédemment présenté par une LED blanche.Avant de présenter le montage à LED réalisé, nous proposons tout

d'abord une revue des différentes sources qui ont été utilisées jusqu'à maintenant en FF-OCM.

3.3.1 Les sources d'éclairage en FF-OCM

On distinguera trois types de sources permettant de satisfaire les besoins de la FF-OCM : les sources thermiques (lampes à incandescence et lampes à arc), les sources fluorescentes et les LED. Notons que des sources cohérentes spatialement (analogues à celles utilisées en TD-OCT, généralement des SLD) ont aussi parfois été utilisées en FF-OCM (notamment pour l'imagerie *in vivo* [89]), cependant, les images obtenues ne sont généralement pas adaptées à l'imagerie *en face* à haute résolution du fait de l'absence de correction des artefacts dus à l'utilisation d'une source cohérente. On ne considérera donc pas ces sources ici.

3.3.1.1 Lampes halogènes

Tout comme en éclairagisme, les lampes halogènes constituent la source de lumière la plus couramment utilisée en FF-OCM jusqu'à maintenant, et leur utilisation a permis d'obtenir d'excellentes images. Le système FF-OCM ayant la meilleure résolution axiale mesurée jusqu'à aujourd'hui est un système utilisant une lampe halogène [77]. Ainsi, les lampes halogènes constituent une source permettant d'obtenir une très haute résolution axiale tout en étant très peu chères (du fait de leur grande utilisation en éclairagisme), ce qui explique leur grande utilisation en FF-OCM et qui constitue d'ailleurs un des remarquables points forts de la FF-OCM[5]. Cependant, les lampes halogène ont une durée de vie relativement courte, liée à un faible rendement énergétique, une grande partie de la puissance consommée par la lampe étant dissipée sous forme de chaleur. Par ailleurs, leur spectre d'émission est extrêmement large, si bien que le spectre effectif du système FF-OCM est toujours limité par la réponse spectrale de la caméra, et même avec des caméras à large réponse spectrale, seule une petite fraction du spectre de la lampe halogène sera effectivement vue par le détecteur et contribuera à la résolution axiale du système. Le faible rendement énergétique est ainsi doublé d'un faible rendement lumineux[6]. De plus, les lampes halogènes émettent de la lumière dans toutes les directions, et seule une faible fraction de la lumière émise par la lampe pourra effectivement être collectée par le collecteur d'un système Köhler et illuminer l'échantillon.

Autrement dit, les lampes halogènes consomment beaucoup d'énergie pour finalement produire de la lumière dont seulement une petite fraction (spatiale et spectrale) sera effectivement utile pour l'imagerie.

3.3.1.2 Lampes à arc

Tout comme les lampes halogènes, les lampes à arc constituent des sources thermiques. Elles produisent de la lumière à partir d'un arc électrique créé entre deux électrodes placées au sein d'un gaz ionisé. Le spectre de la lumière qu'elles émettent est la combinaison d'un specre de source thermique (émission du corps noir) et raies spectrales, liées au gaz utilisé.

5. Notons bien qu'une source typique en SS-OCT coûte typiquement autour de 30.000 €, contre environ 3 € pour une lampe halogène, soit 10.000 fois moins cher pour des résolutions axiales équivalentes.

6. En définissant le rendement lumineux comme la fraction de la puissance rayonnée par la source perçue par le capteur de la caméra, et non pas par l'œil.

Le gaz utilisé par les lampes à arc les plus appropriées pour la FF-OCM est le Xenon. Le spectre des lampes à arc à Xenon est en effet très large et s'étend au proche infrarouge. Cependant, le spectre contient de nombreux raies spectrales dans cette région [101, 94] entrainant des lobes dans la PSF axiale du système FF-OCM, pouvant créer des artefacts dans les images et rendant plus difficile la représentation d'images en coupes verticales. Par ailleurs, le spectre de ces lampes est si large qu'une partie est toujours inutile pour l'imagerie.

Tout comme les lampes halogènes, les lampes à arc ont une courte durée de vie[7], dissipent beaucoup de chaleur, et émettent de façon quasi-isotrope. Elles ont des faibles rendements energétiques et lumineux. Cependant, le plasma générant la lumière des lampes à arc (générés par les électrodes de la lampe) est très petit, et la luminance des lampes à arc peut ainsi être élevée (tout en conservant un éclairage incohérent), et donc permettre une acquisition plus rapide qu'avec une lampe halogène. Par ailleurs, la faible taille du plasma entraîne qu'il est aisé de réinjecter la lumière générée par une lampe à arc dans une fibre optique multimode [101, 94]. Les lampes à arc sont aussi adaptées à l'émission pulsée [102, 91], mais leur instabilité complique l'acquisition d'images pertinentes.

3.3.1.3 Sources fluorescentes

Le principe des sources fluorescentes est très similaire à celui des LED blanches utilisant des luminophores. Les sources fluorescentes sont constituées de matériaux qui, éclairés à une certaine longueur d'onde, réémettent spontanément de la lumière à une longueur d'onde plus élevée. En fonction du matériau utilisé, la lumière réémise par fluorescence peut avoir un spectre large. Le saphir dopé au titanium ($Ti:Al_2O_3$) a le spectre d'émission de fluorescence le plus large connu, s'étendant de 660 nm à 1100 nm. Le pic de son spectre d'absorption étant centré à 490 nm, il peut être excité par divers lasers émettant dans le vert.

Une source fluorescente à spectre large basée sur un cristal de $Ti:Al_2O_3$ éclairé par un laser non linéaire au vanadate de néodymium-yttrium ($Nd:YVO_4$) a été spécifiquement développée pour la FF-OCM [70]. Une source fluorescente basée sur une fibre optique en cristal de Ce^{3+}:YAG pompé par une diode laser bleue, bien qu'ayant un spectre plus fin que la source précédente, a aussi permis d'obtenir des images de haute qualité en FF-OCM [78].

Ce type de source a l'avantage d'avoir un spectre dépourvu de raies spectrales, résultant en un filtrage interférométrique très sélectif, et est de plus tout à fait adapté à l'illumination pulsée à haute vitesse [70].

Cependant, seule une faible partie de la puissance de la source d'excitation est convertie en fluorescence par le cristal, et des lasers d'excitation de haute puissance sont donc nécessaires, compliquant l'utilisation des sources fluorescentes et entrainant un coût élevé pour ces sources.

3.3.1.4 LED

Le principe de fonctionnement et les caractéristiques des LED ont été présentés précédemment. Bien que les LED standard aient des spectres relativement fins, elles ont été utilisées pour différentes applications en FF-OCM. Historiquement, le premier montage de

7. Mais elles sont bien plus chères que les lampes halogènes.

FF-OCM présenté utilisait ainsi une LED à 840 nm comme source de lumière. Les résolutions axiales (mesurées dans l'air) des systèmes FF-OCM à LED vont de 10 μm [48](pour une LED à 840 nm) à 1.5 μm [103] (pour une LED à 565 nm, peu adapté à l'imagerie dans les tissus biologiques du fait de la faible pénétration dans les tissus autour de cette longueur d'onde).

La méthode de combinaison de plusieurs LED pour obtenir une LED blanche a aussi été utilisée en FF-OCM, en combinant trois LED [104], voire cinq LED [105], cette dernière configuration ayant permis d'atteindre une résolution axiale de 3 μm (dans l'air). La combinaison de plusieurs LED a aussi été utilisée dans des systèmes de FF-OCM « en couleur », à plusieurs bandes [106]. Les défauts de cette méthode de combinaison de LED ont été évoqués précédemment. En FF-OCM, ces systèmes ne parviennent de plus pas à atteindre des résolutions axiales équivalentes à celles atteintes avec les autres types de sources ayant des spectres très larges.

Les LED blanches utilisant des luminophores n'ont jusqu'à maintenant pas été utilisées en FF-OCM. Ces sources peuvent être vues comme étant à mi-chemin entre les sources fluorescentes et les sources LED standard, combinant les avantages de l'éclairage LED avec le large spectre offert par la fluorescence (la phosphorescence des luminophores étant un phénomène analogue à la fluorescence).

Notons bien que contrairement aux autres sources évoquées, le spectre des LED (et mêmes des LED blanches) est assez fin pour être entièrement detectés par des capteurs de caméras conventionnels, et ainsi l'intégralité (spectrale) de la lumière émise par les LED peut être effectivement utile pour l'imagerie, assurant un bon rendement lumineux de ces sources pour la FF-OCM (doublé d'un bon rendement énergétique inhérent aux LED). Rappelons finalement qu'il est possible de moduler à haute fréquence l'intensité lumineuse des LED, ces sources peuvent ainsi être adaptées à l'illumination pulsée.

3.3.2 Montage expérimental pour la comparaison halogène-LED

Notre objectif est ainsi de proposer un montage de FF-OCM à éclairage LED ayant des caractéristiques similaires au montage de FF-OCM à éclairage halogène présenté précédemment. Afin de comparer les deux montages, les deux « voies » d'éclairages (halogène et LED) ont été montées sur une plaque, et des butées ont été placées de telle manière que l'on pouvait translater la plaque pour passer d'un type d'éclairage à l'autre, le reste du montage étant ainsi exactement identique d'une source à l'autre, pour assurer une comparaison pertinente entre les deux sources. La figure 3.16 présente une photo du montage incluant la plaque et les deux voies d'éclairage.

En dehors des sources, le montage est le même que présenté précédemment, à quelques détails près : la caméra Dalsa 1M15, lente, a été remplacée par une caméra CMOS (*complementary metal oxide semi-conductor*) Photonfocus (MV1-D1024E-160-CL-12), pouvant acquérir jusqu'à 150 images par secondes pour un champ de 1024×1024 pixels, et dont la profondeur des puits de photons des pixels est de 200.000 électrons, avec un bruit de lecture de 220 électrons. Cette caméra a des pixels plus petit que la Dalsa 1M15 ($10.6\,\mu m \times 10.6\,\mu m$), et ainsi un capteur finalement plus petit ($10.9\,mm \times 10.9\,mm$) bien qu'ayant plus de pixels. Afin de ne pas trop suréchantilloner les images et de ne pas perdre en champ d'observation, la lentille de tube a été remplacée par une lentille de focale 200 mm, spécialement conçue pour des applications de microscopie (très bien corrigée des aberrations pour une utilisation en tant que lentille de tube pour des objectifs corrigés à l'infini). De plus, le champ d'observation des images obtenues précédemment (moins de 500 μm) a été déterminé comme

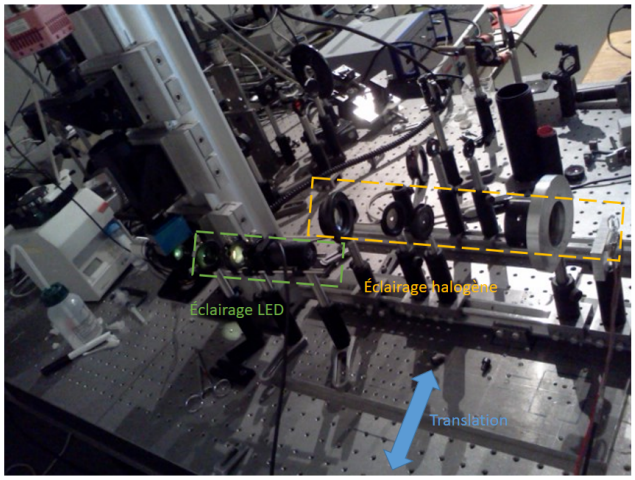

FIGURE 3.16 – Photos du montage de FF-OCM pour la comparaison halogène/LED.

étant relativement faible pour des applications d'imagerie d'échantillons biologique. Après discussion avec des praticiens, il semble qu'un champ de $1\,mm \times 1\,mm$ soit plus adapté, soit environ le double de la taille obtenue jusqu'à maintenant. Pour atteindre ce champ d'observation avec la caméra dont on dispose, on se propose simplement de changer les objectifs de microscope pour des objectifs similaires à ceux utilisés précédemment mais de grandissement 10x (Olympus UMPLFLN 10XW, NA=0.3), et de numéro de champ identique (26.5), résultant ainsi en un champ deux fois plus grand si l'on utilise la même caméra et lentille de tube. En considérant la nouvelle caméra et lentille de tube, le grandissement du système est de 11, et le champ d'observation est ainsi de $990\,\mu m \times 990\,\mu m$. Ces objectifs ont par ailleurs une ouverture numérique un peu plus faible, ce qui permet aussi de limiter le problème de la séparation des plans en profondeur dans les échantillons (voir partie 2.3.3.2) et les aberrations dues au fait qu'on les utilise en combinaison avec de l'huile et non de l'eau, et ainsi de potentiellement pouvoir pénétrer un petit peu plus en profondeur dans les échantillons biologiques.

Par ailleurs, leur pupille est plus grande que pour les objectifs 20x, et ainsi ils transmettent plus de lumière, permettant d'augmenter la vitesse d'acquisition, la saturation des pixels de la caméra étant plus rapidement atteinte.

L'étendue géométrique de ces objectifs vaut (voir équation 2.51)

$$G_{obj} = 1.6\,str.mm^2. \tag{3.1}$$

Finalement, une petite modification a été effectuée au niveau de la lame de verre dans le bras objet. Le fait qu'elle soit collée sur une plaque posait des problèmes, par exemple si l'on souhaite imager un échantillon placée dans un récipient. Une cuve a donc été réalisée, de manière à épouser la forme de l'objectif du bras objet, et la lame de verre a été collée au fond de cette cuve. La cuve était ensuite fixée à une plaque qui pouvait se fixer à l'équerre sur laquelle on avait placée un degré de liberté de réglage, de la même manière que la plaque sur laquelle était précédemment fixée la lame de verre.

Afin de comparer les deux sources, on se propose tout d'abord de présenter leurs caractéristiques radiométriques théoriques et le montage d'éclairage associé à chacune d'elle,

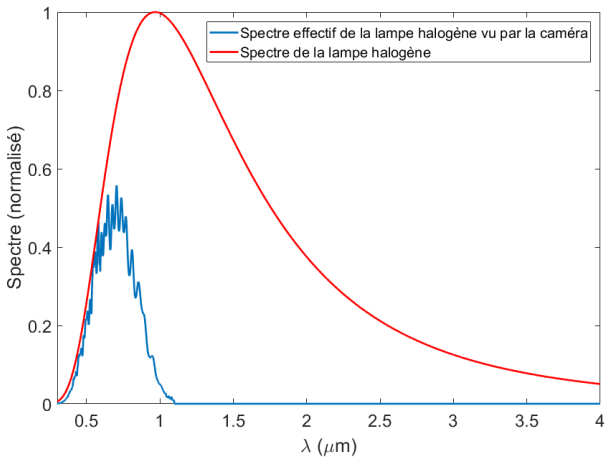

FIGURE 3.17 – Spectre de la lampe halogène et spectre effectif vu par la caméra Photonfocus MV1-D1024E-160-CL.

puis de présenter les méthodes de caractérisation d'un système FF-OCM en termes de résolution (axiale, latérale et temporelle) et de sensibilité (au-delà des considérations théoriques présentées précédemment), et d'appliquer ces méthodes pour les deux sources. Des images d'échantillons biologiques obtenues avec chaque source seront finalement comparées.

3.3.2.1 Eclairage

3.3.2.1.1 Lampe halogène

La lampe halogène est la même qu'utilisée dans le montage présenté à la section 3.2. Il s'agit d'une lampe halogène de 100 W, en configuration d'éclairage de Köhler, avec un collecteur de focale et de diamètre 50 mm et un condenseur de focale 100 mm.

Pour s'intéresser aux propriétés radiométriques de cette source, il convient de comprendre ce que désignent les « 100 W » de cette lampe. Il ne s'agit en effet pas du flux énergétique émis par la lampe, mais de la puissance reçue par la lampe lorsqu'elle est alimentée. Comme on l'a expliquée, le rendement énergétique d'une lampe halogène n'est pas bon du fait d'une forte dissipation de chaleur. On peut estimer qu'environ 15% de la puissance reçue est convertie en rayonnement [8].

Comme expliqué précédemment, ce rayonnement couvre un très large spectre, dépassant largement la réponse spectrale du capteur de la caméra. La figure 3.17 représente le spectre rayonné par la lampe halogène, et le produit de ce spectre avec la réponse spectrale de la caméra (« spectre effectif »). En comparant ces deux spectres, on montre que seul 12% du flux rayonné par la lampe halogène se situe dans le domaine de la sensibilité spectrale de la caméra.

Du point de vue de la lumière effectivement vue par la caméra, tout se passe ainsi comme si la lampe halogène rayonnait un flux de $0.15 \times 0.12 \times 100\,W = 1.8\,W$ (soit un rendement lumineux de 1.8%). Notons par ailleurs que le spectre effectif a une longueur d'onde centrale $\overline{\lambda}_{Halo} \simeq 700\,nm$ et une largeur spectrale $\Delta\lambda_{Halo} \simeq 330\,nm$. Ajoutons à cela qu'on assimilera le filament de tungstène de la lampe à une surface plane de $1\,mm \times 5\,mm$

8. Cette valeur est approximative, et très difficile à trouver dans la littérature, du fait que pour des applications en éclairagisme, la grandeur d'intérêt est le rendement lumineux (lié à la réponse spectrale de l'œil) et non le rendement énergétique.

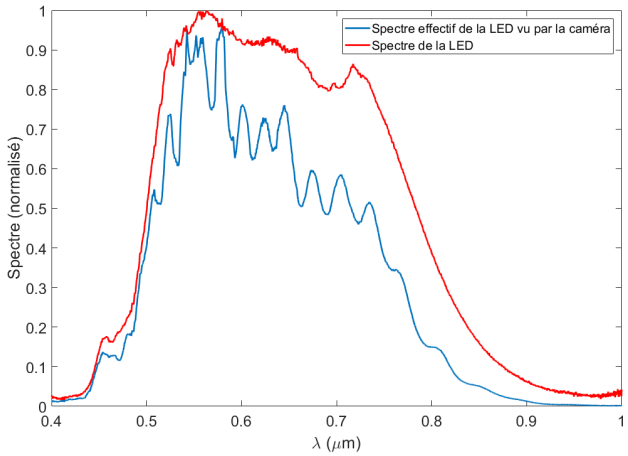

FIGURE 3.18 – Spectre de la LED blanche et spectre effectif vu par la caméra Photonfocus MV1-D1024E-160-CL.

émettant dans tout l'espace ($4\,\pi str$), ainsi, seule une partie (spatiale) de flux « effectif » de 1.8 W sera effectivement collectée par le système FF-OCM.

3.3.2.1.2 LED

La LED blanche utilisée pour la comparaison avec la lampe halogène est une LED Thorlabs MBB1L3. Son spectre, ainsi que son spectre effectif vu par la caméra sont représentés sur la figure 3.18. On remarque que pour cette LED, l'émission de la LED à l'origine de la phosphorescence du luminophore est filtrée. Le spectre de phosphorescence s'étend environ de 470 nm à 850 nm (longueur d'onde centrale $\sim 650\,nm$), soit une gamme de longueur d'onde adaptée à l'imagerie en profondeur dans les milieux biologiques.

On peut calculer que 68% du flux émis par la LED se situe dans le domaine de la sensibilité spectrale de la caméra.

Le spectre effectif a finalement une longueur d'onde centrale $\overline{\lambda}_{LED} \simeq 630\,nm$ et une largeur spectrale $\Delta\lambda_{LED} \simeq 225\,nm$.

Cette LED est placé en configuration Köhler. Un objectif du montage de FF-OCM étant sa compacité, l'éclairage Köhler conçu pour la LED utilise des lentilles de focales courtes. Afin de collecter un maximum de lumière, on utilise un collecteur asphérique de plus grande ouverture numérique possible (le collecteur retenu a une focale de 16 mm et un diamètre de 1" (25.4 mm)). La petite taille de la LED ($1.5\,mm \times 1.5\,mm \times \sim 200\,\mu m$ [9], pas d'ampoule) entraine qu'il est possible de la placer assez proche de ce condenseur pour être effectivement en configuration Köhler. Un condenseur de focale 50 mm est d'autre part utilisé, afin de quand même laisser de la place dans le système pour placer les diaphragmes de l'éclairage Köhler. Cependant, on doit malgré tout renoncer à l'un des deux diaphragmes pour un gain de compacité. On n'utilisera donc pas de diaphragme d'ouverture, ce qui ne pose a priori pas de problèmes, un éclairage incohérent spatialement étant de toute façon requis en FF-OCM.

Contrairement à l'halogène, la LED n'émet pas dans tout l'espace, mais uniquement dans un cone de lumière ayant un angle au sommet d'environ 60°.

9. Bien que la documentation indique une surface de $1\,mm \times 1\,mm$, en observant la surface émettrice au microscope on peut mesurer qu'elle est en fait plus grande que ça.

Grandeur	*Symbole*	*Halogène*	*LED*
Flux lumineux total	$\Phi_{tot}(mW)$	15000	70
Étendue géométrique de la source	$G_0(str.mm^2)$	60	4
Luminance	$L(mW/(str.mm^2))$	250	20
Étendue géométrique du collecteur	$G_1(str.mm^2)$	15	4
Flux incident sur l'échantillon	$\Phi_{ech}(mW)$ [10]	200	15
Proportion du flux détecté par le capteur	$P(\%)$	12	68
Flux incident sur le capteur [11]	$\frac{\Phi_{cam}}{(R_{incoh}+R_{ref})}(mW)$	12	5

TABLE 3.1 – Comparaison des propriétés radiométriques de la lampe halogène et de la LED utilisées dans le montage de FF-OCM.

A partir de ces données et des équations donnée à la partie 2.3.4.1, on peut déterminer les propriétés radiométriques des deux sources, données dans la table 3.1.

Rappelons que ces valeurs ne sont que des ordres de grandeur. Cependant, on peut prévoir à partir de celles-ci qu'un défaut du montage à LED par rapport au montage conventionnel utilisant une lampe halogène sera a priori sa vitesse : du fait du flux plus faible au niveau du capteur de la caméra, le temps d'intégration devra être 2 à 3 fois supérieur pour le montage à LED pour travailler à la limite de saturation de la caméra.

Malgré tout, ce facteur 2 à 3 est relativement faible par rapport à ce qu'on aurait pu prévoir en voyant que la lampe halogène est annoncée comme ayant une puissance de 100 W, et la LED une puissance de 70 mW.

3.3.2.2 Méthode de caractérisation

3.3.2.2.1 Résolution axiale

Pour mesurer la résolution axiale du système, la méthode retenue consiste à considérer comme échantillon une surface identique à la surface de référence, et à utiliser une image tomographique en coupe verticale de cet échantillon. Une coupe dans une telle image donne directement la PSF axiale, calibrée (dans un milieu d'indice n_{im}) si l'on connaît la course du PZT effectuée pour obtenir la coupe verticale. On mesure la résolution axiale à partir de cette coupe calibrée de la PSF axiale.

Si jamais on a des doutes sur la course du PZT ou sur l'indice du milieu d'immersion, il est aussi possible de coupler l'acquisition de la coupe verticale avec une acquisition d'images interférométriques sur une course identique du PZT, mais en plaçant un filtre très selectif à une longueur d'onde λ en sortie de la source : on obtient alors, par une coupe verticale dans les images interférométriques, une calibration de l'axe z, en sachant que l'interfrange vaut dans ce cas $\frac{\lambda}{2n_{im}}$. Avec cette méthode, on peut choisir n'importe quelle n_{im} pour la

10. On rappelle que l'éclairage est plein champ : l'intensité incidente sur l'échantillon est de $\frac{\Phi_{ech}}{\pi\left(\frac{FOV}{2}\right)^2}$, avec $FOV = 2.65\,mm$ pour les objectifs utilisés.

11. Sans prendre en compte R_{incoh} et R_{ref}.

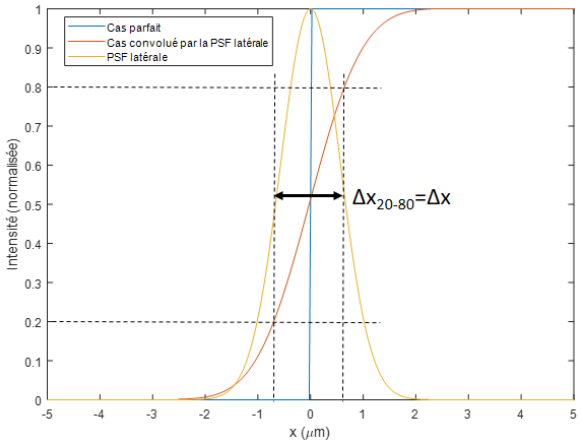

FIGURE 3.19 – Lien entre la largeur d'une marche parfaite imagée par un système FF-OCM et la largeur de la PSF latérale de ce système.

calibration, la mesure est indépendante de l'indice d'immersion. Cette méthode, flexible et très fiable, sera retenue comme la meilleure méthode pour mesurer la résolution axiale.

3.3.2.2.2 Résolution latérale

Il existe deux définitions pour la résolution latérale d'un microscope (voir annexe A.2). La première correspond à la fréquence spatiale maximale mesurable par ce système. Pour mesurer la résolution à partir de cette définition, on utilise une mire contenant des fréquences spatiales croissantes, et on détermine visuellement la fréquence spatiale maximale (en termes de lignes par mm) résolue par le système. Une mire typiquement utilisée pour cela est la mire de résolution USAF 1951.

Cependant, comme on l'a vu, on préfère la seconde définition pour définir la résolution latérale d'un système FF-OCM, à savoir la FWHM de la PSF latérale. Une méthode couramment utilisée pour la mesurer consiste à imager un bord net, considéré comme une « marche » parfaite. L'image de la marche obtenue correspond à la convolution de cette marche avec la PSF axiale du système. Une technique pour mesurer la résolution latérale est alors de mesurer l'écart entre la position correspondant à 20% de la marche et celle correspondant à 80% de la marche (voir figure 3.19). La valeur de cet écart sera noté Δx_{20-80}.

On peut alors montrer que du fait que la marche est convoluée par la PSF latérale du système, Δx_{20-80} est égal à la FWHM de la PSF latérale ($\Delta x_{20-80} = \Delta x$). La figure 3.19 illustre cette égalité.

Cette méthode, donnant une valeur « objective » de Δx, sera retenu comme la méthode de référence pour la mesure de la résolution axiale. Cependant, il faut faire attention au fait que les images doivent être un peu sous-échantillonnées pour que cette méthode fonctionne bien : en effet, si la variation entre 20% et 80% se fait sur trop peu de pixels, on risque d'avoir une valeur faussée par le sous-échantillonnage.

3.3.2.2.3 Résolution temporelle

La résolution temporelle du système est directement donnée par le nombre d'images par secondes de la caméra correspondant à un temps d'intégration permettant d'être à la limite de saturation des pixels (la caméra dispose a priori d'une interface renvoyant cette valeur), par le nombre d'images utilisées par l'algorithme de reconstruction et par le nombre d'images accumulées.

3.3.2.2.4 Sensibilité

La façon la plus simple de mesurer la sensibilité de détection est d'utiliser la même coupe verticale que celle que l'on utilise pour la mesure de la résolution axiale. En effet, rappelons qu'on peut voir la PSF axiale d'un système FF-OCM comme indiquant la valeur de $\gamma^2 R_{ech}$, ainsi la mesure de la PSF sur un système réel permet aussi de retrouver la sensibilité : lorsqu'on s'éloigne de la différence de marche nulle, le produit $\gamma^2 R_{ech}$ diminue et peut être vu comme représentant des valeurs de R_{ech} de plus en plus faible. A partir d'une certaine valeur, on n'observe plus que du bruit : cette valeur correspond à $R_{ech,min}$. En représentant la PSF en échelle logarithmique ($-10log_{10}(PSF)$), la sensibilité est donc directement indiquée par le niveau de « fond » de la PSF. Pour obtenir une valeur quantitative, il faut cependant calibrer la courbe de la PSF axiale en connaissant la valeur de R_{ech} pour la surface imagée pour la mesure de la PSF axiale, qui correspondra à la valeur de la PSF en son pic. Cette méthode sera retenue comme la méthode de référence pour la mesure de la sensibilité. Elle est particulièrement intéressante car elle ne nécessite pas plus de données que celles qui avaient déjà été acquises pour la mesure de la résolution axiale.

Notons qu'on peut, de manière analogue, mesurer la sensibilité uniquement à partir d'une image tomographique en face (en échelle logarithmique) si les franges sont assez resserrés (une coupe dans l'image devant contenir à la fois le pic et le « fond » de la PSF). En pratique cependant, le fond est en général très éloigné du pic, même pour des systèmes à haute résolution, et il est nécessaire d'utiliser deux images tomographiques : l'une au niveau du pic permettant d'effectuer la calibration, et l'autre dans le fond, donnant la valeur de la sensibilité une fois calibrée.

Notons cependant que ces méthodes donnent une sensibilité qui ne correspond pas vraiment à la sensibilité du système lorsqu'un échantillon est imagé : le facteur de réflexion de la surface de référence n'est pas identique au ratio d'intensité rétro-diffusée par l'échantillon, et les franges n'ont pas le même contraste pour cette surface et pour l'échantillon. Afin d'obtenir une valeur de sensibilité plus fidèle à la sensibilité du système dans le cadre de l'imagerie d'échantillons biologiques, une méthode sera d'effectuer la même mesure, mais en immergeant la surface équivalente à la surface de référence dans le bras objet dans de l'eau (simulant le positionnement d'un échantillon dans le bras objet).

3.3.2.3 Comparaison halogène-led

3.3.2.3.1 Caractéristiques

Afin de comparer le montage à LED et le montage à lampe halogène, on a donc effectué ces différentes mesures de résolution et de sensibilité. La figure 3.20 représente avant tout l'allure des franges obtenues pour la LED et pour la lampe halogène.

Il est clair que les interférogrammes sont proches et on s'attend à avoir des caractéristiques similaires d'une source à l'autre, d'autant que le reste du système est identique pour les deux sources.

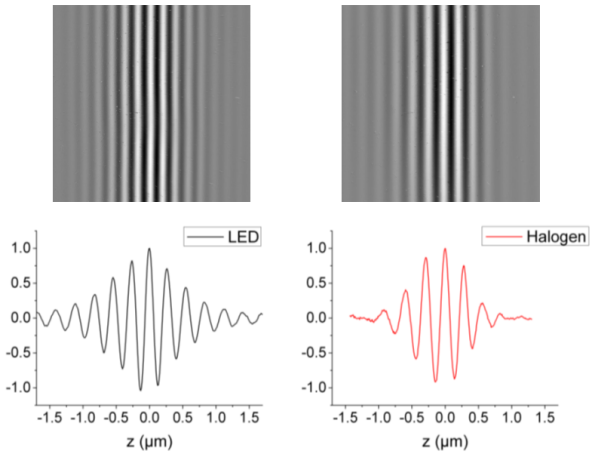

FIGURE 3.20 – Interférogrammes obtenus pour la LED et la lampe halogène, en face (images interférométriques) et pour une coupe calibrée dans la direction axiale.

		Halogène	LED
Résolution axiale (µm)	Théorique	0,5	0,6
	Mesurée	0,7	0,7
Résolution latérale (µm)	Théorique	1,0	0,9
	Mesurée	2	1,8
Sensibilité (dB)	Théorique	74	74
	Mesurée	70	70
Résolution temporelle (s)		0,4	0,8

TABLE 3.2 – Comparaison des caractéristiques du système FF-OCM à LED et du système à lampe halogène.

Le tableau 3.2 présente les caractéristiques (théoriques et mesurées) des deux systèmes, obtenues tel que décrit précédemment. La résolution axiale est donnée en considérant un milieu d'immersion d'indice 1.4. La sensibilité théorique prend en compte $R_{incoh} = 5\%$. La résolution temporelle est donnée en considérant l'imagerie d'un échantillon de peau, avec 10 images accumulées. Aucune valeur théorique ne peut être donnée pour cette caractéristique : si le temps d'intégration peut être évalué théoriquement, le nombre d'images par seconde associé à un temps d'intégration donné dépend de facteurs propres à la caméra dont on n'a pas connaissance.

La figure 3.21 représente la PSF axiale pour les deux sources, qui a permis de mesurer la résolution axiale des systèmes, ainsi que la représentation logarithmique de cette PSF qui a permis de mesurer leur sensibilité.

Finalement, les caractéristiques des deux systèmes sont quasiment identiques, mais comme on l'avait prévu théoriquement, la vitesse en utilisant la LED est plus faible qu'en utilisant la lampe halogène, d'un facteur 2. On remarquera aussi que la résolution latérale est moins bonne que prévue théoriquement. Ceci est probablement dû aux aberrations du fait de l'utilisation des objectifs dans un milieu d'immersion inadapté, et de la lame de verre relativement épaisse (500 μm) traversée en sortie des objectifs. Notons d'ailleurs que malgré l'utilisation d'objectifs de microscope identiques pour les deux sources, la résolution latérale est légèrement meilleure pour le système à LED du fait que la longueur d'onde

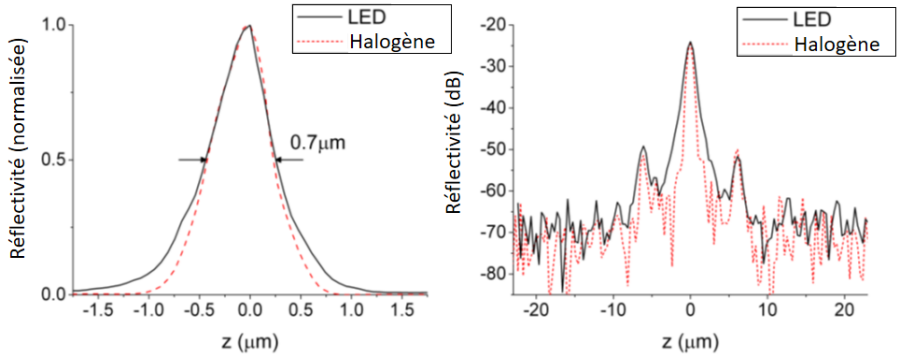

FIGURE 3.21 – PSF axiale du système FF-OCM à éclairage LED et du système à éclairage halogène, en représentation linéaire et logarithmique.

centrale du spectre effectif de ce système est inférieure à celle du système à lampe halogène ($\frac{\bar{\lambda}_{LED}}{\bar{\lambda}_{Halo}} = 0.9$, on retrouve ce facteur entre les résolution latérales théoriques et mesurées).

3.3.2.3.2 Images d'échantillons biologiques

Afin de mettre en évidence la possibilité pour le système à LED d'obtenir des images tomographiques similaires au système conventionnel à lampe halogène dans le cadre de l'imagerie biomédicale (et en particulier l'imagerie de la peau), et ainsi d'illustrer la proximité des caractéristiques présentées précédemment pour les deux systèmes, nous avons imagé un têtard *Xenopus laevis* (*ex vivo*, fourni par l'Institut des Neurosciences Paris-Saclay), ainsi que l'échantillon de peau saine du cou déjà présenté précédemment. Pour chaque échantillon, une pile d'images tomographiques a été obtenue pour un éclairage à lampe halogène, immédiatement suivie d'une pile d'images tomographiques pour un éclairage LED, par translation de la plaque sur laquelle étaient montées les deux voies d'éclairage, tout le reste du système (échantillon inclu) restant fixe par ailleurs. Ainsi, les images tomographiques sont obtenues exactement à la même position dans les échantillons pour les deux systèmes, et permettent une comparaison pertinente de ceux-ci.

La figure 3.22 présente la comparaison des images obtenues avec les deux voies d'éclairage pour l'imagerie du têtard *Xenopus laevis*. Notons que ce têtard est couramment imagé en FF-OCM [107, 101] et peut être considéré comme un échantillon de référence. Il est transparent (c'est à dire peu diffusant et peu absorbant), et principalement constitué d'eau (le milieu d'immersion utilisé pour imager cet échantillon était donc de l'eau). Il est ainsi possible d'imager relativement profondémment dans cet échantillon. Ce têtard présente par ailleurs de grandes cellules mésenchymateuses ($\sim 20\,\mu m$) et de fines membranes permettant d'illustrer la résolution spatiale des systèmes FF-OCM.

Des images en face du têtard à deux profondeurs différentes ($40\,\mu m$ et $120\,\mu m$) sont présentées, ainsi qu'une image en coupe verticale. Les images obtenues avec les deux voies d'éclairage sont quasiment identiques. Les cellules mésenchymateuses sont clairement identifiables. Des structures fortement rétrodiffusantes autour de l'amas de cellules mesenchymateuses sont aussi visibles, il s'agit de melanocytes.

On n'observe pas de différence en termes de résolution ou de profondeur de pénétration entre les deux systèmes.

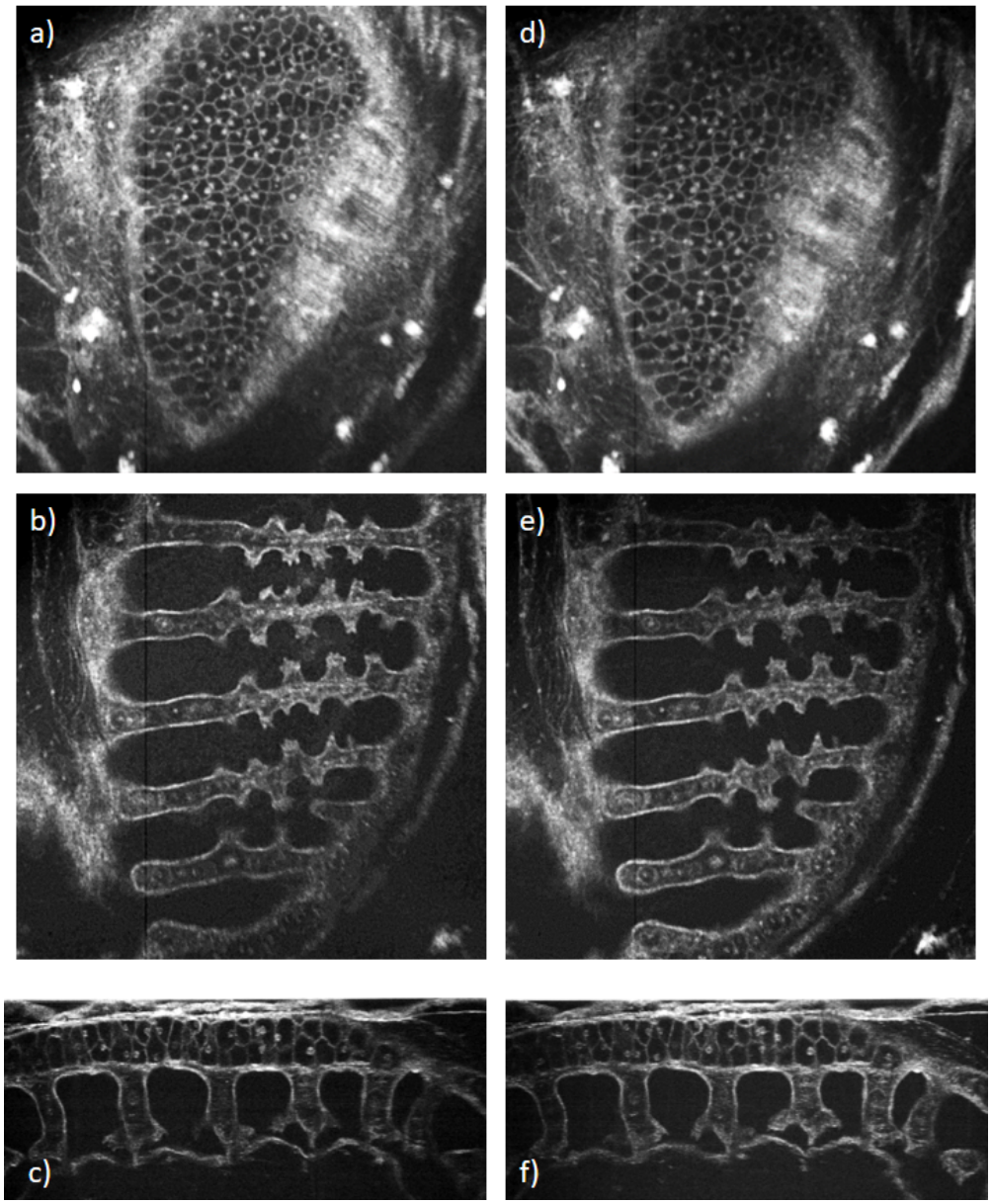

FIGURE 3.22 – Images tomographiques du têtard *Xenopus laevis* obtenues avec un éclairage LED et un éclairage halogène. a), b), c) : images obtenues sur le système à éclairage LED. a) image en face à $40\mu m$ en profondeur, b) image en face à $120\mu m$ en profondeur, c) image en coupe verticale sur une profondeur de 400 μm. d), e), f) : images équivalentes obtenues sur le système à éclairage halogène. Champ des images en face : 990 μm $\times$ 990 μm.

La figure 3.23 présente la comparaison des images obtenues avec les deux voies d'éclairage pour l'imagerie de la peau humaine *ex vivo*. Comme pour le têtard, deux images en face à deux profondeurs différentes sont présentées, ainsi qu'une image en coupe verticale. Les noyaux des cellules du *stratum spinosum* sont résolus pour les deux systèmes [12]. Un follicule pileux est par ailleurs visible. Plus en profondeur, des structures sont toujours clairement identifiables au niveau du *stratum basale* (à la jonction de l'épiderme et du derme). L'image en coupe verticale met d'ailleurs en évidence la possibilité d'imager au-delà de l'épiderme : des structures du derme superficiel sont identifiables, ainsi que l'architecture du follicule pilleux. Notons que pour mettre en évidence au mieux ces structures, 8 images en coupe verticale adjacentes ont été projetées. Du fait de ce traitement, les noyaux des cellules mis en évidence dans les images en face sont plus difficilement visibles.

Les images obtenues pour les deux systèmes sont à nouveau quasiment identiques, cependant, on pourra noter une pénétration légèrement moins bonne pour le système à LED, dû au fait que $\overline{\lambda}_{LED}$ est plus faible que $\overline{\lambda}_{Halo}$, et s'éloigne ainsi de la fenêtre thérapeutique. La différence est cependant très légère : pour les deux sources, la profondeur de pénétration dans la peau peut être estimée à ~ 200 μm.

12. Notons cependant qu'elles sont moins clairement identifiable qu'à la figure 3.14 du fait de la résolution latérale réduite par l'utilisation d'objectifs de microscope de plus faible ouverture numérique.

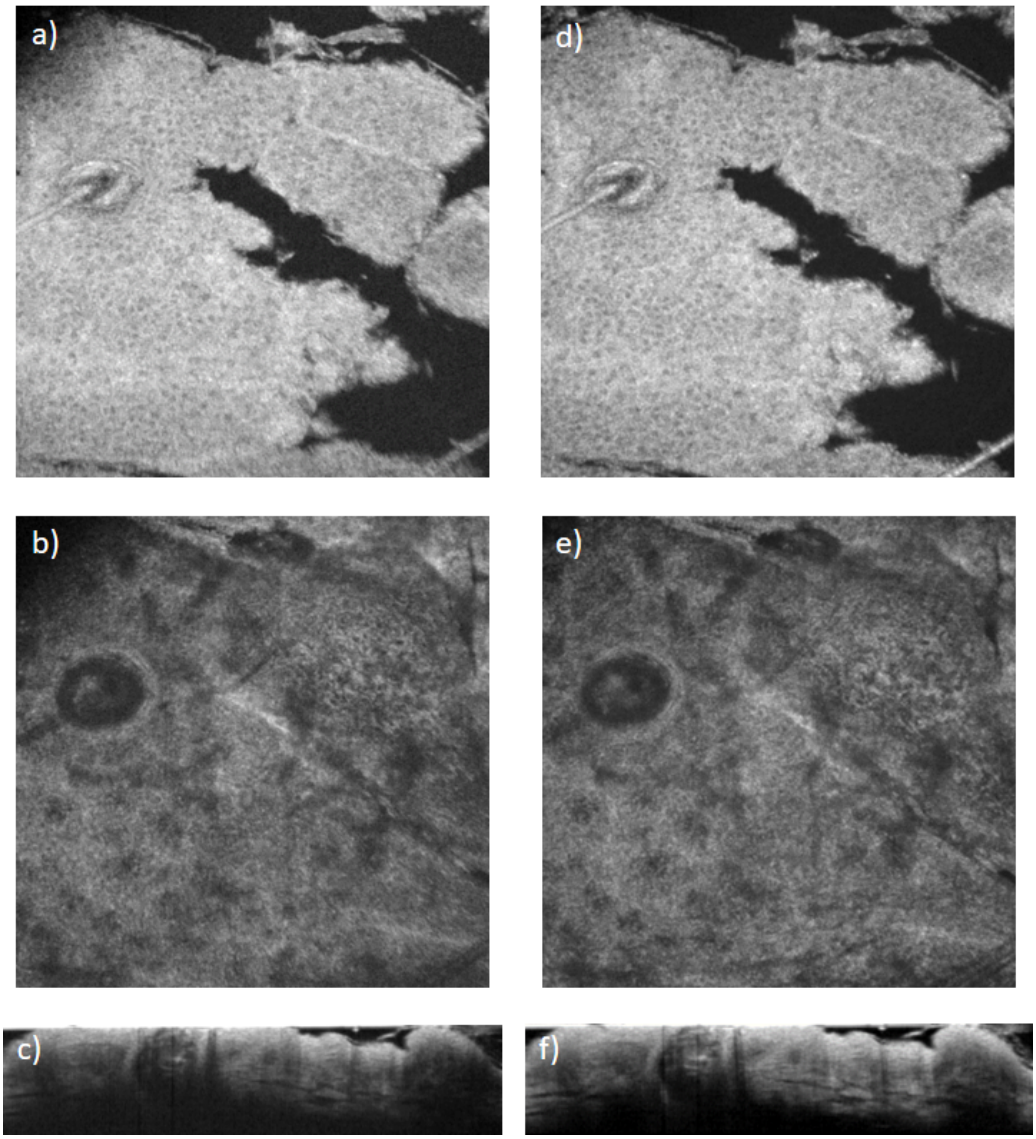

FIGURE 3.23 – Images tomographiques de la peau humaine *ex vivo* obtenues avec un éclairage LED et un éclairage halogène. a), b), c) : images obtenues sur le système à éclairage LED. a) image en face à $40\,\mu m$ en profondeur, b) image en face à $120\,\mu m$ en profondeur, c) image en coupe verticale sur une profondeur de 200 μm. d), e), f) : images équivalentes obtenues sur le système à éclairage halogène. Champ des images en face : 990 μm $\times$ 990 μm.

3.4 Améliorations du montage : vers l'imagerie de la peau *in vivo*

Nous avons vu qu'il était possible de remplacer l'éclairage à lampe halogène par un éclairage LED en FF-OCM sans que la résolution spatiale, la sensibilité ou la profondeur de pénétration n'en soient sensiblement affectées. Cependant, rappelons que la vitesse d'acquisition des images tomographiques pour le système à LED présenté précédemment est deux fois plus faible que pour le système à lampe halogène. Comme indiqué précédemment, les systèmes à lampe halogène ne sont généralement pas assez rapides pour obtenir des images d'échantillon *in vivo*. Le système à LED présenté précédemment est donc encore loin d'un système permettant d'obtenir des images *in vivo*. Nous nous proposons donc à présent de modifier le système afin d'introduire un montage de FF-OCM à éclairage LED permettant d'obtenir des images d'échantillons *in vivo*.

3.4.1 Vitesse d'acquisition et artefacts en FF-OCM

Afin de comprendre pourquoi la vitesse d'acquisition est un paramètre critique pour l'imagerie *in vivo*, rappelons que des sujets *in vivo* sont toujours des sujets en mouvement. Ce mouvement peut être provoqué par le sujet lui même (s'il bouge au cours de l'acquisition, ce qui est fort probable, même chez un humain à qui l'on demande de ne pas bouger), mais même dans le cas d'un sujet anesthésié et stabilisé, un mouvement sera toujours présent, par exemple en raison du flux sanguin. On comprend donc intuitivement qu'une méthode d'imagerie *in vivo* doit être assez rapide pour « figer » le mouvement de telle sorte que durant l'acquisition, tout se passe comme si le sujet était fixe.

Il est possible de quantifier la vitesse d'imagerie minimale d'un système FF-OCM pour imager pertinemment un échantillon en mouvement à une certaine vitesse. Le mouvement de l'échantillon peut être décomposé selon les directions axiales et latérales. Un mouvement dans la direction axiale entraîne un déphasage du signal interférométrique, intégré au cours de l'acquisition de l'image interféromètrique (sur la durée T_{int}). L'image acquise pour un échantillon en mouvement est donc donnée par :

$$E = \eta \int_0^{T_{int}} \left[\overline{I} + A\,\gamma(\delta'_{ech}(t))\,\cos\left(\Phi + \Delta\phi(t)\right) \right] \mathrm{dt}, \tag{3.2}$$

avec $\Delta\phi$ le déphasage dû au mouvement de l'échantillon dans la direction axiale. Avec v_z la vitesse de déplacement de l'échantillon dans la direction axiale, on a :

$$\Delta\phi(t) = \frac{4\pi n}{\overline{\lambda}} v_z t. \tag{3.3}$$

Au cours de l'intégration du signal interférométrique, une variation de $\Delta\phi$ peut rapidement entraîner une perte du signal du fait de la variation sinusoïdale du terme interférométrique : le signal est alors moyenné à 0, ce qui correspond au brouillage des franges. Notons que la variation de $\gamma(\delta'_{ech}(t))$ est bien moins critique que la variation de $\Delta\phi(t)$ du fait qu'elle n'affecte pas la phase du signal et entraîne donc des variations lentes du terme interférométrique (d'ailleurs souvent assez faibles dans les milieux biologiques, généralement relativement homogènes).

On peut montrer qu'à une vitesse v_z donnée, le temps d'intégration maximal pour éviter le brouillage des franges est donné par [70] :

$$T_{int,max} = \frac{\overline{\lambda}}{4nv_z}. \tag{3.4}$$

En considérant par exemple un système dont la longueur d'onde centrale est de 600 nm, pour un échantillon d'indice 1.4 dont le mouvement entraîne un déplacement dans la direction axiale à une vitesse de $50\,\mu m/s$ (typique du mouvement dans les milieux biologiques [70]), le temps d'intégration doit être inférieur à 2 ms pour une imagerie pertinente.

Le mouvement de l'échantillon dans la direction latérale peut aussi affecter l'imagerie, notamment en raison du fait que plusieurs images interférométriques sont nécessaires pour reconstruire l'image tomographique. Si ces images interférométriques sont acquises à des instants différents (montage non *single-shot*), le mouvement de l'échantillon peut entraîner des variations d'amplitude ou de phase entre les images interférométriques utilisées pour la reconstruction de l'image tomographique. Une erreur de phase ne pose généralement pas de problèmes si un algorithme insensible aux erreurs de phase est utilisé. Même si un tel algorithme n'est pas utilisé, le fond sera toujours bien supprimé, et les images obtenues dans le cas d'échantillons biologiques ne seront pas fondamentalement différentes de celles obtenues dans le cas sans erreur de phase. Cependant, une différence d'amplitude entre les images interférométriques utilisées pour la reconstruction peut générer un signal parasite entraînant des artefacts dans l'image tomographique reconstruite. Les différences d'amplitude ne sont généralement pas dues à un mouvement axial, à l'origine uniquement d'un defocus n'entraînant pas de variation majeure de l'amplitude, mais peuvent êtres dues à un mouvement latéral. On peut montrer que pour un échantillon en déplacement latérale à une vitesse v_x, le temps d'acquisition maximal pour éviter la génération d'un signal parasite est donné par[13] [70] :

$$T_{acq,max} = \frac{1}{N_{acc}Nv_x}\sqrt{\frac{2\Delta xc_1}{G\sqrt{\xi_{sat}}} \times \frac{R_{max}}{R_{max} - R_{min}}}, \tag{3.5}$$

avec R_{max} et R_{min} les ratios d'intensité rétrodiffusée maximum et minimum de l'échantillon sur la longueur Δx. La valeur $T_{acq,max}$ dépend ainsi de l'échantillon et du point du champ considéré pour un échantillon donné.

Notons que cette condition sur la vitesse du déplacement latérale est aussi valable si le déplacement de l'échantillon a lieu en dehors du plan de cohérence (R_{max} et R_{min} étant alors juste diminués en raison du defocus). La variation d'amplitude peut être alors vue comme une variation de la valeur du fond entre les images interférométriques utilisées pour la reconstruction, qui entraînera la génération d'un signal indésirable après démodulation.

Pour un mouvement dont la vitesse est du même ordre de grandeur que celle considérée précédemment dans la direction axiale ($50\,\mu m/s$), en considérant les paramètres de notre système FF-OCM ($N_{acc} = 10, N = 5, \Delta x = 2.6\,\mu m, c_1 = 10.6\,\mu m, G = 11, \xi_{sat} = 200.000$) et un contraste typique d'échantillon biologique de 10^{-4} [70] (résultant en $R_{max} = 1$ et $R_{min} = 0.9998$), le temps d'acquisition maximal pour éviter la génération d'artefacts est de 3 ms, soit du même ordre de grandeur que le temps d'intégration maximal pour éviter le brouillage des franges.

13. On considère ici un mouvement latéral dans la direction x. Pour un mouvement dans la direction y, on remplace Δxc_1 par $\Delta yc_2 = \Delta xc_2 = \Delta xc_1$ dans le cas de pixels carrés.

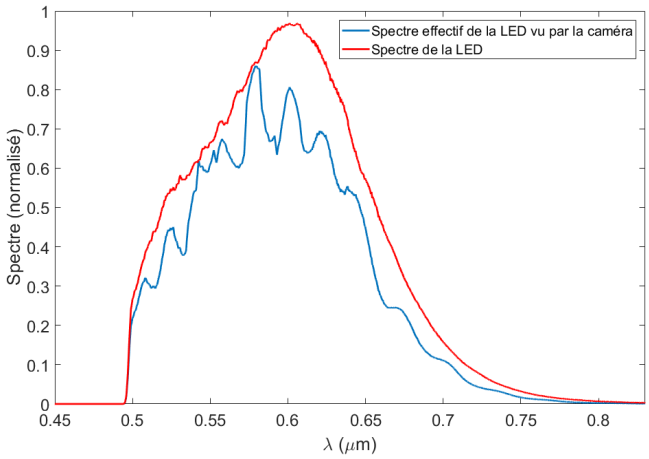

FIGURE 3.24 – Spectre de la LED à haute puissance et spectre effectif vu par la caméra Photonfocus MV1-D1024E-160-CL.

A partir de ces considérations, on retiendra donc que pour une imagerie pertinente d'échantillons biologiques *in vivo*, il est nécessaire que les temps d'intégration et d'acquisition de la caméra soient au maximum de l'ordre de la milliseconde.

3.4.2 Solutions retenues pour l'imagerie à haute vitesse

3.4.2.1 Éclairage

Afin d'augmenter la vitesse d'acquisition du système présenté précédemment, il est nécessaire d'utiliser une LED plus puissante que celle utilisée précédemment. Des LED blanches à phosphore à haute puissance (*high-brightness LED*) sont aujourd'hui disponibles commercialement, cependant, leur spectre n'est pas aussi large que celui de la LED utilisée jusqu'à maintenant, et ne s'étend pas vers l'infrarouge. Malgré tout, nous avons pu trouver une LED à haute puissance qui pourrait être adapté à la FF-OCM (Thorlabs MWWHLP1). Sa puissance est de 2.3 W, correspondant à une luminance de $80\,mW/(str.mm^2)$ (surface de $3.5\,mm \times 3.5\,mm = 12.25\,mm^2$, illumination dans un cône d'angle au sommet 60°).

La figure 3.24 présente le spectre de cette LED, utilisée avec un filtre interférentiel permettant de couper un pic dans le bleu (dû à la LED utilisée pour illuminer le phosphore). En utilisant ce filtre, 85% de la puissance de la LED est conservée. On mesure une longueur d'onde centrale $\overline{\lambda}_{HB-LED} = 600\,nm$ et une FWHM $\Delta\lambda_{HB-LED} = 145\,nm$, résultant en une résolution axiale théorique de $0.8\,\mu m$ et une résolution latérale théorique de $0.9\,\mu m$. Ainsi, les images obtenues en utilisant cette LED devraient finalement être fortement similaires aux images obtenues avec la LED précédente ou la lampe halogène (la profondeur de pénétration risque cependant de diminuer du fait qu'on s'éloigne encore un petit peu plus de la fenêtre thérapeutique par rapport à la LED précédente). La figure 3.25 représente l'interférogramme obtenu pour cette LED, très proche de ceux obtenus précédemment (voir figure 3.20).

En considérant la réponse spectrale de la caméra, on détermine que 77% du flux émis par la LED se situe dans le domaine de la sensibilité spectrale de la caméra (voir figure

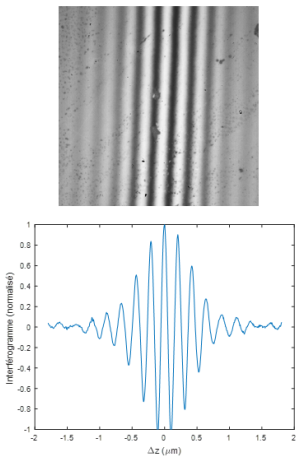

FIGURE 3.25 – Interférogramme obtenue pour la LED de haute puissance, en face (image interférométrique) et pour une coupe calibrée dans la direction axiale.

3.24). Finalement, on peut déterminer qu'avec cette LED, on a :

$$\frac{\Phi_{cam}}{R_{incoh} + R_{ref}} = 20\,mW\,^{14}. \tag{3.6}$$

L'intensité incidente sur le capteur est ainsi environ 4 fois supérieure à celle pour la LED utilisée jusqu'à maintenant, et environ 2 fois supérieure à celle de la lampe halogène. Cette LED devrait ainsi permettre d'atteindre des temps d'intégration et d'acquisition de l'ordre de la milliseconde, assez courts pour pouvoir imager des échantillons *in vivo*.

3.4.2.2 Acquisition

Comme on l'a vu, le lien entre T_{int} et T_{acq} pour une caméra donnée dépend du nombre de pixels du capteurs. Pour la caméra que nous utilisons dans le système, lorsque 1024×1024 pixels sont utilisés, T_{acq} vaut au minimum 6.8 ms, quel que soit T_{int}. Pour pouvoir acquérir des images *in vivo*, nous avons vu qu'il était nécessaire que T_{acq} soit de l'ordre de la milliseconde. Afin de diminuer T_{acq}, il est cependant possible de réduire le nombre de pixels utiles du capteur de la caméra (rendu possible par le fait que la caméra est une caméra CMOS). En considérant $T_{int} = 1\,ms$, on détermine que le nombre de pixels maximum pour pouvoir avoir $T_{acq} \leq 1.1\,ms$ est de 248×248 (cette valeur est dûe au fait que le capteur ne peut pas prendre n'importe quelle taille. La valeur de 248 est propre au capteur). Ainsi la réduction du champ de notre système (limité ainsi à $240\,\mu m \times 240\,\mu m$) devrait permettre une imagerie *in vivo* pertinente. Cependant cette réduction du champ reste un défaut notable du système.

Notons par ailleurs quand dans le montage précédemment présenté, l'application des algorithmes de démodulation était implémenté en C++, soit suite à l'acquisition d'une pile d'images interférométriques, soit en temps réel (voir partie D). Comme on l'a vu, travailler à partir de piles d'images interférométriques n'est pas recommandé du fait de la très grande

14. Soit une intensité de $\dfrac{20}{\pi\left(\dfrac{G \times FOV}{2}\right)^2} = 0.03\,mW/mm^2(\times(R_{incoh} + R_{ref}))$

taille de ces piles, et de l'impossibilité de présenter des images tomographiques en temps réel au cours de l'acquisition.

Cependant, en augmentant grandement la vitesse d'acquisition (d'un facteur ~ 10 si l'on atteint $T_{acq} = 1\,ms$), le programme effectuant les calculs en C++ n'est plus assez rapide pour suivre la cadence de la caméra, et il n'est alors plus possible d'effectuer les calculs en temps réel.

Afin de pouvoir continuer à effectuer les calculs en temps réel à haute cadence, nous avons donc fait le choix d'utiliser un circuit logique programmable (FPGA pour *field programmable gate array*) spécialement dédié au traitement d'images (microEnable IV AD4-CL, SiliconSoftware), une solution déjà explorée dans le cadre de l'imagerie haute vitesse en FF-OCM [98]. Le FPGA est spécialement programmé (à partir d'un logiciel dédié) pour effectuer les calculs de démodulation, et ces calculs peuvent ainsi être effectués extrêmement rapidement. Notons que les cartes FPGA peuvent être reprogrammées à volonté [15].

La caméra envoie alors ses données (images interférométriques) au FPGA, qui applique les algorithmes de démodulation (ainsi que l'accumulation si nécessaire) en temps réel, et renvoie directement à l'ordinateur des images tomographiques. L'ensemble {caméra+FPGA} se suffit alors à lui même pour obtenir des images tomographiques. L'ordinateur ne sert qu'à les afficher et leur appliquer des post-traitements.

Notons cependant que le FPGA a malgré tout des limitations, en particulier par rapport à l'accumulation : le fait de devoir conserver dans sa mémoire beaucoup d'images relativement grandes pour les accumuler sature vite sa mémoire disponible, et il n'a ainsi pas été possible d'accumuler plus de 8 images avec le FPGA retenu.

3.4.3 Amélioration de la sensibilité

Comme on l'a vu, la sensibilité de détection est un paramètre fondamental pour tout système d'imagerie. Dans le cadre de la FF-OCM, il est possible de l'augmenter pour atteindre des valeurs correctes (autour de 70 dB) par l'accumulation d'images interférométriques. Cependant, l'accumulation augmente la durée d'acquisition des images tomographiques. Dans le cadre de l'imagerie *in vivo*, il est fondamental de limiter au maximum cette durée d'acquisition, et donc que la sensibilité soit maximisée avant d'avoir recours à l'accumulation pour l'améliorer.

Dans les montages présentés précédemment, une des causes de la limitation de la sensibilité était le fait que les taches parasites issues du cube séparateur étaient seulement décalées au mieux du champ observé en éclairant de biais l'interféromètre et en jouant sur la position du diaphragme de champ (voir partie 3.2.4). Malgré tout, la « marge de déplacement » des taches parasites était trop faible pour que les taches parasites soient totalement séparées du champ d'observation, et il subsistait donc un *fond* dû aux taches parasites, participant à R_{incoh} et affectant la sensibilité du système. Notons de plus que l'éclairage de biais semblait affecter la résolution latérale, effet perceptible en périphérie des images tomographique présentées précédemment (figure 3.22 et 3.23).

Nous nous proposons donc de modifier l'interféromètre pour pouvoir l'éclairer dans l'axe tout en s'affranchissant des taches parasites dues aux réflexions sur les faces du cube séparateur.

15. Concept de *firmware* par opposition au *hardware*, faisant référence à un élément dont la programmation ne peut être modifiée, et au *software*, faisant référence à la programmation de logiciels fonctionnant sur des éléments déjà programmés (*hardware*).

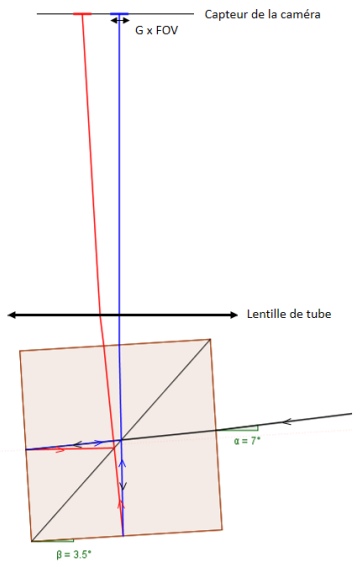

FIGURE 3.26 – Tracé des rayons issus du rayon se propageant selon l'axe optique (en noir) avant d'entrer dans l'interféromètre : en bleu, les rayons utiles réfléchis par l'échantillon et la surface de référence, en rouge, les rayons parasites réflechis par les faces du cube séparateur. La taille du champ dans le plan du capteur de la caméra est connue d'après le champ d'observation et le grandissement du système.

Pour ce faire, la méthode retenue a été d'incliner le cube séparateur d'une quantité suffisante pour que les taches parasites soient finalement entièrement séparées du champ d'observation au niveau de la caméra.

La figure 3.26 illustre par un tracé de rayon la façon dont l'inclinaison du cube permet la séparation des taches parasites et des rayons « utiles » au niveau du capteur de la caméra. Les rayons représentés sont ceux suivant l'axe optique en incidence sur le cube, et déterminant donc le centre du champ au niveau du capteur de la caméra. Notons bien que la taille des taches parasites est la même que la taille du champ utile (limitation par le diaphragme de champ, conjugué avec le plan du capteur de la caméra).

On détermine à partir de ce tracé de rayons, on peut déterminer l'angle duquel il faut incliner le cube séparateur pour séparer les taches parasites en considérant un champ de 11 mm au niveau du capteur de la caméra ($G \times FOV \simeq 11\,mm$). On retiendra une inclinaison de 3.5°, donnant une certaine marge sur le champ (nécessaire si une autre caméra ou lentille de tube sera plus tard utilisée, le champ d'observation maximal des objectifs étant de 2.6 mm).

Notons que nous souhaitons toujours pouvoir placer l'échantillon à observer sous l'objectif du bras objet comme dans un microscope conventionnel, et ainsi l'angle du cube se traduit par une inclinaison de l'objectif de référence et de la voie d'éclairage d'un angle valant deux fois l'inclinaison du cube (voir figure 3.26). Travailler avec une voie d'éclairage inclinée n'est pas trivial, mais heureusement la voie d'éclairage LED est relativement simple et compact, et en la plaçant sur un rail on parvient relativement facilement à l'incliner de l'angle voulu.

Afin d'incliner le cube de l'angle voulu, il a été nécessaire de développer un nouveau

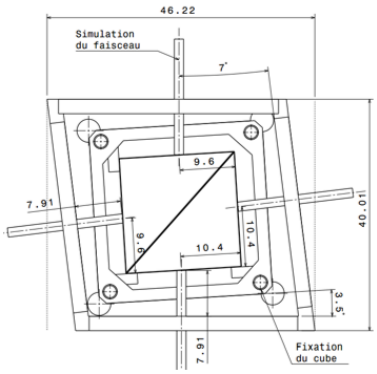

FIGURE 3.27 – Plan du support de cube conçu pour l'élimination des taches parasites dues aux faces du cube.

support pour celui-ci, permettant non seulement de l'incliner mais aussi d'y fixer l'objectif de référence avec l'angle de 7° nécessaire. Les positions pour le centre de l'entrée de la voie d'éclairage et du filetage pour l'objectif de référence sur le support ont été déterminées analytiquement et validées par le tracé de rayon effectué numériquement et présenté précédemment. A partir de ces considérations, un support de cube a été développé et construit en relation avec le bureau d'études mécanique de l'Institut d'Optique. La figure 3.27 présente le plan retenu pour le support de cube.

Une fois ce nouveau support en place dans le système et après inclinaison de la voie d'éclairage de l'angle nécessaire, nous avons mesuré le coefficient de réflexion « effectif » vu par la caméra en l'absence d'éclairage [16], et en allumant la LED mais avec uniquement le cube dans le système. En comparant ces deux mesures, nous pouvons retrouver le coefficient de réflexion dû au cube, qui devrait normalement être nul avec le nouveau support. On détermine un coefficient de réflexion de 0.2% en l'absence d'éclairage, et de 0.24% en présence du cube. Le coefficient de réflexion du cube vaut donc 0.04%, négligeable par rapport à celui du fond de la caméra, et donc participant finalement très peu à R_{incoh}, ce qui correspond à nos attentes.

Notons cependant qu'à l'occasion de ces mesures, le coefficient de réflexion dû aux objectifs a aussi été mesuré, et vaut 1.7%, une valeur relativement élevée : le coefficient de réflexion moyen de la peau participant à R_{incoh} (dont il est impossible de s'affranchir) a été estimé à 2%, et c'est donc finalement, dans ce système, la réflexion des objectifs qui limite le plus la sensibilité. Pour améliorer encore la sensibilité, il faudrait donc utiliser des objectifs dont le traitement anti-reflet est plus efficace dans la gamme de longueur d'onde perçue par la caméra.

Notons aussi qu'à partir de ces mesures, on détermine, pour l'imagerie de la peau humaine, une valeur de R_{incoh} typique de 4% (somme des coefficients de réflexion dus au « fond », aux objectifs et à la peau).

3.4.4 Schéma de démodulation et mécanique associée

Dans les systèmes précédents, il était uniquement possible d'acquérir des images 3D d'échantillons (voir partie 3.2.1). Bien que cela permette d'avoir un montage simple, l'usage

16. Ce « coefficient » correspond simplement au fond (courant d'obscurité) de la caméra, « vu comme correspondant à un coefficient de réflexion » (participant à R_{incoh})

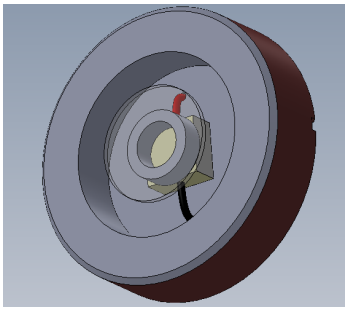

FIGURE 3.28 – Conception en CAO de l'écrou contenant la surface de référence montée sur une puce PZT.

a montré que la nécessité de toujours obtenir des piles d'images n'était pas toujours pratique. En particulier, il est impossible d'observer des images tomographiques en temps réel à une position axiale donnée, ce qui peut être très utile pour, par exemple, déterminer une zone d'intérêt dans un échantillon.

Afin de rémedier à ce problème, on se propose dans ce nouveau système de conserver la possibilité d'obtenir des images 3D comme cela était fait précédemment, mais d'ajouter la possibilité d'obtenir des images tomographiques à une position axiale fixée.

Pour ce faire, la surface de référence a été montée sur une puce PZT très petite ($5 \times 5 \times 2.4\,mm^3$). En faisant osciller sinusoïdalement cette puce et en synchronisant l'oscillation et la prise d'image, il est alors possible d'obtenir des images tomographiques à une position donnée, en utilisant l'algorithme de démodulation sinusoïdal (voir la section 2.3.1.2 et en particulier la figure 2.14).

Pour pouvoir monter la surface de référence sur la puce, un nouvel écrou a été conçu pour la cuve de référence : la surface de référence est collée à une rondelle, elle-même collée sur la puce, collée sur le fond de l'écrou. La rondelle permet d'avoir une épaisseur d'air lorsque la cuve est remplie d'huile, de manière à assurer la réflexion de 3.5% pour la surface de référence, tout comme dans les systèmes précédents. La figure 3.28 présente cet écrou conçu avec le logiciel Solidworks.

L'amplitude d'oscillation de la puce nécessaire pour la démodulation est très faible (de l'ordre de la centaine de nm), mais la puce fonctionnant sur des tensions très élevées et en raison des forces de contrainte de l'huile dans la cuve, le pilotage de la puce s'est avéré compliqué, et en collaboration avec le service électronique de l'Institut d'Optique, un amplificateur a été construit spécialement pour cette application. Des tensions de l'ordre de 30 V devaient ainsi être appliquées à la puce pour s'approcher de la bonne amplitude pour la démodulation sinusoïdale.

Avec ce schéma de démodulation, notons que l'accumulation est effectuée de manière différente qu'avec le schéma linéaire : on ne somme pas des images successives mais des images identiques obtenues pour la même position dans la période d'oscillation de la puce (à trois accumulations par exemple, on somme l'image E_1 obtenue à l'instant t_0 avec l'image E_5 obtenue à un instant $t_0 + T$ (T étant la période d'oscillation de la puce) et l'image E_9 obtenue à un instant $t_0 + 2T$).

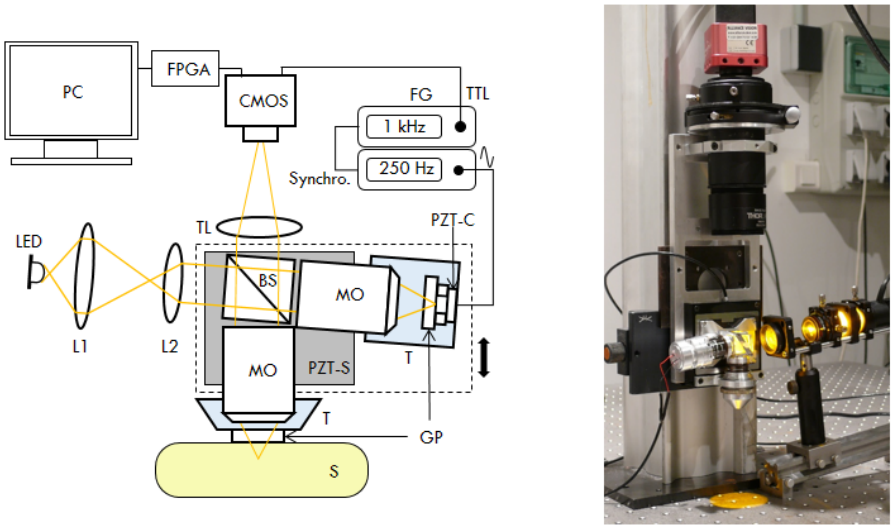

FIGURE 3.29 – Schéma du montage de FF-OCM à LED pour l'imagerie *in vivo*, et photo du montage. L1, collecteur ; L2, condenseur ; BS, cube séparateur ; MO, objectifs de microscope ; T, cuves contenant le liquide d'immersion ; GP, lames de verres ; S, échantillon ; PZT-C, puce piézoélectrique ; PZT-S, platine piézoélectrique ; TL, lentille de tube ; FG, générateur basse fréquence ; TTL, transistor-transistor logic.

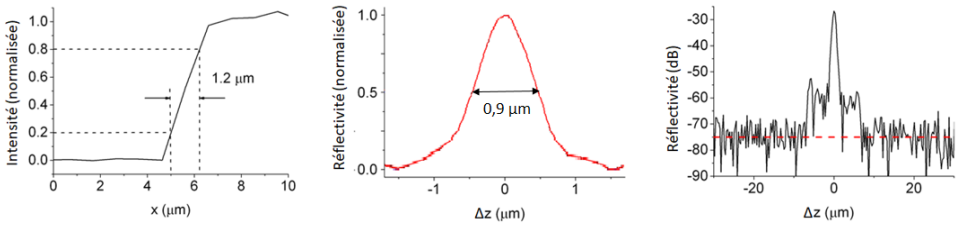

FIGURE 3.30 – Image d'un bord par le système et PSF axiale en représentation linéaire et logarithmique pour les mesures de la résolution latérale, de la résolution axiale et de la sensibilité du système FF-OCM.

3.4.5 Montage et caractéristiques

A partir de l'ensemble des considérations précédentes, la figure 3.29 représente un schéma du montage final du système FF-OCM basé sur une configuration Linnik pour l'imagerie *in vivo*, ainsi qu'une photo du montage construit. On remarquera que le support de la cuve objet a été modifié de manière à ne pas nécessiter de plaque comme dans les montages précédents, cela permettant de placer plus simplement les échantillons sous le microscope. La cuve est vissée dans un support attaché à la platine PZT, et le réglage de la position de la lame de verre du bras objet se fait sans platine de translation, en vissant plus ou moins la cuve.

La figure 3.30 représente les mesures à partir desquelles les caractéristiques du système peuvent être mesurées, de la même manière que pour les systèmes précédents. Du fait de la nécessité d'une vitesse élevée et de l'amélioration de la sensibilité par l'utilisation d'un cube incliné, seules 5 accumulations sont effectuées pour les mesures.

La table 3.3 présente finalement l'ensemble des caractéristiques du système, théoriques

		LED haute puissance
Résolution axiale (µm)	Théorique	0,8
	Mesurée	0,9
Résolution latérale (µm)	Théorique	0,9
	Mesurée	1,2
Sensibilité (dB)	Théorique	74
	Mesurée	74
Résolution temporelle (ms)		20
Dimensions de l'interféromètre (cm x cm x cm)		11 x 11 x 5
Poids de l'interféromètre (g)		210

TABLE 3.3 – Caractéristiques du système FF-OCM à LED de haute puissance pour l'imagerie *in vivo*.

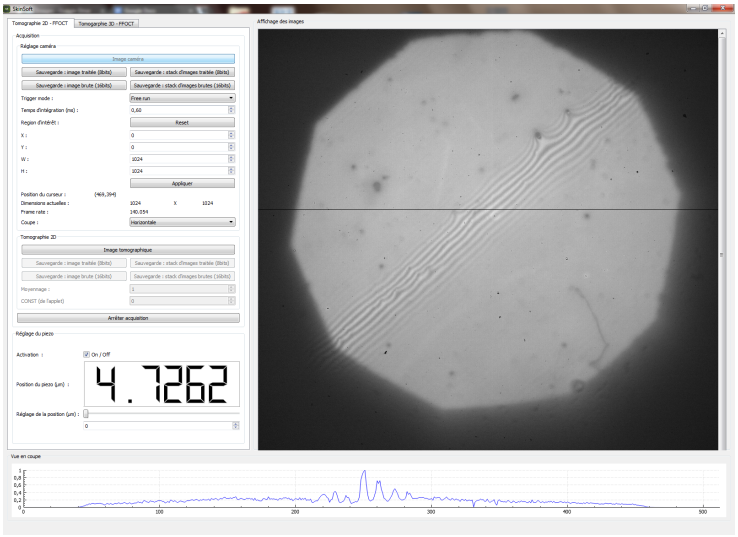

FIGURE 3.31 – Interface du logiciel développé pour piloter le montage de FF-OCM haute vitesse.

et mesurées. On peut voir que le système présente une résolution spatiale similaire aux systèmes précédentes, tout en ayant une résolution temporelle bien plus élevée et une meilleure sensibilité. L'interféromètre est par ailleurs très compact, le support de cube réalisé ayant été pensé pour limiter au maximum l'encombrement de l'interféromètre.

Notons par ailleurs que du fait de l'utilisation du FPGA et du nouveau schéma de démodulation, le logiciel d'acquisition et de visualisation précédemment écrit en C++ ne peut pas être utilisé sur ce système. Un nouveau logiciel a donc été réalisé en collaboration avec un stagiaire de l'Institut d'Optique (Grégoire Kachaner) pour pouvoir paramétrer la caméra, piloter la platine PZT, pouvoir passer du mode d'acquisition linéaire au mode sinusoïdal, afficher les images issues du FPGA et les enregistrer. La figure 3.31 présente une vue de l'interface du nouveau logiciel. Celui-ci est globalement plus simple et plus facile à prendre en main que le précédent présenté à l'annexe D, tous les calculs étant effectués par le FPGA.

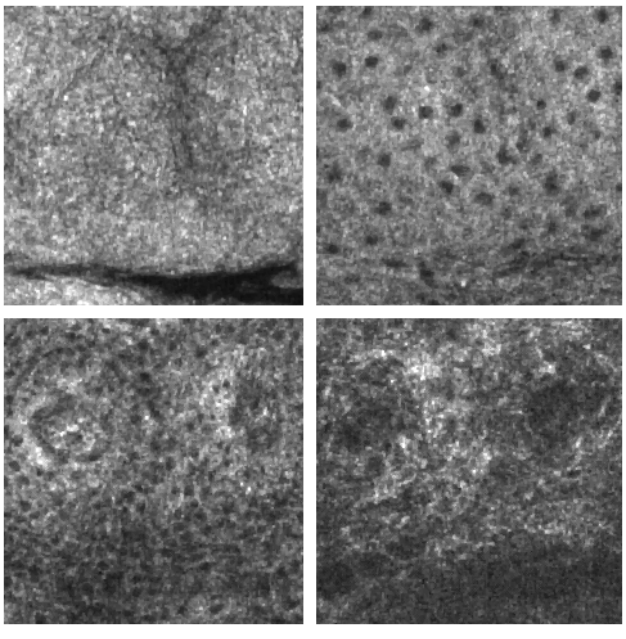

FIGURE 3.32 – Images tomographiques de peau humaine *in vivo* à quatre profondeurs différentes : a) 10 μm, b) 40 μm, c) 80 μm, d) 110 μm. Champ : 240 μm $\times$ 240 μm.

3.4.6 Exemples d'images

A partir de ce nouveau système FF-OCM et du logiciel associé, des images de peau humaine *in vivo* ont pu être obtenues. La figure 3.32 représente ainsi quatre images tomographiques[17] de ma peau obtenues à des profondeurs de 10 μm, 40 μm, 80 μm et 110 μm, correspondant respectivement au stratum corneum, stratum granulosum, stratum spinosum et stratum basale. On retrouve une qualité d'imagerie similaire à celle obtenue pour l'imagerie de la peau *ex vivo*, bien que le champ soit bien plus faible. Comme précédemment, la profondeur de pénétration est suffisante pour imager l'intégralité de l'épiderme, voire le derme superficiel.

En conservant un temps d'exposition de 1 ms, des images sur l'intégralité du champ (1024 $\times$ 1024 pixels) ont aussi été obtenues, nécessitant un temps d'acquisition de 7.2 ms (résolution temporelle du système : 144 ms). Le temps d'exposition est alors assez faible pour éviter le brouillage des franges, mais les mouvements latéraux du sujet peuvent être assez importantes pour générer du signal indésirable, ou une perte de signal. Les images obtenues (aux mêmes profondeurs que précédemment) sont présentées à la figure 3.33.

On voit alors qu'il est possible d'imager la peau superficiellement, mais que le signal est perdu en profondeur. Ceci est probablement dû au fait que la partie superficielle de la peau est plaquée contre la lame de verre de la cuve objet et donc bien stabilisée, mais plus on pénètre dans la peau, plus il peut y avoir de mouvements latéraux, à l'origine de la perte de signal et des artefacts observés.

17. Notons que ces images ont été obtenues à des positions axiales fixes. Obtenir des images 3D sans stabilisation du sujet est compliqué du fait du mouvement sur la durée de l'acquisition : si chaque image en face est effectivement obtenue sans artefacts, il peut y avoir un mouvement global entre la première et la dernière image d'une pile, ce qui se traduira par une image 3D distordue.

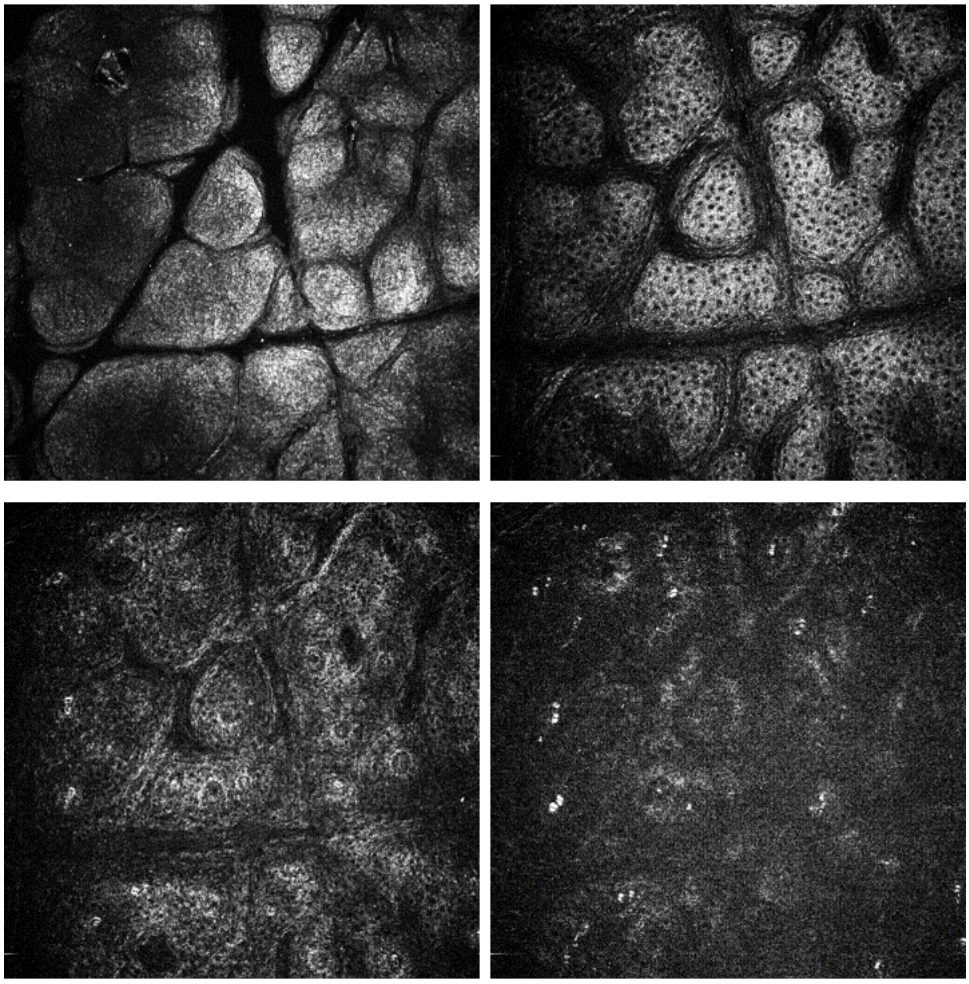

FIGURE 3.33 – Images tomographiques de peau humaine *in vivo* grand champ à quatre profondeurs différentes : a) $10\,\mu m$, b) $30\,\mu m$, c) $60\,\mu m$, d) $110\,\mu m$. Champ : 990 μm $\times$ 990 μm.

3.5 Conclusion

Un système de FF-OCM à haute résolution éclairé par une LED blanche a été développé. Ce montage est basé sur une version simple et compact de la FF-OCM, se présentant comme un microscope conventionnel (utilisant des objectifs à immersion dont le milieu d'immersion a été spécialement adapté à l'imagerie de la peau) et nécessitant un unique degré de liberté mécanique pour l'acquisition d'images 3D. Une résolution axiale de $0.7\,\mu m$ a été mesuré pour le système à LED, identique à celle mesurée sur le même montage éclairé par une lampe halogène, la source de référence pour la FF-OCM à très haute résolution. Des images de têtard *Xenopus laevis* et de peau humaine *ex vivo* obtenues avec les deux sources ont validé que l'illumination à LED blanche pouvait remplacer l'illumination à lampe halogène dans le contexte de l'imagerie biomédicale, les images obtenues pour les deux sources étant identiques, et les LED ayant de nombreux avantages par rapport aux autres sources couramment utilisées en FF-OCM, en particulier un faible coût, une longue durée de vie, une grande efficacité énergétique et une grande compacité.

Afin de développer un montage adapté à l'imagerie de la peau *in vivo* tout en conservant les avantages de l'éclairage LED, la source du montage précédent a été remplacée par une LED de haute puissance, de luminance 4 fois supérieure à la LED précédemment utilisée. L'interféromètre a par ailleurs été modifié de manière à avoir un cube incliné rejetant de la lumière parasite et permettant de maximiser la sensibilité du système. La vitesse d'acquisition des images tomographiques du système ainsi proposé était finalement multipliée par 40, pour une sensibilité supérieure. Avec ce système à haute vitesse, des images de peau *in vivo* ont pu être obtenues, et étaient similaires aux images de peau *ex vivo* obtenues sur le montage précédent, prouvant qu'il était possible d'avoir un système de FF-OCM à éclairage LED, en configuration Linnik (configuration la plus flexible et simple à implémenter), acquérant les images selon un algorithme conventionnel, adapté à l'imagerie *in vivo*. De plus, l'interféromètre utilisé dans le système a été développé de manière à être le plus compact possible ($11 \times 11 \times 5\,cm^3$, 210 g), ouvrant la voie à la possibilité de développer des systèmes de FF-OCM portatifs, la capacité d'imagerie *in vivo* étant plus intéressante si le système peut être utilisé pour sonder n'importe quelle partie du corps en temps réel, ce qui nécessite un outil portatif facile à manœuvrer. Les voies d'éclairage et d'imagerie du système proposé ne sont cependant pas encore assez compactes pour proposer un système portatif.

Un défaut de ce système adapté à l'imagerie *in vivo* est cependant son faible champ, dû au fait qu'il est nécessaire que le temps d'acquisition de la caméra soit assez faible pour éviter l'apparition d'artefacts et la dégradation du signal, ce qui implique d'utiliser moins de pixels du capteur pour pouvoir minimiser la différence entre temps d'acquisition et temps d'intégration. Malgré cela, il a été montré qu'il est possible d'obtenir des images sur tout le champ du capteur, mais que la pénétration était alors limitée. Une solution à ce problème serait de concevoir des caméras plus rapides, ayant en même temps une grande profondeur de puits de photons, comme cela a été proposé récemment [97].

Notons que le développement d'un système de FF-OCM haute vitesse permet non seulement d'imager des échantillons *in vivo*, mais aussi de s'intéresser à la dynamique d'évènements rapides, ce à quoi nous allons à présent nous intéresser.

Chapitre 4

Nouvelles sources de contraste en microscopie par cohérence optique

4.1 Introduction

Les images tomographiques obtenues dans les montages conventionnels d'OCT (et donc de FF-OCM) sont des images donnant une information *anatomique*, ou *structurelle* : la seule « source de contraste » dans ces images est l'intensité rétrodiffusée par l'échantillon dans une gamme de longueurs d'onde donnée, liée à des variations d'indice optique, dont la distribution spatiale permet de donner des informations sur les structures de l'échantillon (leurs formes, limites, contenu ...). A l'instar du microscope, l'OCT est ainsi, dans le domaine médical, principalement un outil d'anatomo-pathologie.

L'information sur l'intensité rétrodiffusée, si elle peut suffire pour certaines applications, ne permet finalement que d'obtenir des images structurelles, et l'aide au diagnostic peut être fortement améliorée si d'autres sources de contraste sont utilisées. C'est par exemple l'utilité des colorants se fixant à certains composants cellulaires utilisés en histologie, qui, couplés à l'utilisation d'un microscope ayant une caméra couleur, permet de distinguer plus aisément les différentes structures des tissus. Le but de l'OCT en dermatologie étant souvent présenté comme le fait de pouvoir remplacer les biopsies et l'examen histologique, il est nécessaire de développer des sources de contraste supplémentaires en OCT si l'on veut s'approcher de la sensibilité et spécificité de l'examen histologique conventionnel.

Des systèmes d'OCT basés sur l'utilisation de plusieurs longueurs d'onde d'illumination ont par exemple été développés afin de proposer des images tomographiques structurelles « en couleur », les différents canaux de couleurs des images correspondant à des images tomographiques conventionnelles obtenue pour des voies d'illumination dont les spectres sont centrés à différentes longueurs d'onde. On parle ainsi d'OCT multispectral. Cependant, pour que les canaux apportent des informations véritablement complémentaires, il est nécessaire que les spectres d'illumination se chevauchent le moins possible, ce qui implique alors des limitations en résolution axiale [1]. De plus, cette implémentation complexifie les montages (besoin de capteur à réponse spectrale très large, voire de plusieurs capteurs, difficultés pour bien recaler les différents canaux ...) et n'est finalement pas couramment

1. Notons que l'objectifs de certains systèmes à plusieurs canaux n'est pas d'apporter une information structurelle complémentaire, mais de combiner la haute résolution offerte par un système dont la voie d'illumination a un spectre centré dans le visible et la grande profondeur de pénétration offerte par un système dont la voie d'illumination a un spectre centré dans l'infrarouge

utilisée, bien qu'elle ait donné plusieurs résultats intéressants en OCT conventionnelle [108] et en FF-OCM [106, 66, 68].

Les sources de contraste complémentaires qui ont le plus largement été adoptées en OCT et qui confèrent à cette technique un avantage notable par rapport à l'histologie conventionnelle sont celles qui permettent une *imagerie fonctionnelle* à partir de systèmes OCT. L'imagerie fonctionnelle permet d'étudier des processus pathologiques par les modifications fonctionnelles qu'ils provoquent, à partir d'images dont le contraste est basé sur des grandeurs physiques liées au fonctionnement des tissus.

L'imagerie fonctionnelle est ainsi le plus généralement effectuée *in vivo*, les tissus observées devant effectivement fonctionner pour que des images pertinentes soient obtenues. La capacité de l'OCT pour l'imagerie *in vivo* a ainsi naturellement mené au développement de méthodes d'imagerie fonctionnelle, rendu aussi possible par le fait que l'OCT est une méthode permettant de mesurer l'amplitude du signal rétrodiffusé par les échantillons, mais aussi sa phase, pouvant apporter de nombreuses informations complémentaires. Plusieurs techniques d'imagerie fonctionnelle ont été développées en OCT [109] :

L'OCT angiographie (OCT-A) permet de visualiser la vascularisation, voire de mesurer des vitesses d'écoulement sanguin (on parle généralement dans ce cas de Doppler OCT (D-OCT)). Cette technique permet d'étudier toutes les pathologies impliquant des modifications dans l'écoulement sanguin.

L'OCT polarimétrique (PS-OCT pour *polarization sensitivive OCT*) permet de caractériser l'action des tissus sur la polarisation de la lumière et en particulier de mesurer la biréfringence des tissus, pouvant être altérée dans des cas pathologiques (cas des brûlures par exemple).

L'OCT elastographie (OCE, pour *optical coherence elastography*) permet de mesurer l'elasticité des tissus, pouvant être altérée dans des cas pathologiques (fibrose, calcifications ...).

L'OCT spectroscopique (S-OCT) mesure localement le contenu spectral de la lumière rétrodifusée par l'échantillon, pouvant varier dans des cas pathologiques (par exemple en raison de brûlures ou de lésions précancereuses).

L'OCT à contraste moléculaire (MC-OCT), utilisant des bio-marqueurs affectant le contraste des images OCT conventionnelles et permettant de caractériser l'environnement moléculaire des tissus.

L'OCT-A, la PS-OCT et l'OCE sont aujourd'hui les méthodes d'imagerie fonctionnelles les plus développées en OCT, ayant donné lieu à des implémentations dans des systèmes cliniques.

Dans le domaine de la FF-OCM, les methodes de spectroscopie (S-FF-OCM) et de polarimétrie (PS-FF-OCM) ont été largement étudiées [110], mais les méthodes d'angiographie et d'elastographie restent anecdotiques [111, 112], malgré leur développement notable dans le domaine de l'OCT conventionnel. On notera cependant qu'une méthode d'imagerie fonctionnelle propre à la FF-OCM, appelée *dynamic FF-OCT* a récemment été developpée [113], basée sur un contraste lié au métabolisme des tissus à l'échelle sub-cellulaire. Cependant, contrairement aux méthodes d'imagerie fonctionnelle en OCT conventionnelle s'appliquant toutes à des échantillons *in vivo*, le *dynamic FF-OCT* est pour l'instant seulement appliqué sur des échantillons *ex vivo* frais.

Afin de se diriger vers des applications d'angiographie en FF-OCM, nous nous proposons dans ce chapitre d'adapter des méthodes d'OCT-A à la FF-OCM, à partir du système haute vitesse développé précédemment, adapté à l'étude d'événements dynamiques tels

que l'écoulement sanguin. Afin de poursuivre le développement des méthodes de contraste augmenté en FF-OCM, ce chapitre présentera dans une seconde partie une implémentation d'un montage de FF-OCM polarimétrique à contraste optimisé, permettant d'adapter le montage de PS-FF-OCM conventionnel à des applications données pour y maximiser le contraste polarimétrique.

4.2 Imagerie du flux sanguin

4.2.1 Introduction

L'extension de l'OCT permettant de visualiser et caractériser le flux sanguin (OCT-A/D-OCT) constitue probablement aujourd'hui l'extension fonctionnelle la plus répandue en OCT. Son développement est lié à la large utilisation de l'OCT dans le domaine de l'ophtalmologie : en effet, de nombreuses pathologies rétiniennes sont associées à des anomalies dans la vascularisation de la rétine, et l'imagerie fonctionnelle du flux sanguin apporte ainsi une information précieuse pour le diagnostic de ces pathologies, en particulier pour leur détection à un stade précoce [114].

Aujourd'hui, la méthode de référence pour l'imagerie de la vascularisation de la rétine est l'angiographie à la fluorescéine ou au vert d'indocyanine (ICG pour *indocyanine green* en Anglais) [115], une méthode invasive nécessitant l'injection en intraveineuse d'agents de contraste. Cependant cette méthode permet seulement de cartographier les vaisseaux sanguins sans apporter d'information quantitative sur la direction et la vitesse des écoulements sanguins, et ne permet pas de distinguer la position axiale des vaisseaux sanguins observés. L'OCT-A est actuellement la technique la plus prometteuse pour devenir la nouvelle méthode de référence pour l'imagerie de la vascularisation de la rétine du fait qu'elle peut apporter la même information, mais de manière non-invasive, à plus haute résolution, résolue axialement dans la rétine, et pouvant de plus apporter en parallèle une information structurelle ainsi qu'une information quantitative sur les caractéristiques des écoulements sanguins (cependant, la cartographie des écoulements sanguins reste l'information principale pour le diagnostic et le suivi des pathologies, notamment du fait qu'obtenir une information quantitative pertinente sur les écoulements sanguins à partir de données OCT est complexe).

Notons bien que si l'OCT-A s'est principalement développée dans le domaine de l'ophtalmologie, l'imagerie du flux sanguin à haute résolution pour la cartographie 3D de la microcirculation du sang dans les tissus peut aussi apporter d'importantes informations quant au diagnostic et au traitement des maladies cardiovasculaires et du cancer, en particulier de la peau [116]. L'angiographie n'est pas encore utilisée en routine dans ce domaine du fait de l'absence d'une méthode efficace adoptée par les praticiens, qui permettrait de visualiser la microvascularisation en profondeur dans les tissus. L'OCT-A pourrait à nouveau constituer la méthode de référence dans ce domaine.

Les vaisseaux sanguins sont généralement compris dans des plans parallèles à la surface de la peau, et l'imagerie *en face* est ainsi la plus appropriée pour visualiser la vascularisation. Or en OCT conventionnel, les images en face sont reconstituées à partir d'images 3D (voir la partie 2.2.1), ce qui génère, dans le contexte de l'angiographie, beaucoup de données inutiles (en dehors des plans contenant les vaisseaux sanguins), complique finalement la visualisation en temps réel de la vascularisation en raison des temps de calcul nécessaire à la reconstruction des images en face, et peut créer des artefacts en cas de mouvements

durant l'acquisition. La FF-OCM, permettant d'obtenir directement des images en face, semble ainsi une méthode appropriée pour l'angiographie.

Nos travaux portent ainsi sur le développement de méthodes d'angiographie sur un système de FF-OCM adapté à l'imagerie de la peau *in vivo*, et précédemment présenté. Jusqu'à maintenant, un seul exemple d'imagerie du flux sanguin a été proposé en FF-OCM [111], mais à partir d'un système illuminé par une source spatialement cohérente générant de nombreux artefacts dans les images tomographiques obtenues.

Afin de comprendre comment développer des méthodes d'angiographie en FF-OCM, nous nous proposons tout d'abord de revenir sur l'étude théorique du signal OCT généré par des particules en mouvement, à partir de laquelle on pourra introduire les méthodes existantes appliquées pour l'imagerie des vaisseaux sanguins en OCT conventionnelle. Le montage expérimental pour l'étude des méthodes d'OCT-A en FF-OCM sera ensuite introduit, et plusieurs méthodes seront présentées pour permettre d'imager le flux sanguin en FF-OCM.

4.2.2 Signal OCT d'un échantillon dynamique

Nous avons déjà succinctement évoqué à la partie 3.4.1 l'effet d'un mouvement axial de l'échantillon sur la phase du signal interférométrique enregistré par la caméra. On a en particulier vu qu'un mouvement axial entrainait un décalage en phase $\Delta\phi(t)$ du signal interférométrique. Ainsi, en considérant des images interférométriques, la fréquence des franges est modifiée pour les zones de l'échantillon en mouvement dans la direction axiale. Ce décalage en fréquence dû au mouvement est appelé *effet Doppler*. On peut ainsi définir une *fréquence Doppler* correspondant à ce décalage en fréquence, et liée à la vitesse de l'échantillon dans la direction axiale (voir équation 3.3) :

$$\Delta\phi(t) = 2\pi f_{Doppler} t \tag{4.1}$$

$$\text{d'où } f_{Doppler} = \frac{2n}{\overline{\lambda}} v_z. \tag{4.2}$$

Le décalage en fréquence n'est donc lié qu'à la composante axiale de la vitesse du mouvement de l'échantillon. On peut le lier à la vitesse v du mouvement en introduisant l'*angle Doppler*, $\alpha_{Doppler}$, correspondant à l'angle entre la direction axiale et la direction du mouvement (voir figure 4.1). La vitesse du mouvement vaut alors $v_z = v\, cos(\alpha_{Doppler})$, et la fréquence Doppler vaut ainsi :

$$f_{Doppler} = \frac{2n}{\overline{\lambda}} v\, cos(\alpha_{Doppler}). \tag{4.3}$$

Il est intéressant d'étudier l'influence de cette modification du signal interférométrique sur le signal OCT. Comme on l'a vu, le signal OCT est constitué d'un terme d'amplitude et un terme de phase, tous les deux mesurables avec des algorithmes adaptés (voir partie 2.3.1.2). Le signal OCT peut donc s'écrire en notation complexe :

$$S_{OCT} = A_{OCT} e^{i\Phi_{OCT}}. \tag{4.4}$$

Dans une zone où l'échantillon en mouvement, on a ainsi $A_{OCT} = A'$ et $\Phi_{OCT} = \Phi + 2\pi f_{Doppler} T_{int}$.

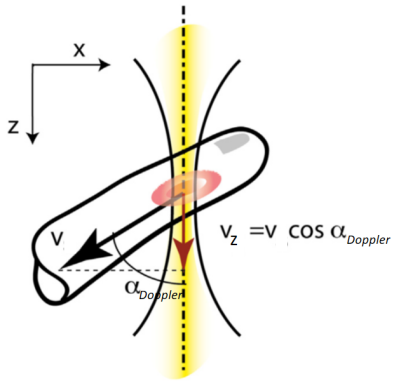

FIGURE 4.1 – Définition de l'angle Doppler en fonction de la direction de la vitesse v des structures en mouvement et de la direction du faisceau d'illumination du système OCT [114].

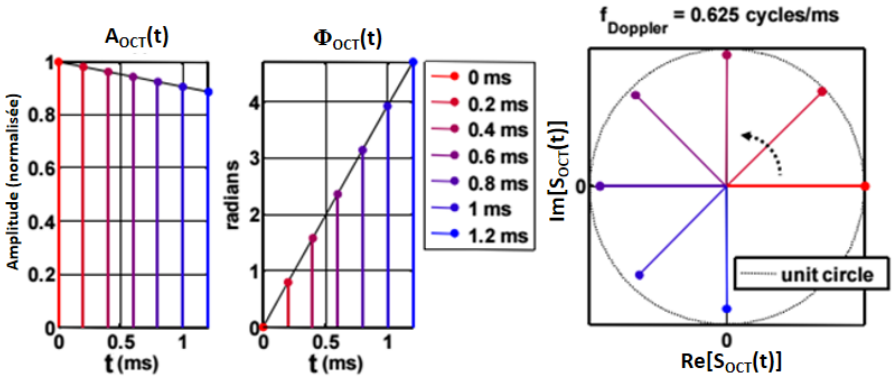

FIGURE 4.2 – Évolution du signal OCT d'une particule en mouvement (vitesse de 10 mm/s avec un angle Doppler de 89°, pour un système de longueur d'onde centrale 800 nm ayant une résolution axiale de 1 μm, et un échantillon d'indice 1.3), en amplitude, phase, et dans le plan complexe. Modifié depuis [117].

Intéressons nous à l'évolution de S_{OCT} dans le plan complexe lorsqu'on image un point de l'échantillon inclue dans une zone en mouvement. Considérons une particule unique en ce point. La phase du signal OCT évolue à mesure que la particule bouge, et vaut, en fonction du temps :

$$\Phi_{OCT} = \Phi + 2\pi f_{Doppler}(T_{int} + t). \tag{4.5}$$

L'amplitude du signal OCT diminue par ailleurs à mesure que la particule s'éloigne de la position de la différence de marche nulle.

La figure 4.2 représente ainsi l'évolution de S_{OCT} au cours du temps pour le point considéré, en amplitude, en phase, et dans le plan complexe.

Cependant, comme on l'a expliqué précédemment, dans un cas réaliste, on n'image jamais une particule unique mais un ensemble de particules contenues dans le volume de résolution du système. La phase et l'amplitude du signal correspondent donc à une phase et une amplitude « globale » pour cet ensemble de particules. Lorsque l'échantillon est en mouvement, les particules contenues dans le volume de résolution sont progressivement

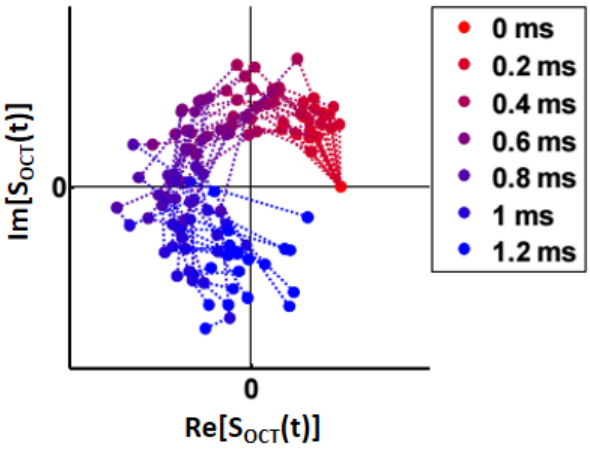

FIGURE 4.3 – Évolution du signal OCT d'un ensemble de particules en mouvement (vitesse de 10 mm/s avec un angle Doppler de 89°, pour un système de longueur d'onde centrale 800 nm ayant une résolution axiale de 1 μm, et un échantillon d'indice 1.3), dans le plan complexe, pour 15 mesures différentes [117].

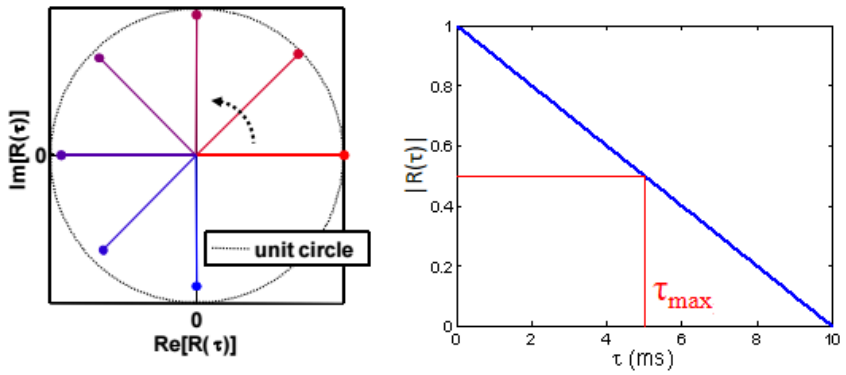

FIGURE 4.4 – Fonction d'autocorrélation $R(\tau)$ du signal OCT en représentation complexe, et en amplitude pour définir le temps de décorrélation τ_{max}. Modifié depuis [117].

remplacées par d'autres particules. À mesure que les particules « initiales » sont remplacées, l'évolution de la phase du signal n'est plus linéaire, mais devient aléatoire : on parle de *décorrélation* du signal. La figure 4.3 représente ainsi l'évolution de S_{OCT} dans le cas d'un ensemble de particules en mouvement.

On peut ainsi définir la fonction d'autocorrélation de S_{OCT}, $R(\tau)$, représentant le « niveau de similitude » entre S_{OCT} à un instant t et un instant $t+\tau$. Il s'agit d'une fonction complexe. On peut définir à partir de cette fonction un temps de décorrélation τ_{max}, correspondant à la durée τ telle que le signal à l'instant $t+\tau$ peut être considéré comme totalement aléatoire par rapport au signal à l'instant t. Cette valeur correspond à la FWHM de l'amplitude de $R(\tau)$. La figure 4.4 représente la fonction d'autocorrélation du signal précédemment considéré, dans le plan complexe et en amplitude de manière à définir le temps de décorrélation.

Notons aussi que l'amplitude du signal est issu de l'intégration d'un signal cohérent sur le volume de résolution du système (voir équation 2.10). Ainsi, l'amplitude du signal

OCT présente des figures de *speckle*, résultant d'interférences entre l'ensemble des particules contenues dans le volume de résolution. Lorsque ces particules changent au cours du mouvement, la figure de speckle change aussi, résultant en une variation aléatoire de l'amplitude, comme présentée sur la figure 4.3. Tout comme dans le cas de la phase, l'amplitude de S_{OCT} est considérée comme totalement aléatoire passé le temps de décorrélation. Autrement dit, passé ce temps, la figure de speckle obtenu par mesure de l'amplitude de S_{OCT} est totalement différente de celle obtenue initialement. Il est intéressant de noter que si l'OCT n'était pas une méthode d'imagerie en lumière cohérente, l'amplitude du signal mesuré pourrait rester invariante même avec un échantillon en mouvement (dans le cas ou l'intensité rétrodiffusée par cet échantillon serait toujours constante durant son mouvement).

Notons bien que dans le cas de l'amplitude comme de la phase, la décorrélation peut être causée par un mouvement axial *ou latéral*, étant donné qu'elle est uniquement due au renouvellement des particules dans le volume de résolution.

4.2.3 État de l'art des techniques d'imagerie du flux sanguin en OCT conventionnel

A partir de l'étude théorique menée précédemment, on constate que le mouvement des échantillons peut avoir une influence sur le signal OCT à la fois en régime de corrélation (par effet Doppler) et de décorrélation (par des variations aléatoires du signal en phase et en amplitude). On distinguera donc deux catégories de méthodes en OCT-A, selon le régime considéré.

Nous nous proposons à présent de revoir l'ensemble des méthodes existantes pour imager et quantifier le mouvement en OCT conventionnel. Dans le cadre de l'imagerie du flux sanguin, un présupposé pour l'ensemble des méthodes est que le seul mouvement dans l'échantillon est dû au flux sanguin, le reste de l'échantillon étant fixe par ailleurs.

4.2.3.1 Effet Doppler

Les premières méthodes à avoir été implémentées pour l'imagerie du mouvement étaient basées sur l'effet Doppler. Cet effet était déjà largement utilisé dans le domaine de l'échographie, où la fréquence des ultrasons est décalée lorsque des échantillons en mouvement sont imagés, tout comme la fréquence des franges d'interférences est décalée en OCT.

Des méthodes ont ainsi d'abord été développées en TD-OCT pour analyser la fréquence des franges d'interférence et isoler les zones où un décalage en fréquence était observé, permettant de cartographier les zones en mouvement [118]. Comme on l'a vu, dans ces zones, la fréquences du signal interférométrique est décalée d'une quantité $f_{Doppler}$, et en mesurant le décalage en fréquence il est donc aussi possible de mesurer la vitesse axiale du déplacement, voire de mesurer la vitesse si l'angle Doppler est par ailleurs mesuré. Cette méthode, souvent appelée *color Doppler OCT* ou CD-OCT, nécessite ainsi d'analyser l'intégralité du signal interférométrique, en mesurant localement sa fréquence à partir d'une fenêtre que l'on balaye. Elle a rapidement été utilisée pour imager le flux sanguin dans des échantillon *in vivo* [119, 120, 121]. Cependant, cette méthode souffre d'une faible sensibilité (il n'est généralement pas possible sur ces systèmes de mesurer des vitesses inférieures à 1 mm/s [122]), d'une perte en résolution par rapport à la résolution du système OCT, et est généralement trop lente pour permettre des mesures en temps réel (en raison des lourds calculs nécessaire à la mesure locale de la fréquence), bien que des efforts aient été apportés

pour optimiser sa vitesse [123]. La méthode de CD-OCT n'est par ailleurs implémentable que sur des systèmes de TD-OCT, étant donné que les calculs se font à partir du signal interférométrique mesuré en fonction de la différence de marche.

Bien que le CD-OCT ait été étudié pour des applications médicales [124, 125], aucune étude clinique n'a été menée avec cette méthode du fait de ses limitations. Ce n'est qu'à partir de 2000 que des études clinique ont été menées en D-OCT, suite au développement d'une méthode de D-OCT différente, basée sur la mesure de la phase du signal OCT, souvent désignée sous le nom de phase resolved D-OCT, ou PR-D-OCT [126]. Cette méthode mesure la fréquence Doppler par l'enregistrement de deux signaux OCT (en pratique, généralement 2 A-scans) à la même position dans l'échantillon, mais à deux instants différents séparés d'un temps Δt. La différence de phase entre les deux signaux à une position z donnée dans l'échantillon vaut alors (voir équation 4.5) :

$$\Delta\Phi_{OCT}(z) = 2\pi f_{Doppler}\Delta t. \tag{4.6}$$

On peut ainsi mesurer $f_{Doppler}$ et déterminer les zones en mouvement, pour lesquelles on peut mesurer la vitesse en connaissant l'angle Doppler :

$$v(z) = \frac{\overline{\lambda}\Delta\Phi_{OCT}(z)}{4n\pi\Delta t cos(\alpha_{Doppler})}. \tag{4.7}$$

Cette méthode peut être implémentée sur des systèmes de TD-OCT comme de FD-OCT, sans perte en résolution par rapport à la résolution des systèmes. Notons que pour une sensibilité optimale, des systèmes stables en phase doivent être utilisés [2], et Δt doit être le plus grand possible, tout en restant inférieur au temps de décorrélation pour des mesures de décalage Doppler pertinentes. Les systèmes de FD-OCT étant stables en phase [127] et étant aujourd'hui les principaux systèmes d'OCT utilisés, la PR-D-OCT est actuellement la méthode de référence en D-OCT, et a été implémentée sur de nombreux systèmes. Cependant, le fait qu'elle se base sur des mesures de phase implique des potentiels problèmes de repliement de phase [114], ainsi que de mesurer la phase en parallèle de l'amplitude, augmentant la quantité de données à enregistrer.

Les méthodes de D-OCT ont l'avantage de pouvoir apporter des informations quantitatives sur les écoulements (de nombreuses méthodes ont été explorées pour la mesure de l'angle Doppler [128, 129, 130]), mais du fait qu'elles se basent sur l'effet Doppler, elles sont fondamentalement plus sensibles aux mouvements dans la direction axiale ($\alpha_{Doppler} \sim 0°$) que dans la direction latérale ($\alpha_{Doppler} \sim 90°$). Comme on l'a vu, le sang s'écoule généralement dans des plans en face, et il n'est ainsi pas trivial d'obtenir des mesures de D-OCT pour des écoulements lents [131] (ce qui est souvent le cas dans les capillaires sanguins très fins pouvant être imagés en OCT).

4.2.3.2 OCT-A en régime de décorrélation

Comme on l'a vu, si l'intervalle de temps entre deux images OCT est supérieur au temps de décorrélation, le signal aura varié aléatoirement en amplitude et en phase dans les zones de l'échantillon en mouvement. De nombreuses méthodes se basent sur ce phénomène pour imager le flux sanguin, en grande partie du fait que contrairement aux méthodes basées sur

2. La vitesse minimale pouvant être mesurée étant $\frac{\overline{\lambda}\delta\Phi_{OCT}}{4n\pi\Delta t cos(\alpha_{Doppler})}$, avec $\delta\Phi_{OCT}$ le plus faible décalage de phase mesurable par le système.

l'effet Doppler, celles-ci sont sensibles au mouvement axial et latéral des échantillons. Ces méthodes ne permettent cependant a priori pas de fournir des informations quantitatives pour caractériser les écoulements, mais apportent une information similaire à celle fournie en angiographie conventionnelle (cartographie du flux sanguin). De ce fait, le terme d'OCT-A fait parfois uniquement référence à ces méthodes, par opposition au D-OCT, qui apporte une information plutôt similaire à celle fournie par l'échographie Doppler.

On pourra distinguer trois types de méthodes d'OCT-A en régime de décorrélation :

1. Les méthodes se basant sur le signal OCT complexe (amplitude et phase).
2. Les méthodes se basant uniquement sur la phase du signal OCT.
3. Les méthodes se basant uniquement sur l'amplitude du signal OCT.

En utilisant le signal OCT complexe, il est possible de directement mesurer la décorrélation du signal [132] afin de différencier les zones de l'échantillon en mouvement des zones statiques. La décorrélation est mesurée selon l'équation suivante, à partir de M-1 images obtenues à des instant t_m différents, chacune associée à une image obtenue à un instant $t_m + \Delta t$:

$$C(z,\Delta t) = \frac{1}{M-1}\sum_{m=1}^{M-1} \frac{A_{OCT}(z,t_m)A_{OCT}(z,t_m+\Delta t)}{\frac{1}{2}(A^2_{OCT}(z,t_m)+A^2_{OCT}(z,t_m+\Delta t))} e^{-\mathrm{i}(\Phi_{OCT}(z,t_m+\Delta t)-\Phi_{OCT}(z,t_m))}. \tag{4.8}$$

Les méthodes se basant sur la phase du signal OCT en régime de décorrélation différencient généralement les zones statiques des zones en mouvement à partir de mesures de différence de phase, similaires à celles utilisée en PR-D-OCT. En régime de décorrélation, on considérera uniquement que la différence de phase dans une zone fixe est nulle, et aléatoire dans une zone en mouvement. Afin d'optimiser la sensibilité de la discrimination, la variance de la différence de phase est calculée à partir de M-1 différences de phase mesurées à la même position (on parle alors de *phase variance OCT* ou PV-OCT) [133, 134, 135]

$$PV(z) = \frac{1}{M-1}\sum_{m=1}^{M-1}\left(\Delta\Phi_m(z) - \frac{1}{M-1}\sum_{m=1}^{M}\Delta\Phi_m(z)\right)^2. \tag{4.9}$$

Tout comme en PR-D-OCT, des systèmes stables en phase doivent être utilisés pour obtenir une bonne sensibilité de mesure. Notons aussi que l'intervalle temporel entre 2 A-scan est, dans la majorité des systèmes OCT, trop faible pour obtenir une différence de phase en régime de décorrélation, et doit être augmenté, par exemple en mesurant les différences de phase entre des B-scans, ou des parties de B-scans, successifs [136]. Cependant, l'augmentation de ce temps rend aussi le système particulièrement sensible aux mouvements de l'échantillon dans la mesure des différences de phase, et une correction sur cette mesure doit être apporté pour obtenir des images d'OCT-A pertinentes [137].

Les méthodes se basant sur l'amplitude du signal OCT ont l'avantage de permettre d'obtenir des images tomographiques et des images d'OCT-A à partir de la même information. Tout comme en PV-OCT, ces méthodes se basent sur le fait que les figures de speckle des images tomographiques restent fixent au cours du temps pour des zones des échantillons statiques, mais varient dans des zones en mouvement si l'intervalle temporel entre les images est supérieur au temps de décorrélation. La première implémentation d'une méthode d'OCT-A basée sur l'amplitude par l'analyse du speckle et non pas sur la

phase du signal n'a été proposée qu'en 2005. Une implémentation plus simple a depuis été introduite, fondée sur le calcul de la variance de l'amplitude du signal OCT sur M images tomographiques pour discriminer les zones statiques des zones en mouvement (on parle de *speckle variance OCT*, ou SV-OCT) [138, 139].

$$SV(z) = \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M}\left(A_{OCT,m}(z) - \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M}A_{OCT,m}(z)\right)^2. \tag{4.10}$$

Notons qu'il est nécessaire que les variations du speckle soient supérieures aux variations dues au bruit de mesure dans les images pour pouvoir identifier le mouvement, mais cela est de toute façon une condition pour pouvoir tout simplement imager le speckle [3]. Tout comme en PV-OCT, du fait des intervalles de temps longs entre les images pour être en régime de décorrélation, des artefacts dus au mouvement peuvent apparaître (moins critiques que sur des mesures de phase cependant). Le nombre d'images à prendre en compte pour le calcul de la variance a ainsi été optimisé en fonction du « niveau de mouvement » de l'échantillon durant la mesure, afin d'obtenir des images pertinentes sans avoir besoin de correction [140].

En utilisant le même concept sur lequel la SV-OCT est fondée, des méthodes encore plus simples ont par la suite été développées, basées uniquement sur des différences d'images tomographiques en amplitude [141, 142]. Une méthode basée uniquement sur un seuillage dans les images tomographiques a même été développée pour l'imagerie des vaisseaux sanguins dans la choroïde (une couche de la rétine), n'ayant ainsi pas besoin d'obtenir plusieurs images à la même position [143].

Finalement, notons que des méthodes de mesures de la décorrélation à uniquement à partir de l'amplitude du signal OCT ont été développées [144, 145].

Les méthodes présentées ci-dessus peuvent être implémentées directement sur des systèmes OCT préexistant, étant donné qu'elles ne se fondent que sur un traitement différents du signal OCT pour générer des images d'angiographie. Elles constituent donc les méthodes les plus couramment utilisées en OCT-A. On notera cependant qu'il existe aussi des méthodes d'OCT-A fondées sur des modifications techniques des montages d'OCT [146, 147, 148].

4.2.4 L'angiographie en FF-OCM

Le fait que très peu de méthodes d'OCT-A aient été développées en FF-OCM jusqu'à présent alors que cette extension a constitué une avancée fondamentale en OCT conventionnelle est principalement dû à deux raisons. La raison principale est probablement que l'angiographie n'a vraiment de sens que sur des échantillons *in vivo*, présentant des écoulements sanguins. Du fait de la difficulté de développer des systèmes permettant d'imager des échantillons *in vivo* en FF-OCM, le développement de méthodes d'OCT-A a très peu été exploré. Une seconde raison est liée aux limitations de la FF-OCM du point de vue de la vitesse d'acquisition (voir parties 2.3.3.4 et 3.4.1). En effet, le système doit être assez rapide pour que le signal des zones de l'échantillon en mouvement puisse être vu, c'est à dire que la vitesse de ce mouvement soit assez faible, dans la direction axiale pour ne

3. Autrement dit, cette méthode ne pourra pas identifier le mouvement d'une zone de l'échantillon qui n'est de toute façon pas vue sur l'image tomographique, ce qui semble assez logique.

pas brouiller les franges, et dans la direction latérale pour ne pas générer d'artefacts. Les mouvements « spontanés » de l'échantillon durant l'acquisition (limitant pour l'imagerie *in vivo*) étant d'amplitude relativement faible, et pouvant de plus être limités par stabilisation, un système de FF-OCM adapté à l'imagerie *in vivo* peut ne pas être assez rapide pour l'OCT-A.

Par ailleurs, rappelons que le temps d'acquisition du signal interférométrique dans le système de FF-OCM permettant l'imagerie d'échantillon *in vivo* (tel que celui précédemment développé) est de l'ordre de la milliseconde. On peut montrer que dans les capillaires sanguins, à l'échelle de l'OCT, les temps de décorrélation sont typiquement autour de la centaine de microsecondes. Ainsi, même en considérant l'acquisition du signal interférométrique dans le cas de système de FF-OCM haute vitesse, deux acquisitions successives seront en régime de décorrélation. L'application des méthodes de D-OCT sont ainsi a priori très compliquées à implémenter en FF-OCM, d'autant plus si des mesures de phase sont nécessaires (PR-D-OCT), étant donné que la phase est récupérée à partir de plusieurs images acquises successivement, augmentant encore le temps d'acquisition entre deux mesures successives.

On retiendra ainsi que pour l'immense majorité des systèmes FF-OCM, le signal est aléatoire en phase et en amplitude entre deux mesures pour des zones de l'échantillon en mouvement (si ces zones peuvent être vues, autrement dit si leur mouvement axial est assez faible pour ne pas brouiller les franges), permettant l'implémentation de techniques d'OCT-A qualitative mais pas des mesures quantitatives de D-OCT. Cependant, la très haute résolution des systèmes FF-OCM pourrait permettre des mesures quantitatives grâce à des méthodes de suivi de particules, si la résolution du système est suffisante pour résoudre les particules en mouvement (ce qui n'est généralement pas le cas en OCT conventionnelle).

Dans la suite de ce chapitre, nous nous inspirons des méthodes d'OCT-A conventionnelles présentées précédemment pour proposer différentes méthodes d'angiographie applicables sur le système FF-OCM haute vitesse précédemment développé, se basant sur l'analyse du signal interférométrique, sur des mesures de différences de phase ou sur des mesures d'amplitude, autrement dit sur les images tomographiques. Des méthodes de suivi de particules sont également explorées à partir d'images tomographiques. Avant de présenter ces méthodes, introduisons d'abord le montage expérimental utilisé pour les tester.

4.2.4.1 Montage expérimental

L'objectif du travail présenté ici est de fournir une preuve de concept des méthodes d'OCT-A pouvant être implémentées en FF-OCM. Pour ce faire, nous utiliserons un échantillon très simple : un capillaire en silice fondue de 100 μm de diamètre, rempli d'intralipide à 20% dont le flux est contrôlable à l'aide d'une pompe péristaltique, et inséré dans du silicone blanc, fortement diffusant. Le capillaire rempli d'intralipide modélise un capillaire sanguin, et le silicone diffusant modélise la peau. Ce type d'échantillon est un modèle classique pour l'étude des capillaires sanguins [147, 111]. La figure 4.5 représente une visualisation 3D de l'échantillon considéré. Le capillaire est fixé à un tube en plastique plus épais, compatible avec la pompe péristaltique.

Le montage de FF-OCM utilisé pour tester les méthodes d'OCT-A est celui présenté dans la partie 3.4. En fonction des méthodes considérées, les images seront soit acquises à une position axiale fixée, soit sous forme de piles avec un déplacement linéaire de la platine PZT. La figure 4.6 présente des images tomographiques du modèle de capillaire sanguin en face et en coupe verticale. On peut voir que du fait de la diffusion de l'intralipide et de la

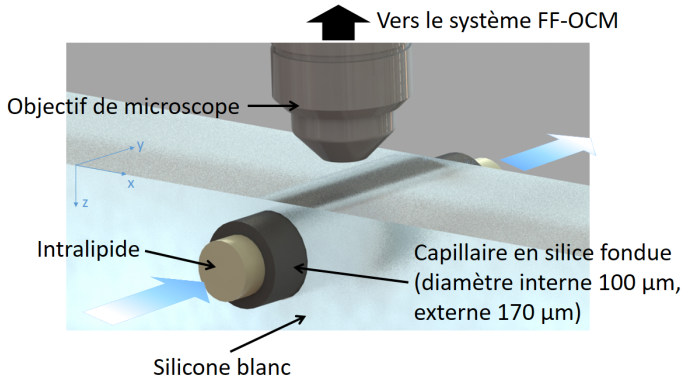

FIGURE 4.5 – Échantillon modélisant un capillaire sanguin dans la peau en représentation 3D.

faible sensibilité de la FF-OCM, l'intralipide n'est visualisable que superficiellement dans le capillaire. Par ailleurs, le capillaire est placé dans le silicone, mais n'est pas recouvert par celui-ci. S'il l'était, le signal issu de l'intralipide serait encore plus difficilement visualisable. Ceci constitue une autre limitation de la FF-OCM pour l'OCT-A : du fait de la faible sensibilité de la FF-OCM, obtenir du signal au niveau du capillaires sanguins (généralement situés à une centaine de microns en profondeur dans la peau pour les plus superficiels) est très compliqué. Ainsi, nous nous contenterons ici de valider les méthodes de FF-OCM-A à partir de notre modèle, sans obtenir d'images sur de la peau *in vivo*.

4.2.4.2 Signal interférométrique

4.2.4.2.1 Dynamic FF-OCM-A

Cette première méthode d'imagerie de flux en FF-OCM se base sur le principe du *dynamic FF-OCT* [113] : dans une zone statique de l'échantillon, le signal interférométrique ne varie pas au cours du temps [4]. Dans une zone où l'échantillon est en mouvement, le signal interférométrique varie aléatoirement (autrement dit, l'état d'interférence mesuré est aléatoire, pour les mêmes raisons que l'amplitude et la phase du signal OCT sont aléatoires).

Ainsi, la méthode la plus simple pour imager le mouvement est de considérer N images interférométriques obtenues à une position axiale dans l'échantillon (sans qu'aucune méthode de démodulation ne soit appliquée), et de calculer la variance pour chaque pixel. Dans les zones statiques, la variance tend vers zéro, tandis qu'elle sera élevée dans les zones en mouvement. On appelera cette méthode d-FF-OCM-A (pour dynamic FF-OCM-A). Le signal de d-FF-OCM-A est ainsi acquis selon l'algorithme suivant :

$$I_{d-FF-OCM-A}(X',Y') = \frac{1}{N}\sum_{m=1}^{N}\left(I_m(X',Y') - \frac{1}{N}\sum_{m=1}^{N} I_m(X',Y')\right)^2 . \tag{4.11}$$

La variance sera d'autant plus élevée que le contraste de franges pour la zone en mouvement est élévé : en effet, l'amplitude de variation du signal interférométrique est directement lié à ce contraste. Dans le cas d'un contraste très faible, les variations du signal

4. Plus exactement, ses variations sont uniquement dues aux bruits de mesure du système.

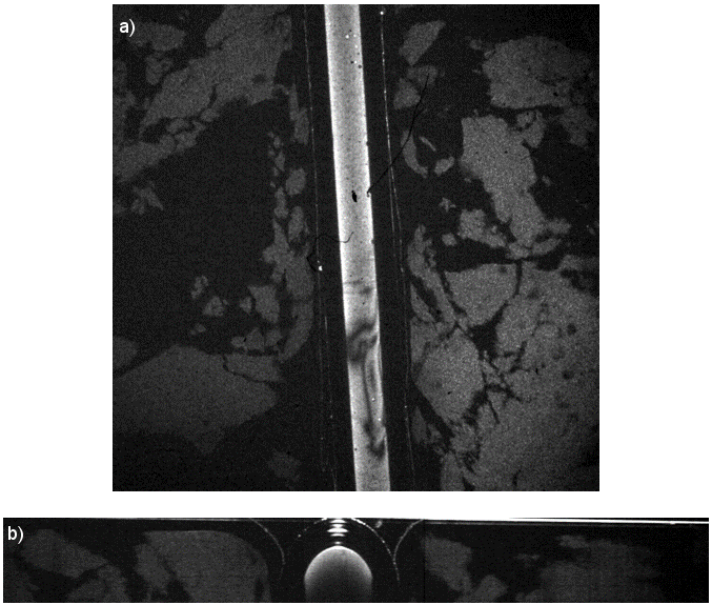

FIGURE 4.6 – Images tomographiques de l'échantillon modélisant le capillaire sanguin, a) en face (au niveau de l'intralipide) et b) en coupe verticale sur une profondeur de 130 μm. Champ de l'image en face : 990 μm $\times$ 990 μm.

sont uniquement dues au bruit de lecture de la caméra et la situation est alors la même que pour une zone statique de l'échantillon. Notons ainsi que la valeur de la variance ne donne pas d'information quantitative sur le mouvement : elle peut être élevée pour une zone dont le mouvement est faible mais pour laquelle le contraste des franges est élevé. De même, la condition nécessaire pour pouvoir visualiser le mouvement est que le contraste des franges dans la zone de l'échantillon en mouvement entraine des variations du signal supérieure aux variations du signal dues aux bruits de mesure (liées à la profondeur des puits d'électron ainsi que le bruit de lecture de la caméra utilisée, voir section 2.3.4.2). Cette condition est identique à la condition permettant de visualiser le signal lorsqu'une méthode de démodulation est appliquée.

La figure 4.7.b représente ainsi l'image de d-FF-OCM-A obtenue pour l'échantillon introduit précédemment, obtenue à partir du calcul de la variance de N=100 images interférométriques. Une image interférométrique est représentée en figure 4.7.a. La zone où l'intralipide est présent est clairement mise en évidence. L'intralipide n'était pas pompé dans le capillaire au moment de l'acquisition des images : le seul mouvement brownien des particules en suspension dans l'intralipide génère un signal d-FF-OCM-A suffisant pour que cette méthode fonctionne. La figure 4.7.b représente une image de d-FF-OCM-A combinée à une image tomographique du même échantillon, mettant en évidence l'absence de signal d-FF-OCM-A dans les zones statiques de l'échantillon (silicone).

Si elle est très simple à implémenter (aucune méthode de démodulation n'étant nécessaire) et fonctionne bien pour imager l'intralipide en mouvement, deux défauts principaux ont pu être identifiés pour cette méthode. D'une part, elle est très sensible aux mouvements de l'échantillon durant l'acquisition : en effet, les zones pour lesquelles le contraste des franges est le plus élevée sont généralement des zones statiques (souvent des interfaces). Du fait de ce contraste élevé, le moindre mouvement de ces zones entrainera une valeur

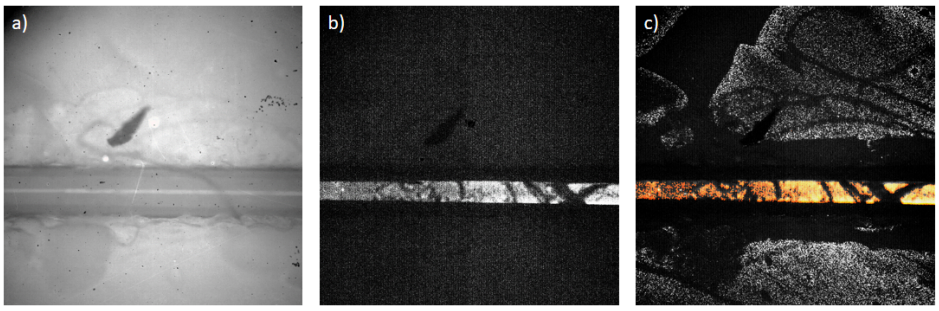

FIGURE 4.7 – a) Image intérferométrique du modèle de capillaire sanguin. b) Image de d-FF-OCM-A. b) Image de d-FF-OCM-A combinée avec une image tomographique obtenue par démodulation sinusoïdale. Champ : 990 μm $\times$ 990 μm.

élevée du signal de d-FF-OCM-A. D'autre part, les images utilisées pour l'acquisition du signal de d-FF-OCM-A ne permettaient pas de reconstruire d'images tomographiques. Afin de combiner les images de flux et les images tomographiques, nous devions donc acquérir successivement deux séries d'images dans des conditions différentes (avec et sans démodulation), ce qui complique la représentation en temps réel d'images combinées.

4.2.4.2.2 Fourier-Domain FF-OCM-A

Cette seconde méthode s'inspire de la méthode de CD-OCT, la première à avoir été implémentée en TD-OCT pour l'imagerie de flux. Elle se fonde sur le fait que le signal interférométrique varie aléatoirement d'une image à l'autre en régime de décorrélation : la fréquences des franges sur une coupe verticale dans une pile d'images interférométriques (acquise avec un déplacement linéaire de la platine PZT) est ainsi aléatoire dans les zones en mouvement, tandis qu'elle est fixe dans les zones statiques. En considérant la transformée de Fourier (2D ou colonnes par colonnes) de la coupe verticale, on observera ainsi la fréquence spatiale due aux zones fixes de l'échantillon (de grande amplitude a priori), mais aussi une distribution de fréquences sur l'ensemble du spectre des fréquences spatiales, correspondant aux fréquences aléatoires des zones en mouvement. A partir de la transformée de Fourier, on peut reconstruire une image tomographique de la manière décrite à la section 3.2.1, mais aussi une image de flux en supprimant la fréquence correspondant aux zones fixes (et les fréquences négatives pour éviter d'obtenir des artefacts) avant d'effectuer la transformée de Fourier inverse. On obtient ainsi, après transformée de Fourier inverse, une image ayant du signal uniquement dans les zones de l'échantillon en mouvement. Cette méthode basée sur la transformée de Fourier sera appelée FD-FF-OCM-A pour *Fourier domain FF-OCM-A*.

Cette méthode s'apparente au CD-OCT du fait qu'une analyse fréquentielle sur le signal interférométrique est utilisée pour identifier le mouvement. Cependant, en FD-FF-OCM-A, il n'est pas nécessaire d'utiliser une fenêtre que l'on balaye sur l'ensemble du signal interférométrique, car on ne peut de toute façon pas obtenir de données quantitatives locales sur le flux.

La figure 4.8 représente les images obtenues pour reconstruire une image de flux en FD-FF-OCM-A : une coupe dans une pile d'images interférométrique, la transformée de Fourier (colonnes par colonnes) de cette coupe ainsi que le tracé de la transformée de Fourier pour trois colonnes correspondant à trois zones différentes de l'échantillon (zone de bruit, zone statique, zone en mouvement), la suppression des fréquences négatives et de

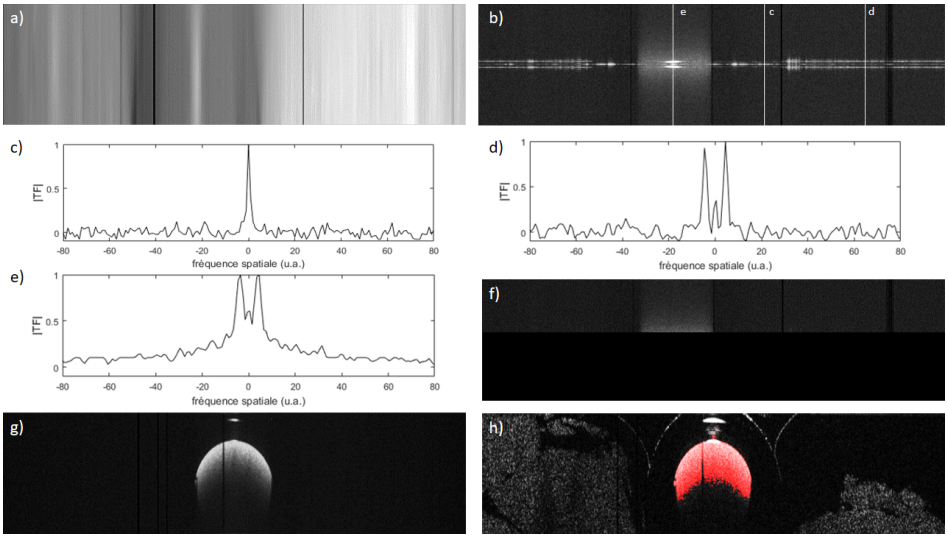

FIGURE 4.8 – a) Coupe verticale, sur une profondeur de 130 μm, dans une pile d'images interférométrique du modèle de capillaire sanguin. b) Transformée de Fourier colonne par colonne de la coupe verticale. c) Transformée de Fourier d'une colonne correspondant à une zone de l'échantillon présentant uniquement du bruit, d) transformée de Fourier d'une colonne correspondant à une zone de l'échantillon statique, e) transformée de Fourier d'une colonne correspondant à une zone de l'échantillon présentant du mouvement. f) Masque appliqué à la transformée de Fourier pour appliquer la méthode de FD-FF-OCM-A. g)Image de FD-FF-OCM-A. h) Image de FD-FF-OCM-A combinée avec une image tomographique obtenue par démodulation par transformée de Fourier. Champ : 600 μm $\times$ 130 μm (X $\times$ Z).

la fréquence correspondant aux zones statiques, et la transformée de Fourier inverse permettant d'obtenir l'image de FD-FF-OCM-A. Une image combinant image tomographique (obtenue par démodulation par transformée de Fourier) et image de FD-FF-OCM-A est finalement présentée. Comme précédemment, les particules d'intralipide sont en mouvement brownien durant l'acquisition de ces images.

En appliquant la méthode de FD-FF-OCM-A à toutes les coupes verticales de la pile d'images interférométriques, il est aussi possible de reconstruire une image de flux en 3D. La figure 4.9 représente une telle image (combiné avec une image tomographique 3D). Celle-ci a été obtenue pour un échantillon légèrement différent de l'échantillon considéré jusqu'à maintenant, constitué non pas d'un seul capillaire mais de trois capillaires en parallèle : le capillaire centrale était rempli d'intralipide à 20% et les capillaires l'entourant étaient rempli d'intralipide à 10%. Ceux ci diffusant moins, leur signal est aussi plus faible, ce qui se traduit par un signal plus faible dans l'image de FD-FF-OCM-A. L'objectif de cet échantillon est de mettre en évidence que tout comme en d-FF-OCM-A, l'amplitude du signal ne donne pas d'information quantitative sur le flux : elle est seulement proportionnelle au ratio d'intensité rétrodiffusée par les zones en mouvement.

Cette méthode a l'avantage d'être basée sur des données permettant aussi de reconstruire une image tomographique. Il est donc aisé d'obtenir une image combinant image de flux et image tomographique. Cependant, comme on l'a vu précédemment, conserver l'intégralité du signal interférométrique peut poser des problèmes de stockage, et implique

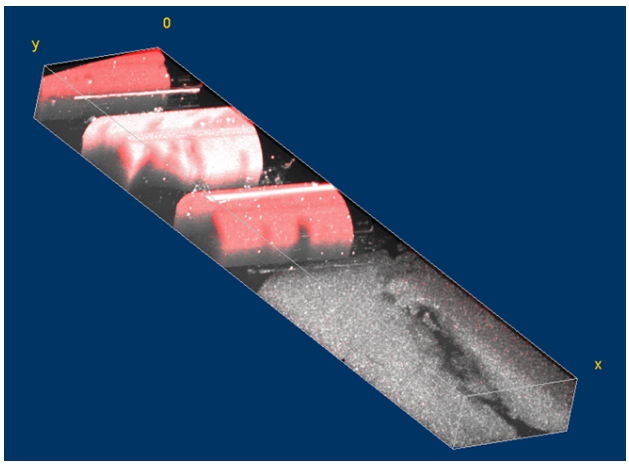

FIGURE 4.9 – Image de flux en 3D obtenue par FD-FF-OCM-A, combinée à une image tomographique 3D, pour un échantillon constitué de trois capillaires dans du silicone. L'intralipide est dilué à 20% dans le capillaire central et 10% dans les capillaires l'entourant. Champ : 800 μm $\times$ 300 μm $\times$ 130 μm (X $\times$ Y $\times$ Z).

aussi d'effectuer tous les traitements a posteriori d'une acquisition d'une piles d'images interférométrique, généralement relativement longue en FF-OCM. Il n'est ainsi pour le moment pas possible de représenter des images de flux en temps réel avec cette méthode.

4.2.4.3 Mesures de phase

La méthode appliquée pour imager le flux en FF-OCM à partir d'images de phase est inspirée des méthodes basées sur des différences de phase présentées précédemment. Cependant, notre système de FF-OCM n'ayant pas été conçu pour obtenir des images de phase à une position axiale fixée, la méthode d'OCT-A basée sur des mesures de phase a été appliquée a posteriori sur une piles d'images interférométriques (identique à celle utilisée en FD-FF-OCM-A), permettant par un algorithme approprié de reconstruire la phase (voir parties 3.2.1 et 2.3.1.2).

A partir d'une image de phase en coupe verticale obtenue en appliquant l'algorithme de Hariharan sur une coupe dans la pile d'images interférométriques, on calcule les différences de phase entre lignes successives : pour les zones fixes, les différences de phase sont constantes (aux effets de bords près) du fait que la phase introduite par le mouvement de la platine PZT est constante au cours de l'acquisition, tandis que dans les zones en mouvements, elles sont aléatoires. En extrayant la valeur de la différence de phase fixe $\Delta\Phi_0$ pour les zones statiques et en la soustrayant à l'image des différences de phase, on obtient alors une image dont le signal est nul dans les zones statiques et aléatoire dans les zones en mouvement. Cette méthode sera appelée PB-FF-OCM-A pour *phase-based FF-OCM-A*. Le signal est ainsi calculé de la manière suivante pour cette méthode :

$$I_{PB-FF-OCM-A}(x,z) = \mid \Delta\Phi(x,z) - \Delta\Phi_0 \mid, \tag{4.12}$$

avec $\Delta\Phi(x,z)$ la différence de phase entre deux lignes successives.

Un défaut majeur de cette méthode est que le signal est aussi aléatoire pour les zones de l'image noyées dans le bruit (signal trop faible pour être perçu). Ainsi, il est nécessaire

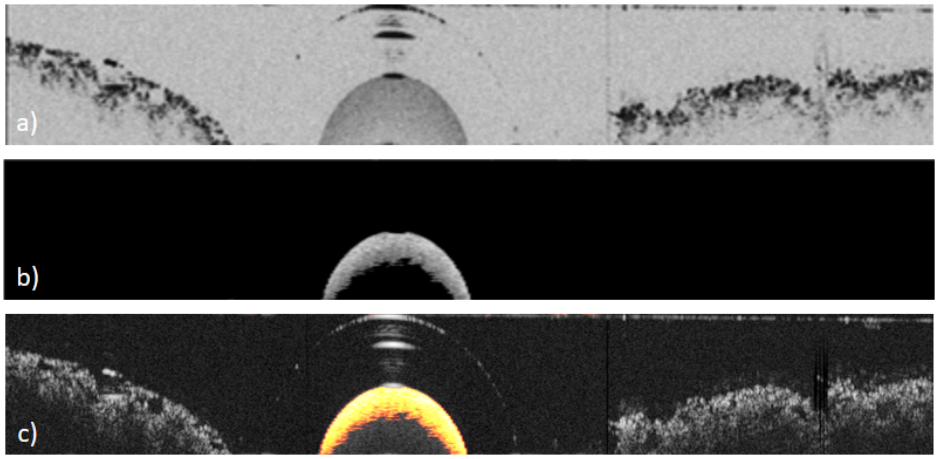

FIGURE 4.10 – a) Image de PB-FF-OCM-A. b) Même image après application d'un masque pour supprimer les zones noyées dans le bruit. c) Image de PB-FF-OCM-A combinée avec une image tomographique obtenue par démodulation linéaire. Champ : 600 μm $\times$ 100 μm (X $\times$ Z).

de sélectionner les zones pertinentes en utilisant un masque obtenu à partir d'une image tomographique conventionnelle $I_{FF-OCM}(x, z)$, supprimant les zones noyées dans le bruit.

La figure 4.10 représente l'image obtenue en appliquant la méthode de PB-FF-OCM-A, ainsi que l'image après application du masque décrit précédemment, et finalement une image combinant image tomographique et image de PB-FF-OCM-A. Comme précédemment, les particules d'intralipide sont en mouvement brownien durant l'acquisition de ces images.

On notera que si le signal de PB-FF-OCM-A est aléatoire dans les zones noyées dans le bruit et les zones en mouvement, l'allure de l'image n'est pas identique dans ces deux zones, laissant supposer que les propriétés statistique des variations de la différence de phase ne sont pas identiques dans les deux cas, et qu'il serait peut être possible d'isoler les zones en mouvement sans utiliser de masque.

Cette méthode pourrait aussi être appliquée sur des images de phase à une position axiale fixée (il n'y aurait alors plus besoin de soustraire $\Delta\Phi_0$ aux différences de phase pour qu'elles soient nulles dans les zones statiques), et pourrait ainsi potentiellement être implémentée en temps réel, d'autant que des images tomographiques peuvent être acquises en parallèle simplement par des algorithmes de recombinaison différents. De plus, dans cette implémentation, la sensibilité de la méthode pourrait être augmentée en se basant non plus sur des simples différences de phase, mais sur la variance des différences de phase, comme en PV-OCT. Cependant, pour l'instant, la nécessité d'utiliser un masque complique fortement l'acquisition, notamment du fait que le seuillage appliqué pour le masque n'est pas déterminé automatiquement.

4.2.4.4 Mesures d'amplitude

4.2.4.4.1 Speckle variance FF-OCM

Cette méthode d'imagerie du flux en FF-OCM constitue une application directe de la méthode de SV-OCT. On s'y référera sous le nom de SV-FF-OCM pour *speckle variance FF-OCM*. A la différence de la SV-OCT, on considère en FF-OCM la variance d'images

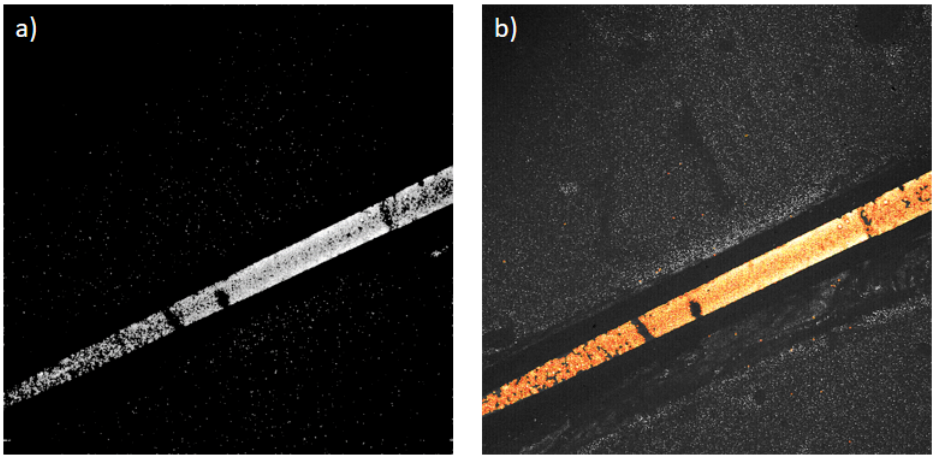

FIGURE 4.11 – a) Image de SV-FF-OCM. b) Image de SV-FF-OCM combinée avec une image tomographique obtenue en moyennant les images utilisées pour calculer l'image de SV-FF-OCM. Champ : 990 μm $\times$ 990 μm.

tomographiques en face obtenues successivement à une position axiale donnée (algorithme de démodulation sinusoïdale). L'image de SV-FF-OCM est alors obtenue selon l'algorithme suivant :

$$SV_{FF-OCM}(X',Y') = \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M}\left(A_{FF-OCM,m}(X',Y') - \frac{1}{M}\sum_{m=1}^{M}A_{FF-OCM,m}(X,Y')\right)^2, \tag{4.13}$$

$A_{FF-OCM,m}(X',Y')$ correspondant à une image tomographique en face, après compression non linéaire [5].

La figure 4.11 représente une image de SV-FF-OCM obtenue par le calcul de la variance de N=100 images tomographiques du modèle de capillaire sanguin. Une image combinant l'image de SV-FF-OCM ainsi qu'une image tomographique (obtenue par le moyennage des 100 images tomographiques utilisée pour l'image de SV-FF-OCM) est également présentée. Comme précédemment, les particules d'intralipide sont en mouvement brownien durant l'acquisition de ces images.

Un avantage notable de cette méthode est ainsi de pouvoir obtenir des images tomographiques et des images de flux à partir des mêmes données, permettant de générer des images de flux à une cadence identique aux images tomographiques (si l'on considère les images tomographiques moyennées sur autant d'images que celles utilisées pour le calcul de la variance). Par ailleurs, le fait de travailler sur des images tomographiques permet potentiellement d'adapter facilement cette méthode à n'importe quel montage FF-OCM.

5. L'application de la compression avant le calcul de la variance est liée au fait que le bruit principal affectant A_{FF-OCM} est le bruit de photon, poissonien. La variance de A_{FF-OCM} est donc proportionnelle à l'amplitude du signal, et ainsi les zones des échantillons ayant un ratio d'intensité rétro-diffusée élevé présenteront aussi une grande variance dans les images tomographiques. Lors du calcul de SV_{FF-OCM}, il est nécessaire que la variance de A_{FF-OCM} soit indépendante de l'amplitude du signal, afin que le calcul de la variance donne bien une valeur très faible dans les zones statiques, quelle que soit l'amplitude de A_{FF-OCM}. La compression non linéaire peut ainsi modifier le signal de telle sorte que la variance soit identique pour le signal noyé dans le bruit et les zones statiques fortement rétro-diffusante.

4.2.4.4.2 SV-FF-OCM : Caractérisation de la gamme de vitesses détectables

La SV-FF-OCM s'est ainsi avérée être la méthode la plus simple à utiliser en pratique sur notre montage FF-OCM, et nous la considérerons donc comme la méthode la plus adaptée à la FF-OCM.

Si l'on a vu qu'il était possible d'imager avec cette méthode un liquide dont les particules sont en mouvement brownien, il est intéressant d'étudier la vitesse maximale d'écoulement pouvant être imagée avec cette méthode. Cette méthode se basant sur des images tomographiques, théoriquement, tant que les zones en mouvement génèrent du signal dans les images tomographiques, la méthode de SV-FF-OCM fonctionne. Or le signal ne peut être perdu que par un mouvement axial trop important générant un brouillage des franges ou un mouvement latéral trop important faussant le signal (voir partie 3.4.1).

À partir de l'équation 3.5 on montre que la vitesse latérale maximale de l'échantillon pour une imagerie pertinente vaut :

$$v_{x,max} = \frac{1}{N_{acc} N T_{acq}} \sqrt{\frac{2\Delta x c_1}{G\sqrt{\xi_{sat}}} \times \frac{R_{max}}{R_{max} - R_{min}}}, \tag{4.14}$$

Un liquide en écoulement présente une réflectivité constante (tant que les propriétés physiques du liquide ne changent pas), et ainsi $R_{max} \sim R_{min}$ [6]. De ce fait, $v_{x,max}$ tend vers l'infini. Notons cependant que le reste de l'échantillon ne présente pas cette propriété, et que pour une imagerie pertinente, il est nécessaire que les zones statiques restent effectivement statiques durant l'acquisition, autrement dit que leurs mouvements latéraux soit assez faible pour ne pas générer d'artefacts.

La perte du signal pourra uniquement être due à la composante axiale de la vitesse d'écoulement du liquide. D'après l'équation 3.4 la vitesse axiale maximale vaut

$$v_{z,max} = \frac{\overline{\lambda}}{4nT_{int}}. \tag{4.15}$$

En considérant un temps d'intégration de 1 ms, et un échantillon d'indice 1.3, la vitesse maximale dans la direction axiale vaut ainsi 115 μm/s. Cependant, en pratique, comme on l'a vu, les capillaires sont généralement contenus dans des plans en face, et présentent donc des angles Doppler proche de 90° (c'est le cas pour notre modèle de capillaire sanguin). Ainsi, en considérant $\theta_{Doppler} = 89.9°$, la vitesse maximale de l'échantillon pour une imagerie SV-FF-OCM pertinente vaut $\sim$ 65 mm/s.

Afin de valider cette étude théorique, la pompe peristaltique a été utilisée pour pomper l'intralipide à différentes vitesses dans les capillaires, de 35 mm/s à 80 mm/s. La figure 4.12 représente les images de SV-FF-OCM (combinées à des images tomographiques) obtenues pour les différentes vitesses de l'intralipide (en incluant aussi une image pour le cas des particules en mouvement brownien). On détermine ainsi que l'imagerie est effectivement pertinente jusqu'à $\sim$ 45 mm/s, valeur à peu près cohérente avec la valeur théorique de 65 mm/s (l'angle Doppler ne valant probablement pas exactement 89.9° : la valeur de 45 mm/s est cohérente avec un angle Doppler de $\sim$89.85°, très proche).

Notons que pour des vitesses supérieures à 45 mm/s, l'intralipide est toujours imagé en périphérie du capillaire. Ceci est dû au fait que la vitesse d'un liquide s'écoulant dans un

6. Les variations de reflectivité sont en fait principalement dues au speckle, dont le contraste est assez faible pour pouvoir considérer $R_{max} \sim R_{min}$.

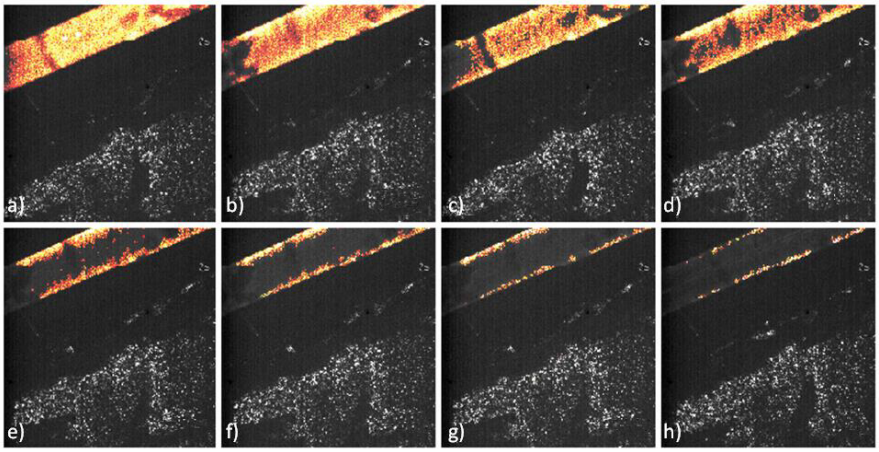

FIGURE 4.12 – Images de SV-FF-OCM du modèle de capillaire sanguin obtenues avec l'intralipide pompé à différentes vitesses : a) mouvement brownien ; b) 35 mm/s ; c) 40 mm/s ; d) 45 mm/s ; e) 50 mm/s ; f) 60 mm/s ; g) 70 mm/s ; h) 80 mm/s. Champ : 240 μm $\times$ 240 μm.

capillaire décroit paraboliquement du centre du capillaire à sa paroi [149]. Ainsi, la vitesse est plus faible au niveau des parois et peut toujours être mise en évidence.

Par ailleurs, il est important de remarquer qu'une vitesse de 50 mm/s est très élevée par rapport à la taille du capillaire. Dans le corps humain, à cette échelle, la vitesse typique du sang est bien plus faible, typiquement autour de quelques centaines de microns par seconde. Ainsi, cette méthode devrait permettre d'imager la microvasculature sans problème du point de vue de la vitesse des écoulements sanguins, tant que les vaisseaux sanguins sont contenus dans des plans à peu près perpendiculaire à la direction d'illumination : en considérant une vitesse maximale de 500 μm/s, l'angle Doppler minimum pour ne pas avoir de brouillage des franges (en considérant une vitesse axiale maximale de 115 μm/s) est d'environ 75°.

4.2.4.4.3 Mesures quantitatives

Imagerie de contraste speckle

Toutes les méthodes de FF-OCM-A présentées jusqu'à maintenant donnent des images permettant de cartographier les écoulements sans en donner d'informations quantitatives sur la vitesse. Afin d'étudier la possibilité d'obtenir des mesures quantitatives en SV-FF-OCM, un échantillon présentant des canaux de différents diamètres (200 μm, 50 μm, 30 μm et 15 μm) inclus dans une zone de taille adaptée au champ d'observation de notre système FF-OCM, a été conçu et réalisé en partenariat avec l'équipe IBIV (imagerie biophotonique *in vivo*) du laboratoire IMNC (imagerie et modélisation en neurobiologie et cancérologie). Ce laboratoire interdisciplinaire, porté par les Universités Paris Diderot et Paris Sud, se spécialise dans l'imagerie multi-modale préclinique et clinique, la modélisation des processus tumoraux et la recherche en radiothérapie. Ce partenariat s'inscrit dans le développement de méthodes d'imagerie multi-modales du petit animal, dans le but d'obtenir des images fonctionnelles de l'activité cérébrale de la souris, en particulier via la mesure de vitesses d'écoulement sanguin.

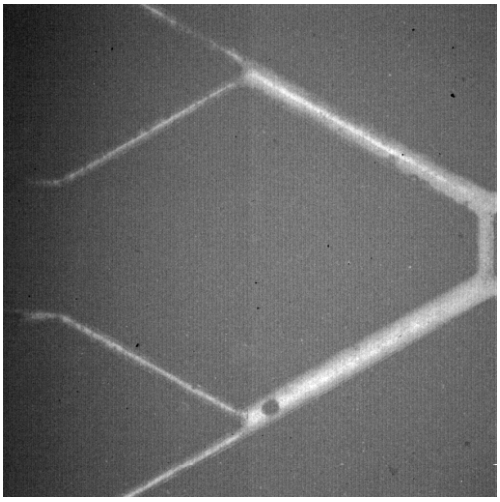

FIGURE 4.13 – Échantillon constitué de différents canaux de diamètres fixés pour l'étude de la possibilité de mesures quantitatives de vitesses d'écoulement en SV-FF-OCM. Champ : 990 μm $\times$ 990 μm.

L'objectif de l'échantillon réalisé, dont une image est présenté en figure 4.13, est de pouvoir avoir un échantillon présentant en parallèle différents écoulements de vitesse connue, afin d'étudier comment l'amplitude du signal SV-FF-OCM peut être reliée à une vitesse d'écoulement. Il a été montré que le contraste du speckle pour une zone en mouvement est lié à la vitesse de ce mouvement [150]. Le contraste du speckle peut se calculer simplement en divisant une image de variance par une image d'amplitude (image tomographique).

Ainsi, le calcul du contraste du speckle à partir des images obtenues en SV-FF-OCM permettrait d'apporter une information quantitative sur les vitesses d'écoulement. Cette méthode d'imagerie quantitative de flux est couramment utilisée sur des systèmes non résolus en profondeur, sous le nom d'imagerie de contraste speckle (ou LASCA pour *laser speckle contrast analysis* ou encore LSCI pour *laser speckle contrast imaging*) [151], et a récemment été implémentée sur un système d'OCT conventionnelle [152].

Nous n'avons malheureusement jusqu'à présent pas pu la tester sur notre système, en raison du fait que le signal était perdu lorsque l'intralipide était pompé dans l'échantillon développé, pour des raisons non identifiées.

Cependant, notons qu'un autre objectif de ces échantillons était de simuler l'imagerie des capillaires du cerveau de souris au travers du crane, les canaux de l'échantillon étant enfouis sous une couche de PDMS (silicone) diffusant d'environ 300 μm modélisant le crane de souris. L'imagerie de capillaires a pu se faire au travers de cette couche (voir figure 4.14), laissant supposer que cette méthode pourrait fonctionner pour l'imagerie angiographique non invasive du cerveau de souris (si le signal provenant du sang en écoulement n'est pas perdu).

Suivi de particules

Afin de fournir des informations quantitatives sur les écoulements, une autre option est de profiter de la haute résolution du système FF-OCM pour « suivre » les particules au cours de leur déplacement à partir de l'acquisition d'une série d'images tomographiques à une position axiale fixée. A partir de cette série d'images, si l'on peut identifier des

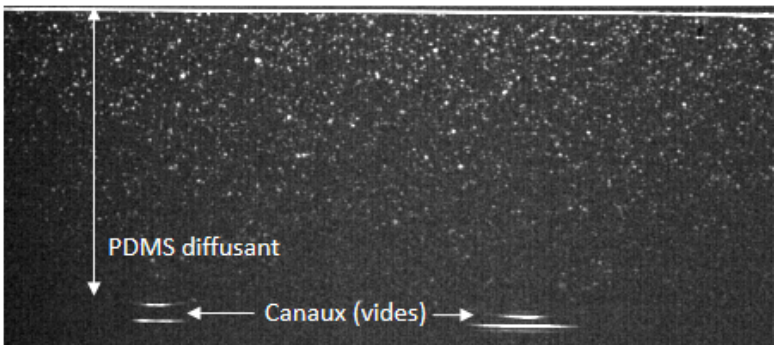

FIGURE 4.14 – Image en coupe verticale de l'échantillon constitué de différents canaux. On y voit une couche de 300 μm de PDMS diffusant, modélisant le crane de souris. Champ : 990 μm $\times$ 350 μm (X $\times$ Z).

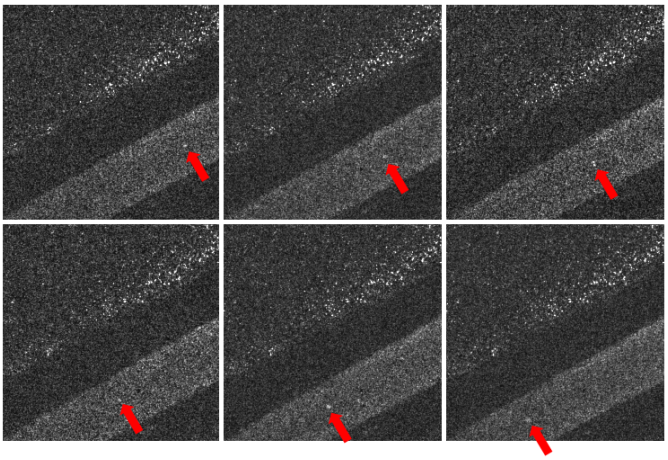

FIGURE 4.15 – Suivi d'un amas de particules d'intralipide en FF-OCM. Champ des images : 240 μm $\times$ 240 μm.

particules individuelles, on peut déterminer la distance qu'elles ont parcourues entre deux images successives, et connaissant l'intervalle Δt_{FF-OCM}, déterminer leur vitesse.

Dans le cas de l'intralipide, les particules en suspension mesurent typiquement 200 nm [153], bien en deçà de la limite de résolution du système FF-OCM. Cependant, en acquérant des séries d'images, il a été possible d'identifier clairement des particules se déplaçant. La figure 4.15 représente plusieurs images sur lesquelles on peut suivre une particule dont la taille peut être estimée à 4 μm. Il pourrait s'agir d'un amas de particules d'intralipide.

La figure 4.16 représente le suivi de cette « particule » au cours du temps, ainsi que sa vitesse mesurée en fonction du temps. Remarquons que pour pouvoir être suivie, le contraste de la particule par rapport au liquide environnant doit être assez élevée, ce qui implique que sa vitesse doit être assez faible pour pouvoir être imagée (voir équation 4.14). Cela explique que la particule qui a pu être imagée présente une vitesse d'écoulement très faible par rapport à la vitesse d'écoulement globale de l'intralipide, qui était pompé à une vitesse d'environ 30 mm/s durant l'acquisition.

Cette méthode ne donne pas ici une information pertinente sur l'écoulement, mais

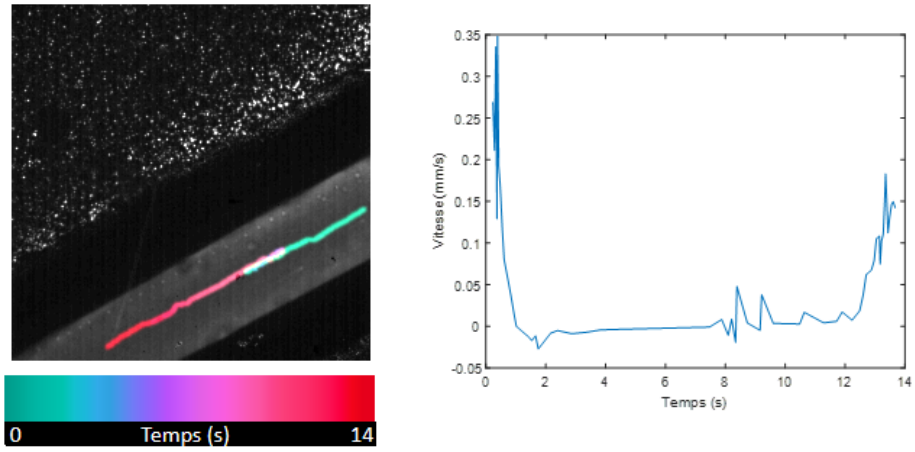

FIGURE 4.16 – a) Représentation du parcours de la particule au cours du temps, la couleur codant le temps. b) Évolution de la vitesse de la particule au cours du temps.

seulement sur le mouvement d'une particule donnée au sein de celui-ci. Cependant, en répétant la mesure pour de nombreuses particules au cours de l'écoulement, on peut espérer, en moyennant les résultats pour toutes les particules, parvenir à obtenir une information quantitative sur l'écoulement dans sa globalité. Dans le cas des écoulements sanguins, on peut espérer obtenir une information d'autant plus pertinente que les cellules sanguins sont a priori assez grandes pour être résolues en FF-OCM [154].

Notons que cette méthode ne peut donner une information que sur la vitesse latérale de l'écoulement, et qu'il est nécessaire que la composante axiale de la vitesse soit assez faible pour que la particule reste assez longtemps dans le volume de cohérence du système pour pouvoir être suivie. Il est intéressant de noter que jusqu'à maintenant, peu de méthodes permettent d'apporter des informations quantitatives sur la composante latérale des vitesses d'écoulement en OCT, bien que cela constitue un besoin important dans le domaine du D-OCT [149, 155].

4.2.5 Conclusion

L'imagerie du flux sanguin a constitué une avancée majeure en OCT, et de nombreuses méthodes ont été développées sur des systèmes conventionnelles afin de pouvoir cartographier, voire de caractériser les écoulements, dans des échantillons *in vivo*. Ces méthodes se basent soit sur le fait que la phase du signal OCT est décalée dans les zones des échantillons en mouvement (effet Doppler), soit sur le fait que le signal OCT varie aléatoirement en amplitude et en phase dans les zones en mouvement, si l'intervalle de temps entre les images est suffisant pour que le signal soit décorrélé d'une image à l'autre. Ces propriétés sont aussi vérifiées par le signal en FF-OCM, cependant jusqu'à maintenant, malgré l'impact des méthodes d'angiographie en OCT conventionnel, très peu de méthodes ont été développées pour l'angiographie en FF-OCM, principalement en raison de sa limitation en termes de vitesse d'acquisition du signal interférométrique.

Nous avons, à partir d'un montage FF-OCM haute vitesse, implémenté différentes méthodes permettant de cartographier les écoulements, en les validant à partir de l'imagerie d'un modèle de capillaire sanguin dans la peau. Des méthodes basées sur une analyse temporelle ou fréquentielle du signal interférométrique ont été développées, ainsi qu'une

méthode basée sur des mesures de différence de phase, cependant la méthode retenue comme la plus simple à implémenter et permettant d'effectuer des mesures en temps réel a été la méthode de *speckle variance*, basée sur une analyse temporelle de l'amplitude du signal OCT (autrement dit, d'images tomographiques conventionnelles). En dehors de la méthode basée sur l'analyse temporelle du signal interférométrique, ces méthodes étaient toutes implémentées pour la première fois à notre connaissance en FF-OCM.

Nous avons montré que notre système de SV-FF-OCM permettait de mesurer des vitesses d'écoulement jusqu'à 45 mm/s pour notre modèle de capillaire sanguin, et qu'il était théoriquement de mesurer des vitesses supérieures à 500 μm/s tant que l'angle Doppler des capillaires imagés restait supérieur à 75°.

En tirant parti de la haute résolution latérale de la FF-OCM, nous avons aussi pu proposer une méthode de suivi de particules sur des images tomographiques conventionnelles pour proposer une méthode apportant une information quantitative sur les vitesses d'écoulement dans la direction latérale, ce qui n'avait jamais pu être fait en OCT conventionnelle du fait d'une résolution latérale trop faible.

Ce travail, se basant uniquement sur des mesures effectuées dans un modèle (simple) de capillaire sanguin, a démontré la faisabilité de techniques d'angiographie en FF-OCM, et pourrait ouvrir la voie à des méthodes de micro-angiographie *in vivo* en temps réel basées sur la FF-OCM. Cependant, l'application de ces méthodes sur des échantillons *in vivo* est encore complexe, notamment en raison de la faible sensibilité de la FF-OCM (en partie liée au fait qu'une acquisition rapide est nécessaire pour la FF-OCM-A, limitant le nombre d'images pouvant être accumulées) et du fait que les capillaires sanguins sont généralement en profondeur dans les tissus. L'amélioration de la sensibilité des systèmes FF-OCM est ainsi le point fondamental qui permettrait de rendre possible l'application des méthodes d'angiographie développées sur des échantillons *in vivo*.

4.3 Imagerie polarimétrique à contraste optimisé

4.3.1 Introduction

L'OCT polarimétrique (PS-OCT) constitue la première extension fonctionnelle de l'OCT a avoir été implémentée, à peine un an après l'introdution de l'OCT [156]. L'utilisation de l'interférométrie pour la mesure des propriétés polarimétriques de matériaux (autrement dit, leur action sur la polarisation de la lumière lorsqu'ils rétrodiffusent (ou réflechissent) celle-ci) était en effet déjà largement répandue [157], certaines méthodes ayant été développées en lumière blanche [158]. Ces méthodes ont pu être directement adaptées à l'OCT, fournissant ainsi des images dont le contraste était basé sur les propriétés polarimétriques des échantillons observées, résolues en profondeur [159, 160].

La propriété polarimétrique généralement imagée en OCT est la *biréfringence*, du fait que les tissus fibreux sont biréfringents. Notons que la dépolarisation peut également être mesurée en PS-OCT et apporter des informations pertinentes, notamment en ophtalmologie [161].

Les mesures de biréfringence en PS-OCT ont été montrées comme particulièrement utile en ophtalmologie pour le diagnostic du glaucome [162] et la caractérisation de la cornée [163], ainsi qu'en dentisterie pour le suivi des caries [164]. Dans le domaine de la dermatologie, des modifications de la biréfringence de la peau sont observées lorsque la structure et la distribution du collagène dans la peau sont modifiées. Des mesures de biréfringence

permettent ainsi d'évaluer la profondeur de brûlures [165] ou le photovieillissement de la peau [166], mais aussi d'aider au diagnostic du cancer de la peau, du fait de son action sur le collagène [167]. Des méthodes basées sur la PS-OCT ont par exemple été développées pour la détection du carcinome basal, et présentent une sensibilité et specificité supérieures aux méthodes de détection se basant uniquement sur des données structurelles [168, 169].

Plusieurs systèmes de PS-FF-OCM ont été développés jusqu'à maintenant, permettant d'obtenir des mesures de biréfringence sur des images en face à haute résolution. Le premier système de PS-FF-OCM nécessitait une rotation manuelle d'un polariseur [170]. Des systèmes utilisant deux caméras ont par la suite été implémentés, permettant d'imager la biréfringence en temps réel [171, 172]. D'autre part, un système utilisant une unique caméra et un modulateur de polarisation a été développé. L'utilisation d'une unique caméra multiplie cependant le temps d'acquisition par deux en comparaison des montages à deux caméras [173]. On notera aussi le développement d'un système multi-modal permettant de combiner imagerie polarimétrique et spectroscopique [174].

Tous ces systèmes se fondent sur la même configuration en termes d'élements polarisants dans le système (identique à celle utilisée en PS-OCT depuis 1992), les différences résidant dans la façon d'acquérir le signal. Il a cependant été montré que d'autres configurations pouvaient correctement mesurer la biréfringence en PS-OCT [175]. Des algorithmes ont par ailleurs été développées pour optimiser la configuration des éléments polarisant d'un système d'imagerie « conventionnel » en lumière polarisée, de manière à optimiser le contraste des images polarimétriques, en considérant une « cible » et un « fond » [176], ou même un nombre donné de zones distinctes [177]. Ces méthodes n'ont jusqu'à maintenant jamais été implémentées sur des systèmes d'imagerie polarimétrique résolue en profondeur telles que l'OCT.

Nous nous proposons ainsi de développer un système de PS-FF-OCM dont la configuration est optimisée de manière à maximiser le contraste entre une cible et un fond dans les images polarimétriques d'un échantillon où deux zones distinctes ont été identifiées. Nous nous proposons par ailleurs d'implémenter cette méthode d'optimisation sur un montage original de PS-FF-OCM, utilisant une seule caméra, mais sans perte de vitesse par rapport aux montages à deux caméras.

Nous présenterons tout d'abord dans cette partie les principes de l'imagerie polarimétrique en FF-OCM (théorie et montages), avant d'introduire la méthode d'optimisation du contraste pour un échantillon présentant une cible et un fond, en particulier dans le contexte de la FF-OCM. Le montage expérimental de PS-FF-OCM à une caméra sera ensuite présenté, ainsi que les résultats obtenus à partir de la méthode d'optimisation du contraste.

Ces travaux ont été effectués dans le cadre d'un séjour en tant qu'étudiant chercheur invité à l'université Stanford (Californie, États-Unis), au sein du *Stanford Biomedical Optics Group* (SBO), un laboratoire ayant une grande expertise dans le domaine de l'OCT et ayant développé au cours des dernières années plusieurs outils novateurs pour répondre à des besoins cliniques.

4.3.2 FF-OCM en lumière polarisée

4.3.2.1 Théorie et formalisme de Jones

La polarisation d'une onde lumineuse correspond à l'orientation de son champ électrique associé, autrement dit à l'orientation de $\vec{E_0}$ (voir équation 1.1). Rappelons que le champ

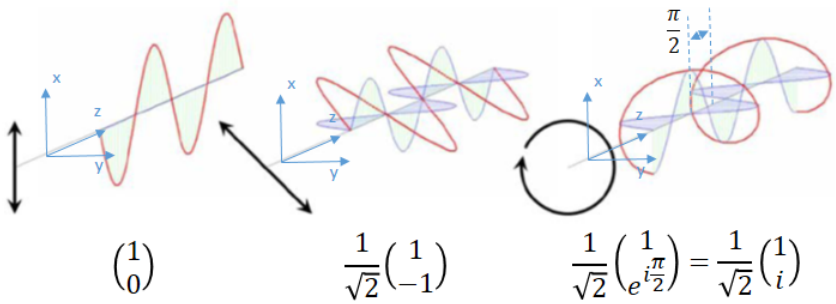

FIGURE 4.17 – Représentation de l'évolution de $\vec{E}$ dans l'espace (rouge), et des deux champs linéaires orthogonaux selon lesquels on peut le décomposer, pour trois situations différentes. Les vecteurs de Jones associés à la polarisation de $\vec{E}$ sont donnés pour chaque situation. Modifié depuis [178].

électrique est toujours orthogonal à la direction de propagation de l'onde lumineuse, ainsi $\vec{E_0}$ peut être représenté un vecteur en deux dimensions dans un plan orthogonal à la direction de propagation de la lumière. En considérant une propagation de la lumière selon z, on peut ainsi écrire :

$$\vec{E}(z,t) = \begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} e^{(i\vec{k}\,z - i\omega t)}, \tag{4.16}$$

avec $E_x = A_x e^{i\varphi_x}$ et $E_y = A_y e^{i\varphi_y}$. On a ainsi $E_0 = \sqrt{A_x^2 + A_y^2}$.

Ainsi, on peut décomposer le champ $\vec{E}(z,t)$ en deux champs (scalaires) orthogonaux, dans les directions x et y. Dans le cas où ces deux champs n'ont pas de variations aléatoires (relation de phase $\varphi = \varphi_x - \varphi_y$ fixée, A_x et A_y fixés), la lumière est dite *purement polarisée*.

En choisissant bien l'origine des phases, il est possible de noter :

$$\begin{pmatrix} E_x \\ E_y \end{pmatrix} = E_0 \begin{pmatrix} \frac{A_x}{E_0} \\ \frac{A_y}{E_0} e^{i\varphi} \end{pmatrix}. \tag{4.17}$$

Le vecteur $\begin{pmatrix} \frac{A_x}{E_0} \\ \frac{A_y}{E_0} e^{i\varphi} \end{pmatrix}$ (normalisé) est alors suffisant pour totalement décrire l'état de polarisation de l'onde lumineuse. Ce vecteur est appelé *vecteur de Jones*. On utilisera uniquement ces vecteurs pour étudier la polarisation dans des situations où la lumière est purement polarisée. Notons que dans le cas d'une imagerie en lumière cohérente (comme l'OCT), la lumière peut toujours être considérée purement polarisée.

La figure 4.17 représente le motif tracé par $\vec{E}$ au cours du temps pour différents déphasages et amplitudes des deux champs orthogonaux selon x et y, et donne les vecteurs de Jones associés à ces différentes polarisations.

Lorsque la lumière purement polarisée interagit avec un matériau (transmission, réflexion, rétrodiffusion ...), le vecteur de Jones peut être modifié en sortie du matériau. Mathématiquement, l'effet du matériau sur la polarisation peut être défini par une matrice 2×2 agissant sur le vecteur de Jones incident. Cette matrice caractérisant l'effet du matériau est appelée *matrice de Jones*.

En considérant que la lumière en sortie du matériau reste purement polarisée (c'est à dire en négligeant la dépolarisation pouvant être due au matériau), le matériau peut uniquement avoir deux effets sur la polarisation incidente : déphaser les deux champs selon lesquels $\vec{E}$ peut être décomposé, ou atténuer leurs amplitudes. Un matériau déphasant les deux champs est dit *biréfringent*[7], la *biréfringence* correspondant au déphasage η introduit par le matériau entre les deux champs. La propriété associée à une atténuation différente de l'amplitude pour les deux champs est appelée diatténuation. Cette propriété nous intéressera peu dans le contexte de l'imagerie d'échantillons biologiques, ceux-ci ne présentant généralement pas de diatténuation [110].

Les matériaux biréfringents déphasent les deux champs linéaires orthogonaux du fait que dans ces matériaux, l'indice vu par la lumière dépend de la polarisation de celle-ci, ainsi que de l'orientation du matériau par rapport à la direction de propagation de la lumière. Si l'indice vu par la lumière est le même pour des polarisations selon deux directions (orthogonales) de l'espace, et différent pour une polarisation dans la direction orthogonale au plan formé par les deux directions précédentes, le matériau est dit *uniaxe*, et l'axe pour lequel la lumière polarisée dans cette direction voit un indice différent est appelé *axe optique* du matériau. Dans le cas où les indices vus sont différents pour les polarisations dans les trois directions de l'espace, le matériau est dit *biaxe*. Les échantillons biologiques peuvent généralement être modélisés par des matériaux uniaxes [175].

Un échantillon biologique sera ainsi caractérisé par sa biréfringence η, mais aussi par la direction de son axe optique Θ, angle entre la direction x (dans la base (x,y) dans laquelle on écrivait le vecteur de Jones incident sur la matériau) et l'axe optique du matériau. Dans la base (x,y), la matrice de Jones générale d'un matériau uniaxe biréfringent linéairement (modélisant un échantillon biologique) peut ainsi s'écrire [175] :

$$\mathbf{J}_{ech}(\eta,\Theta) = \begin{pmatrix} \cos\Theta & -\sin\Theta \\ \sin\Theta & \cos\Theta \end{pmatrix} \begin{pmatrix} e^{\mathrm{i}\frac{\eta}{2}} & 0 \\ 0 & e^{-\mathrm{i}\frac{\eta}{2}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \cos\Theta & \sin\Theta \\ -\sin\Theta & \cos\Theta \end{pmatrix}. \tag{4.18}$$

Dans le contexte de l'imagerie d'échantillons biologique, comme évoqué précédemment, on imagera généralement la biréfringence plutôt que l'axe optique.

4.3.2.2 FF-OCM polarimétrique (PS-FF-OCM)

Afin d'obtenir une image de biréfringence en FF-OCM, il est nécessaire d'introduire des éléments polarisants dans le montage de FF-OCM conventionnel. Le montage de FF-OCM modifié pour pouvoir imager la biréfringence (ou l'axe optique) est présenté en figure 4.18. La lumière incidente est polarisée linéairement à 0° (∥), tandis que deux lames quart d'onde sont placées dans les deux bras de l'interféromètre. Les lames quart d'onde sont

7. On notera bien que $\vec{E}$ peut être décomposé dans n'importe quelle « base d'états de polarisation », le déphasage dû à certains matériaux peut ainsi être fait entre deux champs n'étant pas polarisés linéairement. Par exemple, $\vec{E}$ peut être décomposé dans la base des polarisations circulaires (droite et gauche). Certains matériaux déphasent ainsi les deux champs *polarisés circulairement* sur lesquels $\vec{E}$ peut être décomposé. On parle de biréfringence circulaire. D'un point de vue mathématique, les vecteurs propres de leur matrice de Jones associée sont les vecteurs de Jones correspondant aux polarisations circulaires droite et gauche, $\begin{pmatrix} 1 \\ \mathrm{i} \end{pmatrix}$ et $\begin{pmatrix} 1 \\ -\mathrm{i} \end{pmatrix}$, tandis que pour un matériau déphasant les champs selon x et y (biréfringence linéaire), les vecteurs propres sont simplement $\begin{pmatrix} 1 \\ 0 \end{pmatrix}$ et $\begin{pmatrix} 0 \\ 1 \end{pmatrix}$. On considérera ici uniquement des échantillons linéairement biréfringents.

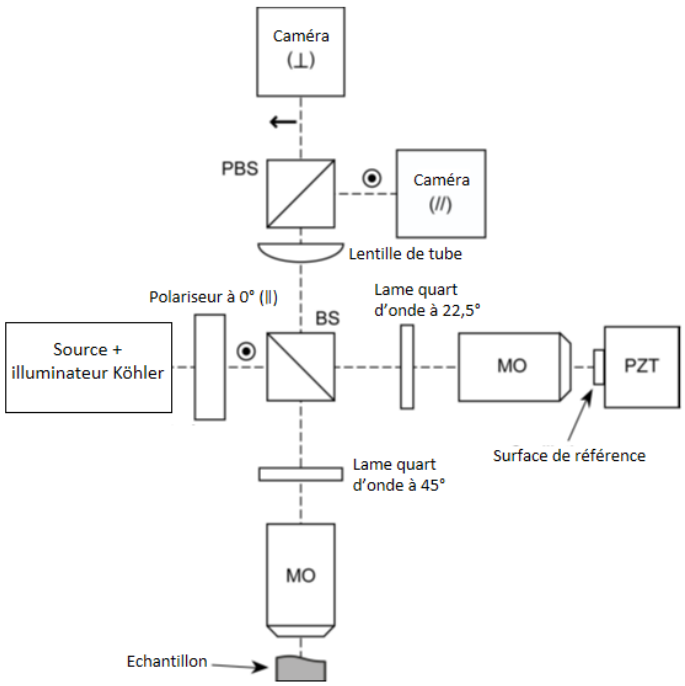

FIGURE 4.18 – Montage de PS-FF-OCM conventionnel [110]. BS : cube séparateur, PBS : cube séparateur de polarisation, MO : objectif de microscope.

des éléments biréfrigents linéaires, de biréfringence $\frac{\pi}{2}$. En plaçant leurs axes optiques à 22.5° dans le bras de référence et à 45° dans le bras de référence, on montre facilement que la lumière incidente sur l'échantillon et la lumière revenant du bras de référence sont polarisées circulairement. Les composantes de la polarisation selon 0° ($\parallel$) et 90° ($\perp$) sont finalement mesurées en sortie de l'interféromètre (nous présentons ici un montage effectuant cette mesure à partir de deux caméras. Comme expliqué précédemment, d'autres schémas d'acquisition sont possibles).

Comme en FF-OCM conventionnelle, un décalage de phase est appliqué de manière à obtenir plusieurs images interférométriques déphasées dans les deux directions d'analyse de l'état de polarisation en sortie de l'interféromètre. A partir de ces images interférométriques ($I^{\parallel}_{1\ldots N}$ et $I^{\perp}_{1\ldots N}$), on peut alors reconstruire la biréfringence ou l'axe optique, selon les algorithmes suivants, en considérant ainsi un décalage de phase pas à pas tel que décrit à la section 2.3.1.2 :

$$\eta = \arctan\left(\sqrt{\frac{(I_1^{\parallel} - I_3^{\parallel})^2 + (I_2^{\parallel} - I_4^{\parallel})^2}{(I_1^{\perp} - I_3^{\perp})^2 + (I_2^{\perp} - I_4^{\perp})^2}}\right), \tag{4.19}$$

$$\Theta = \frac{1}{2}\left(\arctan\left[\frac{(I_2^{\parallel} - I_4^{\parallel})^2}{(I_1^{\parallel} - I_3^{\parallel})^2}\right] - \arctan\left[\frac{(I_2^{\perp} - I_4^{\perp})^2}{(I_1^{\perp} - I_3^{\perp})^2}\right]\right). \tag{4.20}$$

Notons bien que la biréfringence mesurée à une profondeur donnée ne correspond en fait pas à la biréfringence de l'échantillon à cette profondeur, mais à la biréfringence accumulée au cours de la traversée de l'échantillon pour atteindre cette profondeur (aller et retour).

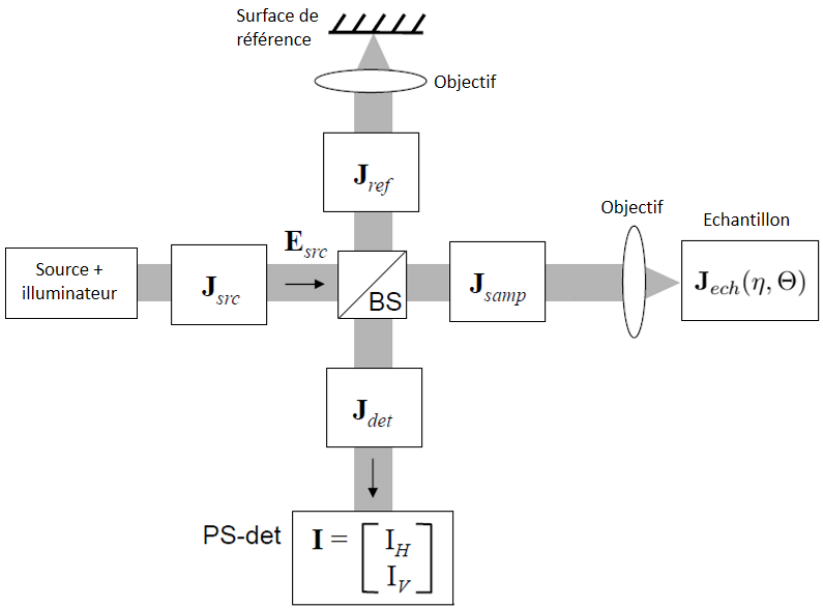

FIGURE 4.19 – Montage de PS-OCT dans le cas le plus général [175], en fonction des matrices de Jones associées aux éléments polarisants dans les bras de l'interféromètre. BS : cube séparateur.

La disposition des éléments polarisants dans le montage de FF-OCM pour la mesure de la biréfringence est identique à celle utilisée dans la quasi-totalité des montages de PS-OCT. Cependant, il a été montré que d'autres montages peuvent aussi mesurer la biréfringence, avec d'autres éléments polarisants, placés différemment dans le montage [175].

On peut ainsi décrire un montage « généralisé » de PS-OCT (valable aussi en PS-FF-OCM), en considérant des éléments polarisants quelconques (caractérisés par des matrices de Jones) dans les différents bras de l'interféromètre. Ce montage généralisé est présenté en figure 4.19.

Une étude théorique montre que l'intensité mesurée en sortie de l'interféromètre selon les deux composantes ($\parallel$ et $\perp$) de la polarisation vaut, en fonction des matrices de Jones des composants dans les différents bras (voir figure 4.19), de la polarisation initiale de la lumière $\vec{E}_{src}$ et du signal OCT à la position sondée [175] :

$$\begin{pmatrix} I_{\parallel} \\ I_{\perp} \end{pmatrix} = K + 2\Re[\mathbf{J}_{ref}\mathbf{J}_{det}\mathbf{J}_{samp}^{T}\mathbf{J}_{ech}\mathbf{J}_{samp}\vec{E}_{src}S_{OCT}], \tag{4.21}$$

avec K une constante.

Ce résultat sera fondamental pour toutes les études théoriques sur des montages différents du montage de PS-OCT conventionnel.

4.3.3 Optimisation du contraste pour un scénario « cible/fond »

4.3.3.1 Principe

L'objectif des méthodes de PS-OCT est d'apporter une source de contraste permettant de mettre en évidence dans les images certains tissus plus clairement que dans les images

tomographiques conventionnelles. L'obtention de la valeur quantitative de la biréfringence du tissu n'est donc généralement pas fondamentale. Le paramètre le plus important des images obtenues en PS-OCT serait ainsi plutôt le contraste entre le tissu biréfringent (la « cible ») et les tissus non biréfringents l'environnant (le « fond »). Notre objectif est ainsi de développer une méthode de maximisation du contraste entre une cible et un fond dans un montage de PS-FF-OCM.

Les systèmes d'imagerie polarimétriques possèdent de nombreux degrés de liberté pouvant avoir une influence sur le contraste entre la cible et le fond du fait des degrés de liberté des élements polarisants introduits dans le système (quatre degrés de liberté pour une matrice de Jones quelconques). Une méthode d'optimisation à ainsi été développée en définissant une fonction de mérite donnant le contraste entre la cible et le fond en fonction des différents degrés de liberté des éléments polarisants du système, puis en recherchant le maximum de cette fonction [176].

Cette méthode a été proposée par l'équipe SPIM (Systèmes d'imagerie et Physique des Images) du Laboratoire Charles Fabry, spécialisée dans le développement de systèmes d'imagerie innovants, en particulier dans les domaines de l'optique adaptative, de la co-conception de systèmes hybrides et de l'imagerie polarimétrique.

Jusqu'à maintenant, cette méthode a été développée sur des systèmes d'imagerie en lumière incohérente (la lumière pouvait ainsi être partiellement polarisée), à des échelles macroscopiques, consistant à éclairer une scène avec un certain état de polarisation, et à analyser la lumière rétrodiffusée par la scène selon un autre état de polarisation. Dans ce contexte, le contraste $\mathcal{C}$ dépend uniquement des états de polarisation incidents ($\vec{S}$) et d'analyse ($\vec{T}$).

Cette méthode nécessite avant tout de déterminer le « type » d'image pour lesquelles le contraste sera optimisé. Il peut s'agir de simples images d'intensité [176] mais aussi d'images obtenues après certains traitements. Afin que l'optimisation du contraste soit indépendante des conditions d'éclairage, il a par exemple été proposé de travailler sur des images OSC (*Orthogonal state contrast*) [179].

Après avoir déterminé le type d'image dans lesquelles le contraste sera considéré, il convient de définir le contraste. On peut définir le contraste simplement comme la différence de niveau dans l'image entre la cible et le fond [176], cependant il a été montré que pour optimiser le contraste au mieux visuellement, il était nécessaire de prendre en compte la variance au niveau de la cible et du fond dans les images. Pour ce faire, une bonne définition du contraste serait le ratio de Fisher entre la cible et le fond [180] :

$$\mathcal{C}(\vec{S},\vec{T}) = \frac{[< i >_c - < i >_f]^2}{\mathrm{var}[i]_c + \mathrm{var}[i]_f}, \tag{4.22}$$

avec $< i >_c$ la moyenne de l'image i considérée pour le calcul du contraste dans la zone de la cible et $< i >_f$ dans la zone du fond, et $\mathrm{var}[i]_c$ et $\mathrm{var}[i]_f$ les variances de i dans les zones de la cible et du fond.

Une autre définition pertinente du contraste est la distance de Bhattacharyya [179] dont le ratio de Fisher est une approximation.

Une fois le type d'image et le contraste définis, le maximum du contraste en fonction des caractéristiques polarimétriques du système peut être déterminé, analytiquement [176] ou numériquement, en calculant le contraste pour toutes les valeurs possibles des degrés de libertés des éléments polarisants du système [180] ou en utilisant un algorithme d'optimisation insensibles aux maxima locaux [179].

Notons que pour déterminer l'expression du contraste de telle manière qu'elle soit uniquement dépendante des paramètres (réglables) des éléments polarisants du système, il est nécessaire de connaitre a priori les propriétés polarimétriques de la cible et du fond. Cette méthode est donc adaptée pour l'optimisation du contraste dans un contexte donné où l'on sait d'avance quelle est la cible et quel est le fond, dont on a calculé les matrices de Jones associées par une méthode appropriée.

Notons aussi qu'une version plus générale de cette méthode a été développée pour ne plus considérer une unique cible et un fond, mais pour pouvoir discriminer au mieux plusieurs éléments dans une image [177].

4.3.3.2 Application au PS-FF-OCM

La méthode d'optimisation du contraste polarimétrique décrite précédemment, développée principalement pour des applications militaires (décamouflage), n'a jamais été implémentée à l'échelle microscopique sur des images résolues en profondeur.

Le fait de travailler sur un système capable d'imager en profondeur tel que l'OCT peut poser un problème du fait que, comme on l'a vu, les propriétés polarimétriques mesurées correspondent aux propriétés « accumulées » de l'ensemble de l'échantillon traversée pour atteindre la profondeur imagée (aller/retour). Ainsi, si l'on travaille sur des images conventionnelles d'OCT en coupe verticale (B-scan), il sera a priori compliqué de déterminer une valeur pertinente pour comparer une cible et un fond, étant donné que si la cible et le fond sont épais, les grandeurs polarimétriques qui seront mesurées varieront beaucoup au sein même de la cible ou du fond.

Ce problème peut être en partie résolu en travaillant sur des images en face, obtenue à une profondeur donnée, pour laquelle les grandeurs polarimétriques mesurées pour la cible et le fond devraient être globalement constantes. Cependant, la détermination d'une configuration optimale pour maximiser le contraste entre la cible et le fond à une profondeur donnée pourra ne pas être la configuration optimale à une autre profondeur, ce qui constitue toujours une limitation forte pour des applications réalistes. Cependant, il semble que la FF-OCM soit l'implémentation la plus appropriée dans le but de tester cette méthode d'optimisation du contraste polarimétrique en OCT.

Comme expliqué précédemment, il convient de définir le type d'image et le contraste à prendre en compte pour l'optimisation. Nous proposons ici de prendre en compte le résultat de l'algorithme donné à l'équation 4.19 comme type d'image. Cet algorithme a en effet l'avantage de fournir la biréfringence quantitative dans le cas du montage de PS-FF-OCM conventionnelle, et surtout de toujours fournir une grandeur indépendante des variations du signal OCT. Notons $H(x, y)$ une image en face obtenue selon cet algorithme [8]. Le contraste que nous prendrons en compte sera le ratio de Fisher tel que défini à l'équation 4.22, soit dans notre cas :

$$\mathcal{C} = \frac{[< H >_c - < H >_f]^2}{\mathrm{var}[H]_c + \mathrm{var}[H]_f}. \tag{4.23}$$

D'après les équations 4.21 et 4.19, il est possible d'exprimer le contraste en fonction des coefficients des matrices de Jones des différents éléments polarisants du système.

8. On a ainsi $H = \arctan\left(\sqrt{\frac{(I_1^{\parallel}-I_3^{\parallel})^2+(I_2^{\parallel}-I_4^{\parallel})^2}{(I_1^{\perp}-I_3^{\perp})^2+(I_2^{\perp}-I_4^{\perp})^2}}\right)$.

Ainsi, il y aura au maximum 14 degrés de liberté sur lesquelles l'optimisation pourra être faite (coefficients de $\mathbf{J}_r$, de $\mathbf{J}_{det}$, de $\mathbf{J}_{samp}$ et de $\vec{E}_{src}$).

Une fois la fonction de mérite définie en fonction des degrés de liberté du système, nous nous proposons d'utiliser l'algorithme SCE-UA (*shuffled complex evolution* [181]) (déjà précédemment utilisé pour cette méthode [179]) pour déterminer les coefficients des matrices de Jones permettant d'obtenir le contraste maximal. Cet algorithme a été implémenté en Matlab à partir d'une routine disponible en ligne [9], nécessitant uniquement de fournir la fonction de mérite à optimiser ainsi que le nombre de degrés de liberté et leurs bornes, et le nombre d'itérations voulu pour l'application de l'algorithme. Il nous a ainsi fallu seulement définir en Matlab la fonction de mérite en fonction des degrés de liberté du système pour l'optimiser grâce à la routine de SCE-UA [10].

La figure 4.20 représente ainsi un exemple de résultat d'optimisation en simulation, pour un échantillon présentant de la biréfringence circulaire. On définit une image constitué de deux zones, l'une étant caractérisée par une matrice de Jones d'un matériau biréfringent circulairement, et l'autre ne présentant pas de biréfringence (la matrice de Jones associée est ainsi une matrice identité). Un bruit est par ailleurs associé aux deux zones. La figure 4.20.b. représente l'image de biréfringence obtenue pour un montage conventionnel. La zone présentant de la biréfringence circulaire y est indiscernable, le montage conventionnel étant uniquement conçu pour mesurer la biréfringence linéaire. La figure 4.20.c. représente l'image obtenue pour un système dont les coefficients des matrices de Jones des éléments polarisants ont été déterminés par la méthode d'optimisation du contraste polarimétrique [11]. Dans cette image, la zone présentant de la biréfringence circulaire est clairement identifiée [12].

4.3.4 PS-FF-OCM à contraste polarimétrique optimisé : Travail expérimental

4.3.4.1 Montage expérimental

4.3.4.1.1 Montage de FF-OCM à Stanford

La construction d'un montage de PS-FF-OCM nécessite de l'espace dans les bras de l'interféromètre afin d'y placer les éléments polarisants (voir figure 4.18). De plus, pour tester la méthode d'optimisation du contraste, il est nécessaire d'avoir un montage flexible, dans lequel on peut facilement modifier l'orientation des élements polarisants ou les remplacer par d'autres. Le montage de FF-OCM compact décrit au chapitre 3 n'est ainsi pas modifiable facilement pour obtenir un montage de PS-FF-OCM.

Un nouveau montage de FF-OCM a ainsi été construit dans l'optique d'avoir un montage PS-FF-OCM adapté au test de la méthode d'optimisation du contraste. Dans ce

9. http://yarpiz.com/80/ypea110-shuffled-complex-evolution

10. Notons que pour un résultat optimal, nous avons déterminé que 500 itérations étaient nécessaires, ce qui peut entraîner de très longs calculs, notamment si la fonction de mérite met du temps à être calculée en raison d'un codage Matlab non optimal. La première version de l'optimisation mettait ainsi environ 70h à compiler, contre une vingtaine de minutes après optimisation du codage Matlab.

11. On considérait dans cette simulation que les élements polarisants du système pouvaient uniquement être des éléments linéairement biréfringents, ayant donc deux degrés de liberté (biréfringence et axe optique).

12. L'objectif de cette simulation est uniquement de donner un exemple de l'intérêt de la méthode, mais ne correspond pas à un cas réaliste en OCT, la biréfringence circulaire ne pouvant être perçue en OCT du fait de son annulation au cours de l'aller-retour dans l'échantillon. L'aller-retour n'est pas pris en compte dans cette simulation.

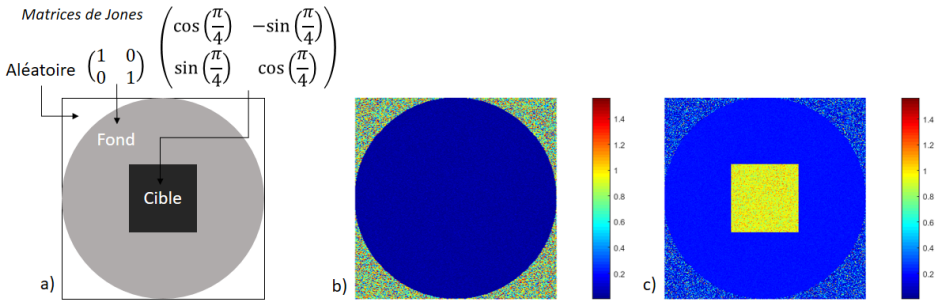

FIGURE 4.20 – Simulations d'images polarimétrique (H(x,y)) d'un échantillon constitué d'un fond n'ayant pas d'influence sur la polarisation et d'une cible (au centre) présentant de la biréfringence circulaire (d'angle $\frac{\pi}{4}$). a) Schéma de l'échantillon considéré. b) H(x,y) pour un montage conventionnel de PS-FF-OCM. c) H(x,y) pour un montage optimisé selon l'algorithme d'optimisation du contraste polarimétrique.

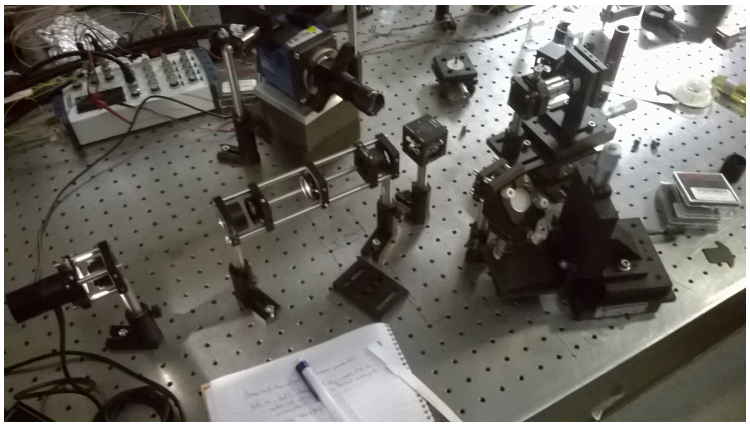

FIGURE 4.21 – Photo du montage de FF-OCM construit à Stanford.

montage, de l'espace a été prévu au niveau de la voie d'illumination, dans les bras de l'interféromètre et en sortie de l'interféromètre. Le montage a par ailleurs été construit à l'horizontal sur la table optique, permettant d'ajouter ou de retirer facilement des éléments. Un miroir de renvoi était installé pour que l'objectif du bras objet soit lui à la verticale, pour placer facilement les échantillons sous l'objectif comme dans un montage sur colonne. La figure 4.21 présente une photo du montage construit. On remarquera que le cube séparateur a été incliné tout comme dans le montage présenté à la section 3.4, ce qui pouvait être fait de manière plus simple sur un montage horizontal.

Ce montage est éclairé par une LED blanche ayant un spectre quasi-identique à celui de la LED utilisée dans le montage de la section 3.4, mais de puissance moindre (550 mW), ce qui ne pose pas de problème ici, l'objectif n'étant pas d'obtenir des images d'échantillons *in vivo*. Le montage d'éclairage Köhler a été conçu en considérant comme source l'image de la LED, formé par un système optique constitué de deux lentilles, les rayons issus de la LED étant renvoyés à l'infini entre les deux lentilles. Dans cet espace, un polariseur peut ainsi être placé, et l'éclairage vérifie les propriétés de l'éclairage Köhler.

La caméra utilisée est une caméra CMOS PCO (pco.edge 5.5), utilisée précédemment dans un montage de FF-OCM au sein du SBO. Cette caméra avait principalement été choi-

sie du fait de son grand nombre de pixels (2560 × 2160), dont on verra l'utilité. Une lentille de tube de focale 100 mm est utilisée, permettant de bien échantillonner spatialement le signal au niveau de la caméra, sachant que des objectifs de grandissement 20x (Olympus, PlanN, NA=0.4) sont utilisés.

La surface de référence consiste en une densité, dont le coefficient de réflexion à sa surface est de 4%. Elle est montée sur un PZT piloté en pas à pas pour la démodulation du signal. Notons que la surface de référence correspond ainsi à la surface « interne » de la densité, ce qui explique l'utilisation d'une densité plutôt qu'une lame de verre (la réflexion de la face « externe » est largement atténuée et ne perturbe pas le signal).

Ce système a été conçu avec le matériel disponible, et précédemment utilisé, au SBO. On notera deux défauts au montage réalisé : la FWC de la caméra est faible pour un montage FF-OCM (30.000 electrons, soit dix fois moins que pour la caméra utilisée sur le montage développé précédemment), ce qui a nécessité de travailler en accumulant 50 images pour que le signal ne soit pas trop faible, et les objectifs de microscope ne sont pas de haute qualité, et sont de plus conçus pour travailler avec des lames couvre-objet, que nous n'utiliserons pas, et dans l'air, ce qui pose des problèmes de correction de la dispersion si des échantillons biologiques sont imagés.

4.3.4.1.2 Adaptation du montage pour l'imagerie polarimétrique

A partir du montage construit, un montage de PS-FF-OCM conventionnel a été obtenu en ajoutant les éléments polarisants nécessaires : un polariseur (prisme de Glan-Thompson) dans la voie d'éclairage, et deux lames quart d'onde dans les bras de l'interféromètre. Ces éléments sont tous associés à des montures permettant de régler leur angle.

Du fait de l'utilisation d'une source à spectre large, il est nécessaire d'utiliser des éléments polarisants achromatiques. Notons qu'il est complexe de concevoir des lames quart d'onde achromatiques, et celles utilisées ici (Newport RP44) sont donc chères (celles utilisées ici coûtent presque 1500 €).

Le montage doit aussi être modifié de telle manière à pouvoir analyser deux états de polarisations linéaires ($\parallel$ et $\perp$) en sortie du système. Afin de pouvoir les analyser en utilisant une unique caméra, un module a été construit de manière à séparer spatialement la polarisation $\parallel$ et la polarisation $\perp$. Du fait du large champ de la caméra, il est ainsi possible d'obtenir simultanément sur la capteur deux images correspondant aux deux directions de polarisation analysées. Le module se compose de deux cubes séparateurs de polarisation et deux miroirs d'inclinaison réglable. Le premier cube sépare les deux polarisations, qui sont séparées spatialement par les miroirs inclinés, recombinées par le deuxième cube et finalement toutes les deux imagées au niveau du capteur de la caméra. La figure 4.22 illustre le fonctionnemment de ce module permettant d'imager les deux états de polarisation sur une seule caméra.

Un tel module permettant d'analyser les deux états de polarisations $\parallel$ et $\perp$ simultanément à l'aide d'une seule caméra n'avait à notre connaissance jamais été proposé en PS-FF-OCM.

Le module utilisé ici avait été précédemment construit, sans jamais avoir été effectivement utilisé sur un montage de PS-FF-OCM. En le testant, on a montré qu'il introduisait beaucoup de vignettage, limitant finalement le champ observé à 350 μm, tandis que les objectifs ont un champ d'observation de 1.1 mm. Pour remédier à cela, des éléments plus grands devraient être utilisés. En raison d'une contrainte temporelle du fait de la durée

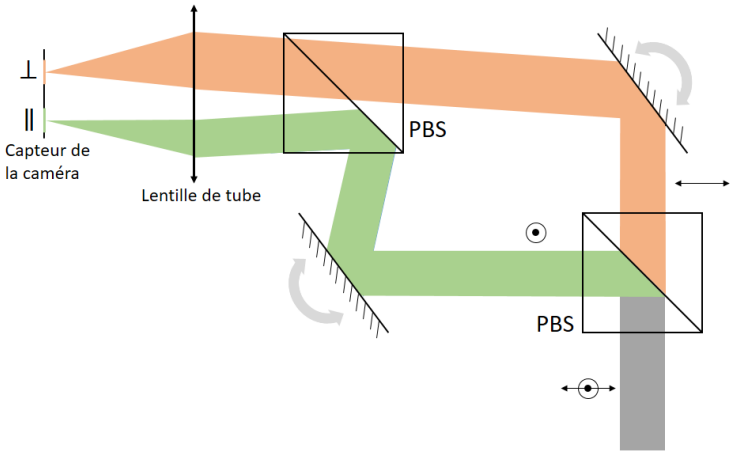

FIGURE 4.22 – Schéma de fonctionnement du module permettant de séparer les polarisations orthogonales ∥ et ⊥ au niveau du capteur de la caméra. PBS : cube séparateur de polarisation.

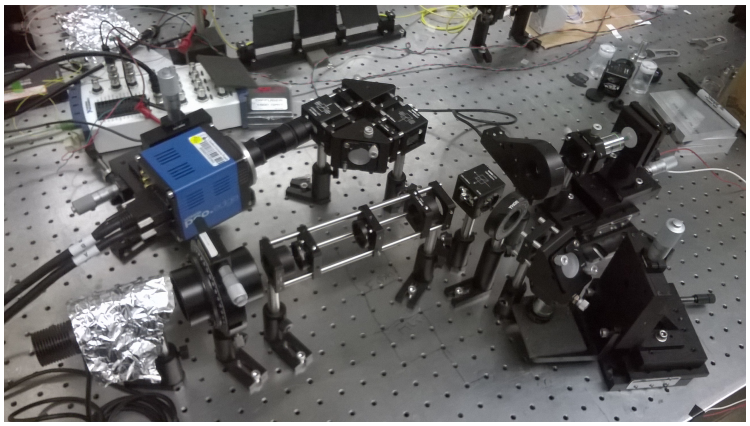

FIGURE 4.23 – Photo du montage de PS-FF-OCM construit.

réduite du séjour à Stanford, le module n'a pas pu être modifié de manière à corriger ce défaut.

La figure 4.23 présente une photo du montage de PS-FF-OCM finalement construit.

Notons que les angles des différents éléments doivent être bien réglés pour une imagerie PS-FF-OCM pertinente (voir section 4.3.2.2). La base définissant les angles 0° et 90° (directions x et y, polarisations ∥ et ⊥) est determinée par les cubes séparateurs de polarisations du module décrit précédemment. Une procédure simple, basée uniquement sur la quantité de lumière dans les images correspondant aux polarisation ∥ et ⊥ sur le capteur de la caméra a été développée pour régler les angles des différents éléments à 0° (polariseur), 22.5° (lame quart d'onde du bras de référence) et 45° (lame quart d'onde du bras objet). La figure 4.24 représente les deux images obtenues sur le capteur de la caméra lorsque le montage est correctement réglé, avec pour échantillon une surface identique à la surface de référence. Notons qu'il ne devrait pas y avoir de franges dans la direction ∥. Leur présence est probablement due au fait que les lames quart d'onde ne fonctionnent pas parfaitement sur tout le spectre de la lumière.

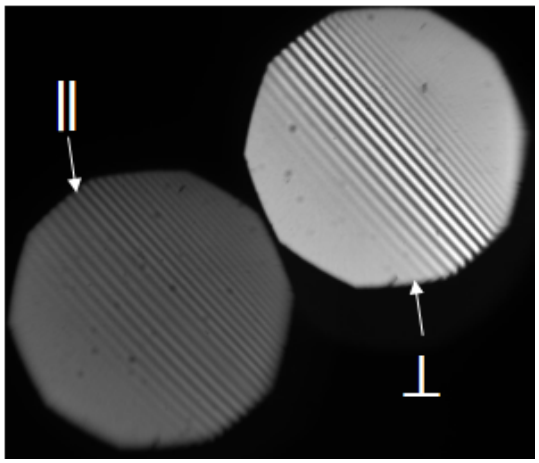

FIGURE 4.24 – Images obtenues pour les polarisations ∥ et ⊥ lorsque le montage de PS-FF-OCM est réglé en configuration conventionnelle, avec un échantillon identique à la surface de référence.

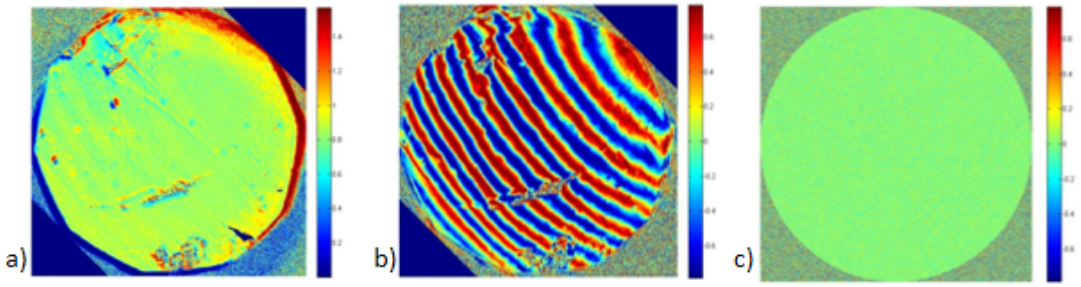

FIGURE 4.25 – Images polarimétriques d'un film polarisant. a) H(x,y), b) axe optique, c) H(x,y) obtenue en simulation numérique, connaissant la matrice de Jones du film polarisant.

Afin de tester le montage pour l'imagerie polarimétrique, un film polarisant a été utilisé comme échantillon. La mesure de la « biréfringence » (en tant que résultat de l'algorithme donnant la biréfringence (image H(x,y)), un film polarisant n'étant pas un élement biréfringent mais polarisant) était cohérente avec l'image obtenue par simulation pour cet échantillon (sa matrice de Jones étant connue[13]), comme présenté sur la figure 4.25. Sur cette figure, le calcul de l'axe optique est aussi présenté. Comme on le voit, il est impossible de mesurer pertinemment l'axe optique en raison de ses variations trop importantes sur le champ d'observation (pourtant faible), entrainant un repliement de la mesure. Ceci justifie d'ailleurs le fait de travailler uniquement sur l'algorithme de mesure de biréfringence dans le cadre de notre optimisation, les images de l'axe optique n'étant pas exploitables (en plus d'être moins adaptées à la caractérisation des échantillons comme expliqué précédemment).

Dans le cadre de la méthode d'optimisation du contraste polarimétrique, notons qu'il n'y avait pas à notre disposition d'autres éléments polarisants que ceux utilisés dans le montage de PS-FF-OCM. L'optimisation pourra ainsi être faite uniquement sur l'orientation des différents composants, ce qui réduit à 3 le nombre de degrés de liberté.

13. Il est nécessaire de prendre en compte l'aller-retour de la lumière dans le film polarisant pour la matrice de Jones à prendre en compte dans la simulation.

Afin de régler correctement les angles des éléments polarisants selon le résultat de l'optimisation, il convient de bien calibrer les angles des éléments polarisants par rapport à la base (x,y), au-delà de la configuration particulière correspondant au montage conventionnel de PS-FF-OCM. Une procédure a ainsi été développée pour associer les angles indiqués par les montures des éléments aux angles dans la base (x,y). Cette procédure est plus complexe que celle pour déterminer la configuration conventionnelle de PS-FF-OCM, cependant, elle se base aussi uniquement sur la quantité de lumière dans les images correspondant aux polarisation $\parallel$ et $\perp$ sur le capteur de la caméra. L'idée de cette calibration est de calculer théoriquement le ratio des quantités de lumière dans les deux images en fonction de l'angle dans la base (x,y), puis de calculer en pratique le ratio en fonction des angles indiqués par la monture de l'élément à calibrer. En comparant les deux mesures, on peut associer les angles indiqués par les montures aux angles dans la base (x,y). Cette procédure est faite pour chaque élément du système.

4.3.4.2 Imagerie à contraste optimisé

A partir du montage de PS-FF-OCM ainsi développé, différents échantillons ont été testés afin de trouver un échantillon présentant deux zones pouvant être identifiées comme une cible et un fond [14]. Les échantillons ont tous été testés sur le montage conventionnel de PS-FF-OCM, en essayant d'identifier les deux zones en fonction de différences dans les images H(x,y), dont le contraste pourrait ensuite être optimisé par application de l'algorithme.

Il s'est avéré très compliqué de trouver un échantillon pertinent pour tester l'algorithme d'optimisation du contraste polarimétrique, principalement en raison du champ très faible (obtenir deux zones présentant des propriétés polarimétriques différentes sur un champ si faible pour un même échantillon est très compliqué), mais aussi du fait que les images H(x,y) n'était pas calculées en temps réel, mais a posteriori à partir d'une routine Matlab (les tests d'échantillons étaient donc relativement ardus).

Rappelons aussi que l'algorithme nécessite de connaitre les matrices de Jones associées à la cible et au fond. Ces matrices sont théoriquement mesurables à partir d'un montage de PS-FF-OCM conventionnel en assimilant les échantillons à des matériaux biréfringents linéaires uniaxes ne présentant pas de diatténuation (voir partie 4.3.2). Cependant, dans l'objectif de démontrer la méthode d'optimisation du contraste polarimétrique, s'ajouter la contrainte de devoir mesurer une matrice de Jones au préalable en imageant des échantillons ayant des matrices de Jones inconnues s'est avéré une forte contrainte, le développement d'un montage de PS-FF-OCM permettant de mesurer pertinemment des matrices de Jones étant en soi un lourd travail.

Finalement, dans l'objectif de démontrer la faisabilité de la méthode d'optimisation du contraste polarimétrique, nous avons retenu pour le test de la méthode un échantillon de matrice de Jones connue, à savoir un film polarisant, identique à celui déjà évoqué précédemment (voir figure 4.25). Cet échantillon ne présentait pas deux zones pouvant être identifiées comme une cible et un fond, cependant ses propriétés polarimétriques changent si on le tourne (modification de son axe optique [15]). L'optimisation a donc été faite en considérant un échantillon dont une zone correspondrait à un film polarisant dont l'axe optique a un angle aléatoire (la cible), tandis que le reste de l'échantillon correspondrait à

14. Les échantillons testés incluaient : du blanc de poulet, du plastique biréfringent, du film polarisant, en essayant parfois de les insérer dans d'autres matériaux (pâte à modeler, silicone) pour fournir un fond.
15. Comme on l'a vu, les mesures d'axes optiques ne sont cependant pas pertinentes sur notre montage.

Élément polarisant	*Angle (montage conventionnel)*	*Angle (montage optimisé)*
Polariseur	0°	-21°
Lame quart d'onde (bras de référence)	22.5°	23.5°
Lame quart d'onde (bras objet)	45°	0°

TABLE 4.1 – Angles des différentes composants du système pour le montage conventionnel de PS-FF-OCM et le montage optimisé pour l'échantillon constitué de deux zones, correspondant à deux films polarisants ayant des orientations différentes (0° et -43°).

un film polarisant dont l'axe optique a un angle de 0° (le fond). L'angle aléatoire choisi était de -43°, correspondant à un angle tiré en tournant aléatoirement le film polarisant (fixé sur une monture rotative), après avoir calibré l'angle de l'axe optique du film polarisant (de manière analogue aux angles des éléments polarisants du système PS-FF-OCM).

Le résultat de l'optimisation sur les angles des éléments polarisants du système est donné à la table 4.1, et comparé aux angles du montage de PS-FF-OCM conventionnel.

Deux images H(x,y) ont ensuite été successivement obtenues pour le film polarisant à 0° ($H_0(x,y)$) et à -43° ($H_{-43}(x,y)$), pour le montage en configuration conventionnelle et en configuration optimisée. Pour chaque montage, une image a finalement été reconstruite en incluant la zone centrale de l'image $H_{-43}(x,y)$ dans l'image $H_0(x,y)$ afin de simuler un échantillon ayant deux zones présentant des propriétés polarimétriques différentes. Pour les deux montages, une image tomographique de l'échantillon simulé a été construite de la même manière.

Ces images sont présentées à la figure 4.26, accompagnées des images H(x,y) obtenues par simulation numérique pour les deux montages, à partir des paramètres des éléments polarisants et de la matrice de Jones du film polarisant.

Comme on peut le voir, les deux zones de l'échantillon correspondant à des orientations différentes du film polarisant sont indiscernables dans les images obtenues sur un montage PS-FF-OCM conventionnel, mais sont parfaitement séparées (avec un bon contraste, estimable à ∼50 %) dans les images obtenues sur le montage optimisé. Les deux zones ne sont évidemment pas discernables dans les images tomographiques, quel que soit le montage. On remarquera aussi que les images obtenues sont cohérentes avec les images simulées, montrant que tous les éléments polarisants du système et le film polarisant ont bien l'effet attendu (ce qui était de toute façon nécessaire à un bon fonctionnement de l'algorithme d'optimisation du contraste).

On notera finalement que l'intérêt de l'algorithme d'optimisation peut aussi être de déterminer des configurations plus simples que celle du montage PS-FF-OCM conventionnel permettant d'obtenir des images dont le contraste polarimétrique est finalement meilleur. Le fait de devoir placer des éléments polarisants dans les bras de l'interféromètre peut par exemple parfois poser des problèmes : en utilisant l'algorithme d'optimisation, on peut trouver une configuration optimale en imposant $\mathbf{J}_{samp} = \mathbf{J}_{det} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix}$, et ainsi optimiser le contraste tout en ayant un montage simplifié.

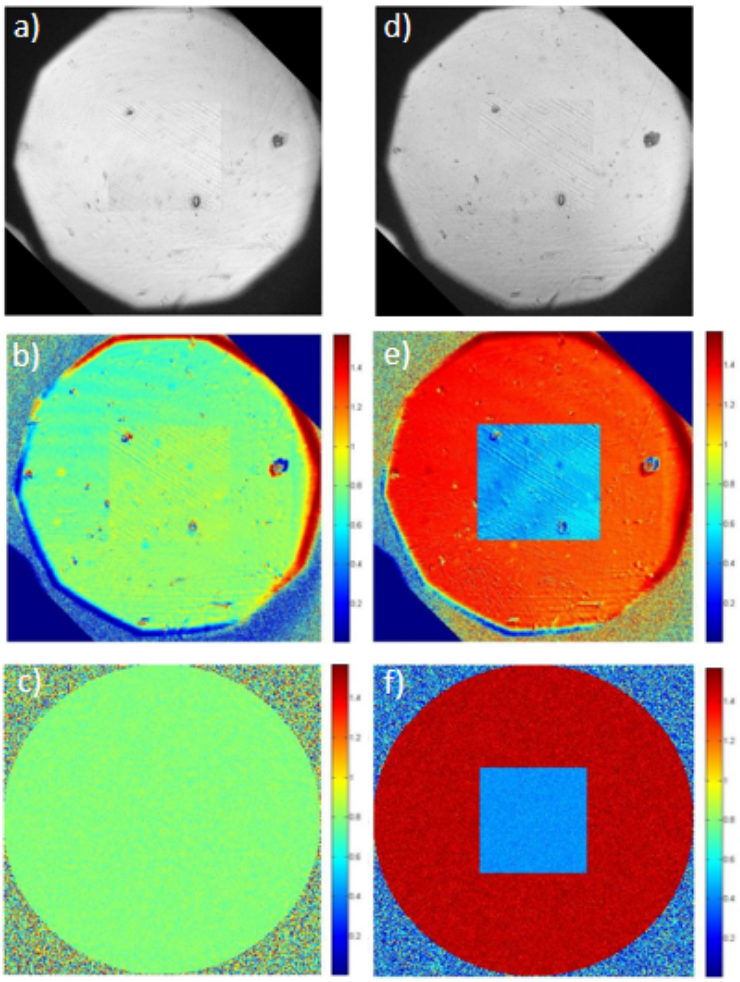

FIGURE 4.26 – Images tomographiques (mesurées (a, d)) et polarimétriques (mesurées, (b, e), et simulées numériquement (c, f)) d'un échantillon constitué de deux zones, correspondant à deux films polarisants ayant des orientations différentes (0° et -43°), pour le montage conventionnel de PS-FF-OCM (a, b, c), et le montage optimisé (d, e, f) pour maximiser le contraste entre les deux zones de l'échantillon.

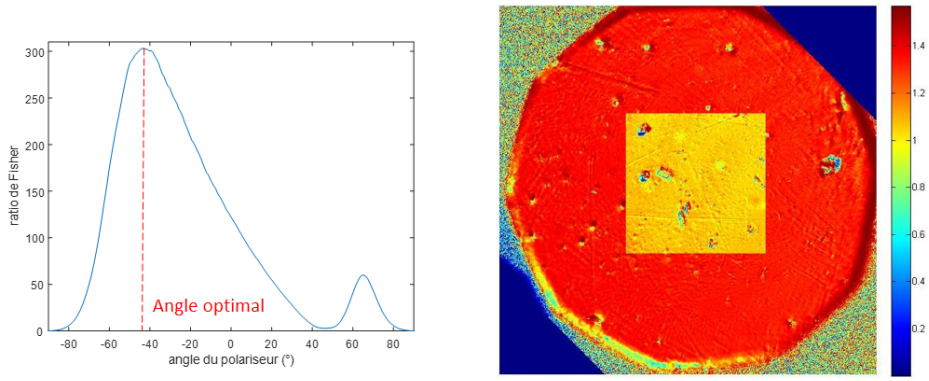

FIGURE 4.27 – Optimisation du contraste pour l'échantillon étudié précédemment (film polarisant dans deux orientations), avec un seul élément polarisant dans le système (polariseur), ayant un unique degré de liberté (son orientation). a) calcul du contraste (ratio de Fisher) en fonction de l'angle du polariseur et détermination de l'angle donnant le contraste optimal, b) image H(x,y) obtenue sur le système correspondant, avec le polariseur placé à l'angle optimal.

Dans le cas de l'échantillon considéré précédemment pour tester l'algorithme d'optimisation du contraste, on pourrait même penser qu'il est assez simple pour que le contraste puisse être optimisé en jouant uniquement sur l'angle du polariseur en entrée du système, sans autre élément polarisant dans le système. Dans ce cas, le contraste dépend d'une seule variable (l'angle du polariseur), et utiliser l'algorithme SCE-UA n'est pas nécessaire pour déterminer la valeur de l'angle du polariseur maximisant le contraste : on peut simplement calculer numériquement le contraste en fonction de toutes les valeurs possibles de l'angle du polariseur. Ce calcul est présenté en figure 4.27.a. La figure 4.27.b présente l'image obtenue sur un montage dont le seul élément polarisant est le polariseur, placé à l'angle donnant le meilleur contraste selon la figure 4.27.a. Comme on le voit, les deux zones sont clairement discernables, bien que le contraste polarimétrique (pouvant être estimé à $\sim$15 %) est moins bon que dans le cas d'un optimisation prenant en compte des éléments polarisants dans les bras de l'interféromètre.

On montre ici que dans la logique d'optimisation du contraste polarimétrique, ce qui est finalement généralement l'objectif en PS-OCT, le montage conventionnel de PS-FF-OCM, relativement complexe, donne parfois des résultats moins bon qu'un montage extrêmement simple consistant simplement à illuminer l'échantillon avec une polarisation adaptée.

4.3.5 Conclusion et pistes de développement

En mesurant la biréfringence, l'OCT polarimétrique permet d'avoir accès à des informations permettant de mieux différencier des tissus dans le contexte de certaines pathologies. L'immense majorité des systèmes de PS-OCT se fondent sur un montage permettant d'obtenir des images à partir d'une mesure quantitative de la biréfringence. Cependant, l'objectif principal de la PS-OCT, avant de fournir une mesure quantitative de la biréfringence des échantillons, est surtout de fournir des images présentant un gain en contraste en comparaison des images tomographiques conventionnelles, permettant de mettre en évidence certaines structures du fait de leur propriétés polarimétriques différentes.

En utilisant un algorithme d'optimisation du contraste polarimétrique dans le cadre de

l'imagerie d'échantillons présentant une « cible » dont on cherche à maximiser le contraste par rapport à un « fond », nous sommes parvenus à obtenir des images de PS-FF-OCM à contraste optimisé, permettant de discerner avec un bon contraste deux zones ayant des propriétés polarimétriques différentes au sein d'un échantillon très simple (film polarisant), qui ne pouvaient pas être discernées en utilisant un montage de PS-FF-OCM conventionnel mesurant la biréfringence. Cet algorithme, développé au LCF dans le cadre de l'imagerie polarimétrique à l'échelle macroscopique pour des applications militaires, n'avaient jusqu'à maintenant jamais été appliqué en imagerie microscopique résolue en profondeur. A partir de cet algorithme d'optimisation, il a aussi pu être montré que des montages très simples, mais optimisés, de PS-FF-OCM, tel qu'un montage dont le seul élément polarisant est un polariseur placé directement après la source lumineuse, pouvaient suffire pour améliorer notablement le contraste dans les images polarimétriques pour certains échantillons.

Cependant cette optimisation est évidemment dépendante de l'échantillon considéré, et il est nécessaire de connaitre a priori les propriétés polarimétriques de la cible et du fond dont on cherche à optimiser le contraste afin que l'algorithme fonctionne. Cependant, ce travail montre que dans le contexte d'une détection d'une cible dont on sait que d'une mesure à une autre, les propriétés polarimétriques resteront globalement identiques (tout comme celles du fond l'entourant), il est possible de développer des montages polarimétriques simples dont le contraste sera optimisé pour ce couple cible/fond, permettant ainsi de bien mieux discriminer la cible en comparaison d'un montage de PS-FF-OCM conventionnel.

Cependant, beaucoup de travail reste à faire avant de pouvoir tester cet algorithme d'optimisation dans le contexte d'applications médicales, telles que l'optimisation de la détection du carcinome de la peau en PS-FF-OCM. En effet, l'optimisation a pour l'instant uniquement été démontré sur un échantillon extrêmement simple dont la matrice de Jones était connue. Pour un échantillon biologique, il serait tout d'abord nécessaire de trouver un moyen de mesurer pertinemment les matrices de Jones de la cible et du fond. Pour ce faire, il serait probablement d'abord nécessaire d'imager des échantillons dont la matrice de Jones est connue, mais plus complexe que celle d'un film polarisant, à partir desquels on pourrait développer une méthode efficace de caractérisation des matrices de Jones, avant de l'appliquer à des échantillons biologiques. Notons que s'il est possible de mesurer pertinemment les matrices de Jones d'échantillons présentant une cible et un fond, le travail présenté ici est a priori directement applicable à l'optimisation du contraste polarimétrique dans ces échantillons. Cependant, un problème à garder à l'esprit est le fait que les propriétés polarimétriques dépendent de la profondeur sondée : une optimisation effectuée pour une cible à une certaine profondeur dans un échantillon pourrait ne pas fonctionner si la cible est à une autre profondeur, à moins de trouver une grandeur polarimétrique sur laquelle effectuer l'optimisation indépendante de la profondeur. De plus, ce travail a été effectué en considérant de la lumière purement polarisée (du fait que l'OCT est une méthode d'imagerie en lumière cohérente), cependant il a été montré que la dépolarisation pouvait avoir un effet sur les mesures de PS-OCT [182] ainsi, il pourrait être nécessaire d'effectuer l'optimisation en considérant un formalisme plus général que le formalisme de Jones, prenant en compte la lumière partiellement polarisée (formalisme de Stokes-Mueller). Finalement, une analyse prenant en compte la polarisation en fonction de la longueur d'onde devrait être effectuée pour une modélisation exhaustive permettant d'effectuer une optimisation pertinente, notamment du fait que des sources à spectre très large sont utilisées en OCT.

4.4 Conclusion

Le développement de méthodes d'imagerie fonctionnelle a constitué une avancée majeure dans le domaine de l'OCT, en apportant des sources de contraste complémentaires aux images tomographiques obtenues sur les montages conventionnels permettant d'améliorer notablement l'étude des processus pathologiques. Dans le domaine de la FF-OCM, les principales modalités à avoir été développées sont l'imagerie multispectrale, spectroscopique et polarimétrique.

À partir du montage précédemment introduit, nous avons développé des méthodes d'imagerie angiographique en FF-OCM, une modalité jusqu'à maintenant très marginalement étudiée, tandis qu'elle constitue l'extension la plus utilisée en OCT conventionnelle. En nous inspirant des méthodes d'OCT-A développées en OCT conventionnelle, nous proposons quatre méthodes différentes pouvant être implémentées en FF-OCM pour l'imagerie du flux sanguin : *dynamic FF-OCM-A*, *Fourier-Domain FF-OCM-A*, *Phase-based FF-OCM-A* et *speckle variance FF-OCM*. Cette dernière méthode a été considérée comme la plus simple à implémenter, et a permis d'imager un modèle de vaisseau sanguin pour des vitesses d'écoulement jusqu'à 45 mm/s. Des méthodes de mesure quantitatives de vitesse d'écoulement ont par ailleurs été explorées en FF-OCM, à partir d'images SV-FF-OCM et de suivi de particules, méthodes très peu étudiées jusqu'à maintenant, même en OCT conventionnelle.

Nous avons aussi étudié un développement de la modalité polarimétrique en FF-OCM : bien que cette méthode ait déjà été implémentée avec succès en FF-OCM, le contraste des images obtenues se base toujours sur une mesure quantitative de la biréfringence. Nous nous somme proposés d'appliquer en FF-OCM polarimétrique un algorithme d'optimisation du contraste pour des échantillons présentant une cible et un fond ayant des propriétés polarimétriques différentes, permettant de déterminer les éléments polarisants nécessaires dans le montage pour que le contraste entre la cible et le fond soit optimal. Cet algorithme n'avait jusqu'à maintenant jamais été utilisé pour des méthodes d'imagerie polarimétriques à l'échelle microscopique et résolues en profondeur. Nous avons démontré qu'il était effectivement possible d'optimiser les élements d'un montage de PS-FF-OCM à partir de cet algorithme pour imager un échantillon simple constitué de deux zones distinctes (film polarisant dans deux orientations différentes) avec un contraste optimal, tandis qu'un montage conventionnel de PS-FF-OCM ne permettait pas de différencier les deux zones.

Ces développements de l'imagerie fonctionnelle en FF-OCM sont cependant encore à leurs prémices, et ont été étudiés uniquement sur des échantillons simples. L'étude menée ici montre seulement la faisabilité de mesures d'angiographie en FF-OCM et d'une méthode d'optimisation du contraste en PS-FF-OCM, mais du travail reste à faire pour leur optimisation et validation dans le cadre de l'imagerie d'échantillons biologiques, qui pourrait mettre en évidence la possibilité d'applications biomédicales à partir de ces développements techniques. Une limitation principale de la FF-OCM pour l'application de ces méthodes d'imagerie fonctionnelle à des échantillons biologiques est sa faible sensibilité, limitant les mesures en profondeur dans les échantillons, tandis que l'imagerie fonctionnelle n'est parfois pertinente qu'a des profondeurs à la limite, voire au-delà, des capacités de la FF-OCM, comme par exemple pour l'angiographie dans la peau, la majeure partie de la vascularisation étant à des profondeurs supérieures à la limite de pénétration de la FF-OCM.

Nous allons ainsi dans le chapitre suivant nous intéresser à un développement technique

de l'OCT, inspiré de la FF-OCM, mais permettant d'atteindre de plus grandes profondeurs de pénétration du fait d'une meilleure sensibilité, tout en conservant une résolution spatiale identique : la microscopie par cohérence optique confocale à éclairage « ligne ».

Chapitre 5

Microscopie par cohérence optique confocale à éclairage « ligne »

5.1 Introduction

La FF-OCM présente une profondeur de pénétration moindre que l'OCT conventionnelle. Tandis l'OCT conventionnelle permet typiquement d'atteindre des profondeurs de pénétration de l'ordre du millimètre [183], la profondeur de pénétration en FF-OCM est limité à $\sim 200\,\mu m$ dans la peau. Comme on l'a vu, ceci est du à l'absence de filtrage confocale en FF-OCM, directement lié au fait d'utiliser un éclairage et une détection plein champ. De ce fait, les photons rétro-diffusés par l'échantillon sont uniquement filtrés interférométriquement, résultant en une profondeur pénétration similaire à celle d'un microscope confocal [184], se basant uniquement sur un filtrage confocal.

Développer un système combinant les avantages de la FF-OCM (haute résolution, parallélisation de l'acquisition, simplicité du montage) avec la profondeur de pénétration de l'OCT conventionnelle est ainsi un enjeu majeur. Un tel système serait particulièrement intéressant dans le domaine de la dermatologie.

Afin d'améliorer la pénétration en FF-OCM, il est possible d'utiliser des sources de lumière dont le spectre est centré dans le proche infrarouge, où le libre parcours moyen de diffusion est plus grand dans les tissus (voir figure 1.8), permettant ainsi de récupérer des photons plus en profondeur dans les tissus par rapport à des systèmes fonctionnant dans le visible [68, 101]. Cependant, l'utilisation de sources dans le proche infrarouge va aussi de pair avec une résolution spatiale plus faible par rapport aux systèmes fonctionnant dans le visible (voir équations 2.36 et 2.37), et nécessite l'utilisation de caméras plus chères, si bien que finalement peu de systèmes FF-OCM fonctionnent avec des sources infrarouges.

Une véritable avancée pour améliorer la profondeur de pénétration en FF-OCM serait ainsi plutôt de trouver un moyen de combiner le filtrage interférométrique de la FF-OCM avec un filtrage confocal. Récemment, un microscope confocal interférométrique plein champ a été proposé [1], utilisant une matrice de VCSEL (diode laser à cavité verticale émettant par la surface) couplée à une fibre multimode pour paralléliser le filtrage confocal dans un système utilisant une détection interférométrique et une source à faible longueur de cohérence [185]. Cependant, le spectre de la source n'était pas assez large pour obtenir une

1. Notons que les auteurs auraient pu choisir le terme de « FF-OCM confocal » s'ils venaient de la communauté de l'OCT.

résolution axiale comparable à celle de l'OCM, et ce système n'a pas permis d'obtenir d'images convaincaintes pour l'imagerie de tissus biologiques.

Nous présentons ici une nouvelle méthode, inventée par Arnaud Dubois [186], permettant de combiner filtrage interférométrique et filtrage confocal à partir d'un montage inspiré de celui de FF-OCM : la microscopie par cohérence optique confocale à éclairage « ligne » (LC-OCM, pour *line (field) confocal optical coherence microscopy*).

Après avoir introduit le principe de cette méthode, nous présenterons le développement d'un montage de LC-OCM à partir du montage de FF-OCM précédemment construit. Des images en coupes verticales seront obtenues en LC-OCM, mettant en évidence le gain en terme de profondeur de pénétration par rapport à la FF-OCM. L'extension fonctionnelle d'OCT-A par *speckle variance* développée précédemment en FF-OCM sera par ailleurs introduite en LC-OCM.

5.2 Principe

La LC-OCM est une technique en tout point similaire à la FF-OCM, à la différence près qu'au lieu d'éclairer (et d'imager) l'ensemble du champ à observer, seule une ligne du champ est éclairée et imagée. Ainsi, la LC-OCM constitue une méthode de FF-OCM où l'on considère un champ selon une ligne plutôt qu'un champ en 2 dimensions (plein champ). La figure 5.1 présente le schéma général d'un montage de LC-OCM. On notera la proximité de ce schéma avec celui du montage de FF-OCM (voir figure 2.6). Notons bien que du fait de l'illumination linéaire, un éclairage Köhler, adapté à l'imagerie plein champ, n'est pas utile. Le positionnement des lentilles du système d'illumination est par ailleurs très flexible : la lumière étant collimatée entre les deux lentilles, celles-ci peuvent être proches l'une de l'autre. De plus, la lentille cylindrique est ici représentée de telle manière à renvoyer les rayons à l'infini au niveau de l'échantillon/la surface de référence pour la direction qu'elle focalise. Cependant le fait que les rayons soient à l'infini à ce niveau n'est pas fondamentale, le but étant simplement d'illuminer une ligne. De ce fait, la position de la lentille cylindrique par rapport aux objectifs de microscope est flexible, tant qu'on s'arrange pour que la ligne illumine bien l'intégralité du champ que l'on souhaite imager et qu'il n'y ait pas de vignettage au niveau de la pupille des objectifs [2].

En LC-OCM, une image tomographique sera reconstituée à partir de plusieurs images linéaires concaténées. Cette technique constitue ainsi un intermédiaire entre l'OCM ponctuel (où un seul point est imagé à la fois, et deux balayages sont nécessaires pour reconstituer des images tomographiques) et la FF-OCM (où les images en face sont acquises sans balayage). L'intérêt de cette méthode est ainsi de conserver une partie du gain en vitesse de la FF-OCM (du fait de la parallélisation de l'acquisition), tout en conservant le filtrage confocal de l'OCM ponctuel. En effet, en éclairant et imageant une seule ligne dans l'échantillon, un filtrage confocal est obtenu dans une direction. Il a été montré qu'un tel filtrage confocal linéaire est suffisant pour s'approcher des performances d'un filtrage confocal ponctuel [187](voir figure 5.2). Ainsi, plusieurs systèmes de microscopie confocale ont été développés en utilisant un éclairage « ligne » [188, 189, 190, 191], mais aussi différents systèmes de TD-OCT [192, 193], SD-OCT [194, 195] (nécessitant alors un capteur 2D pour imager les différentes longueurs d'onde en parallèle) et SS-OCT [196, 197]. Dans ces systèmes OCT, l'objectif de l'éclairage « ligne » est surtout d'augmenter la vitesse d'acquisition.

2. On verra cependant plus loin que des sources très puissantes peuvent être utilisées en LC-OCM, donc même cette condition n'est pas critique.

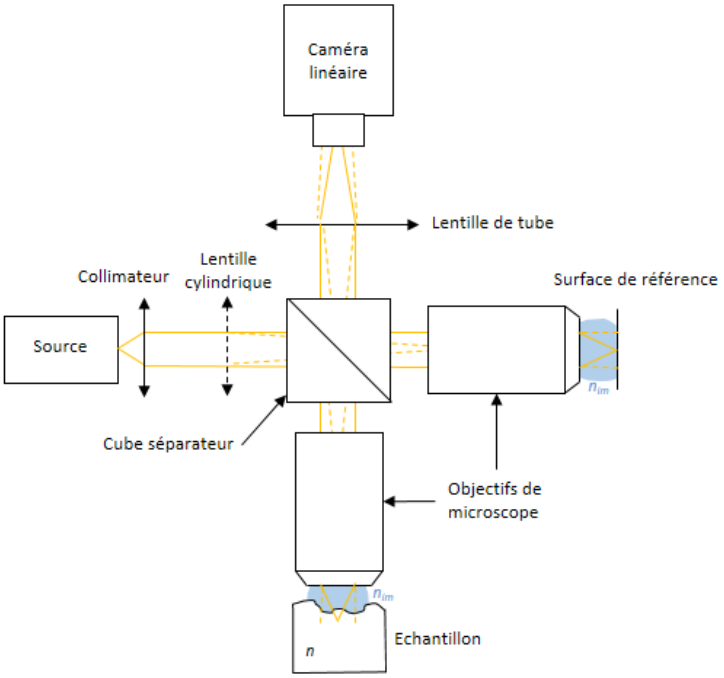

FIGURE 5.1 – Schéma d'un montage de LC-OCM utilisant un interféromètre de Linnik et des objectifs de microscope à immersion. Les rayons pleins et pointillés indiquent les rayons dans deux directions orthogonales, définies par les axes de la lentille cylindrique.

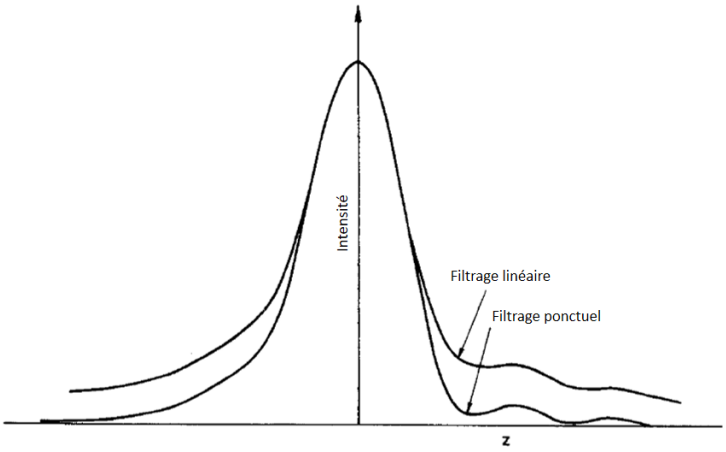

FIGURE 5.2 – PSF axiales obtenues pour un microscope confocal à filtrage ponctuel (microscope confocal conventionnel) et un microscope confocal à filtrage linéaire [187].

Le fait de combiner un filtrage confocal et interférométrique et une parallélisation de l'acquisition confère de nombreux avantages à la LC-OCM :

- La combinaison du filtrage confocal et interférométrique implique une profondeur de pénétration quasiment identique aux systèmes d'OCT conventionnels, tout en ayant une très haute résolution latérale en se basant sur un système de FF-OCM.
- Le fait d'acquérir le signal selon une ligne permet d'utiliser des caméras linéaires, bien plus rapides que les caméras 2D utilisées en FF-OCM.
- L'acquisition d'un B-scan nécessite un unique balayage axial. Un B-scan peut ainsi être acquis bien plus rapidement qu'en OCM ponctuel, mais aussi qu'en FF-OCM (du fait que les caméras linéaires sont plus rapides).
- Afin d'obtenir un filtrage confocal efficace en éclairant selon une ligne, il est nécessaire d'utiliser des sources spatialement cohérentes pour obtenir une ligne focalisée au mieux. Du fait de l'éclairage selon une ligne, l'utilisation de sources spatialement cohérentes pour l'éclairage n'introduit pas de figures d'interférences parasites (résultant des interférences entre plusieurs point du champ : sur une seule ligne, elles sont négligeables). Cela implique qu'il est possible d'utiliser des sources de luminance supérieures aux sources incohérentes utilisées en FF-OCM, comme des lasers. Le temps d'intégration minimal de la caméra pour travailler en régime de saturation peut ainsi n'être plus limité par la source comme en FF-OCM, mais par la caméra elle-même, ou les normes de sécurité pour l'exposition lumineuse dans le cas de l'imagerie d'échantillons vivants. Le signal interférométrique peut ainsi être acquis extrêmement rapidement.
- L'acquisition très rapide du signal implique qu'il est possible d'imager des échantillons *in vivo*, et que des méthodes d'OCT-A sont tout à fait implémentables en LC-OCM.
- Le fait d'utiliser une source cohérente, en combinaison avec un système d'illumination très simple et sans contrainte de positionnement, implique qu'il est possible d'utiliser une source fibrée, et que la voie d'éclairage peut être compacte, résultant en la possibilité de concevoir des systèmes compacts et portatifs, en utilisant un interféromètre compact tel que celui développé au chapitre 3.

La LC-OCM peut ainsi constituer un outil d'aide au diagnostic répondant aux besoins des dermatologues (voir section 1.3.2), plus adapté que la FF-OCM du fait de sa profondeur de pénétration accrue, de la facilité à obtenir des images *in vivo*, et de sa compacité.

Un défaut de cette méthode par rapport à la FF-OCM est cependant son coût, du fait de l'utilisation de sources spatialement cohérentes à spectre large. Cependant, tous les systèmes d'OCT conventionnels fonctionnent avec ce type de source. La LC-OCM peut ainsi bénéficier de toutes les avancées en terme d'éclairage de l'OCT conventionnelle.

La LC-OCM a été conçue comme une méthode permettant d'obtenir des B-scans *in vivo*. Notons qu'une méthode très proche du LC-OCM, appelée LS-OCM (*line scanning OCM*), utilise un montage similaire au montage de LC-OCM, mais en fixant l'échantillon à imager sur une platine motorisé pour le translater au cours de l'acquisition et obtenir des images en face [198, 199]. Cependant, cette méthode est difficilement compatible avec l'imagerie *in vivo*.

5.3 Développement d'un montage de LC-OCM

5.3.1 Montage expérimental

L'acquisition d'un B-scan en LC-OCM peut se faire de manière identique à l'acquisition d'une image 3D en FF-OCM par démodulation linéaire (la concaténation des lignes en LC-OCM donne un B-scan, là où la concaténation d'images en face donnait une image 3D en FF-OCM). De ce fait, tous les outils développés précédemment pour l'acquisition d'images 3D en FF-OCM peuvent être appliqués à l'acquisition de B-scan en LC-OCM.

Ainsi, le montage de LC-OCM est quasi-identique au montage de FF-OCM présenté en figure 3.8 : il suffit de remplacer la voie d'éclairage du montage de FF-OCM précédemment développé par un voie d'éclairage adaptée à la LC-OCM pour obtenir un montage de LC-OCM fonctionnel. En effet, comme on l'a vu, il est possible de sélectionner les pixels actifs du capteur de la caméra utilisée dans le montage de FF-OCM, et il est ainsi possible de sélectionner une ligne unique de façon à ce que la caméra soit équivalente à une caméra linéaire [3].

La source utilisée pour notre montage de LC-OCM est un laser supercontinuum (NKT photonics, SuperK Extreme EXR4), type de source déjà évoqué dans le cadre de l'OCT conventionnelle (voir section 2.2.3.1), donnant les meilleures résolutions axiales obtenues en TD-OCT. Le spectre de ce laser est par ailleurs filtré pour ne conserver que les longueurs d'onde dans le visible (inférieures à $\sim$ 900 nm), de façon à ne conserver que la partie spectrale qui nous intéresse (du point de vue de la réponse spectrale de la caméra), en limitant au maximum l'exposition de l'échantillon à d'autres longueurs d'onde. Comme expliqué précédemment, du fait de sa haute luminance, la puissance du laser ne sera pas limitante pour minimiser le temps d'intégration de la caméra, et de façon à limiter l'exposition de l'échantillon, le laser était utilisé au minimum de sa puissance, correspondant à un flux de 40 mW sur la région spectrale filtrée.

Le spectre du laser supercontinuum (filtré) est présenté en figure 5.3. Le spectre effectif vu par la caméra est également présenté. Celui-ci a une longueur d'onde centrale $\lambda_{Laser} \simeq 710\,nm$ et une largeur spectrale $\Delta\lambda_{Laser} \simeq 300\,nm$.

Du fait que cette source est cohérente spatialement, elle peut être injectée dans une fibre optique monomode et l'intégralité du flux émis peut illuminer l'échantillon [4]. Le flux au niveau de l'échantillon vaut donc 20 mW. A partir de la figure 5.3, on mesure que 50% de la lumière incidente sur la caméra est perçue par celle-ci ($P_{Laser} = 0.5$), et on a donc finalement, au niveau du capteur de la caméra $\frac{\Phi_{cam}}{(R_{incoh} + R_{ref})} = 2.5\,mW$. Bien que cette valeur soit plus faible que pour les sources incohérentes vues précédemment, l'éclairage se fait ici selon une ligne, correspondant à une surface dans le plan du capteur de la caméra de $\sim$ 30 mm (G $\times$ FOV) $\times$ $\sim$ 18 μm (G $\times$ le diamètre de la PSF latérale des objectifs, correspondant à la largeur de la ligne [5], résultant finalement en une intensité de $4.6\,mW/mm^2$ ($\times(R_{incoh} + R_{ref})$), $\sim$150 fois plus élevée que pour la LED à haute puissance

3. Il est cependant nécessaire d'avoir un degré de liberté de réglage en rotation de la caméra, pour que celle-ci puisse être tournée de telle manière que la ligne de lumière incidente sur son capteur corresponde effectivement à une ligne de pixels.

4. Si le collimateur et la lentille cylindrique ont bien été choisis de telle manière qu'il n'y a pas de vignettage du à la pupille des objectifs.

5. En considérant que l'intégralité de la pupille des objectifs de microscope (de diamètre 10.8 mm (voir équation A.10)) est éclairée. Si elle ne l'est pas, une « ouverture numérique effective » sera à prendre en compte pour le calcul de la largeur de la ligne.

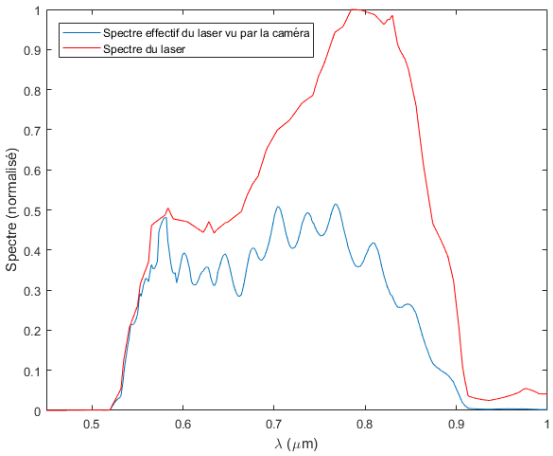

FIGURE 5.3 – Spectre du laser supercontinuum (filtré) et spectre effectif vu par la caméra Photonfocus MV1-D1024E-160-CL.

utilisée précédemment en FF-OCM [6] (voir section 3.4.2.1).

Afin que la largeur de la ligne au niveau de l'échantillon corresponde effectivement à la largeur de la PSF latérale des objectifs utilisés [7], la lumière doit être collimatée en sortie de la fibre optique monomode. Pour ce faire, un collimateur à miroir parabolique (de focale $f_{MP} = 33\,mm$, faisceau collimaté de diamètre $\varnothing_{MP} = 8.5\,mm$) est utilisé.

La figure 5.4.a présente le schéma du montage de LC-OCM ainsi construit. Notons qu'en pratique, l'interféromètre utilisé était le même que pour le système de FF-OCM précédemment construit, ayant un cube séparateur incliné. Cette inclinaison n'est pas fondamentale en FF-OCM, la probabilité que les lignes parasites issues des faces du cube tombent exactement sur la ligne « utile » étant très faible. Une image de la ligne imagée par la caméra est présentée en figure 5.4.b (par la suite, le capteur de la caméra ne prendra en compte qu'une ligne de pixel).

5.3.1.1 Caractéristiques

La mesure de la résolution axiale du système de LC-OCM peut se faire de manière identique à la mesure de la résolution axiale pour un système de FF-OCM. La figure 5.5 représente la PSF axiale mesurée sur le système, en représentation linéaire et logarithmique.

La résolution axiale mesurée est de 0.8 μm. D'après le spectre effectif vu par la caméra, la résolution axiale théorique est de 0.5 μm. La résolution mesurée est probablement légèrement moins bonne du fait que le spectre de cette source varie avec sa puissance. Le spectre de la source utilisée à 10% de sa puissance est ainsi probablement moins large que le spectre donné par la documentation.

La sensibilité mesurée en considérant la représentation logarithmique de la PSF axiale est de 73 dB en ne considérant pas d'accumulation. Cette valeur n'est pas beaucoup plus élevée que pour un système FF-OCM. Ceci est dû au fait que la méthode de mesure de la sensibilité en FF-OCM n'est pas faite en prenant en compte un échantillon diffusant

6. Notons malgré tout que R_{incoh} sera aussi beaucoup plus faible en LC-OCM, le facteur 150 ne se retrouvera donc pas en terme de temps d'intégration pour l'imagerie dans les tissus biologiques.

7. Afin d'obtenir le filtrage confocal le plus efficace possible, et de maximiser l'intensité au niveau du capteur de la caméra.

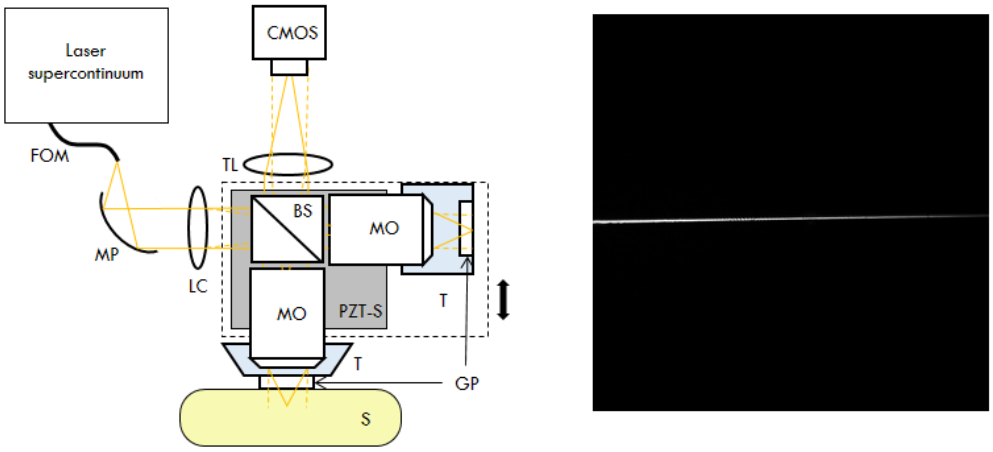

FIGURE 5.4 – Schéma du montage de LC-OCM, et image de la ligne obtenue sur la caméra. FOM, fibre optique monomode ; MP, miroir parabolique ; LC, lentille cylindrique ; BS, cube séparateur ; MO, objectifs de microscope ; T, cuves contenant le liquide d'immersion ; GP, lames de verres ; S, échantillon ; PZT-S, platine piézoélectrique ; TL, lentille de tube.

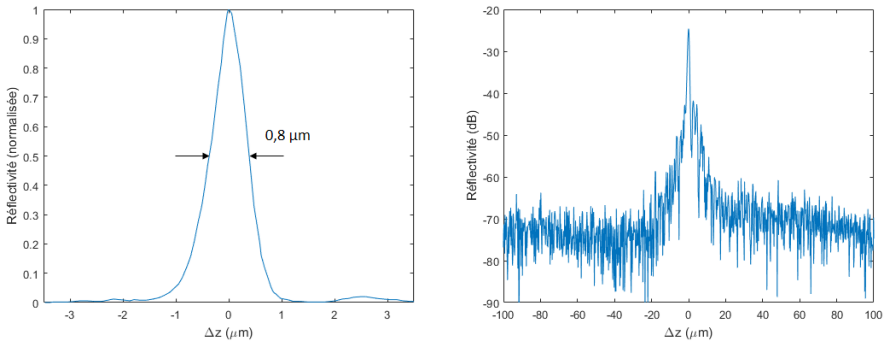

FIGURE 5.5 – PSF axiale du système LC-OCM en représentation linéaire et logarithmique.

dans le système, cependant, la méthode de mesure donne des résultats cohérents avec la valeur théorique de la sensibilité obtenue en considérant des échantillons diffusants, avec R_{incoh} de l'ordre de quelques pourcents. Cette méthode de mesure est ainsi adaptée pour la FF-OCM, mais moins pour la LC-OCM, méthode pour laquelle R_{incoh} est environ 10 fois plus faible qu'en FF-OCM [198].

De même, la méthode de mesure de la résolution latérale en FF-OCM, nécessitant des images plein champ, est peu adaptée à la LC-OCM en mode « B-scan ». On estimera donc la résolution latérale en prenant en compte la valeur théorique donnée par l'équation 2.36, pour notre système, 1.2 μm.

Finalement, dans le cadre de l'imagerie de la peau, en utilisant la source à 10% de sa puissance, le temps d'intégration pour travailler en limite de saturation de la caméra était de 0.05 ms, proche du temps d'intégration minimum possible pour la caméra utilisée. La caméra étant utilisée selon une ligne (1024 × 1 pixels), le temps d'acquisition pouvait être réduit à 0.07 ms, soit 15300 lignes par seconde. Les images acquises étant des B-scan en LC-OCM, la résolution temporelle du système sera considérée comme l'intervalle temporel entre deux B-scans. Elle dépend donc de la profondeur sondée. Du fait de l'utilisation d'un algorithme de démodulation linéaire nécessitant un déplacement de l'interféromètre d'une quantité $\Delta z = \frac{\overline{\lambda}}{8 n_{im} N_{acc}}$ entre deux lignes successives (voir partie 3.2.1), pour un déplacement Z_{tot}, $\frac{Z_{tot}}{\Delta z}$ lignes sont nécessaires. Ce déplacement Z_{tot} correspond à une profondeur sondée dans l'échantillon de $Z_{tot}\frac{n_{im}}{n}$. Ainsi, pour sonder une profondeur $Z_{tot,ech}$ dans un échantillon d'indice n, le nombre de lignes nécessaires est donné par :

$$N_{lignes} = \frac{8 N_{acc} Z_{tot,ech} n}{\overline{\lambda}}, \tag{5.1}$$

Finalement, la résolution temporelle du système est donc donnée par :

$$\Delta t_{LC-OCM} = N_{lignes} \times T_{acq}, \tag{5.2}$$

$$\Delta t_{LC-OCM} = \frac{8 N_{acc} Z_{tot,ech} n}{\overline{\lambda}} \times T_{acq}. \tag{5.3}$$

En considérant $Z_{tot,ech} = 500\,\mu m$, n=1.4 et $N_{acc} = 1$, la résolution temporelle du système est de 550 ms, soit 1.8 B-scan par seconde. Ce temps est supérieur au temps entre deux images en face sucessives en FF-OCM, mais largement inférieur au temps nécessaire pour obtenir une piles d'images en face sur une profondeur de 500 μm dans un échantillon.

Notons finalement que le champ d'observation (dans la direction latérale) est identique à celui du système FF-OCM (990 μm) du fait de l'utilisation d'une lentille de tube, d'objectifs de microscope et d'une caméra identique au montage de FF-OCM.

5.3.1.2 Exemples d'images et comparaison à la FF-OCM

A partir de ce montage, des B-scan ont pu être obtenus en utilisant les outils développés pour l'acquisition d'images 3D en FF-OCM. La figure 5.6 représente ainsi une image en coupe verticale de ma peau, sur une profondeur de 350 μm. Cette image a été obtenue sans accumulation.

Comme on peut le voir, une résolution cellulaire est atteinte, et du signal est obtenu pour une profondeur jusqu'à $\sim$ 300 μm, là où la profondeur maximum atteinte en FF-OCM

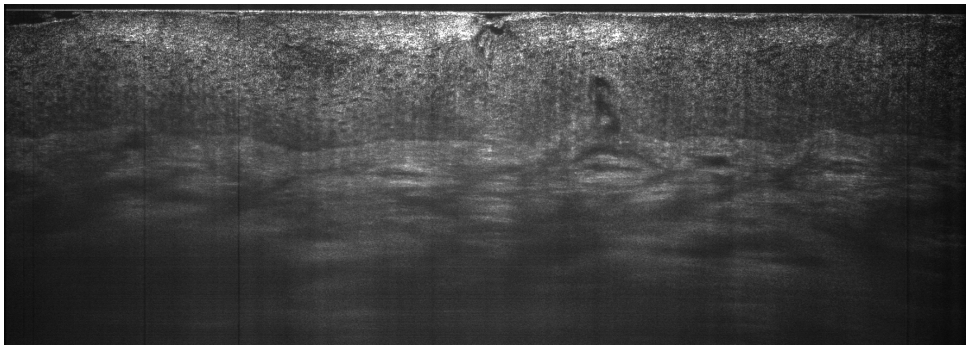

FIGURE 5.6 – Coupe verticale (B-scan) de peau humaine *in vivo* obtenue avec un système de LC-OCM. Champ : 990 μm $\times$ 350 μm (X $\times$ Z).

était de $\sim$ 200 μm. En particulier, la jonction epiderme/derme, dont la visualisation avait été identifiée comme cruciale, est très nettement visible.

Afin de comparer les performances de la LC-OCM et de la FF-OCM en terme de profondeur de pénétration, un échantillon d'oreille de souris (*ex vivo*) a été imagée en coupe verticale en utilisant les deux systèmes, sur une profondeur de 500 μm. Comme on l'a vu, le passage d'un système à l'autre est relativement simple, et l'échantillon a ainsi pu être imagé exactement à la même position avec les deux systèmes.

La figure 5.7 présente les images obtenues avec les deux systèmes. L'effet de l'accumulation est par ailleurs exploré, deux images, sans accumulation et avec 10 images accumulées, étant obtenues pour chaque système.

L'oreille de souris est un échantillon présentant une couche de cartilage à environ 200 μm en profondeur [200]. En FF-OCM, on devine cette couche si 10 images sont accumulées (elle n'est pas visible sans accumulation), tandis qu'elle est intégralement visualisée en LC-OCM sans accumulation, et il est possible de visualiser l'intégralité de l'oreille en profondeur avec 10 images accumulées. Le gain en profondeur de pénétration du LC-OCM est ainsi clairement mis en évidence, la LC-OCM permettant de visualiser des structures en profondeur indiscernables en FF-OCM.

5.3.1.3 SV-LC-OCM

Comme on l'avait vu, un défaut du système de SV-FF-OCM développé pour l'imagerie du flux sanguin (voir la partie 4.2.4.4) était sa faible sensibilité, ne permettant pas dans notre modèle de capillaire sanguin d'imager l'intégralité de l'intralipide en profondeur, et plus généralement, rendant compliqué l'application de mesures d'angiographie dans les tissus, au sein desquels les vaisseaux sanguins sont généralement en profondeur.

La technique de speckle variance a été implémentée en LC-OCM sur une série de B-scan acquis à la même position sur un modèle de capillaire sanguin légèrement différent de celui utilisé précédemment : du fait de la plus grande profondeur de pénétration, le capillaire rempli d'intralipide était placé *en profondeur* dans le silicone. Le signal revenant de l'intralipide est donc bien plus faible que pour l'échantillon précédemment développé. La figure 5.8 représente l'image de SV-LC-OCM obtenue, combiné avec une image tomographique. Comme on peut le voir, la sensibilité du système est assez bonne pour pouvoir imager intégralement l'intralipide, pourtant situé en profondeur dans le silicone très diffusant. La LC-OCM est ainsi une technique plus adaptée que la FF-OCM pour l'implémentation

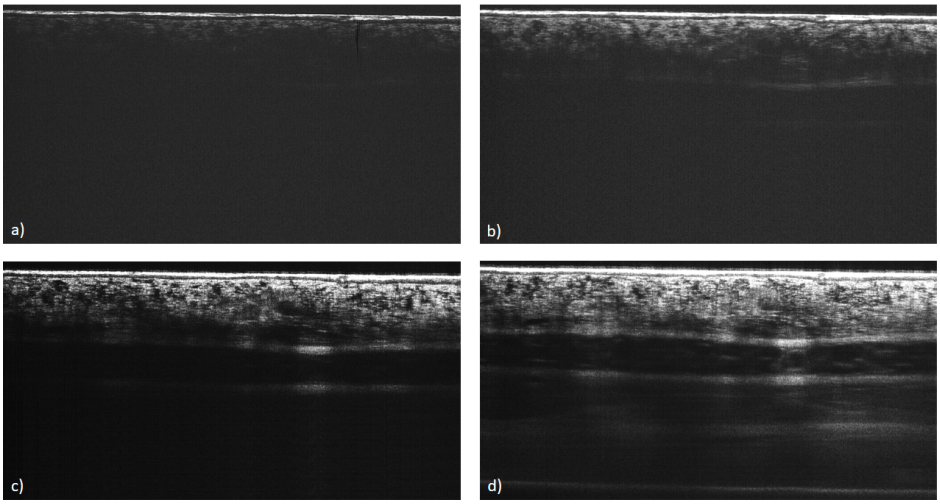

FIGURE 5.7 – Coupes verticales d'oreille de souris obtenues avec un système de FF-OCM sans accumulation (a) et avec 10 images accumulées (b), et avec un système de LC-OCM, sans accumulation (c) et avec 10 images accumulées (d). Champ : 990 μm $\times$ 500 μm (X $\times$ Z).

de techniques d'angiographie, du fait de sa profondeur de pénétration accrue permettant potentiellement d'imager les capillaires sanguins en profondeur dans les tissus. Notons cependant que l'intervalle temporel entre deux B-scans est élevé, et l'application de la SV-LC-OCM sur des échantillons *in vivo* est donc encore compliquée du fait qu'il ne doit pas y avoir de mouvement global de l'échantillon entre deux B-scans successifs pour éviter d'avoir des artefacts en SV-LC-OCM. De plus, comme on l'avait vu, des images de flux en coupe verticale sont généralement très peu parlantes.

On notera finalement qu'on s'est ici intéressé au SV-LC-OCM, cependant l'application de la méthode de FD-FF-OCM-A précédemment développé serait aussi très simplement applicable du fait de la nécessité d'acquérir des piles de lignes en LC-OCM (tout comme une démodulation par transformée de Fourier serait facilement applicable pour reconstruire les

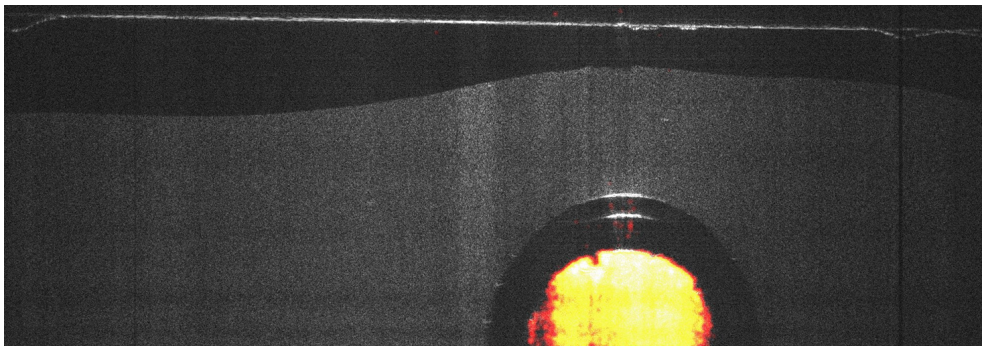

FIGURE 5.8 – Image d'un modèle de capillaire sanguin (capillaire rempli d'intralipide inséré dans du silicone blanc) en SV-LC-OCM, combiné avec une image tomographique de LC-OCM. Champ : 600 μm $\times$ 250 μm (X $\times$ Z).

B-scans). Notons que le problème de stockage posé en FD-FF-OCM-A du fait de la nécessité de conserver une piles d'images brutes est moins gênant en LC-OCM, où les images brutes sont des lignes, nécessitant beaucoup moins de mémoire que des images 2D.

5.4 Conclusion

Un système de LC-OCM permettant d'obtenir des images en coupes verticales d'échantillon *in vivo* a été développé. Ce système, analogue à un système de FF-OCM mais basé sur un éclairage des échantillons selon une ligne, permet d'augmenter la profondeur de pénétration en comparaison d'un système de FF-OCM, en combinant le filtrage interférométrique de la FF-OCM avec un filtrage confocal linéaire, tout en conservant la haute résolution spatiale de la FF-OCM. Le gain en pénétration de la LC-OCM a été démontré en imageant un même échantillon (oreille de souris ex vivo) avec un système de LC-OCM et de FF-OCM. L'éclairage « ligne » nécessite par ailleurs d'utiliser une source spatialement cohérente puissante (typiquement un laser supercontinuum), et permet d'atteindre des temps d'intégration très faibles pour saturer le capteur. Ainsi, des images de peau humaine *in vivo* ont pu être obtenues en LC-OCM , avec une profondeur de pénétration supérieure en comparaison du système de FF-OCM pour l'imagerie *in vivo* développé précédemment. Nous avons de plus montré qu'il était possible d'appliquer les méthodes d'imagerie du flux sanguin développées en FF-OCM à la LC-OCM. En particulier, la technique de *speckle variance* a été appliquée pour imager de l'intralipide s'écoulant dans un capillaire en LC-OCM.

Du fait de l'obtention d'images de résolution similaire aux images de FF-OCM, mais avec une plus grande profondeur de pénétration, la possibilité d'application de méthodes d'imagerie fonctionnelle et la possibilité d'imagerie *in vivo* sans avoir besoin d'optimisation particulière, la LC-OCM est une méthode très prometteuse. Le défaut majeur de la LC-OCM est cependant le coût élevé des sources spatialement cohérentes à spectre large, largement supérieur à celui des sources utilisées en FF-OCM.

Conclusion générale

Les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit se sont articulés autour du développement de systèmes de FF-OCM permettant de proposer des outils adaptés à l'imagerie anatomique et fonctionnelle de la peau humaine *in vivo*. L'objectif de ces travaux est d'aller vers la réalisation de dispositifs d'imagerie utilisables par les dermatologues dans le contexte du diagnostic du cancer de la peau.

Ainsi, une première étape de nos travaux a été de développer un système de FF-OCM adapté à l'imagerie de la peau, compact, et pouvant acquérir des images tomographiques 3D d'échantillons à partir d'un unique degré de liberté, le rendant particulièrement simple d'utilisation. A partir de ce système, nous avons montré qu'un éclairage par une unique LED blanche permettait d'atteindre des performances identiques à celles obtenues en éclairage par lampe halogène, tout en bénéficiant des nombreux avantages de l'éclairage LED : compacité, faible coût, très bon rendement énergétique... Nous avons ainsi développé un système de FF-OCM par éclairage à LED blanche, ayant une résolution de 0.7 μm $\times$ 1.8 μm (axial $\times$ latéral), et une sensibilité de détection de 70 dB. Des images de têtard et de peau humaine *ex vivo* ont validé que ce système à LED permettait d'obtenir des images de qualité identique à celles obtenues avec un système conventionnel à éclairage par lampe halogène.

Cependant, la puissance de la LED n'était pas suffisante pour atteindre des vitesses d'acquisition permettant d'imager des échantillons *in vivo*. Afin de proposer un système adapté à l'imagerie de la peau *in vivo* tout en bénéficiant des avantages de l'éclairage LED, une LED de haute puissance a par la suite été utilisée, en combinaison avec un interféromètre compact ($11 \times 11 \times 5$ cm^3, 210 g), optimisé pour maximiser la sensibilité de détection, permettant finalement d'obtenir des images tomographique à une cadence de 50 Hz, avec une sensibilité de 74 dB, tout en conservant une très haute résolution spatiale (0.9 μm $\times$ 1.2 μm (axial $\times$ latéral)). L'interféromètre a par ailleurs été modifié pour pouvoir acquérir des images en continu à une profondeur fixée dans l'échantillon, permettant ainsi d'afficher en temps réel les images tomographiques obtenues. Des images de peau humaine *in vivo* à différentes profondeurs ont été obtenues sur ce système. Ce système de FF-OCM à éclairage LED est simple, compact et adapté à l'imagerie à haute résolution en temps réel de la peau humaine *in vivo*. Cependant, pour pouvoir imager profondément dans la peau (jusqu'à $\sim$ 150 μm), il a été nécessaire de diminuer la taille du champ d'observation, en passant d'un champ de 990 μm $\times$ 990 μm (sur le premier montage à LED) à un champ de 240 μm $\times$ 240 μm. Ceci constitue la principale limitation de ce système (qui pourrait être surmontée par le développement de caméras plus rapides), avec la faible sensibilité (inhérente à la FF-OCM) en comparaison aux systèmes d'OCT conventionnels.

A partir de ce montage à haute vitesse, nous nous sommes proposés d'étudier l'implémentation de méthodes d'angiographie (cartographie, voire caractérisation, des écoulements sanguins) en FF-OCM. De telles méthodes ont largement été implémentées en OCT conventionnelle, donnant des résultats très intéressants pour de nombreuses applications médicales, y compris en dermatologie, mais avaient très peu été explorées en FF-OCM. Nous avons ici développé quatre méthodes d'angiographie en FF-OCM, basées sur une analyse des images interférométriques (temporelle ou fréquentielle), des images de phase ou des images tomographiques conventionnelles d'amplitude. Seule une de ces méthodes avait déjà été étudiée en FF-OCM, pour une application différente. Ces différentes méthodes ont toutes été testées sur un modèle de capillaire sanguin constitué d'intralipide s'écoulant dans un capillaire en verre placé dans du silicone diffusant. Elles ont permis d'isoler l'intralipide en mouvement, démontrant la possibilité d'imager des écoulements à très haute résolution en FF-OCM. Nous avons montré que la méthode basée sur l'analyse d'images tomographiques, la plus simple à implémenter, permettait d'imager l'intralipide en écoulement à des vitesses de 0 à 45 mm/s. Cependant, la sensibilité du système FF-OCM était insuffisante pour tester ces méthodes sur des écoulements sanguins *in vivo*.

Nos travaux ont par ailleurs aussi porté sur l'implémentation d'une autre méthode d'imagerie fonctionnelle en FF-OCM : l'imagerie polarimétrique, permettant d'obtenir des images d'échantillons dont le contraste dépend de leurs propriétés polarimétriques, celles-ci pouvant apporter des informations très utiles, notamment en dermatologie. L'imagerie polarimétrique en FF-OCM a déjà été étudiée, mais en se basant toujours sur un montage identique permettant de mesurer la biréfringence des échantillons. Nous nous sommes proposé ici d'implémenter une méthode d'optimisation permettant de modifier le montage conventionnel de FF-OCM polarimétrique de manière à obtenir des images présentant un contraste polarimétrique maximal entre deux zones d'un échantillon donné. Ce travail a été mené dans le cadre d'un séjour de deux mois à l'université Stanford, au cours duquel un montage de FF-OCM polarimétrique a été développé, et la méthode d'optimisation testée avec succès sur un échantillon simple (maximisation du contraste entre deux zones d'orientation différentes dans un film polarisant). Si du travail reste à faire pour pouvoir appliquer cette méthode sur des échantillons biologiques, nos travaux ont montré pour la première fois qu'il était possible d'améliorer le contraste de la FF-OCM polarimétrique simplement en adaptant le montage à une situation donnée, à partir d'une méthode d'optimisation encore jamais utilisée à l'échelle microscopique sur des systèmes capables d'imager en profondeur.

A partir de nos travaux, nous avons identifié que la profondeur de pénétration de la FF-OCM était insuffisante pour le développement d'outils pouvant effectivement être utilisés par les dermatologues et permettant l'implémentation de méthodes d'imagerie fonctionnelle. Afin de remédier à ce problème, nous nous sommes intéressés au développement d'un nouveau système, identique au système de FF-OCM précédemment développé, mais dont l'éclairage se fait selon une ligne obtenue à partir d'un laser supercontinuum plutôt que sur l'ensemble du champ d'observation. Cette méthode (la microscope par cohérence optique confocale à éclairage « ligne », ou LC-OCM) permet ainsi de combiner le filtrage interférométrique de la FF-OCM avec un filtrage confocal linéaire pour en améliorer la sensibilité et ainsi la profondeur de pénétration. Un système basé sur cette méthode a été construit et a permis d'obtenir des images de peau humaine *in vivo*, avec une profondeur de pénétration supérieure à 300 μm. et une résolution spatiale du même ordre qu'en FF-OCM (0.8 μm $\times$ 1.2 μm (axial $\times$ latéral)). Nous considérons ce système comme étant

très prometteur pour répondre aux besoins des dermatologues, mais il nécessite une source d'illumination plus onéreuse qu'en FF-OCM.

Il semble ainsi que le prolongement logique des travaux engagés durant cette thèse serait d'aller vers le développement d'un système de LC-OCM optimisé pour l'imagerie médicale. Pour ce faire, plusieurs pistes sont à envisager :

— La maximisation du champ d'observation : Dans notre système, le champ d'observation ne correspond pas au champ maximal pouvant être imagé par les objectifs de microscope. Augmenter la taille du champ observé pour tirer profit du champ de vision disponible des objectifs, en utilisant une lentille de tube et une caméra différentes, semble ainsi impératif.

— L'amélioration de la profondeur de pénétration : Si la combinaison du filtrage interférométrique et du filtrage confocal permet déjà d'atteindre des grandes profondeurs de pénétration en comparaison à la FF-OCM, les images obtenues au cours de nos travaux étaient acquises sans accumulation, avec une source de spectre centré vers le visible. En combinant l'accumulation avec une source centrée vers le proche infrarouge, on pourra certainement atteindre des profondeurs de pénétration supérieures. Cependant, le décalage vers l'infrarouge implique une perte de résolution, il est donc nécessaire de déterminer le meilleurs compromis entre profondeur de pénétration et résolution spatiale. Afin d'optimiser l'imagerie en profondeur, le développement de méthodes d'optique adaptative, déjà largement étudiées en OCT conventionnelle [201], pourrait s'avérer intéressant pour réduire la perte en résolution due à la diffusion plus importante en profondeur dans les tissus.

— Le développement d'un système de LC-OCM portatif : Le système développé au cours de cette thèse était basé sur un interféromètre compact, cependant l'ensemble du système était encore loin d'être portatif. La miniaturisation des autres éléments du système (voie d'éclairage et d'imagerie) permettrait d'obtenir un outil manipulable à la main permettant aux dermatologues d'imager facilement n'importe quelle partie de la peau d'un patient.

— L'application des méthodes d'angiographie en LC-OCM : les méthodes d'angiographie développées durant ma thèse sont directement applicables à la LC-OCM. Nous avons déjà montré que la technique de *speckle variance* fonctionnait parfaitement en LC-OCM sur un modèle de capillaire sanguin. Il faudrait à présent tester ces méthodes pour imager la microvasculature de la peau. D'autres méthodes d'imagerie fonctionnelle, telle que l'imagerie polarimétrique, déjà étudiée dans nos travaux, l'imagerie à contraste moléculaires ou encore l'élastographie pourrait aussi être envisagées en LC-OCM.

Cependant, au-delà de ces améliorations techniques de la LC-OCM, n'oublions pas que ce système est avant tout destiné aux dermatologues : l'établissement de la LC-OCM comme une technique effectivement utile pour l'imagerie dermatologique se fera ainsi avant tout via des tests cliniques, qui constituent une prochaine étape importante du travail effectué durant cette thèse.

Annexe A

Microscopie optique

La microscopie a été développée dans le but de pouvoir observer des structures trop petites pour être observées à l'œil nu. Afin de comprendre la manière dont fonctionne un microscope, commençons par nous intéresser à ce qui limite l'œil pour la visualisation des petites structures.

L'œil est un système d'imagerie d'optique : composé de lentilles (la cornée et le cristallin) baignant dans du liquide (humeur aqueuse et humeur vitrée), il collecte les rayons lumineux incidents (limités par sa pupille) et les focalise sur un capteur photosensible (la rétine) de telle manière que tous les rayons issus d'un point de l'objet observé sont focalisés en un seul point sur la rétine. La figure A.1.a représente schématiquement l'imagerie d'un objet par l'œil, en considérant une seule lentille pour représenter l'ensemble {cornée+cristallin}.

Comment faire pour observer un petit objet à l'œil ? La réponse est a priori intuitive : l'approcher au plus près de manière à le « voir le plus grand possible ». Autrement dit, à ce que son image occupe le plus de place possible sur la rétine, d'un point de vue optique, que le rayon principal (rayon (BOB') sur la figure A.1.a) soit le plus incliné possible, ce qui correspond à un grandissement maximal par le système optique que constitue l'œil [1]. Dans un système optique habituel, le grandissement est fixé par la disposition des lentilles et leurs focales. Cependant, le cristallin a une focale variable, et ainsi le grandissement est variable et sera d'autant plus important qu'on approche l'objet de l'œil. Mais dans une certaine limite : si l'on approche l'objet trop près, le cristallin n'a plus la capacité de bien focaliser les rayons sur la rétine. Ceci est illustré sur la figure A.1.b. La position de l'objet la plus proche de l'œil pour laquelle il est encore possible pour l'ensemble {cornée+cristallin} de former une image sur la rétine est défini comme étant le *punctum proximum*. L'objectif du microscope est donc de dépasser cette limitation et de permettre à l'œil de former des images nettes d'objets comme s'ils étaient en deçà du *punctum proximum*, c'est à dire avec un grandissement plus grand que celui imposé à l'œil par cette limite. Notons finalement qu'au repos, la focale du cristallin est telle que l'ensemble {cornée+cristallin} focalise bien sur la rétine les rayons lumineux provenant de l'infini, comme illustré sur la figure A.1.c. Dans ces conditions, la taille d'un objet (à l'infini) peut être défini par sa taille angulaire (α sur la figure), directement liée à la taille de son image sur la rétine.

1. Grandissement d'un sytème optique : $G = \frac{A'B'}{AB}$ avec AB la taille de l'objet et $A'B'$ la taille de l'image de l'objet faite par le système optique.

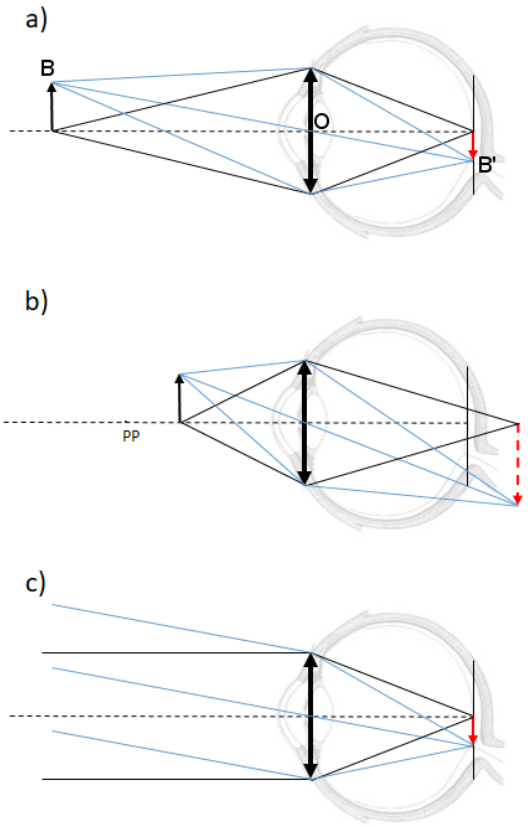

FIGURE A.1 – a) Schéma de l'imagerie d'un objet par l'oeil, b) schéma de l'imagerie d'un objet situé en deçà du *punctum proximum* (PP), c) schéma de l'imagerie d'un objet à l'infini.

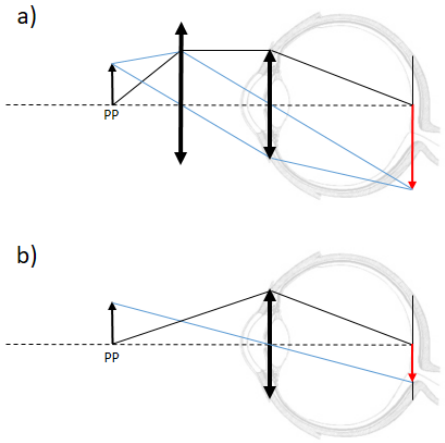

FIGURE A.2 – Principe de la loupe : a) imagerie d'un objet en utilisant une loupe, b) imagerie du même objet à l'œil, l'objet étant placé au *punctum proximum*.

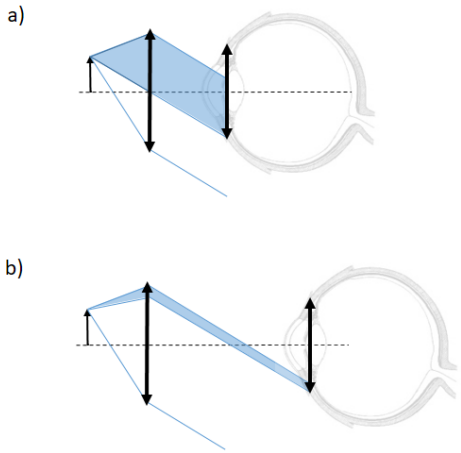

FIGURE A.3 – Rayons lumineux issus du point de l'objet le plus excentré de l'axe optique collectés par l'œil après une loupe, pour deux positions de l'œil.

A.1 Optique du microscope

Le système optique le plus simple permettant de grossir un objet au-delà de la limite de l'œil est une simple lentille convergente. C'est le principe de la loupe, illustré sur la figure A.2. En plaçant un objet à la distance focale de la lentille, ses rayons sont renvoyés à l'infini après passage par la lentille, la taille de l'objet peut alors être caractérisé par une certaine taille angulaire, et l'œil peut l'imager avec un cristallin au repos. Si la taille angulaire (lié à la focale de la lentille utilisée) est plus importante que l'angle du rayon principal lorsque l'objet est imagé par l'œil à son *punctum proximum*, alors la limite de l'œil en terme de grandissement est dépassée.

L'utilisation d'une lentille simple pose cependant des problèmes. Un problème facilement visible est celui du *vignettage* et de la limitation du *champ d'observation*[2] (taille de la zone de l'objet pouvant être imagée après passage par le système optique) : après passage

2. ou FOV pour *field of view* en Anglais.

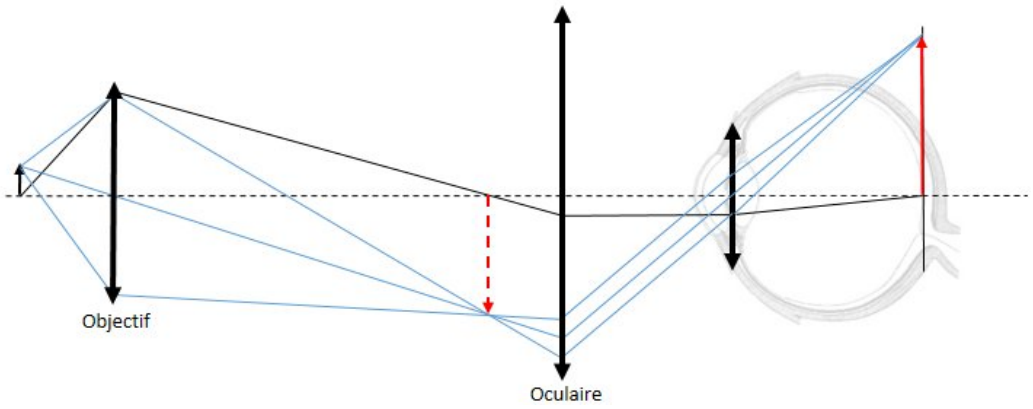

FIGURE A.4 – Schéma du microscope le plus basique, à deux lentilles.

par la lentille, seule une partie des rayons lumineux (à l'infini) vont pouvoir être collectés par l'œil (limitation par sa pupille). Il est clair (voir figure A.3) qu'à moins que la pupille de l'œil ne soit confondue avec celle de la lentille (à savoir la lentille elle-même si le système optique se limite à une lentille simple), les rayons les plus inclinés (correspondant aux points de l'objets les plus excentrés de l'axe optique) seront en partie coupés, et moins de lumière parviendra à l'œil pour ces rayons (phénomène de vignettage), ou pourront même ne pas du tout être collectés par la rétine (limitation du champ d'observation). Une solution à ce problème est d'utiliser une seconde lentille pour imager la pupille de la première lentille à une position dans l'espace où l'utilisateur pourra venir placer la pupille de son œil sans contraintes physiques. Comme on l'a dit, lorsque les pupilles sont confondues, les problèmes évoquées précédemment disparaissent. On s'arrange alors pour les rayons soient renvoyés à l'infini après la deuxième lentille (la première lentille forme une image de l'objet au foyer de la deuxième), pour que l'imagerie puisse toujours être faite par l'œil avec un cristallin au repos. Ce système à deux lentilles est illustré en figure A.4), et constitue la base du microscope. La première lentille est appelée *objectif* du microscope, la seconde est appelée *oculaire*.

Les objectifs sont souvent conçus pour imager des objets placés à leur distance focale, de telle manière que les rayons lumineux sont renvoyés à l'infini en sortie de ces objectifs. Lorsqu'on utilise de tels objectifs (en conjugaison infini/foyer), il est alors nécessaire d'utiliser une lentille entre l'objectif et l'oculaire, pour former l'image qui sera ensuite renvoyée à nouveau à l'infini par l'oculaire, tout en pouvant maintenir le renvoi de la pupille du système dans une zone accessible à la pupille de l'œil. Cette troisième lentille est appelée *lentille de tube*. L'intérêt de ces objectifs et de pouvoir utiliser des objectifs de différentes focales avec la même structure {lentille de tube+oculaire}. La figure A.5) illustre cette configuration.

Notons finalement que si une caméra est utilisée, l'oculaire n'a alors plus lieu d'être : si l'on considère une caméra comme étant simplement un capteur photosensible, il suffit de la placer à la position où l'image intermédiaire (renvoyée à l'infini par l'oculaire pour une imagerie à l'œil) est formée (en sortie de l'objectif ou de la lentille de tube) pour pouvoir obtenir une image. Une caméra étant utilisée au cours de nos travaux, c'est ce cas qui nous intéresse. Par ailleurs, des objectifs infini/foyer sont utilisés : dans ces conditions, le

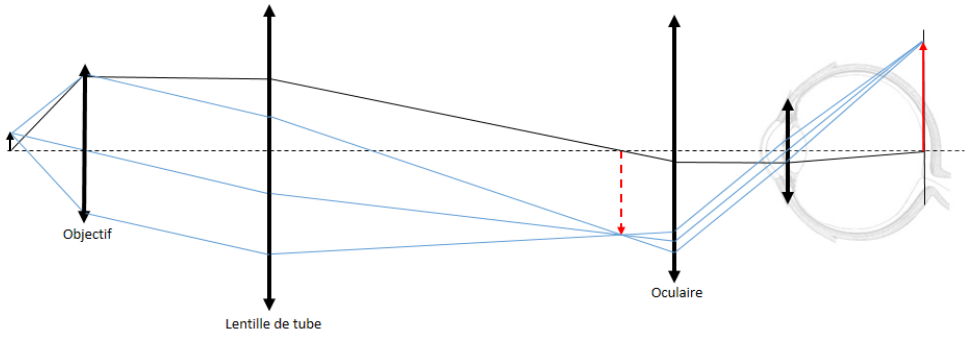

FIGURE A.5 – Schéma du microscope avec objectif en conjugaison infini/foyer.

grandissement G du système est simplement donné par

$$G = \frac{f_{Lt}}{f_{obj}}, \tag{A.1}$$

avec f_{Lt} la focale de la lentille de tube et f_{obj} la focale de l'objectif.

A.2 Objectifs, résolution et aberrations

L'objectif est l'élément essentiel du microscope. C'est lui qui collecte la lumière directement issue de l'échantillon. Comme expliqué précédemment, le grandissement du microscope dépend en partie de la focale de l'objectif, cependant les constructeurs n'ont pas pour usage de donner la focale des objectifs dans leurs specifications : en général, c'est le grandissement *de l'objectif* qui est donné, donnant le rapport entre la taille de l'image (intermédiaire) formée par l'objectif et la taille de l'objet, en indiquant en parallèle la distance entre les plans d'appui de l'objectif et de l'oculaire (liée à la distance de l'objectif à laquelle l'image intermédiaire est formée dans les conditions d'utilisation pour lesquelles l'objectif a été conçu), appelée *longueur de tube*. Pour les objectifs en configuration infini/foyer, le grandissement indiqué correspond au rapport entre la taille de l'image formée par la lentille de tube, *en considérant pour celle-ci une focale propre au constructeur*. Le tableau A.1 donne les focales de lentilles de tubes propres aux quatre principaux constructeurs d'objectifs. Si besoin, on peut ainsi retrouver la focale de l'objectif par la relation

$$f_{obj} = \frac{f_{Lt,constructeur}}{G_{obj}}, \tag{A.2}$$

avec $f_{Lt,constructeur}$ la focale de la lentille de tube propre au constructeur et G_{obj} le grandissement indiqué pour l'objectif.

Cependant le grandissement n'est pas la donnée la plus essentielle du microscope. En effet, obtenir l'image la plus grande possible d'un échantillon n'a que peu d'intérêt si :

1. Le grandissement implique une perte de champ d'observation.
2. L'objet est agrandie, mais il est impossible de discerner les structures les plus fines de l'échantillon.

D'après cette remarque, les deux grandeurs les plus importantes de l'objectif sont donc sont donc :

Constructeur	*focale de lentille de tube associée (mm)*
Leica	200
Nikon	200
Olympus	180
Zeiss	165

TABLE A.1 – Focales de lentilles de tube propres aux quatre principaux constructeurs d'objectifs de microscope. Extrait de www.microscopyu.com

1. Son champ d'observation (FOV) : la taille (a priori un diamètre) de la zone de l'échantillon pouvant être imagée sans perte de lumière, directement lié à l'agencement physique des éléments constituant l'objectif (composé en réalité de plus d'une lentille). Cette donnée est parfois indiquée par les constructeur sous la forme du numéro de champ FN (pour *field number* en Anglais), lié au champ d'observation par
$$FOV = \frac{FN}{G_{obj}}(mm). \tag{A.3}$$
2. Sa limite de résolution : la finesse maximale des structures qu'il est capable de discerner.

Afin de comprendre de quel paramètre de l'objectif dépend sa résolution, reprenons le raisonnement présenté à la partie 1.2.2 (cas d'un échantillon mince) : plus les structures sont fines, plus elles correspondent à une fréquence spatiale élevée contenue dans $O(x, y)$, et ainsi à un angle de diffraction élevé. Ainsi, la fréquence spatiale f_s la plus grande pouvant être vue par l'objectif (et donc la structure la plus fine, de taille $\frac{1}{f_s}$, pouvant être résolue) est liée à l'angle maximal de la lumière que l'objectif peut admettre. D'après l'équation 1.5 cette fréquence maximale vaut

$$f_{s,max} = \frac{n_d \sin(\theta_{d,max})}{\lambda}. \tag{A.4}$$

Dans cette équation, n_d et $\theta_{d,max}$ correspondent à l'indice de l'échantillon, et à l'angle diffracté dans l'échantillon. Cependant, le produit $n \sin(\theta)$ est un invariant au cours de la propagation dans un système optique (loi de Descartes), et on peut donc finalement avoir

$$f_{s,max} = \frac{n_{im} \sin(\mathrm{U})}{\lambda}, \tag{A.5}$$

avec n_{im} l'indice du milieu dans lequel l'objectif est immergé (l'*indice d'immersion*), et U l'angle maximal admis par l'objectif (voir figure A.6). C'est donc le produit de ces deux grandeurs qui détermine la résolution de l'objectif. On définit ainsi l'*ouverture numérique* de l'objectif (NA, pour *numerical aperture* en Anglais) :

$$NA = n_{im} \sin(\mathrm{U}). \tag{A.6}$$

Afin que l'ouverture numérique (et donc la résolution) ne varie pas en fonction du champ, les objectifs de microscope sont conçus de telle manière que leur pupille soit placée dans leur plan focal arrière : ainsi, l'objectif récupère un cone de lumière identique pour tous les points du champ, comme illustré sur la figure A.7 a). L'objectif est dit *télécentrique* (dans l'espace objet).

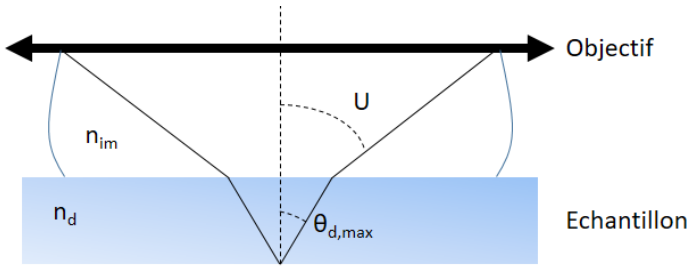

FIGURE A.6 – Définition de l'ouverture numérique de l'objectif.

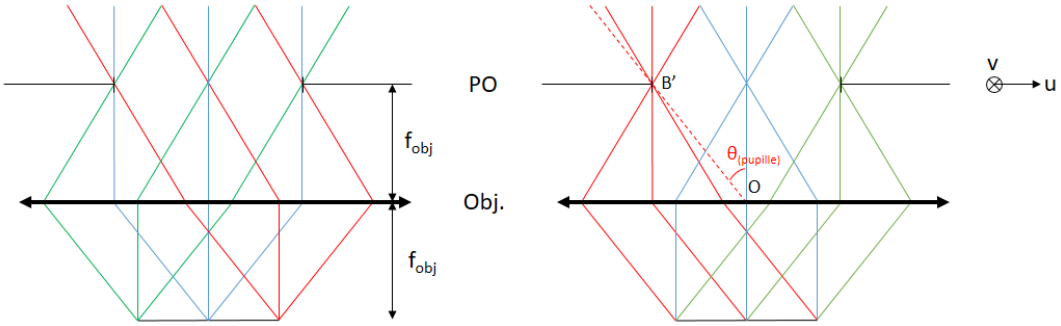

FIGURE A.7 – a) Illustration de la télécentricité de l'objectif. b) Focalisation de chaque direction correspondant à une fréquence spatiale. PO : pupille de l'objectif.

Notons que la lumière (diffractée) dans une direction donnée est focalisée en un point au niveau de la pupille, comme illustré sur la figure A.7 b). Ainsi, au niveau de la pupille, chaque point correspond à une fréquence spatiale, et l'intensité en ce point indique la « quantité » de cette fréquence spatiale contenue dans l'échantillon. On retrouve donc dans le plan de la pupille la quantité $\omega(u, v)$ définie à l'équation 1.4. L'association fréquence spatiale↔angle devient dans le plan de la pupille une association fréquence spatiale↔position. A partir de la figure A.7 b), on peut montrer qu'on a [3]

$$n_{im} \sin(\theta) = \frac{u}{f_{obj}} \tag{A.7}$$

$$\text{d'où } f_s \lambda = \frac{u}{f_{obj}} \text{ d'après (A.5)} \tag{A.8}$$

$$\text{et ainsi } f_s = \frac{u}{\lambda f_{obj}}, \tag{A.9}$$

donnant la relation entre la position u au niveau de la pupille et la fréquence spatiale associée f_s [4]. On peut ainsi directement déterminer le lien entre le diamètre de la pupille

3. Dans la figure A.7 b), il est important de noter que la distance de la lentille simple (modélisant l'objectif) à laquelle la lumière est focalisée vaut f_{obj}, mais selon la direction du rayon principal. C'est donc la distance OB' qui vaut f_{obj}, et la focalisation ne se fait pas exactement dans le plan de la pupille (à moins de considérer des angles assez faibles de telle manière que $\tan(\theta) \approx \sin(\theta) \approx \theta$). Cependant en réalité, les objectifs (constitués de plus d'une lentille...) sont conçus de manière à corriger cet effet, et la focalisation peut effectivement se faire dans le plan de la pupille. Notons de plus que la pupille est a priori dans l'air : au niveau de la pupille, l'angle $\theta_{(pupille)}$ est donc en fait tel que $\sin(\theta_{(pupille)}) = n_{im} \sin(\theta)$.

4. Le raisonnement est ici effectué à 1 dimension. Dans un objet à 2 dimensions, une notion d'orientation

de l'objectif $\varnothing_{obj}$ et son ouverture numérique :

$$\varnothing_{obj} = 2\,NA\,f_{obj}. \tag{A.10}$$

C'est ainsi la taille de la pupille qui détermine la limite de résolution de l'objectif.

Il est utile d'introduire ici la notion de *cohérence spatiale* de l'éclairage. Jusqu'à maintenant, nous avons uniquement considéré des échantillons éclairés par des ondes planes, se propageant dans une unique direction. La cohérence spatiale de la lumière est liée à l'étendue de la source lumineuse (où à l'étendue angulaire de la lumière une fois collimatée) : une source ponctuelle est totalement cohérente, tandis qu'une source s'étendant à l'infini est totalement incohérente. Ainsi, tous les raisonnements ont été fait en considérant une source cohérente spatialement (étendue angulaire nulle une fois collimatée). Avec une telle source toute la lumière diffractée dans n'importe quel angle θ est intégralement récupérée par l'objectif, jusqu'à une certaine limite, correspondant à l'angle U. Dans le plan de la pupille, cela correspond au fait que chaque angle θ correspond à deux points (voir figure A.7 b)) : tant que les deux points sont inclus dans la pupille, toute la lumière associée à la fréquence spatiale est récupérée. Toutes les fréquences associées à un angle inférieur à U sont donc récupérées aussi bien les unes que les autres par l'objectif : elles sont vues avec un *contraste* identique. La limite de résolution correspond à $f_{s,max}$ définie à l'équation A.5.

Dans le cas d'un éclairage incohérent spatialement, l'étendue angulaire du faisceau collimatée s'étend à l'infini mais la lumière qui sera effectivement récupérée par l'objectif est de toute façon limitée par son ouverture numérique. Ainsi une source se définit comme incohérente spatialement par rapport à un objectif donné si son étendue angulaire est supérieure ou égale à $\arcsin(NA)$ (en considérant que la source est collimatée dans l'air). Dans le cas d'une source incohérente, les effets de diffraction des différentes directions d'éclairage s'additionnent. Dans le plan de la pupille, la diffraction pour une fréquence spatiale donnée ne correspond plus à deux points, mais à deux taches, correspondant à l'addition des effets de tous les rayons correspondant à toutes les inclinaisons admises par l'objectif, et couvrant finalement toute la pupille. La figure A.8 représente la différence entre les figures de diffractions pour une fréquence spatiale donnée entre les cas cohérent et incohérent. On voit que dans le cas incohérent, la quantité de lumière perçue par l'objectif baisse continument à mesure que la fréquence spatiale augmente, jusqu'à une fréquence spatiale maximale correspondant à la situation ou les deux taches de diffraction sont tangentes à la pupille. La limite de résolution dans le cas incohérent correspond donc à :

$$f_{s,max,incoherent} = \frac{\varnothing_{obj}}{\lambda f_{obj}} \tag{A.11}$$

$$= \frac{2NA}{\lambda}\,. \tag{A.12}$$

d'après les équations A.9 et A.10. Un éclairage spatialement incohérent permet donc d'imager des fréquences spatiales inaccessibles en éclairage spatialement cohérent (bien qu'avec un constraste réduit). D'autre part, en éclairage spatialement cohérent, il est possible que les interférences entre les structures de l'échantillon créent des *artefacts* dans les images, c'est à dire des informations ne correspondant pas à des informations sur la morphologie de l'échantillon, mais dues à la façon dont les images sont acquises. Ces artefacts sont dues

de la fréquence est introduite, mais le distance à l'origine r d'un point dans la pupille correspond toujours bien à $f_s = \frac{r}{\lambda f_{obj}}$.

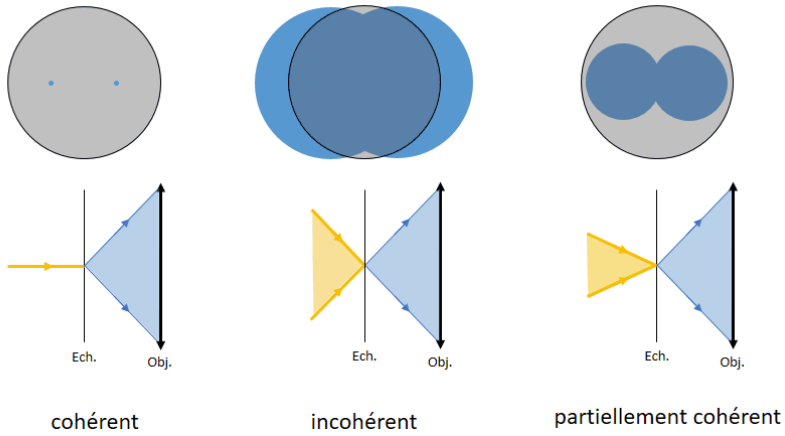

FIGURE A.8 – Illustration des trois cas cohérent, incohérent et partiellement cohérent spatialement, pour l'éclairage d'un point donné, et dans le plan de la pupille pour une fréquence spatiale donnée.

aux interférences pouvant avoir lieu entre les structures de l'échantillon. En éclairage incohérent spatialement, des interférences ont lieu pour toutes les directions d'illumination, et leur superposition moyenne leurs effets : les images en éclairage incohérent sont dénuées d'artefacts liés aux interférences. Ainsi, l'éclairage incohérent spatialement est souvent préféré en microscopie. Il est évidemment aussi possible d'avoir une source partiellement cohérente, dont l'étendue angulaire ne couvre pas toute la pupille, correspondant à un cas intermédiaire entre les cas cohérent et incohérent : les taches de diffraction ne couvrent pas toute la pupille, et sont donc totalement récupérées jusqu'à une certaine fréquence spatiale (inférieure à $\frac{NA}{\lambda}$), après quoi on observe une diminution du contraste des fréquences spatiales jusqu'à une fréquence spatiale maximale inférieure à $\frac{2NA}{\lambda}$. Les figures A.8 et A.9 résument les trois situations et le contraste des fréquences spatiales perçues. Notons que la fonction du contraste en fonction de la fréquence spatiale est appelée *fonction de transfert de modulation* (ou MTF pour *modulation transfer function* en Anglais).

Cette façon de définir la résolution d'un objectif est la plus complète et appropriée à la microscopie, cependant un autre critère caractérisant la résolution est souvent utilisé. On a vu que la limitation angulaire de l'objectif entrainait un filtrage passe-bas des fréquence spatiale (voir figure A.9). Par ce même effet de filtre passe-bas, si l'on considère un objet ponctuel ($O(x, y) = \delta(x, y)$), il est impossible pour l'objectif d'en former une image restant ponctuel. On peut montrer que l'image d'un objet ponctuel est en fait une figure de diffraction correspondant à la diffraction par la pupille de l'objectif, appelée *tache d'Airy*. En considérant l'objectif comme un filtre, la tache d'Airy correspond à la *réponse impulsionnelle* du filtre, ou PSF pour *point spread function* en Anglais. Par retour inverse de la lumière, on peut montrer que dans le cas d'un échantillon quelconque, la plus petite zone dont l'objectif peut récupérer la lumière correspond à la PSF dans l'espace de l'échantillon, donnée par :

$$h(u) = \frac{2J_1(u)}{u}, \tag{A.13}$$

avec $u = \frac{2\pi}{\lambda} r\, NA$ avec r la distance radiale au centre de la PSF, et J_1 la fonction de Bessel du premier ordre. La figure A.10 représente la forme de la PSF.

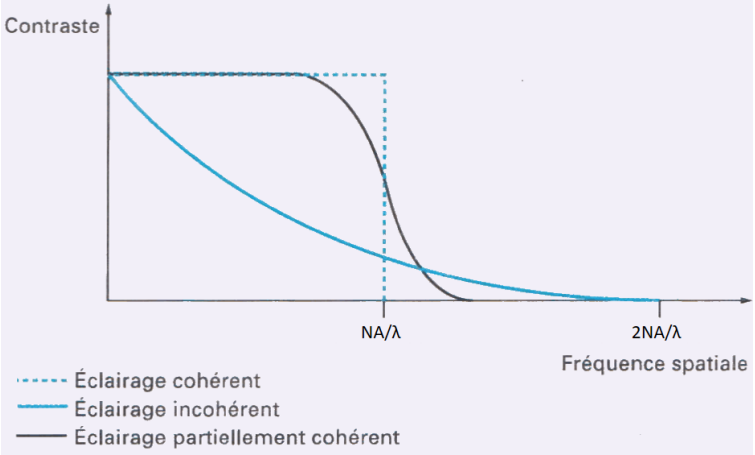

FIGURE A.9 – Fonctions de transfert de modulation pour les trois cas cohérent, incohérent et partiellement cohérent spatialement [202].

Le diamètre de la PSF peut donc être vue comme correspondant au diamètre de la plus petite structure pouvant être vue par l'objectif. Le diamètre de la PSF est donnée par :

$$\Delta x = \frac{0.61\lambda}{NA}. \tag{A.14}$$

Ce diamètre correspond à la distance entre les deux annulations autour du pic central de la PSF (identique dans le cas d'un éclairage spatialement cohérent ou incohérent). Une définition alternative du diamètre la plus petite structure pouvant être vue par l'objectif correspond à la largeur à mi-hauteur (ou FWHM pour *full width at half maximum* en Anglais) de la PSF.

Définir la résolution comme la largeur de la PSF est en pratique très utile, et plus simple que de considérer la MTF. C'est donc ce critère que nous conserverons pour caractériser la résolution des objectifs, bien qu'il ne soit pas le plus approprié à la microscopie [5].

Notons que la PSF considérée jusqu'ici est une fonction en deux dimensions, correspondant à la lumière récupérée par l'objectif dans un plan donné. Cependant, si l'on considère un échantillon épais, l'objectif recupère de la lumière de tout un volume tridimensionnel. On peut donc aussi définir une PSF axiale, correspondant à la plus petite zone dont l'objectif peut récupérer la lumière dans la direction axiale (direction d'illumination). Cette zone est appelée *profondeur de champ* de l'objectif. La figure A.11 représente l'allure typique de la PSF axiale d'un objectif de microscope. En considérant pour critère que le déplacement d'un objet ponctuel depuis la position où il est parfaitement focalisé par rapport à l'objectif ne doit pas introduire une différence de marche supérieure à $\frac{\lambda}{4}$ (tolérance de Lord Rayleigh), on peut montrer que la profondeur de champ (largeur de la PSF axiale) vaut

$$\Delta z = \frac{0.5\lambda}{n_{im}(1-\cos(\mathrm{U}))} \text{ [202]}, \tag{A.15}$$

La profondeur de champ est d'autant plus faible que l'ouverture de l'objectif est élevée,

5. Ce critère est adapté en astronomie, où l'objectif est bien souvent de résoudre des points très proches, caractérisés par des taches d'Airy.

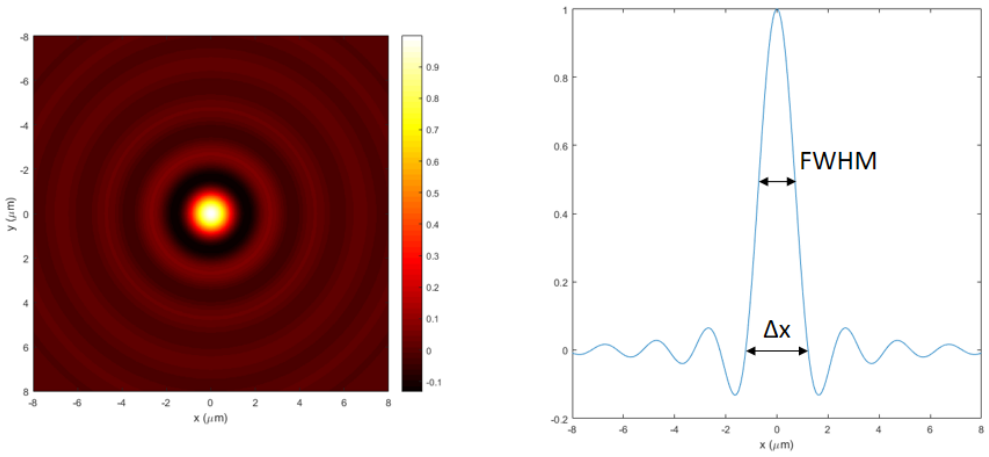

FIGURE A.10 – Tache d'Airy d'un objectif ouvert à 0.3 ($NA = 0.3$) en considérant une longueur d'onde d'illumination $\lambda = 600nm$, en 2D et en coupe (éclairage spatialement cohérent).

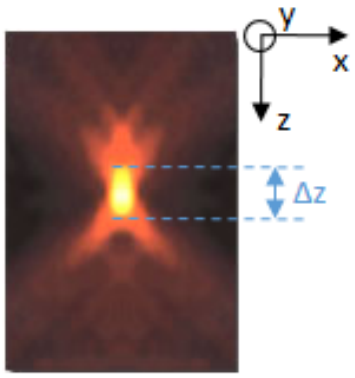

FIGURE A.11 – Allure de la PSF axiale d'un objectif de microscope, avec z la direction d'illumination. Extrait de http ://www.olympusmicro.com.

et donc que la résolution (latérale) de l'objectif est élevée (Δx faible).

Le volume $\Delta x \times \Delta x \times \Delta z$ constitue ainsi le *voxel de résolution* de l'objectif. Δx correspond à la *résolution latérale* de l'objectif, tandis que Δz correspond à sa *résolution axiale*.

Indiquons finalement que la correction des aberrations est l'enjeu majeur de la conception d'un objectif de microscope. En effet, nous avons indiqué que le diamètre de la pupille limitait la résolution de l'objectif. Cependant, ce sont les aberrations qui limitent réellement le diamètre de la pupille lors de la conception de l'objectif. Plus les angles que l'objectif admet sont élevés, plus la pupille peut être grande, mais plus il est difficile d'avoir une bonne focalisation des rayons par l'objectif. Les aberrations optiques correspondent au fait que le système optique ne dévie pas les rayons de la bonne manière pour avoir un point objet focalisé en un point image [6]. On distingue cinq grands types d'aberrations : aberration sphérique, coma, astigmatisme, courbure de champ, distorsion. Sans entrer dans les détails des aberrations, retenons que plus l'ouverture numérique d'un objectif est élevée, plus il est compliqué de limiter les aberrations, et d'autant plus si un grand champ d'observation est désiré. Notons aussi que des aberrations (dites chromatiques) sont liées à la longueur d'onde de la lumière, deux longueurs d'onde n'étant en général pas focalisées à la même position par une lentille. On distinguera trois grandes classes d'objectifs en fonction de la qualité de la correction des aberrations. De la moins bonne correction à la meilleure, on distingue [202]

1. Les achromats : corrigés des aberrations chromatiques pour deux longueurs d'onde et de l'aberration sphérique.
2. Les apochromats : corrigés des aberrations chromatiques pour trois longueurs d'onde, de l'aberration sphérique et de la coma.
3. Les planapochromats : corrigés des aberrations chromatiques pour trois longueurs d'onde, de l'aberration sphérique, de la coma et de la courbure de champ.

Notons que les autres éléments optiques du microscope (lentille de tube et oculaire) ne doivent pas introduire d'aberrations si l'on veut conserver la qualité des objectifs lors de l'imagerie (en général, cela est bien moins compliqué car les angles en sortie de l'objectif sont beaucoup plus faibles qu'en entrée). Notons que pour certains microscope, la conception des différents éléments est conjointe. On ne peut alors pas utiliser l'objectif indépendamment des autres éléments sans perdre en qualité du point de vue de la correction des aberrations. Notons aussi qu'il arrive souvent que la conception de l'objectif soit faite en considérant que l'échantillon est recouvert d'une lame couvre objet. L'épaisseur de la lame couvre objet prise en compte pour la conception est alors indiquée sur l'objectif.

Un dernier paramètre important en pratique lors de l'utilisation d'un objectif de microscope est sa *distance de travail* (ou WD pour *working distance* en Anglais), correspondant à la distance physique entre la surface de l'objectif et l'échantillon pour qu'il soit bien focalisé. Plus cette distance est faible, plus il est compliqué d'utiliser l'objectif en pratique. En général, plus l'ouverture est élevée, plus la distance de travail est faible.

La figure A.12 montre une photographie d'un objectif de microscope. On peut voir qu'on retrouve les informations essentielles sur les performances de l'objectif inscrites sur la monture.

6. En se limitant à des considérations d'optique géométrique.

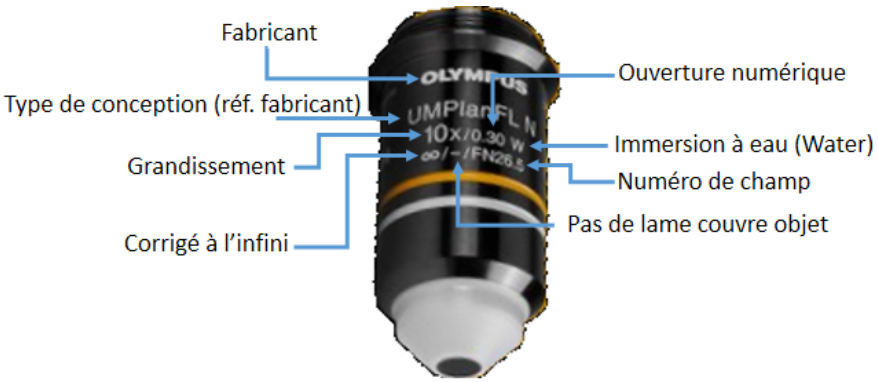

FIGURE A.12 – Photographie d'un objectif de microscope. Extraite de www.edmundoptics.com

A.3 Éclairage

Afin d'éclairer au mieux l'échantillon à observer au microscope, trois paramètres sont particulièrement importants :

1. L'éclairage de l'échantillon doit être uniforme et homogène : chaque point doit être éclairé par la même quantité de lumière.
2. La cohérence spatiale de la lumière éclairant l'échantillon doit être la même en tout point, sans quoi les fréquences spatiales perçues pourraient varier en fonction du point considéré dans l'échantillon.
3. Un maximum de lumière issue de la source doit parvenir à l'échantillon, afin de pouvoir l'éclairer avec un maximum de lumière pour une puissance de source minimale.

Le premier point implique que chaque point de l'échantillon est éclairé par un cone de lumière identique « coté source » (en supposant une source *isotrope*, émettant la même quantité de lumière dans toutes les directions), et que l'échantillon n'est conjugué avec aucun élément qui pourrait présenter des inhomogénéités.

Le deuxième point implique que chaque point de l'échantillon est éclairé par le même cone de lumière « coté échantillon », l'angle de ce cone définissant la cohérence spatiale de la lumière (voir figure A.8).

Le troisième point implique l'utilisation d'une lentille permettant de collecter un maximum de lumière au niveau de la source afin de la rediriger vers l'échantillon.

Avant de s'intéresser au montage optique permettant de vérifier ces conditions, notons que nos travaux ont pour objectif l'imagerie d'échantillons biologiques non préparés, ainsi, l'éclairage se fera nécessairement par la même « voie » que l'imagerie, à moins d'éclairer l'échantillon de biais entre l'objectif et l'échantillon (il sera alors très compliqué de vérifier les conditions pour un bon éclairage énoncées précédemment, d'autant plus que la distance de travail des objectif est généralement faible). Ainsi, la voie d'éclairage passera par l'objectif, comme indiqué sur le schéma de principe de la figure A.13. Un microscope éclairé de cette manière est appelé *microscope en réflexion*, et cet éclairage est parfois désigné comme un éclairage en *épiscopie*. Notons que cette configuration implique une certaine perte de lumière en raison de l'utilisation d'un cube séparateur : uniquement la moitié de la lumière incidente sur le cube atteint l'échantillon, et uniquement la moitié de la lumière revenant de l'échantillon atteint la caméra.

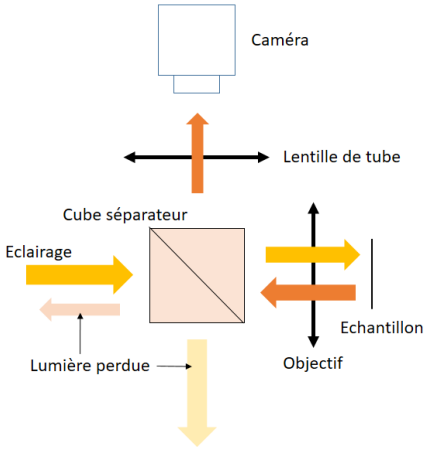

FIGURE A.13 – Schéma de principe de la microscopie en réflexion.

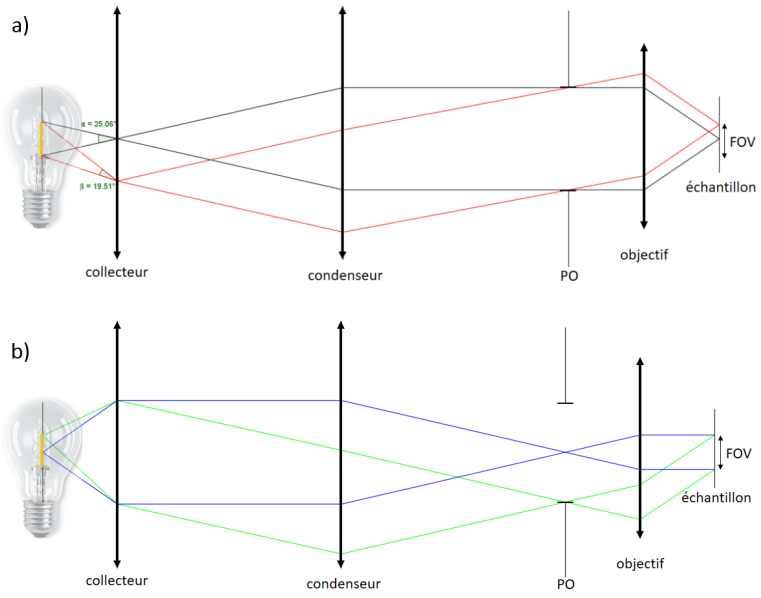

FIGURE A.14 – Montage d'éclairage en épiscopie vérifiant les différentes contraintes. a. Rayons éclairant un point sur l'axe optique et un point à la périphérie du champ. b. Rayons issus de la source sur l'axe optique et au point de la source le plus excentré tel que les rayons sont admis par l'objectif (focalisation au niveau de la périphérie de la pupille de l'objectif). La partie jaune de la source représente la partie de la source éclairant effectivement l'échantillon, soit la taille de la source correspondant à un éclairage incohérent, limité par l'ouverture de l'objectif.

La figure A.14 présente le montage le plus simple permettant de vérifier ces différentes contraintes. On place une lentille (collecteur) directement après la source afin de collecter un maximum de lumière, puis afin d'éclairer tous les points de l'échantillon par le même cone de lumière, on exploite la télécentricité de l'objectif en conjuguant la source avec la pupille de l'objectif via une seconde lentille (condenseur).

Comme on peut le voir, chaque point de l'échantillon est éclairé par un cone de lumière identique, c'est à dire une zone identique de la source. La taille de cette zone est limitée par l'ouverture de l'objectif, et constitue la partie de la source « utile » (Utiliser une source plus grande n'augmente pas la quantité de lumière reçue au niveau de l'échantillon). Du fait que tous les point sont éclairés par cette même zone, si la source présente des inhomogénéités, elles sont moyennées (de la même manière en tout point de l'échantillon) et l'éclairage est finalement parfaitement homogène au niveau de l'échantillon. Utiliser une source plus petite entraine un éclairage partiellement cohérent. On peut donc contrôler la cohérence de l'éclairage en jouant sur la taille de la source, en plaçant un diaphragme devant la source par exemple. Par ailleurs, on observe un conjugaison entre le collecteur et l'échantillon, il faut donc faire attention à ce que le collecteur soit assez grand pour ne pas limiter le champ. Si l'on veut délibérément limiter le champ, il est possible d'ajouter un diaphragme au niveau du collecteur. Notons qu'avec les deux diaphragmes évoquées, on peut contrôler de manière totalement indépendante la cohérence et le champ. Il faut aussi que le condenseur soit assez grand pour ne pas couper les rayons dessinés sur la figure A.14, sans quoi on perd de la lumière au niveau de l'échantillon, et tous les points ne sont plus éclairés par le même cone de lumière coté échantillon, entrainant une cohérence dépendant du champ.

Notons qu'avec ce montage, chaque point n'est pas éclairé exactement par le même cone de lumière « coté source ». Cependant il est très difficile de s'affranchir de cette limitation, et sur des systèmes réels, le champ d'observation est en général assez faible pour que la variation de l'angle du cone soit imperceptible. En revanche, un problème plus fondamental de ce système est la conjugaison entre le collecteur et l'échantillon, qui implique que la moindre poussière sur le collecteur va se voir au niveau de l'échantillon, et entraîner une inhomogénéité de l'éclairage. Par ailleurs, il est en pratiqué très compliqué de placer un diaphragme au niveau de la source (les sources sont souvent protégées, et chauffent) si l'on désire contrôler la cohérence spatiale de l'éclairage.

Afin de résoudre ces problèmes, un montage légèrement modifié permet de conjuguer la source et l'échantillon à des emplacements où il n'y a pas d'éléments, permettant d'y placer facilement des diaphragmes pour pouvoir contrôler la cohérence spatiale et le champ. Ce montage, présenté à la figure A.15 est appelé *éclairage Köhler*, du nom de son inventeur, August Köhler. C'est ce montage d'illumination que l'on retrouve sur la quasi-totalité des microscopes. On voit sur la figure A.15 que l'on retrouve toutes les caractéristiques requises pour l'éclairage, avec en plus un contrôle aisé de la cohérence spatiale et du champ, rendu possible par le repositionnement de la source au-delà de la focale du collecteur, permettant d'en former une image où il est alors possible de placer un diaphragme pour contrôler la cohérence spatiale (diaphragme d'ouverture). L'objectif étant considéré comme corrigé à l'infini, le diaphragme permettant de contrôler le champ (diaphragme de champ) est logiquement placé au foyer du condenseur (c'était déjà le cas précédemment, mais le collecteur se trouvait alors à cet emplacement). Les focales du collecteur et du condenseur ont été choisies de manière arbitraire pour les schémas, mais le choix de la focale du collecteur est en réalité important car il fixe la quantité de lumière récupérée pour éclairer l'échantillon. Notons qu'avec ce montage, si le collecteur ou le condenseur ont un diamètre

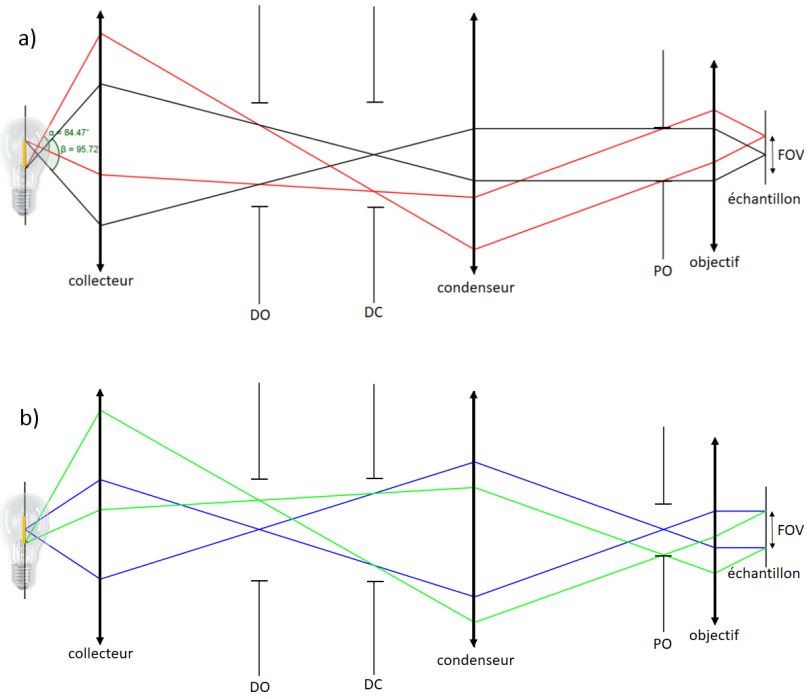

FIGURE A.15 – Montage d'éclairage Köhler en épiscopie.

trop faible pour laisser passer tous les rayons, la cohérence dépend alors du champ [7]. Par ailleurs, l'échantillon n'est conjugué à aucun élément dans un éclairage Köhler, garantissant une bonne homogénéité de l'éclairage. Le seul désavantage de ce type de montage est son encombrement.

Finalement, remarquons que la qualité des optique du montage d'éclairage est bien moins critique pour celle des optiques du montage d'imagerie : des aberrations au niveau du collecteur et du condenseur ne pourront entrainer que de légères inhomogénéités d'éclairage, de la perte de lumière et parfois des effets de bords liés aux aberrations chromatiques. L'essentiel est donc d'être autour d'une configuration Köhler pour avoir un éclairage globalement correct. Cependant, dans les microscopes haut de gamme, le montage d'éclairage peut aussi être corrigé des aberrations, ce qui peut être assez complexe car les angles issus de la source peuvent être très grand, notamment si l'on essaye de maximiser la lumière collectée.

A partir de ces différentes considérations, la figure A.16 réprésente le schéma global du microscope en réflexion que nous allons considérer comme référence pour l'imagerie des tissus biologiques non préparés.

7. À nouveau, au vu des dimensions d'un système réel, cela ne devrait pas arriver. Si jamais uniquement le collecteur a un diamètre trop petit, il est possible de rajouter une lentille pour conjuguer le collecteur à l'échantillon et se retrouver dans une situation similaire au montage précédent, mais la lentille ajoutée doit aussi avoir un diamètre assez grand pour ne couper aucun rayon, et on retrouve une conjugaison collecteur/échantillon pouvant être gênante... Cependant on retrouve cette configuration à trois lentilles chez certains fabricants.

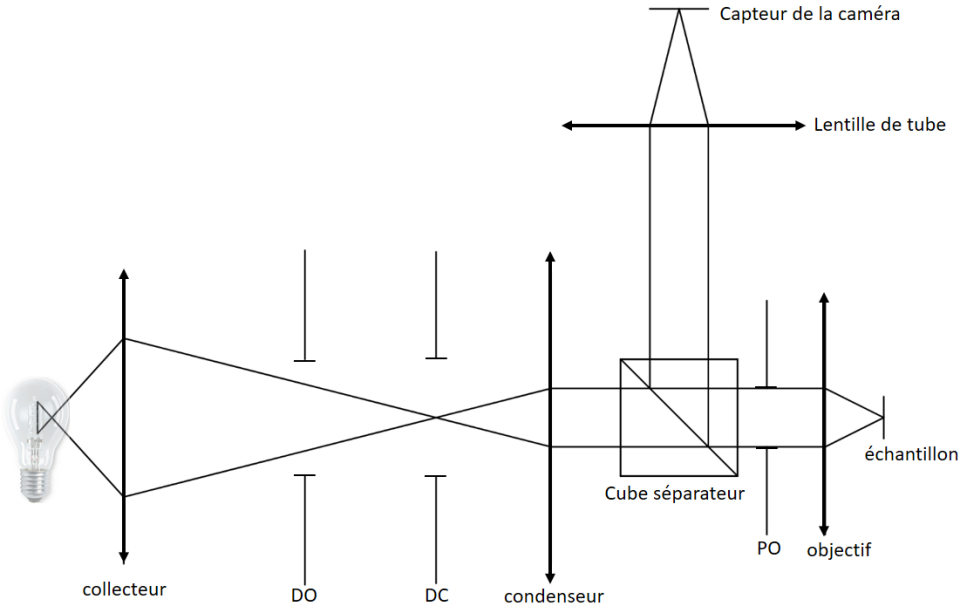

FIGURE A.16 – Schéma du microscope en réflexion.

Annexe B

Interférences à deux ondes

B.1 Lumière monochromatique

Considérons l'interféromètre de Michelson présenté à la figure B.1. La lumière incidente, provenant d'un laser collimaté, et correspondant ainsi à une onde plane monochromatique caractérisée par un champ $E(x) = E_0\, e^{\mathrm{i}k\,x}$ (d'intensité $I_0 = |E_0|^2$), est divisée par une lame séparatrice 50 :50 (la moitié de la lumière est transmise et la moitié est réfléchie), réflechie par une surface dans chaque bras (de coefficients de reflexion r_1 et r_2), puis recombinés après un second passage dans le cube séparateur. Après recombinaison, les deux champs (revenant des deux bras de l'interféromètre) sont donc les suivants :

$$E_1(y) = \frac{1}{2} r_1 E_0\, e^{\mathrm{i}(k\,y+\phi_1)}, \tag{B.1}$$

$$\text{et } E_2(y) = \frac{1}{2} r_2 E_0\, e^{\mathrm{i}(k\,y+\phi_2)}, \tag{B.2}$$

avec ϕ_1 et ϕ_2 les phases accumulées par les deux ondes avant recombinaison, liées à la distance qu'elles ont parcourues.

D'après la figure B.1, on voit que $\phi_1 = \frac{2\pi}{\lambda}(L + 2L_1)$ et $\phi_2 = \frac{2\pi}{\lambda}(L + 2L_2)$ [1]. Le capteur (ponctuel, placé en $y = Y$) mesure ainsi l'intensité suivante :

$$I_{mono} = |E_1(Y) + E_2(Y)|^2 \tag{B.3}$$

$$= |\frac{1}{2} r_1 E_0\, e^{(\mathrm{i}k\,Y+\mathrm{i}\phi_1)} + \frac{1}{2} r_2 E_0\, e^{(\mathrm{i}k\,Y+\mathrm{i}\phi_2)}|^2 \tag{B.4}$$

$$= |\frac{1}{2} E_0\, e^{\mathrm{i}k\,Y}|^2 |r_1\, e^{\mathrm{i}\phi_1} + r_2\, e^{\mathrm{i}\phi_2}|^2 \tag{B.5}$$

$$= \frac{I_0}{4} \left(r_1\, e^{\mathrm{i}\phi_1} + r_2\, e^{\mathrm{i}\phi_2}\right) \left(r_1\, e^{\mathrm{i}\phi_1} + r_2\, e^{\mathrm{i}\phi_2}\right)^* \tag{B.6}$$

$$= \frac{I_0}{4} \left(r_1\, e^{\mathrm{i}\phi_1} + r_2\, e^{\mathrm{i}\phi_2}\right) \left(r_1\, e^{-\mathrm{i}\phi_1} + r_2\, e^{-\mathrm{i}\phi_2}\right) \tag{B.7}$$

$$= \frac{I_0}{4} \left(r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 e^{\mathrm{i}(\phi_1-\phi_2)} + r_2 r_1 e^{\mathrm{i}(\phi_2-\phi_1)}\right) \tag{B.8}$$

$$= \frac{I_0}{4} \left(r_1^2 + r_2^2 + r_1 r_2 \left(e^{\mathrm{i}\Delta\phi} + e^{-\mathrm{i}\Delta\phi}\right)\right) \tag{B.9}$$

$$I_{mono} = \frac{I_0}{4} \left(r_1^2 + r_2^2 + 2 r_1 r_2 \cos(\Delta\phi)\right), \tag{B.10}$$

1. Le facteur 2 est dû à l'aller retour avant recombinaison

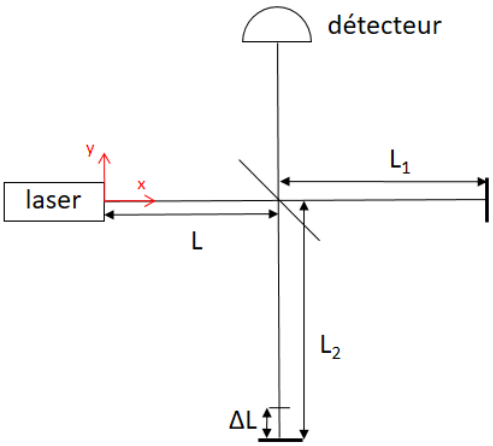

FIGURE B.1 – Interféromètre de Michelson.

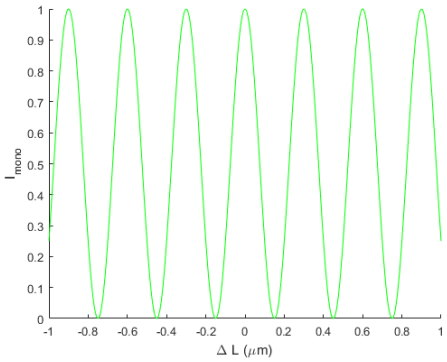

FIGURE B.2 – Intensité mesurée par le détecteur en sortie de l'interféromètre de Michelson, en fonction de ΔL. La longueur d'onde considérée est de 600 nm. On considère I_0 unitaire, et $r_1 = r_2 = 1$ (les deux surfaces sont des miroirs).

$\Delta\phi$ correspondant ainsi au déphasage entre les deux ondes, $\Delta\phi = \phi_1 - \phi_2 = \frac{4\pi}{\lambda}(L_1 - L_2) = \frac{4\pi}{\lambda}\Delta L$, $2\Delta L$ étant ainsi la différence de marche δ entre les deux ondes.

La figure B.2 représente I_{mono} en fonction de ΔL, correspondant à une situation où l'on translate une des deux surface d'une quantité ΔL en gardant l'autre surface fixe (en partant d'une situation initiale où $L_1 = L_2$). Notons que I_{mono} est une fonction de λ et ΔL (ou δ).

B.2 Lumière polychromatique

Dans le cas d'une lumière polychromatique, l'intensité mesurée par le capteur correspond à la somme des intensités (données par l'équation B.10)pour toutes les longueurs d'onde contenues dans le spectre de la lumière, pondérées par un certain facteur $S(\lambda)$ correspondant à la « quantité » de chaque longueur d'onde dans le spectre de la lumière.

La figure B.3 représente le résultat des interférences en lumière polychromatique pour un spectre contenant trois longueurs d'ondes discrètes, en représentant l'intensité mesurée par le capteur en fonction de ΔL. Comme on le voit sur la figure, les interférences n'ont

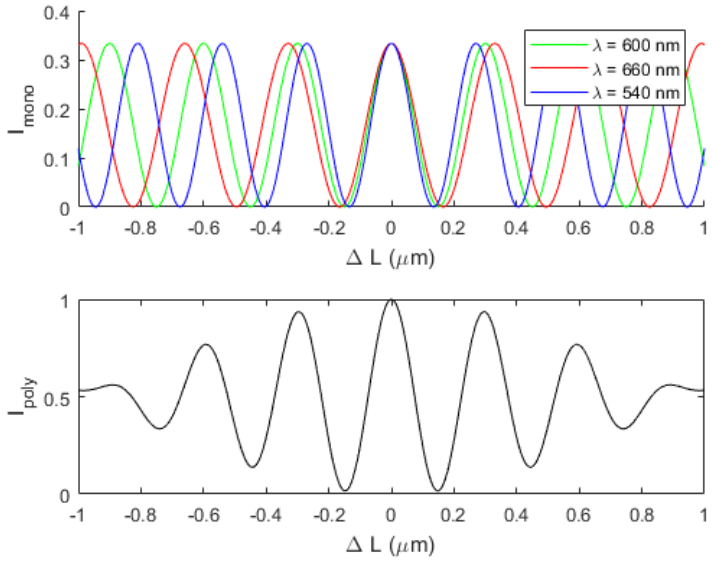

FIGURE B.3 – Intensité mesurée par le détecteur en sortie de l'interféromètre de Michelson, en fonction de ΔL, pour trois longueurs d'onde (540 nm, 600 nm et 660 nm), et pour une source polychromatique contenant ces trois longueurs d'onde.

alors lieu (i.e. leur contraste est bon) qu'autour de la position de la différence de marche nulle ($\Delta L = 0$), là où les différents « réseaux de franges d'interférences » correspondant aux intensités pour les trois longueurs d'onde sont à peu près en phase, tandis que pour des valeur de ΔL trop grandes, les réseaux de franges d'interférences sont déphasés et la somme des intensités tend vers 0.

Afin de comprendre la forme de la variation du contraste des franges autour de la différence de marche nulle, écrivons l'intensité mesurée par le capteur. Pour simplifier le calcul, nous ne prendrons pas en compte la variable λ mais la variable $\sigma = \frac{1}{\lambda}$, et on considérera δ plutôt que ΔL. Par ailleurs, la grandeur $S(\sigma)$ (le « spectre » de la source) est considérée telle que $\int_0^{+\infty} S(\sigma)\,\mathrm{d}\sigma = 1$, et on considèrera les coefficients de réflexion indépendant de la longueur d'onde sur les plages spectrales considérées. Ainsi l'intensité mesurée est la suivante :

$$I_{poly} = \int_0^{+\infty} S(\sigma)\left[\frac{I_0}{4}\left(r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \cos(2\pi\sigma\delta)\right)\right]\mathrm{d}\sigma \tag{B.11}$$

$$= \frac{I_0}{4}\left(r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \int_0^{+\infty} S(\sigma)\cos(2\pi\sigma\delta)\mathrm{d}\sigma\right). \tag{B.12}$$

Le « terme d'interférence » est ainsi $\int_0^{+\infty} S(\sigma)\cos(2\pi\sigma\delta)\mathrm{d}\sigma$. Notons le $M(\delta)$. Nous allons le réécrire pour lui donner une forme mathématiquement cohérente avec ce que l'on a observé à la figure B.3, à savoir le produit d'un cosinus et d'une certaine fonction de contraste (forme $\gamma(\delta)cos(K\delta)$ avec γ la fonction de contraste).

D'après la parité de la fonction cosinus, on a :

$$M(\delta) = \int_{-\infty}^{0} S(-\sigma)\cos(2\pi\sigma\delta)\mathrm{d}\sigma, \tag{B.13}$$

et ainsi

$$M(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{S(\sigma)+S(-\sigma)}{2}\cos(2\pi\sigma\delta)\mathrm{d}\sigma. \tag{B.14}$$

Notons $S_{sym}(\sigma) = \frac{S(\sigma)+S(-\sigma)}{2}$; il s'agit d'une forme symétrisé du spectre $S(\sigma)$, et ainsi une fonction paire. Notons par ailleurs que pour une fonction paire $F(\sigma)$, on a $\int_{-\infty}^{+\infty} F(\sigma)\sin(K\sigma)\mathrm{d}\sigma = 0$, car le produit d'une fonction paire et d'une fonction impaire donne une fonction impaire. Ainsi, en sachant que $e^{2\mathrm{i}\pi\sigma\delta} = \cos(2\pi\sigma\delta) + \mathrm{i}\sin(2\pi\sigma\delta)$, on a finalement :

$$M(\delta) = \int_{-\infty}^{+\infty} S_{sym}(\sigma)e^{2\mathrm{i}\pi\sigma\delta}\mathrm{d}\sigma \tag{B.15}$$

$$M(\delta) = TF\left[S_{sym}(\sigma)\right](\delta). \tag{B.16}$$

Ainsi $M(\delta)$ est la transformée de Fourier de $S_{sym}(\sigma)$. Or $S_{sym}(\sigma)$ peut s'écrire comme la convolution de $\frac{S(\sigma)}{2}$ et de deux Dirac, positionnés à $+\overline{\sigma}$ et $-\overline{\sigma}$, avec $\overline{\sigma}$ la valeur centrale de σ dans $S(\sigma)$. Ainsi :

$$M(\delta) = TF\left[\frac{S(\sigma)}{2} * (\delta_{\overline{\sigma}} + \delta_{-\overline{\sigma}})\right](\delta), \tag{B.17}$$

où $*$ désigne le produit de convolution, et δ_x un Dirac en x.D'après les propriétés de la transformée de Fourier, on a :

$$M(\delta) = \frac{1}{2}TF\left[S(\sigma)\right](\delta) \times TF\left[(\delta_{\overline{\sigma}} + \delta_{-\overline{\sigma}})\right](\delta), \tag{B.18}$$

or la transformée de Fourier de deux Dirac symétriques correspond (à un facteur 2 près) à un cosinus [2], ici de fréquence $\overline{\sigma}$, ainsi $TF\left[(\delta_{\overline{\sigma}} + \delta_{-\overline{\sigma}})\right](\delta) = 2\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta)$, et donc finalement :

$$M(\delta) = TF\left[S(\sigma)\right](\delta)\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta). \tag{B.19}$$

On retrouve bien une forme $\gamma(\delta)cos(K\delta)$ pour $M(\delta)$. L'intensité s'écrit donc :

$$I_{poly} = \frac{I_0}{4}\left(r_1^2 + r_2^2 + 2r_1r_2\left(TF\left[S(\sigma)\right](\delta)\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta)\right)\right). \tag{B.20}$$

La fonction de contraste du réseau de franges en lumière polychromatique correspond ainsi à la transformée de Fourier du spectre de la lumière. Plus le spectre sera large, plus la

2. Ce résultat a en fait déjà été évoqué à la partie A.2. On y avait vu qu'un échantillon comportant une unique fréquence spatiale, dans le cas spatialement cohérent, correspondait à deux points dans l'espace de la pupille du microscope (voir figure A.8) : formellement, on aurait pu montrer qu'il s'agit d'une transformée de Fourier d'un cosinus en deux Dirac symétriques.

fonction de contraste sera fine, et plus on ne pourra observer des interférences que pour des différences de marche très faibles entre les deux bras. On notera la fonction de contraste $\gamma(\delta) = TF\left[S(\sigma)\right](\delta)$:

$$I_{poly} = \frac{I_0}{4}\left(r_1^2 + r_2^2 + 2r_1 r_2 \gamma(\delta)\,\cos(2\pi\overline{\sigma}\delta)\right). \tag{B.21}$$

Annexe C

Exemples d'applications de l'OCT

L'application majeure de l'OCT est l'ophtalmologie, du fait de sa capacité à visualiser les couches de la rétine. Des coupes de rétines saines ont été présentées à la figure 2.5, mais l'OCT est avant tout devenu le technique d'imagerie de référence pour le diagnostic et le suivi de pathologies rétiniennes telles que les trous et oedèmes maculaires, la dégénérescence maculaire liée à l'âge et la rétinopathie diabétique (ces deux dernières constituant les pathologies représentant les principales causes de cécité dans les pays industrialisés). La figure C.1 représente par exemple des images d'un suivi d'une rétine atteintes de dégénérescence maculaire liée à l'âge et d'un décollement de la rétine associé, à différents moments de la thérapie. obtenue sur un système commercial Zeiss Cirrus HD-OCT, populaire chez les ophtalmologues.

L'OCT permet également de visualiser de nombreuses zones du segment antérieur de l'œil comprenant la cornée, l'iris et le cristallin , fournissant des informations pertinentes pour le diagnostic et le suivi du glaucome.

Les systèmes OCT étant quasi exclusivement conçus à base de fibres optiques, l'OCT est aussi souvent couplée à des systèmes d'imagerie endoscopique. On retrouve ainsi l'utilisation de l'OCT pour imager les parois internes de l'œsophage et du colon, comme présenté à la figure C.2 pour un œsophage de porc, reconstitué en 3D et en coupe dans différentes direction [203].

De la même manière, l'utilisation de la fibre optique permet à l'OCT d'être utilisé en cardiologie, où son efficacité a été démontrée pour l'imagerie intra-vasculaires des plaques de cholesterol dans les artères, difficiles à observer en radiologie conventionnelle. La figure C.3 représente une image OCT obtenue sur un système commercial LightLab d'une artère saine comparée à une artère bouchée présentant des calcifications [204].

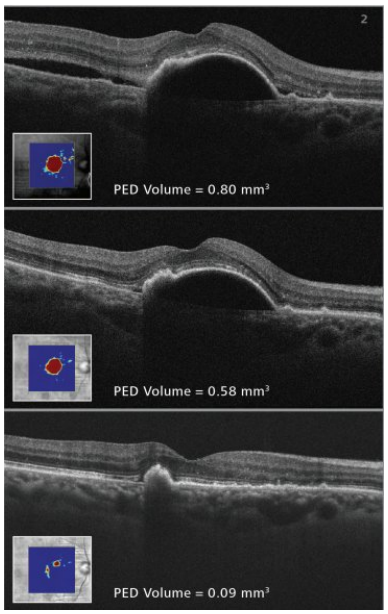

FIGURE C.1 – Suivi d'une rétine atteinte de dégénérescence maculaire liée à l'âge et d'un décollement de la rétine associé au cours d'une thérapie par injections intra-vitréennes d'anti-VEGF. Les coupes ont été effectuées à un an d'intervalle. Extrait de www.zeiss.com.

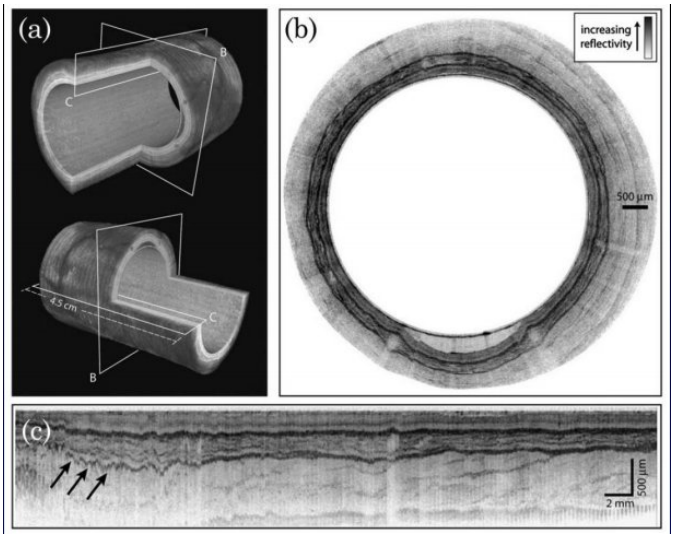

FIGURE C.2 – Œsophage porcin imagé *in vivo* par un système d'OCT endoscopique, reconstitué en 3D et en coupe selon différents plans indiqués en a).

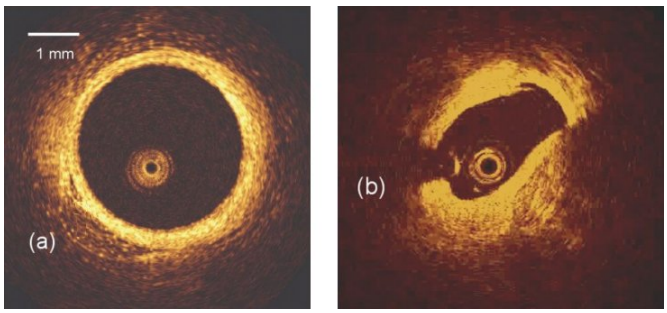

FIGURE C.3 – Parois d'artères imagées avec un système d'OCT endoscopique. a) artère saine, b) artère bouchée présentant des calcifications.

Annexe D

Logiciel développé pour le système de FF-OCM

L'objectif de ce logiciel est de proposer une interface permettant d'afficher les images interférométriques obtenues directement de la caméra afin de pouvoir régler la différence de marche nulle entre les deux lames de verres avant acquisition des images d'échantillon, de régler l'accumulation et de piloter le PZT en conséquence (le mouvement à appliquer au PZT est présenté à la figure 3.3), de proposer un outil pour vérifier que le déphasage d'une image interférométrique à l'autre est bien de $\frac{\pi}{2}$, de présenter les images tomographiques au fur et à mesure de l'acquisition, en face, mais aussi pour une coupe verticale effectuée au centre du champ (la coupe verticale se remplissant au fur et à mesure de l'acquisition), et finalement de proposer des outils permettant de mesurer la résolution axiale et la sensibilité du système. Les détails de la manière de coder ce logiciel du point de vue C++ ne seront pas abordés dans ce manuscrit.

L'interface se constitue de quatre onglets. Le premier (« Initialization ») est présenté à la figure D.1. Il permet de régler tous les paramètres de l'acquisition : le nombre d'images nécessaires pour l'algorithme de démodulation, l'algorithme utilisé (même si l'algorithme de Larkin a finalement été retenu, d'autres algorithmes ont pu être testé avec ce logiciel), le nombre d'images accumulées, le nombre de pixels pour le binning, le nombre d'images tomographiques successives moyennées (« binning axial »), le nombre d'images en face que l'on souhaite acquérir (que l'on peut noter N_{tomo}).

Le logiciel donne aussi la possibilité de faire varier l'accumulation au cours de l'acquisition (utile pour gagner en sensibilité seulement en profondeur où il y a moins de signal, sans perdre de temps à accumuler là où le signal est fort), et donne la possibilité de traiter les images interférométriques en temps réel (permet de les afficher au cours de l'acquisition) ou d'attendre que l'acquisition de toutes les images interférométriques soit terminée avant de les traiter pour obtenir les images tomographiques (peut nécessiter beaucoup d'espace dans la mémoire vive, mais il n'y a aucun temps de calcul entre les images et donc pas de problèmes si l'acquisition est rapide).

Le logiciel renvoie aussi la position du PZT, et permet de démoduler selon un schéma linéaire, mais aussi pas à pas si on le souhaite (prend beaucoup de temps en raison de temps de stabilisation du PZT longs d'un pas à l'autre). Le schéma sinusoïdal a été testé, mais ne fonctionne pas car le PZT ne peut pas osciller correctement sur des très faibles distance vue la masse de l'interféromètre à déplacer. Pour le schéma linéaire (ou pas à pas), on règle l'amplitude totale sur laquelle on souhaite obtenir des images tomographiques dans

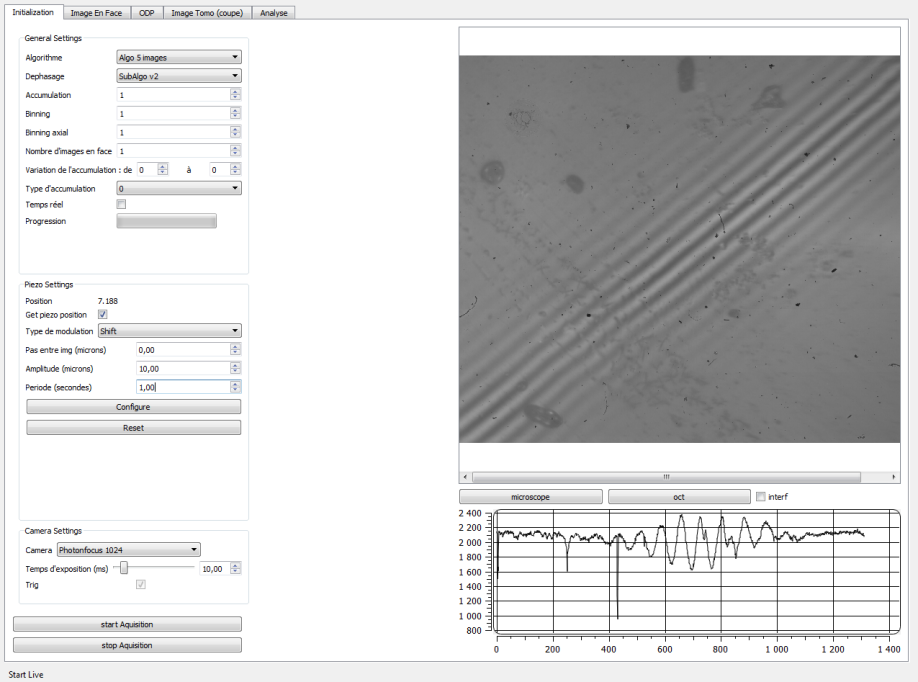

FIGURE D.1 – Interface du logiciel développé pour piloter le montage de FF-OCM.

l'échantillon (profondeur jusqu'à laquelle on va), ainsi que la durée totale de la course du piézo pour une acquisition 3D (liée à la durée d'acquisition des images par la caméra). Il est aussi possible de séparer les images acquises successivement par une certaine quantité (le PZT « sautera » alors d'une position à une autre entre chaque image, tout comme pour le pas, ce type d'acquisition prend beaucoup de temps en raison de problèmes de stabilisation, et on utilisera plutôt un schéma linéaire « continu »). Le bouton « configure » active le PZT selon les paramètres rentrés par l'utilisateur, le bouton « reset » l'arrête et le repositionne à sa position initiale.

Si dans un premier temps un caméra Dalsa 1M15, d'autres caméras ont ensuite été utilisées, et une dernière option du logiciel était de sélectionner le type de caméra utilisé dans le montage, et, si possible, de permettre de régler le temps d'intégration de la caméra.

Dans cet onglet, les images de la caméra sont affichées, ainsi qu'une coupe au centre de ces images en parallèle, ou, si l'option interf est cochée, les coupes sur 4 images successives (permet de vérifier que le déphasage est bien de $\frac{\pi}{2}$ entre les images successives lorsque le PZT est activé). Il est aussi possible d'afficher à la place de ces images les images tomographiques si l'option « temps réel » est cochée (les images tomographiques sont alors affichées mais pas acquises). De la même manière une coupe centrale dans ces images est affichées en parallèle (permet par exemple de vérifier la qualité de la démodulation pour une interface simple).

Les autres onglets du logiciel sont simplement des onglets d'affichage, d'enregistrement et d'analyse suite à une acquisition. Le deuxième onglet, (« Image En Face ») affiche les images suite à une acquisition, et permet de les enregistrer. Notons qu'au cours de l'acquisition, la position du PZT associée à chaque image en face est acquise (plus précisemment la position pour la première image interférométrique utilisée pour la reconstruction de l'image en face), et lors de l'enregistrement, le logiciel ouvre ImageJ (logiciel de traitement

d'images), et associe via ce logiciel à chaque image la position du PZT correspondante dans un fichier d'en-tête de l'image. Ainsi, lorsqu'une pile d'image est ouverte par la suite, la position que le PZT avait pour chaque image peut être affichée.

Le troisième onglet (« ODP » pour opposition de phase) permet d'afficher plusieurs coupes dans des images interféromètriques acquises successivement suite à l'acquisition d'une image 3D. Il permet de vérifier que le déphasage est bien de $\frac{\pi}{2}$ entre les images interférométriques. Il n'est utilisable que si l'option « temps réel » n'était pas activé durant l'acquisition.

Le quatrième onglet (« Image Tomo (coupe) ») présente des coupes verticales dans les images 3D. Durant l'acquisition, on observe une coupe centrale dans l'image 3D se remplissant au fur et à mesure de l'acquisition. Suite à une acquisition, l'onglet permet d'observer n'importe quelle coupe verticale dans l'image 3D. Cet onglet constitue uniquement un onglet de visualisation.

Le dernier onglet (« Analyse ») est utile si l'échantillon imagée durant l'acquisition était un échantillon de référence. Cet onglet permet de calibrer des coupes dans les images tomographiques obtenues sur l'échantillon de référence à partir de données sur cet échantillon, rentrées par l'utilisateur, afin de mesurer la résolution axiale et la sensibilité du système.

Bibliographie

[1] A. H. Layard, *Discoveries in the ruins of Nineveh and Babylon* (G.P. Putnam & Co., 1853).

[2] P. Boutibonnes, "L'œil de leeuwenhoek et l'invention de la microscopie," Alliages **39**, 58–66 (1999).

[3] R. Hooke, *Micrographia or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses.* (J. Martyn and J. Allestry, 1665).

[4] J. J. Lister, "On some properties in achromatic object-glasses applicable to the improvement of the microscope," Philosophical Transactions of the Royal Society of London **120**, 187–200 (1830).

[5] G. Mie, "Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen," Annalen der Physik **3**, 377–445 (1908).

[6] M. I. Mishchenko, L. D. Travis, and A. A. Lacis, *Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles* (Cambridge University Press, 2002).

[7] D. Sacchet, "Linear and non-linear full-field optical coherence tomography," Ph.D. thesis, Université Paris Sud - Paris XI (2010).

[8] H. Benisty, *Optique Physique - Interférence et diffraction* (Institut d'Optique Graduate School, 2016).

[9] F. Harms, "Imagerie des tissus à haute résolution en profondeur par tomographie de cohérence optique plein champ : approches instrumentales et multimodales pour l'application au diagnostic per-opératoire du cancer." Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI (2015).

[10] J. Sandby-Møller, T. Poulsen, and H. C. Wulf, "Epidermal thickness at different body sites : Relationship to age, gender, pigmentation, blood content, skin type and smoking habits," Acta Dermato-Venereologica **83**, 410–413 (2003).

[11] P. Borellus, *Historiarum et observationum medicophysicarum centuria* (A. Colomerium, 1653).

[12] M. Malpighi, *De viscerum structura exercitatio anatomica* (J. Montij, 1666).

[13] M. F. X. Bichat, *Traité des membranes en général et diverses membranes en particulier* (Richard, Caille & Ravier, 1800).

[14] R. J. Cooper, "Bioimaging : Watching the brain at work," Nat Photon **8**, 425–426 (2014). News and Views.

[15] J. Xia, J. Yao, and L. H. V. Wang, "Photoacoustic tomography : Principles and advances (invited review)," Progress In Electromagnetics Research **147**, 1–22 (2014).

[16] S. Resink, P. A. Boccara, and P. W. Steenbergen, "State-of-the art of acousto-optic sensing and imaging of turbid media," Journal of biomedical optics **17**, 040901 – (2012).

[17] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, "Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy," Science **305**, 1007–1009 (2004).

[18] W. Denk, J. Strickler, and W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," Science **248**, 73–76 (1990).

[19] W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences," Nat Biotech **21**, 1369–1377 (2003).

[20] M. Minsky, "Microscopy apparatus," (1961). US Patent 3,013,467.

[21] T. Wilson and C. Sheppard, *Theory and practice of scanning optical microscopy* (Academic Press, 1984).

[22] R. C. Youngquist, S. Carr, and D. E. N. Davies, "Optical coherence-domain reflectometry : a new optical evaluation technique," Opt. Lett. **12**, 158–160 (1987).

[23] D. Huang, E. Swanson, C. Lin, J. Schuman, W. Stinson, W. Chang, M. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. Puliafito, and a. et, "Optical coherence tomography," Science **254**, 1178–1181 (1991).

[24] J. Fujimoto and W. Drexler, "Introduction to optical coherence tomography," in "Optical Coherence Tomography : Technology and Applications," , W. Drexler and J. G. Fujimoto, eds. (Springer, 2008), chap. 1, pp. 1–45.

[25] G. Moneron, "Microscopie tridimensionnelle à très haute résolution par tomographie par cohérence optique," Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI (2006).

[26] J. A. Izatt, E. A. Swanson, J. G. Fujimoto, M. R. Hee, and G. M. Owen, "Optical coherence microscopy in scattering media," Opt. Lett. **19**, 590–592 (1994).

[27] T. H. Ko, D. C. Adler, J. G. Fujimoto, D. Mamedov, V. Prokhorov, V. Shidlovski, and S. Yakubovich, "Ultrahigh resolution optical coherence tomography imaging with a broadband superluminescent diode light source," Opt. Express **12**, 2112–2119 (2004).

[28] 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**, 1800–1802 (2002).

[29] J. S. Schuman, "Spectral domain optical coherence tomography for glaucoma (an aos thesis)," Trans Am Ophthalmol Soc **106**, 426–458 (2008).

[30] 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**, 219–229 (1998).

[31] A. Fercher, C. Hitzenberger, G. Kamp, and S. El-Zaiat, "Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry," Optics Communications **117**, 43–48 (1995).

[32] R. Leitgeb, C. K. Hitzenberger, and A. F. Fercher, "Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography," Opt. Express **11**, 889–894 (2003).

[33] M. Wojtkowski, "High-speed optical coherence tomography : basics and applications," Appl. Opt. **49**, D30–D61 (2010).

[34] S. R. Chinn, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "Optical coherence tomography using a frequency-tunable optical source," Opt. Lett. **22**, 340–342 (1997).

[35] R. Huber, D. C. Adler, and J. G. Fujimoto, "Buffered fourier domain mode locking : unidirectional swept laser sources for optical coherence tomography imaging at 370,000 lines/s," Opt. Lett. **31**, 2975–2977 (2006).

[36] R. Huber, M. Wojtkowski, J. G. Fujimoto, J. Y. Jiang, and A. E. Cable, "Three-dimensional and c-mode oct imaging with a compact, frequency swept laser source at 1300 nm," Opt. Express **13**, 10523–10538 (2005).

[37] A. Aguirre and J. Fujimoto, "Optical coherence microscopy," in "Optical Coherence Tomography : Technology and Applications," , W. Drexler and J. G. Fujimoto, eds. (Springer, 2008), chap. 17, pp. 505–542.

[38] J. A. Izatt, M. D. Kulkarni, H.-W. Wang, K. Kobayashi, and M. V. Sivak, "Optical coherence tomography and microscopy in gastrointestinal tissues," IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics **2**, 1017–1028 (1996).

[39] R. A. Leitgeb, M. Villiger, A. H. Bachmann, L. Steinmann, and T. Lasser, "Extended focus depth for fourier domain optical coherence microscopy," Opt. Lett. **31**, 2450–2452 (2006).

[40] J. Mo, M. de Groot, and J. F. de Boer, "Focus-extension by depth-encoded synthetic aperture in optical coherence tomography," Opt. Express **21**, 10048–10061 (2013).

[41] K. Sasaki, K. Kurokawa, S. Makita, and Y. Yasuno, "Extended depth of focus adaptive optics spectral domain optical coherence tomography," Biomed. Opt. Express **3**, 2353–2370 (2012).

[42] T. S. Ralston, D. L. Marks, P. S. Carney, and S. A. Boppart, "Inverse scattering for optical coherence tomography," J. Opt. Soc. Am. A **23**, 1027–1037 (2006).

[43] J. P. Rolland, P. Meemon, S. Murali, K. P. Thompson, and K. sung Lee, "Gabor-based fusion technique for optical coherence microscopy," Opt. Express **18**, 3632–3642 (2010).

[44] J. Holmes and S. Hattersley, "Image blending and speckle noise reduction in multi-beam oct," Proc. SPIE **7168**, 71681N–8 (2009).

[45] J. Schmitt, S. Lee, and K. Yung, "An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue," Optics Communications **142**, 203 – 207 (1997).

[46] B. Qi, A. P. Himmer, L. M. Gordon, X. V. Yang, L. D. Dickensheets, and I. A. Vitkin, "Dynamic focus control in high-speed optical coherence tomography based on a microelectromechanical mirror," Optics Communications **232**, 123 – 128 (2004).

[47] V. X. D. Yang, N. Munce, J. Pekar, M. L. Gordon, S. Lo, N. E. Marcon, B. C. Wilson, and I. A. Vitkin, "Micromachined array tip for multifocus fiber-based optical coherence tomography," Opt. Lett. **29**, 1754–1756 (2004).

[48] E. Beaurepaire, A. C. Boccara, M. Lebec, L. Blanchot, and H. Saint-Jalmes, "Full-field optical coherence microscopy," Opt. Lett. **23**, 244–246 (1998).

[49] B. Považay, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, H. Arthaber, and W. Drexler, "Full-field time-encoded frequency-domain optical coherence tomography," Opt. Express **14**, 7661–7669 (2006).

[50] M. Davidson, K. Kaufman, I. Mazor, and F. Cohen, "An application of interference microscopy to integrated circuit inspection and metrology," in "Integrated Circuit Metrology, Inspection, & Process Control," , K. M. Monahan, ed. (SPIE, 1987).

[51] G. S. Kino and S. S. C. Chim, "Mirau correlation microscope," Applied Optics **29**, 3775 (1990).

[52] P. J. Caber, "Interferometric profiler for rough surfaces," Applied Optics **32**, 3438 (1993).

[53] J. Schmit, J. Reed, E. Novak, and J. K. Gimzewski, "Performance advances in interferometric optical profilers for imaging and testing," Journal of Optics A : Pure and Applied Optics **10**, 064001 (2008).

[54] J. Wyant, "Interferometric optical metrology : basic principles and new systems," Laser Focus **18**, 65–71 (1982).

[55] P. Carré, "Installation et utilisation du comparateur photoélectrique et interférentiel du bureau international des poids et mesures," Metrologia **2**, 13 (1966).

[56] K. G. Larkin, "Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry," J. Opt. Soc. Am. A **13**, 832–843 (1996).

[57] A. Federici, "Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique plein champ étendus spatialement et spectralement," Ph.D. thesis, Université Paris-Saclay (2015).

[58] K. Creath, "Phase-measurement interferometry techniques," in "Progress in optics XXVI," , E. Wolf, ed. (Elsevier, 1988), chap. 5, pp. 349–398.

[59] A. Harasaki, J. Schmit, and J. C. Wyant, "Improved vertical-scanning interferometry," Appl. Opt. **39**, 2107–2115 (2000).

[60] A. Dubois, "Phase-map measurements by interferometry with sinusoidal phase modulation and four integrating buckets," J. Opt. Soc. Am. A **18**, 1972–1979 (2001).

[61] A. Federici, H. S. G. da Costa, J. Ogien, A. K. Ellerbee, and A. Dubois, "Wide-field, full-field optical coherence microscopy for high-axial-resolution phase and amplitude imaging," Appl. Opt. **54**, 8212–8220 (2015).

[62] P. J. Caber, "Interferometric profiler for rough surfaces," Appl. Opt. **32**, 3438–3441 (1993).

[63] A. Dubois, L. Vabre, A.-C. Boccara, and E. Beaurepaire, "High-resolution full-field optical coherence tomography with a linnik microscope," Appl. Opt. **41**, 805–812 (2002).

[64] A. Dubois, J. Selb, L. Vabre, and A.-C. Boccara, "Phase measurements with wide-aperture interferometers," Appl. Opt. **39**, 2326–2331 (2000).

[65] C. K. Hitzenberger, A. Baumgartner, W. Drexler, and A. F. Fercher, "Dispersion effects in partial coherence interferometry : Implications for intraocular ranging," Journal of Biomedical Optics **4**, 144–151 (1999).

[66] A. Federici and A. Dubois, "Three-band, 1.9-μm axial resolution full-field optical coherence microscopy over a 530-1700 nm wavelength range using a single camera," Opt. Lett. **39**, 1374–1377 (2014).

[67] S. Labiau, G. David, S. Gigan, and A. C. Boccara, "Defocus test and defocus correction in full-field optical coherence tomography," Opt. Lett. **34**, 1576–1578 (2009).

[68] D. Sacchet, J. Moreau, P. Georges, and A. Dubois, "Simultaneous dual-band ultra-high resolution full-field optical coherence tomography," Opt. Express **16**, 19434–19446 (2008).

[69] M. A. Choma, M. V. Sarunic, C. Yang, and J. A. Izatt, "Sensitivity advantage of swept source and fourier domain optical coherence tomography," Opt. Express **11**, 2183–2189 (2003).

[70] D. Sacchet, M. Brzezinski, J. Moreau, P. Georges, and A. Dubois, "Motion artifact suppression in full-field optical coherence tomography," Appl. Opt. **49**, 1480–1488 (2010).

[71] G. J. Tearney, E. A. Swanson, J. G. Fujimoto, B. E. Bouma, S. A. Boppart, and B. Golubovic, "Rapid acquisition of in vivo biological images byuse of optical coherence tomography," Opt. Lett. **21**, 1408–1410 (1996).

[72] B. Karamata, P. Lambelet, M. Laubscher, M. Leutenegger, S. Bourquin, and T. Lasser, "Multiple scattering in optical coherence tomography. i. investigation and modeling," J. Opt. Soc. Am. A **22**, 1369–1379 (2005).

[73] B. Karamata, P. Lambelet, M. Leutenegger, M. Laubscher, S. Bourquin, and T. Lasser, "Multiple scattering in optical coherence tomography. ii. experimental and theoretical investigation of cross talk in wide-field optical coherence tomography," J. Opt. Soc. Am. A **22**, 1380–1388 (2005).

[74] A.-H. Dhalla, J. V. Migacz, and J. A. Izatt, "Crosstalk rejection in parallel optical coherence tomography using spatially incoherent illumination with partially coherent sources," Opt. Lett. **35**, 2305–2307 (2010).

[75] A. Grebenyuk, A. Federici, V. Ryabukho, and A. Dubois, "Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination," Appl. Opt. **53**, 1697–1708 (2014).

[76] B. Karamata, P. Lambelet, M. Laubscher, R. P. Salathé, and T. Lasser, "Spatially incoherent illumination as a mechanism for cross-talk suppression in wide-field optical coherence tomography," Opt. Lett. **29**, 736–738 (2004).

[77] A. Federici and A. Dubois, "Full-field optical coherence microscopy with optimized ultrahigh spatial resolution," Opt. Lett. **40**, 5347–5350 (2015).

[78] C.-C. Tsai, C.-K. Chang, K.-Y. Hsu, T.-S. Ho, M.-Y. Lin, J.-W. Tjiu, and S.-L. Huang, "Full-depth epidermis tomography using a mirau-based full-field optical coherence tomography," Biomed. Opt. Express **5**, 3001–3010 (2014).

[79] T. Cao and H. L. Tey, "High-definition optical coherence tomography – an aid to clinical practice and research in dermatology," JDDG : Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **13**, 886–890 (2015).

[80] M. Boone, G. B. E. Jemec, and V. Del Marmol, "High-definition optical coherence tomography enables visualization of individual cells in healthy skin : comparison to reflectance confocal microscopy," Experimental Dermatology **21**, 740–744 (2012).

[81] K. Fletcher and A. Dubois, "In vivo-Hautkrebsdiagnose mittels optischer Kohärenztomographie," biophotonik magazin **1**, 35 (2017).

[82] O. Assayag, M. Antoine, B. Sigal-Zafrani, M. Riben, F. Harms, A. Burcheri, K. Grieve, E. Dalimier, B. L. C. de Poly, and C. Boccara, "Large field, high resolution full-field optical coherence tomography : A pre-clinical study of human breast tissue

and cancer assessment," Technology in Cancer Research & Treatment **13**, 455–468 (2014).

[83] J. M. Guilera, A. B. Capurro, C. C. Alvárez, and S. P. Sardá, "The role of reflectance confocal microscopy in clinical trials for tumor monitoring," Dermatologic Clinics **34**, 519 – 526 (2016). Confocal Microscopy.

[84] M. Rajadhyaksha, A. Marghoob, A. Rossi, A. C. Halpern, and K. S. Nehal, "Reflectance confocal microscopy of skin in vivo : From bench to bedside," Lasers in Surgery and Medicine **49**, 7–19 (2017).

[85] K. König, "Clinical multiphoton tomography," Journal of Biophotonics **1**, 13–23 (2008).

[86] L. Schmitz, U. Reinhold, E. Bierhoff, and T. Dirschka, "Optical coherence tomography : its role in daily dermatological practice," JDDG : Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft **11**, 499–507 (2013).

[87] J. Holmes, "Theory and applications of multi-beam OCT," in "1st Canterbury Workshop on Optical Coherence Tomography and Adaptive Optics," (SPIE, 2008).

[88] C. Dunsby, Y. Gu, and P. M. W. French, "Single-shot phase-stepped wide-field coherence-gated imaging," Opt. Express **11**, 105–115 (2003).

[89] 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," Optics Communications **282**, 674 – 683 (2009).

[90] H. M. Subhash, "Full-field and single-shot full-field optical coherence tomography : A novel technique for biomedical imaging applications," Advances in Optical Technologies **2012**, 26 (2012).

[91] G. Moneron, A. C. Boccara, and A. Dubois, "Stroboscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography," Opt. Lett. **30**, 1351–1353 (2005).

[92] S. E. Schausberger, B. Heise, S. Bernstein, and D. Stifter, "Full-field optical coherence microscopy with riesz transform-based demodulation for dynamic imaging," Opt. Lett. **37**, 4937–4939 (2012).

[93] M. Akiba and K. Pui Chan, "In vivo video-rate cellular-level full-field optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **12**, 064024–064024–7 (2007).

[94] K. Grieve, A. Dubois, M. Simonutti, M. Paques, J. Sahel, J.-F. L. 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**, 6286–6295 (2005).

[95] Y. Watanabe and M. Sato, "Three-dimensional wide-field optical coherence tomography using an ultrahigh-speed cmos camera," Optics Communications **281**, 1889 – 1895 (2008). Optics in Life Sciences.

[96] E. Dalimier, A. Bruhat, K. Grieve, F. Harms, F. Martins, and C. Boccara, "High resolution in-vivo imaging of skin with full field optical coherence tomography," Proc. SPIE **8926**, 89260P–8 (2014).

[97] E. Auksorius and A. C. Boccara, "Fingerprint imaging from the inside of a finger with full-field optical coherence tomography," Biomed. Opt. Express **6**, 4465–4471 (2015).

[98] P. Montgomery, F. Anstotz, D. Montaner, and F. Salzenstein, "Real time and high quality on-line 4d ff-oct using continuous fringe scanning with a high speed camera and fpga image processing," in "Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy - Technology and Applications," , A. Dubois, ed. (Pan Stanford Publishing, 2016), chap. 11, pp. 393–427.

[99] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, and X.-H. Hu, "Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm," Physics in Medicine and Biology **51**, 1479 (2006).

[100] P. Xiao, M. Fink, and A. C. Boccara, "Full-field spatially incoherent illumination interferometry : a spatial resolution almost insensitive to aberrations," Opt. Lett. **41**, 3920–3923 (2016).

[101] 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**, 726–735 (2006).

[102] K. Grieve, G. Moneron, A. Dubois, J.-F. L. Gargasson, and C. Boccara, "Ultrahigh resolution ex vivo ocular imaging using ultrashort acquisition time en face optical coherence tomography," Journal of Optics A : Pure and Applied Optics **7**, 368 (2005).

[103] E. Auksorius and A. C. Boccara, "Dark-field full-field optical coherence tomography," Opt. Lett. **40**, 3272–3275 (2015).

[104] J. Schmitt, S. Lee, and K. Yung, "An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue," Optics Communications **142**, 203 – 207 (1997).

[105] D. Sacchet, J. Moreau, P. Georges, and A. Dubois, "Multi-band ultrahigh resolution full-field optical coherence tomography," Proc. SPIE **7372**, 73721F–9 (2009).

[106] B.-W. Yang, Y.-Y. Wang, Y.-M. Lin, Y.-S. Juan, H.-T. Chen, and S.-P. Ying, "Applying rgb led in full-field optical coherence tomography for real-time full-color tissue imaging," Appl. Opt. **53**, E56–E60 (2014).

[107] A. Dubois, K. Grieve, G. Moneron, R. Lecaque, L. Vabre, and C. Boccara, "Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography," Appl. Opt. **43**, 2874–2883 (2004).

[108] F. Spöler, S. Kray, P. Grychtol, B. Hermes, J. Bornemann, M. Först, and H. Kurz, "Simultaneous dual-band ultra-high resolution optical coherence tomography," Opt. Express **15**, 10832–10841 (2007).

[109] J. Kim, W. Brown, J. R. Maher, H. Levinson, and A. Wax, "Functional optical coherence tomography : Principles and progress," Phys Med Biol **60**, R211–R237 (2015). 25951836[pmid].

[110] A. Dubois, "Technological extensions of full-field optical coherence microscopy for multicontrast imaging," in "Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy - Technology and Applications," , A. Dubois, ed. (Pan Stanford Publishing, 2016), chap. 13, pp. 467–518.

[111] P. M. McNamara, H. M. Subhash, and M. J. Leahy, "In vivo full-field en face correlation mapping optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **18**, 126008 (2013).

[112] A. Nahas, M. Bauer, S. Roux, and A. C. Boccara, "3d static elastography at the micrometer scale using full field oct," Biomed. Opt. Express **4**, 2138–2149 (2013).

[113] C. Apelian, F. Harms, O. Thouvenin, and A. C. Boccara, "Dynamic full field optical coherence tomography : subcellular metabolic contrast revealed in tissues by interferometric signals temporal analysis," Biomed. Opt. Express **7**, 1511–1524 (2016).

[114] R. A. Leitgeb, R. M. Werkmeister, C. Blatter, and L. Schmetterer, "Doppler optical coherence tomography," Prog Retin Eye Res **41**, 26–43 (2014).

[115] L. A. Yannuzzi, "Indocyanine green angiography : A perspective on use in the clinical setting," American Journal of Ophthalmology **151**, 745 – 751 (2011).

[116] Z. Chen and J. Zhang, "Doppler optical coherence tomography," in "Optical Coherence Tomography : Technology and Applications," , W. Drexler and J. G. Fujimoto, eds. (Springer, 2008), chap. 21, pp. 621–651.

[117] V. J. Srinivasan, A. C. Chan, and E. Y. Lam, "Doppler oct and oct angiography for in vivo imaging of vascular physiology," in "Selected Topics in Optical Coherence Tomography," , G. Liu, ed. (InTech, 2012), chap. 2, pp. 21–40.

[118] 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**, 64–66 (1997).

[119] Z. Chen, T. E. Milner, S. Srinivas, X. Wang, A. Malekafzali, M. J. C. van Gemert, and J. S. Nelson, "Noninvasive imaging of in vivo blood flow velocity using optical doppler tomography," Opt. Lett. **22**, 1119–1121 (1997).

[120] 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**, 1439–1441 (1997).

[121] S. Yazdanfar, M. D. Kulkarni, and J. A. Izatt, "High resolution imaging of in vivo cardiac dynamics using color doppler optical coherence tomography," Opt. Express **1**, 424–431 (1997).

[122] M. D. Kulkarni, T. G. van Leeuwen, S. Yazdanfar, and J. A. Izatt, "Velocity-estimation accuracy and frame-rate limitations in color doppler optical coherence tomography," Opt. Lett. **23**, 1057–1059 (1998).

[123] A. M. Rollins, S. Yazdanfar, J. K. Barton, and J. A. Izatt, "Real-time in vivo color doppler optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **7**, 123–129 (2002).

[124] J. Kehlet Barton, J. A. Izatt, M. D. Kulkarni, S. Yazdanfar, and A. J. Welch, "Three-dimensional reconstruction of blood vessels from in vivo color doppler optical coherence tomography images," Dermatology **198**, 355–361 (1999).

[125] S. Yazdanfar, A. M. Rollins, and J. A. Izatt, "Imaging and velocimetry of the human retinal circulation with color doppler optical coherence tomography," Opt. Lett. **25**, 1448–1450 (2000).

[126] Y. Zhao, Z. Chen, C. Saxer, S. Xiang, J. F. de Boer, and J. S. Nelson, "Phase-resolved optical coherence tomography and optical doppler tomography for imaging blood flow in human skin with fast scanning speed and high velocity sensitivity," Opt. Lett. **25**, 114–116 (2000).

[127] R. Leitgeb, L. F. Schmetterer, M. Wojtkowski, C. K. Hitzenberger, M. Sticker, and A. F. Fercher, "Flow velocity measurements by frequency domain short coherence interferometry," Proc. SPIE **4619**, 16–21 (2002).

[128] R. Michaely, A. H. Bachmann, M. L. Villiger, C. Blatter, T. Lasser, and R. A. Leitgeb, "Vectorial reconstruction of retinal blood flow in three dimensions measured with high resolution resonant doppler fourier domain optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **12**, 041213–7 (2007).

[129] Y. Wang, B. A. Bower, J. A. Izatt, O. Tan, and D. Huang, "In vivo total retinal blood flow measurement by fourier domain doppler optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **12**, 041215–8 (2007).

[130] S. Makita, T. Fabritius, and Y. Yasuno, "Quantitative retinal-blood flow measurement with three-dimensional vessel geometry determination using ultrahigh-resolution doppler optical coherence angiography," Opt. Lett. **33**, 836–838 (2008).

[131] G. Liu and Z. Chen, "Advances in doppler oct," Chin. Opt. Lett. **11**, 011702 (2013).

[132] V. J. Srinivasan, S. Sakadžić, I. Gorczynska, S. Ruvinskaya, W. Wu, J. G. Fujimoto, and D. A. Boas, "Quantitative cerebral blood flow with optical coherence tomography," Opt. Express **18**, 2477–2494 (2010).

[133] J. Fingler, D. Schwartz, C. Yang, and S. E. Fraser, "Mobility and transverse flow visualization using phase variance contrast with spectral domain optical coherence tomography," Opt. Express **15**, 12636–12653 (2007).

[134] D. Y. Kim, J. Fingler, J. S. Werner, D. M. Schwartz, S. E. Fraser, and R. J. Zawadzki, "In vivo volumetric imaging of human retinal circulation with phase-variance optical coherence tomography," Biomed. Opt. Express **2**, 1504–1513 (2011).

[135] B. J. Vakoc, R. M. Lanning, J. A. Tyrrell, T. P. Padera, L. A. Bartlett, T. Stylianopoulos, L. L. Munn, G. J. Tearney, D. Fukumura, R. K. Jain, and B. E. Bouma, "Three-dimensional microscopy of the tumor microenvironment in vivo using optical frequency domain imaging," Nat Med **15**, 1219–1223 (2009).

[136] B. Braaf, K. A. Vermeer, K. V. Vienola, and J. F. de Boer, "Angiography of the retina and the choroid with phase-resolved oct using interval-optimized backstitched b-scans," Opt. Express **20**, 20516–20534 (2012).

[137] J. Fingler, R. J. Zawadzki, J. S. Werner, D. Schwartz, and S. E. Fraser, "Volumetric microvascular imaging of human retina using optical coherence tomography with a novel motion contrast technique," Opt. Express **17**, 22190–22200 (2009).

[138] A. Mariampillai, B. A. Standish, E. H. Moriyama, M. Khurana, N. R. Munce, M. K. K. Leung, J. Jiang, A. Cable, B. C. Wilson, I. A. Vitkin, and V. X. D. Yang, "Speckle variance detection of microvasculature using swept-source optical coherence tomography," Opt. Lett. **33**, 1530–1532 (2008).

[139] J. Xu, S. Han, C. Balaratnasingam, Z. Mammo, K. S. K. Wong, S. Lee, M. Cua, M. Young, A. Kirker, D. Albiani, F. Forooghian, P. Mackenzie, A. Merkur, D.-Y. Yu, and M. V. Sarunic, "Retinal angiography with real-time speckle variance optical coherence tomography," British Journal of Ophthalmology **99**, 1315–1319 (2015).

[140] A. Mariampillai, M. K. K. Leung, M. Jarvi, B. A. Standish, K. Lee, B. C. Wilson, A. Vitkin, and V. X. D. Yang, "Optimized speckle variance oct imaging of microvasculature," Opt. Lett. **35**, 1257–1259 (2010).

[141] C. Blatter, T. Klein, B. Grajciar, T. Schmoll, W. Wieser, R. Andre, R. Huber, and R. A. Leitgeb, "Ultrahigh-speed non-invasive widefield angiography," Journal of Biomedical Optics **17**, 070505–1–070505–3 (2012).

[142] Y. Huang, Q. Zhang, M. Thorell, L. An, M. Durbin, M. Laron, U. Sharma, G. Gregori, P. Rosenfeld, and R. Wang, "Swept-source oct angiography of the retinal vasculature using intensity differentiation-based optical microangiography algorithms," Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina **45**, 382–389 (2014).

[143] Y. Yasuno, Y. Hong, S. Makita, M. Yamanari, M. Akiba, M. Miura, and T. Yatagai, "In vivo high-contrast imaging of deep posterior eye by 1-μm swept source optical coherence tomography and scattering optical coherence angiography," Opt. Express **15**, 6121–6139 (2007).

[144] E. Jonathan, J. Enfield, and M. J. Leahy, "Correlation mapping method for generating microcirculation morphology from optical coherence tomography (oct) intensity images," Journal of Biophotonics **4**, 583–587 (2011).

[145] Y. Jia, O. Tan, J. Tokayer, B. Potsaid, Y. Wang, J. J. Liu, M. F. Kraus, H. Subhash, J. G. Fujimoto, J. Hornegger, and D. Huang, "Split-spectrum amplitude-decorrelation angiography with optical coherence tomography," Opt. Express **20**, 4710–4725 (2012).

[146] L. An and R. K. Wang, "In vivo volumetric imaging of vascular perfusion within human retina and choroids with optical micro-angiography," Opt. Express **16**, 11438–11452 (2008).

[147] M. Szkulmowski, A. Szkulmowska, T. Bajraszewski, A. Kowalczyk, and M. Wojtkowski, "Flow velocity estimation using joint spectral and time domain optical coherence tomography," Opt. Express **16**, 6008–6025 (2008).

[148] F. Jaillon, S. Makita, E.-J. Min, B. H. Lee, and Y. Yasuno, "Enhanced imaging of choroidal vasculature by high-penetration and dual-velocity optical coherence angiography," Biomed. Opt. Express **2**, 1147–1158 (2011).

[149] Y. Wang and R. Wang, "Autocorrelation optical coherence tomography for mapping transverse particle-flow velocity," Opt. Lett. **35**, 3538–3540 (2010).

[150] J. D. Briers and A. F. Fercher, "Retinal blood-flow visualization by means of laser speckle photography." Investigative Ophthalmology & Visual Science **22**, 255 (1982).

[151] M. Draijer, E. Hondebrink, T. van Leeuwen, and W. Steenbergen, "Review of laser speckle contrast techniques for visualizing tissue perfusion," Lasers Med Sci **24**, 639–651 (2009).

[152] W. J. Choi, Y. Li, W. Qin, and R. K. Wang, "Cerebral capillary velocimetry based on temporal oct speckle contrast," Biomed. Opt. Express **7**, 4859–4873 (2016).

[153] V. M. Kodach, D. J. Faber, J. van Marle, T. G. van Leeuwen, and J. Kalkman, "Determination of the scattering anisotropy with optical coherence tomography," Opt. Express **19**, 6131–6140 (2011).

[154] M. Unekawa, M. Tomita, T. Osada, Y. Tomita, H. Toriumi, J. Tatarishvili, and N. Suzuki, "Frequency distribution function of red blood cell velocities in single capillaries of the rat cerebral cortex using intravital laser-scanning confocal microscopy with highspeed camera," Asian Biomedicine **2**, 203–218 (2008).

[155] X. Liu, Y. Huang, J. C. Ramella-Roman, S. A. Mathews, and J. U. Kang, "Quantitative transverse flow measurement using optical coherence tomography speckle decorrelation analysis," Opt. Lett. **38**, 805–807 (2013).

[156] M. R. Hee, D. Huang, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto, "Polarization-sensitive low-coherence reflectometer for birefringence characterization and ranging," J. Opt. Soc. Am. B **9**, 903–908 (1992).

[157] H. F. Hazebroek and A. A. Holscher, "Interferometric ellipsometry," Journal of Physics E : Scientific Instruments **6**, 822 (1973).

[158] M. Kobayashi, H. Hanafusa, K. Takada, and J. Noda, "Polarization-independent interferometric optical-time-domain reflectometer," Journal of Lightwave Technology **9**, 623–628 (1991).

[159] 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**, 934–936 (1997).

[160] C. K. Hitzenberger, E. Götzinger, M. Sticker, M. Pircher, and A. F. Fercher, "Measurement and imaging of birefringence and optic axis orientation by phase resolved polarization sensitive optical coherence tomography," Opt. Express **9**, 780–790 (2001).

[161] B. Baumann, E. Götzinger, M. Pircher, and C. K. Hitzenberger, "Measurements of depolarization distribution in the healthy human macula by polarization sensitive oct," Journal of Biophotonics **2**, 426–434 (2009).

[162] B. Cense, T. C. Chen, B. H. Park, M. C. Pierce, and J. F. de Boer, "Thickness and birefringence of healthy retinal nerve fiber layer tissue measured with polarization-sensitive optical coherence tomography," Investigative Ophthalmology & Visual Science **45**, 2606 (2004).

[163] E. Götzinger, M. Pircher, M. Sticker, A. F. Fercher, and C. K. Hitzenberger, "Measurement and imaging of birefringent properties of the human cornea with phase-resolved, polarization-sensitive optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **9**, 94 (2004).

[164] A. Baumgartner, S. Dichtl, C. Hitzenberger, H. Sattmann, B. Robl, A. Moritz, A. Fercher, and W. Sperr, "Polarization–sensitive optical coherence tomography of dental structures," Caries Research **34**, 59–69 (1999).

[165] B. H. Park, C. Saxer, S. M. Srinivas, J. S. Nelson, and J. F. de Boer, "In vivo burn depth determination by high-speed fiber-based polarization sensitive optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **6**, 474 (2001).

[166] M. C. Pierce, J. Strasswimmer, B. H. Park, B. Cense, and J. F. de Boer, "Birefringence measurements in human skin using polarization-sensitive optical coherence tomography," Journal of Biomedical Optics **9**, 287 (2004).

[167] S. L. Jacques, J. C. Ramella-Roman, and K. Lee, "Imaging skin pathology with polarized light," Journal of Biomedical Optics **7**, 329 (2002).

[168] L. Duan, T. Marvdashti, A. Lee, J. Y. Tang, and A. K. Ellerbee, "Automated identification of basal cell carcinoma by polarization-sensitive optical coherence tomography," Biomed. Opt. Express **5**, 3717–3729 (2014).

[169] T. Marvdashti, L. Duan, S. Z. Aasi, J. Y. Tang, and A. K. E. Bowden, "Classification of basal cell carcinoma in human skin using machine learning and quantitative features captured by polarization sensitive optical coherence tomography," Biomed. Opt. Express **7**, 3721–3735 (2016).

[170] J. Moreau, V. Loriette, and A.-C. Boccara, "Full-field birefringence imaging by thermal-light polarization-sensitive optical coherence tomography. ii. instrument and results," Appl. Opt. **42**, 3811–3818 (2003).

[171] G. Moneron, A.-C. Boccara, and A. Dubois, "Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography," Opt. Lett. **32**, 2058–2060 (2007).

[172] B. Heise, B. Buchroithner, S. E. Schausberger, P. Hierzenberger, G. Eder, and D. Stifter, "Simultaneous detection of optical retardation and axis orientation by polarization-sensitive full-field optical coherence microscopy for material testing," Laser Physics Letters **11**, 055602 (2014).

[173] K. S. Park, W. J. Choi, T. J. Eom, and B. H. Lee, "Single-camera polarization-sensitive full-field optical coherence tomography with polarization switch," Journal of Biomedical Optics **18**, 100504 (2013).

[174] A. Dubois, "Spectroscopic polarization-sensitive full-field optical coherence tomography," Opt. Express **20**, 9962–9977 (2012).

[175] K. L. Lurie, T. J. Moritz, and A. K. Ellerbee, "Design considerations for polarization-sensitive optical coherence tomography with a single input polarization state," Biomed. Opt. Express **3**, 2273–2287 (2012).

[176] F. Goudail and A. Bénière, "Optimization of the contrast in polarimetric scalar images," Opt. Lett. **34**, 1471–1473 (2009).

[177] G. Anna, F. Goudail, and D. Dolfi, "Optimal discrimination of multiple regions with an active polarimetric imager," Opt. Express **19**, 25367–25378 (2011).

[178] B. H. Park and J. F. de Boer, "Polarization sensitive optical coherence tomography," in "Optical Coherence Tomography : Technology and Applications," , W. Drexler and J. G. Fujimoto, eds. (Springer, 2008), chap. 22, pp. 653–695.

[179] G. Anna, F. Goudail, and D. Dolfi, "General state contrast imaging : an optimized polarimetric imaging modality insensitive to spatial intensity fluctuations," Journal of the Optical Society of America A **29**, 892 (2012).

[180] G. Anna, F. Goudail, and D. Dolfi, "Polarimetric target detection in the presence of spatially fluctuating mueller matrices," Opt. Lett. **36**, 4590–4592 (2011).

[181] Q. Y. Duan, V. K. Gupta, and S. Sorooshian, "Shuffled complex evolution approach for effective and efficient global minimization," Journal of Optimization Theory and Applications **76**, 501–521 (1993).

[182] J. F. de Boer and T. E. Milner, "Review of polarization sensitive optical coherence tomography and stokes vector determination," Journal of Biomedical Optics **7**, 359 (2002).

[183] J. Schmitt, "Optical coherence tomography (oct) : a review," **5**, 1205 – 1215 (1999).

[184] J. B. Pawley, ed., *Handbook Of Biological Confocal Microscopy* (Springer US, 2006).

[185] B. Redding, Y. Bromberg, M. A. Choma, and H. Cao, "Full-field interferometric confocal microscopy using a vcsel array," Opt. Lett. **39**, 4446–4449 (2014).

[186] A. Dubois, "Appareil et procede de tomographie optique," (2015). WO Patent App. PCT/EP2014/078,867.

[187] C. Sheppard and X. Mao, "Confocal microscopes with slit apertures," Journal of Modern Optics **35**, 1169–1185 (1988).

[188] G. J. Brakenhoff and K. Visscher, "Confocal imaging with bilateral scanning and array detectors," Journal of Microscopy **165**, 139–146 (1992).

[189] K.-B. Im, S. Han, H. Park, D. Kim, and B.-M. Kim, "Simple high-speed confocal line-scanning microscope," Opt. Express **13**, 5151–5156 (2005).

[190] P. J. Dwyer, C. A. DiMarzio, J. M. Zavislan, W. J. Fox, and M. Rajadhyaksha, "Confocal reflectance theta line scanning microscope for imaging human skin in vivo," Opt. Lett. **31**, 942–944 (2006).

[191] P. J. Dwyer, C. A. DiMarzio, and M. Rajadhyaksha, "Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues," Appl. Opt. **46**, 1843–1851 (2007).

[192] I. Zeylikovich, A. Gilerson, and R. R. Alfano, "Nonmechanical grating-generated scanning coherence microscopy," Opt. Lett. **23**, 1797–1799 (1998).

[193] Y. Watanabe, K. Yamada, and M. Sato, "Three-dimensional imaging by ultrahigh-speed axial-lateral parallel time domain optical coherence tomography," Opt. Express **14**, 5201–5209 (2006).

[194] A. F. Zuluaga and R. Richards-Kortum, "Spatially resolved spectral interferometry for determination of subsurface structure," Opt. Lett. **24**, 519–521 (1999).

[195] Y. Yasuno, T. Endo, S. Makita, G. Aoki, M. Itoh, and T. Yatagai, "Three-dimensional line-field fourier domain optical coherence tomography for in vivo dermatological investigation," Journal of Biomedical Optics **11**, 014014 (2006).

[196] M. Mujat, N. V. Iftimia, R. D. Ferguson, and D. X. Hammer, "Swept-source parallel OCT," in "Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XIII," , J. G. Fujimoto, J. A. Izatt, and V. V. Tuchin, eds. (SPIE, 2009).

[197] D. J. Fechtig, B. Grajciar, T. Schmoll, C. Blatter, R. M. Werkmeister, W. Drexler, and R. A. Leitgeb, "Line-field parallel swept source mhz oct for structural and functional retinal imaging," Biomed. Opt. Express **6**, 716–735 (2015).

[198] Y. Chen, S.-W. Huang, A. D. Aguirre, and J. G. Fujimoto, "High-resolution line-scanning optical coherence microscopy," Opt. Lett. **32**, 1971–1973 (2007).

[199] Y. Chen, S. W. Huang, C. Zhou, B. Potsaid, and J. G. Fujimoto, "Improved detection sensitivity of line-scanning optical coherence microscopy," IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics **18**, 1094–1099 (2012).

[200] O. Liba, M. D. Lew, E. D. SoRelle, R. Dutta, D. Sen, D. M. Moshfeghi, S. Chu, and A. de la Zerda, "Speckle-modulating optical coherence tomography in living mice and humans," **8**, 15845 EP – (2017). Article.

[201] R. S. Jonnal, O. P. Kocaoglu, R. J. Zawadzki, Z. Liu, D. T. Miller, and J. S. Werner, "A review of adaptive optics optical coherence tomography : Technical advances, scientific applications, and the future," Investigative Opthalmology & Visual Science **57**, OCT51 (2016).

[202] G. Roblin, "Microscopie optique," Techniques de l'ingénieur Métrologie optique et photonique (1999).

[203] B. J. Vakoc, M. Shishko, S. H. Yun, W.-Y. Oh, M. J. Suter, A. E. Desjardins, J. A. Evans, N. S. Nishioka, G. J. Tearney, and B. E. Bouma, "Comprehensive esophageal microscopy by using optical frequency domain imaging (with video)," Gastrointestinal Endoscopy **65**, 898–905 (2007).

[204] J. Schmitt, D. Kolstad, and C. Petersen, "Intravascular optical coherence tomography opens a window onto coronary artery disease," Opt. Photon. News **15**, 20–25 (2004).

Liste de publications

Articles publiés dans des revues avec comités de lecture :

— Jonas Ogien, Arnaud Dubois.
High-resolution full-field optical coherence microscopy using a broadband light-emitting diode.
Optics Express, Optical Society of America, 2016, 24, pp.9922.

— Antoine Federici, Henrique Gutierrez da Costa, Jonas Ogien, Audrey Ellerbee, Arnaud Dubois.
Wide-field full-field optical coherence microscopy for high axial resolution phase and amplitude imaging.
Applied optics, Optical Society of America, 2015, 54, pp.8212.

Communications à des congrès avec publication des actes :

— Jonas Ogien, Arnaud Dubois.
Compact LED-based full-field optical coherence microscopy for high-resolution high-speed in vivo imaging.
SPIE Photonics West, Janvier 2017, San Francisco, United States.
Proc. SPIE 10053, Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXI.

— Jonas Ogien, Arnaud Dubois.
Speckle variance full-field optical coherence microscopy for high-resolution micro-vasculature mapping.
SPIE Photonics West, Janvier 2017, San Francisco, United States.
Proc. SPIE 10053, Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXI.

Communications à des congrès sans publication des actes :

— Arnaud Dubois, Jonas Ogien, Arthur Davis, Olivier Levecq, Hicham Azimani, David Siret.
Novel optical coherence tomography approaches for high-resolution biomedical imaging.
Journées d'imagerie optique non conventionnelle, Mars 2017, Paris, France.

— Jonas Ogien, Arnaud Dubois.
Microscopie par cohérence optique plein champ à éclairage LED pour l'imagerie biomédicale.

Colloque Diagnostic et Imagerie Optiques en Médecine et en biologie (OPT-DIAG), Mai 2016, Paris, France.

— Jonas Ogien, Arnaud Dubois.
Tomographie optique cohérente plein champ à haute résolution en éclairage par diode électroluminescente.
Journées Imagerie Optique Non-Conventionnelle, Mars 2016, Paris, France.

— Antoine Federici, Henrique Gutierrez da Costa, Jonas Ogien, Audrey Ellerbee, Arnaud Dubois.
A wide-field full-field optical coherence microscope.
Focus On Microscopy, Mars 2016, Taipei, Taiwan.

université PARIS-SACLAY
ÉCOLE DOCTORALE
Physique et ingénierie : électrons, photons, sciences du vivant (EOBE)

Titre : Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau

Mots clés : Imagerie médicale et biologique, Tomographie par cohérence optique, Microscopie tridimensionnelle, Microscopie interférométrique.

Résumé : La microscopie par cohérence optique (OCM) est une technique d'imagerie tomographique basée sur l'interférométrie en lumière blanche permettant d'imager les milieux biologiques à l'échelle microscopique. L'OCM est une méthode particulièrement adaptée à l'imagerie dermatologique, en particulier pour le diagnostic du cancer de la peau, car elle permet d'obtenir des images similaires aux images histologiques sans nécessiter d'effectuer de biopsie.
Ces travaux de thèse portent sur le développement de la microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau, dans le but de fournir au dermatologue un outil d'imagerie compact, adapté à l'imagerie dermatologique in vivo, et permettant d'obtenir des images à la fois structurelles et fonctionnelles.
Un dispositif de microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM) compact, à éclairage par LED blanche, a tout d'abord été développé, permettant d'obtenir des images tomographiques à très haute résolution (0.7 µm × 1.8 µm) jusqu'à ~200 µm de profondeur dans la peau. En utilisant une LED de haute puissance, des images de peau in vivo ont pu être obtenues.
A partir de ce dispositif de FF-OCM, des méthodes d'imagerie fonctionnelle permettant de cartographier les écoulements sanguins (angiographie) ont été mises en oeuvre. Quatre méthodes, basées sur une analyse du signal interférométrique (temporelle ou fréquentielle), d'images de phase ou d'images d'amplitude ont permis d'imager de l'intralipide s'écoulant dans un modèle de capillaire sanguin.
L'imagerie fonctionnelle polarimétrique a aussi été explorée en FF-OCM. Une optimisation du contraste des images polarimétriques a été obtenue en modifiant les composants polarisants d'un montage conventionnel de FF-OCM polarimétrique en fonction de l'échantillon imagé. Cette méthode a été testée sur un échantillon polarisant simple.
Finalement, une nouvelle méthode d'OCM, la microscopie par cohérence optique confocale à éclairage « ligne » (LC-OCM) a été étudiée, dans le but de développer un système permettant d'imager la peau in vivo, avec une plus grande profondeur de pénétration dans les tissus que la FF-OCM. Ce système, combinant un filtrage interférométrique et un filtrage confocal, a permis d'obtenir des images de peau in vivo en coupe verticale et en coupe en face, avec une résolution spatiale similaire à celle de la FF-OCM, mais à une profondeur supérieure atteignant 300 µm.

Title : Development of optical coherence microscopy systems for skin imaging

Keywords : Medical and biological imaging, Optical coherence tomography, Three-dimensional microscopy, Interference microscopy.

Abstract : Optical coherence microscopy (OCM) is a technique for tomographic imaging based on white light interferometry, making it possible to image biological media with micrometer-scale spatial resolution. OCM is particularly well-suited to dermatological imaging, especially skin cancer diagnosis, since it provides images that are similar to histological images without the need for biopsy.
This PhD thesis focuses on the development of OCM for skin imaging, with the aim of providing a compact, *in vivo* imaging tool for the dermatologist, capable of acquiring structural and functional images of the skin.
A compact, full-field OCM (FF-OCM) system illuminated by a white LED was first developed, making it possible to obtain tomographic images at an ultra-high resolution (0.7 µm × 1.8 µm), up to ~200 µm in depth within the skin. Using a high power LED, in vivo skin images could be obtained.
Using this FF-OCM setup, functional imaging methods for blood flow mapping (angiography) were implemented. Four methods, based on temporal or frequency analysis of the interferometric signal, phase images or amplitude images, have been shown to be able to image intralipid flow within a model blood capillary.
Functional polarimetric imaging has also been explored in FF-OCM. Contrast optimization in polarimetric images has been obtained by modifying the polarizing components of the conventional polarization sensitive FF-OCM setup depending on the sample to be imaged. This method has been tested on a simple polarizing sample.
Finally, a new OCM method, line-field confocal OCM (LC-OCM), has been studied. The goal here was to develop a system capable of imaging the skin in vivo, with a tissue penetration depth greater than what is possible for FF-OCM. This system, which combines interferometric filtering and confocal filtering, makes it possible to obtain in vivo skin images in vertical and en face slices, with a spatial resolution similar to that of FF-OCM, but with a greater penetration depth of 300 µm.

Université Paris-Saclay
Espace Technologique / Immeuble Discovery
Route de l'Orme aux Merisiers RD 128 / 91190 Saint-Aubin, France