



HAL
open science

Tomographie par cohérence optique confocale en ligne multimodale pour le diagnostic non invasif des cancers cutanés

Arthur Davis

► **To cite this version:**

Arthur Davis. Tomographie par cohérence optique confocale en ligne multimodale pour le diagnostic non invasif des cancers cutanés. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLO004 . tel-02134277

HAL Id: tel-02134277

<https://pastel.hal.science/tel-02134277v1>

Submitted on 20 May 2019

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.

Tomographie par cohérence optique confocale en ligne multimodale pour le diagnostic non invasif des cancers cutanés

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

Ecole doctorale n°575 Electrical, optical, biophysics and engineering (EOBE)
Spécialité de doctorat : Physique

ARTHUR DAVIS

Composition du Jury :

Christophe GORECKI Directeur de Recherche, Institut Femto-ST	Rapporteur
Gilles TESSIER Professeur, Institut de la Vision	Rapporteur
Frédéric PAIN Maître de Conférences, Laboratoire IMNC	Examineur
Michael ATLAN Chargé de Recherche, Institut Langevin	Examineur
Arnaud DUBOIS Professeur, Laboratoire Charles Fabry	Directeur de thèse
David SIRET Directeur technique, DAMAE Medical	Invité

Table des matières

Liste des figures	v
Liste des tableaux	ix
Introduction générale	1
1 Introduction sur l'imagerie optique en profondeur des milieux biologiques	3
1.1 Voir sous la peau : un enjeu de santé publique	4
1.1.1 Le cancer cutané	4
1.1.2 Le diagnostic des cancers de la peau aujourd'hui	4
1.1.3 Besoins	6
1.2 L'optique dans les milieux complexes	8
1.2.1 L'absorption de la lumière	9
1.2.2 La diffusion de la lumière	10
1.3 État de l'art des méthodes d'imagerie des milieux biologiques	13
1.3.1 La microscopie confocale	13
1.3.2 La microscopie non-linéaire	17
1.3.3 La microscopie à feuille de lumière	19
1.3.4 La tomographie par cohérence optique (OCT)	20
1.4 Conclusion	21
2 La tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT)	23
2.1 Introduction	24
2.2 La tomographie par cohérence optique à balayage (OCT)	24
2.2.1 Principe général	24
2.2.2 Cohérence temporelle et interférences à deux ondes	25
2.2.3 Implémentations	27
2.3 La microscopie par cohérence optique (OCM)	31
2.3.1 Microscopie par cohérence optique à balayage	31
2.3.2 Microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM)	32
2.4 Caractérisation d'un système d'OCT	34
2.4.1 Résolution axiale	34
2.4.2 Résolution latérale	40
2.4.3 Sensibilité	41
2.4.4 Résolution temporelle	45
2.4.5 Récapitulatif	46
2.5 Tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT)	47
2.5.1 Montage expérimental	47
2.5.2 Ajustement dynamique de la mise au point	58
2.5.3 Interférences en LC-OCT	59
2.5.4 Interférométrie à décalage de phase	61

2.5.5	Acquisition des images en LC-OCT	63
2.5.6	Comparaison avec l'état de l'art	67
3	Dispositif de LC-OCT à deux bandes	69
3.1	Introduction	70
3.2	Principe général	71
3.2.1	Montage expérimental	71
3.2.2	Superposition du plan de cohérence et des plans de focalisation	73
3.2.3	Acquisition des images en pratique	74
3.3	Caractérisation du système	76
3.3.1	Bandes spectrales	76
3.3.2	Résolution axiale	78
3.3.3	Résolution latérale	79
3.3.4	Sensibilité	79
3.3.5	Fusion des images	81
3.4	Applications à l'imagerie de la peau	83
3.4.1	Comparaison entre les bandes	83
3.4.2	Amélioration du ratio résolution/pénétration	86
3.4.3	Amélioration du contraste et différenciation d'échantillons	87
3.5	Conclusion	88
4	Dispositif de LC-OCT couplé à la microscopie Raman	91
4.1	Introduction	92
4.2	La diffusion Raman	93
4.2.1	Interprétation quantique de l'effet Raman	93
4.2.2	Interprétation classique de l'effet Raman	95
4.3	Spectroscopie Raman	97
4.3.1	Spectre Raman	97
4.3.2	Instrumentation	99
4.4	Dispositif de LC-OCT couplé à la spectroscopie Raman	104
4.4.1	Montage expérimental	104
4.4.2	Effet de l'ouverture numérique	107
4.4.3	Calibration et acquisition des spectres	108
4.5	Résultats	111
4.5.1	Résolution spatiale	111
4.5.2	Spectre Raman de la peau	112
4.5.3	Différenciation entre l'épiderme et le derme	114
4.6	Conclusion	115
	Conclusion générale	117
	Bibliographie	121

Liste des figures

1.1	Illustration des critères visuels utilisés en dermatologie pour le diagnostic du mélanome.	5
1.2	Taux de survie à cinq ans et coût annuel moyen de traitement d'un patient atteint d'un mélanome en fonction du stade de développement du mélanome.	6
1.3	Exemple de coupe histologique de la peau.	7
1.4	Bilan de puissance dans un milieu diffusant traversé par une onde lumineuse. . .	8
1.5	Récapitulatif des événements possibles lorsqu'un photon incident rencontre un milieu diffusant et absorbant.	9
1.6	Spectres d'absorption des constituants majeurs de la peau.	10
1.7	Facteur d'efficacité d'extinction d'une particule dans un milieu.	11
1.8	Représentation polaire de l'efficacité de diffusion pour des particules sphériques. .	13
1.9	Schéma du principe de fonctionnement de la microscopie confocale.	14
1.10	Représentation du critère de Rayleigh pour la détermination de la résolution latérale.	15
1.11	Images de peau acquises par microscopie confocale en réflectance.	15
1.12	Diagramme de Jablonski décrivant le phénomène de fluorescence.	16
1.13	Différence entre l'excitation de la fluorescéine à un photon et à deux photons. . .	17
1.14	Diagramme de Jablonski en microscopie non linéaire.	18
1.15	Images de microscopie SHG de la couche dermique chez l'humain et chez la souris.	18
1.16	Schéma d'un montage de microscopie à feuille de lumière.	19
1.17	Image <i>en coupe</i> de la rétine par un système d'OCT.	20
2.1	Principe général de l'OCT.	25
2.2	Représentation schématique de la cohérence temporelle.	26
2.3	Phénomène d'interférences en lumière temporellement cohérente et incohérente. .	26
2.4	Schéma d'un dispositif typique d'OCT.	28
2.5	Illustration du principe de l'OCT en domaine temporel.	28
2.6	Illustration du principe de l'OCT fréquentielle.	29
2.7	Avantage de la FD-OCT sur la TD-OCT	30
2.8	Image de peau humaine saine en coupe verticale réalisée avec le dispositif Vivosight de Michelson Diagnostics.	30
2.9	Images d'un têtard de grenouille par OCM plein champ	32
2.10	Schéma de principe d'un dispositif d'OCM plein champ.	33
2.11	Illustration de la résolution axiale en domaine temporel et fréquentiel.	35
2.12	Simulation numérique de la résolution axiale en fonction de l'ouverture numérique et de la longueur de cohérence	38
2.13	Simulation numérique de la résolution axiale en fonction de la profondeur en présence d'un écart de dispersion	39
2.14	Largeur du faisceau d'éclairage dans l'objet dans le cas d'un faisceau gaussien. .	41
2.15	Simulation numérique de l'enveloppe des franges en échelles linéaire et logarithmique.	42

2.16	Sensibilité de détection en fonction du coefficient de réflexion de la surface de référence	45
2.17	Image de peau acquise par LC-OCT	48
2.18	Schéma typique d'un montage de LC-OCT.	49
2.19	Représentation graphique de l'évolution du RSB spatial en fonction de.	51
2.20	Correction numérique de la non-uniformité de l'éclairage.	52
2.21	Sensibilité de détection en fonction de la capacité de charge effective du capteur.	53
2.22	Images d'une carte de détection d'infrarouge acquises avec deux capacités de charge différentes.	54
2.23	Représentation du RSB temporel en fonction de l'intensité moyenne.	55
2.24	Différentes méthodes de balayage axial pour un système de LC-OCT en configuration Linnik.	56
2.25	Différentes configurations pour l'interféromètre dans un système de LC-OCT.	57
2.26	Décalage des plans de focalisation et de cohérence avec la profondeur d'imagerie.	59
2.27	Figure d'interférence créée par une surface plane.	60
2.28	Écart angulaire entre plan de focalisation et plan de cohérence.	61
2.29	Figure d'interférence avec prise en compte de la profondeur de champ des objectifs.	61
2.30	Démodulation d'une surface réfléchissante par interférométrie à décalage de phase.	63
2.31	Principe de création d'un B-scan en LC-OCT.	64
2.32	Grandeurs utiles pour l'expression de la différence de marche.	64
2.33	Représentation schématique de la modulation linéaire de la phase.	66
3.1	Schéma d'un montage de LC-OCT à deux bandes.	71
3.2	Courbe de déplacement du moteur piézoélectrique.	73
3.3	Effet du chromatisme des objectifs de microscope.	74
3.4	Illustration du déphasage induit par le déplacement du plan de cohérence pour un système à deux bandes.	75
3.5	Schéma fonctionnel du prototype de LC-OCT à deux bandes.	76
3.6	Spectres détectés des bandes VIS et IR.	77
3.7	Figures d'interférence expérimentales (normalisées) créées par une interface verre/air.	78
3.8	Profils d'intensité expérimentaux créés par une lame fendue de silice fondue dans la bande VIS et dans la bande IR.	79
3.9	Mesure de la sensibilité. Enveloppes des franges d'interférence en échelle logarithmique.	80
3.10	B-scans avant redimensionnement d'un objet de calibration pour le recalage d'images.	82
3.11	B-scans <i>in vivo</i> de peau humaine claire (phototype II) acquis simultanément dans la bande VIS et dans la bande IR.	83
3.12	B-scans <i>in vivo</i> de peau humaine (phototype VI) acquis simultanément dans la bande VIS et dans la bande IR.	84
3.13	Profils d'intensité en profondeur obtenus à partir des images présentées en figure 3.12.	85
3.14	Images résultant de la fusion en niveau de gris des images issues des bandes VIS et IR.	85
3.15	Décomposition en ondelettes d'une image de peau acquise par un système de LC-OCT.	88
3.16	Images résultant de la fusion en couleur des images issues des bandes VIS et IR.	89
4.1	Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie impliqués dans les phénomènes de diffusion.	94
4.2	Ellipsoïdes de polarisabilité de l'eau.	96
4.3	Ellipsoïdes de polarisabilité du dioxyde de carbone.	97
4.4	Spectres Raman du silicium cristallin pur et de l'huile de paraffine.	98

4.5	Schéma du dispositif de microscopie confocale Raman conçu au laboratoire.	99
4.6	Transmission du jeu de filtres du système de microscopie Raman.	100
4.7	Évolution du flux collecté par un objectif en fonction de son ouverture numérique.	102
4.8	Effet des composants d'un spectromètre sur la résolution spectrale.	103
4.9	Schéma du prototype de LC-OCT couplé à la microscopie Raman.	105
4.10	Spectres d'émission de fluorescence de quelques fluorophores endogènes typiques.	107
4.11	Images de peau acquises avec un dispositif de LC-OCT avec différents objectifs de microscope.	109
4.12	Suppression de l'autofluorescence d'un spectre Raman.	110
4.13	Mesure de la résolution axiale du microscope Raman.	113
4.14	Mesure d'un spectre de diffusion Raman de peau.	113
4.15	Différentiation entre l'épiderme et le derme par microscopie Raman.	116

Liste des tableaux

1.1	Récapitulatif des performances de l'état de l'art.	22
2.1	Mesures de la PSF transverse pour différents objectifs de microscope.	51
2.2	Comparaison des performances de l'état de l'art avec la LC-OCT.	67
3.1	Récapitulatif des caractéristiques du système de LC-OCT à deux bandes.	81
4.1	Raies présentes et identifiables dans le spectre Raman de peau.	114

Introduction générale

La microscopie optique est apparue vers la fin du XVI^e siècle mais elle reste aujourd'hui une technologie de pointe qui continue à faire l'objet de nombreux développements. Les progrès en matière de fabrication de lentilles et de microscopes pendant le XVII^e siècle ont entre autres permis les premières observations de cellules par Robert Hooke qui compila ses travaux en Biologie dans l'ouvrage *Micrographia*. Plus tard, Antoni van Leeuwenhoek améliore la capacité de grossissement des microscopes ce qui lui permet de découvrir les protozoaires et les spermatozoïdes. Ce n'est qu'au XIX^e siècle qu'Ernst Abbe développe la théorie de la formation des images en microscopie. Il formalise notamment le phénomène de limitation de la résolution d'un microscope optique par la diffraction de la lumière. Il conçoit également de nombreuses inventions permettant d'améliorer la qualité d'imagerie des microscopes en réduisant les aberrations optiques qu'il contribua fortement à formaliser.

Les premiers microscopes fonctionnent en champ large et en champ clair, c'est-à-dire que l'échantillon est éclairé sur l'ensemble du champ de vue et le contraste de l'image formée provient de l'atténuation et de la transmission ou réflexion de la lumière incidente. Les scientifiques exploreront ensuite d'autres formes de contraste avec entre autres la microscopie en champ sombre, à contraste de phase, et à contraste interférentiel. La microscopie en champ large fait encore l'objet de développements avec notamment la technologie PALM (pour *photoactivated localization microscopy*, soit microscopie par localisation photoactivée) permettant d'atteindre des résolutions spatiales surpassant la limite de diffraction et qui a valu le prix Nobel de Chimie en 2014 à Eric Betzig et William Moerner. Toutefois, ces techniques sont bien souvent cantonnées à l'imagerie en surface et ne permettent pas d'observer des objets situés à l'intérieur du corps, même à quelques millimètres de profondeur, sans avoir recourt à la chirurgie.

Dans les années 1950 apparait la microscopie confocale mais ce n'est que dans les années 1990 qu'elle commence à se généraliser dans le domaine scientifique. Contrairement à la microscopie en champ large, la microscopie confocale reconstruit les images point par point grâce à un balayage du faisceau, mais elle a la capacité de sectionner optiquement les échantillons semi-transparents en profondeur grâce à un diaphragme rejetant la lumière en dehors du plan de focalisation. La microscopie confocale a également sa méthode de super-résolution avec la microscopie STED (*stimulated emission depletion*, soit déplétion par émission stimulée) inventée par Stephan Hell qui a aussi reçu le prix Nobel de Chimie en 2014.

Dans ce manuscrit nous nous intéresserons à une nouvelle technique d'imagerie optique appelée la tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT) et qui est basée sur la tomographie par cohérence optique (OCT) et la microscopie confocale en réflectance (RCM). L'OCT est apparue en 1991 et a introduit une nouvelle méthode de sectionnement optique grâce à la cohérence temporelle. En l'espace de quelques années l'OCT s'impose comme un outil de référence en ophtalmologie pour l'imagerie de la rétine. Depuis, l'OCT s'est rapidement développée et diversifiée au-delà du domaine de l'ophtalmologie. C'est dans cette logique de développement que s'inscrit ce projet de thèse.

Ce manuscrit s'articule autour de quatre chapitres : le premier introduit tout d'abord le contexte clinique dans lequel s'inscrit cette thèse et établit ensuite l'état de l'art en matière d'imagerie médicale pour la dermatologie.

Dans un deuxième chapitre, on s'attarde sur les modalités d'imagerie basées sur l'interférométrie en lumière faiblement cohérente que sont l'OCT, la microscopie par cohérence optique à balayage (OCM) et sa variante à éclairage plein champ (FF-OCM). Ces modalités nous permettront d'introduire la LC-OCT qui constitue l'élément central de la thèse, et de détailler son principe de fonctionnement. Un exemple de dispositif de LC-OCT y est décrit en détails, puis caractérisé et finalement comparé à l'état de l'art préalablement établi. On montre également un exemple d'application à l'imagerie de la peau.

Le troisième chapitre présente un dispositif de LC-OCT fonctionnant dans deux bandes spectrales différentes centrées à 770 nm et 1250 nm. La première bande permet de produire des images à haute résolution ($1.2\ \mu\text{m} \times 1.3\ \mu\text{m}$, axial \times latéral) tandis que la seconde offre une profondeur de pénétration étendue ($\sim 700\ \mu\text{m}$). On propose alors deux méthodes de fusion : l'une en niveaux de gris, l'autre en couleurs. La fusion en niveaux de gris permet d'obtenir une image conservant les atouts de chaque bande, à savoir la résolution dans les zones superficielles de la peau et la grande profondeur de pénétration. La fusion en couleurs, quant à elle, peut révéler dans une certaine mesure des propriétés spectroscopiques de l'échantillon.

Dans le quatrième et dernier chapitre nous présentons un dispositif de LC-OCT couplé à un microscope Raman. La microscopie Raman est une méthode de spectroscopie tirant profit de l'effet Raman qui est un phénomène de diffusion inélastique de la lumière par certaines molécules et dont le spectre est caractéristique des molécules en question. Cette technique est donc capable d'identifier la composition moléculaire d'un échantillon, ce qu'on appelle son "empreinte digitale". La spectroscopie Raman a été appliquée au diagnostic du cancer cutané avec de bons résultats mais nécessite de longs temps d'acquisition ce qui la rend peu commode d'utilisation. Couplée à la LC-OCT, celle-ci pourrait alors lever d'éventuelles ambiguïtés dans les images de LC-OCT. De plus, l'imagerie à haute résolution par LC-OCT permettrait de localiser les zones à analyser par spectroscopie Raman et donc de limiter la durée totale de l'acquisition des spectres.

Chapitre 1

Introduction sur l'imagerie optique en profondeur des milieux biologiques

Sommaire

1.1	Voir sous la peau : un enjeu de santé publique	4
1.1.1	Le cancer cutané	4
1.1.2	Le diagnostic des cancers de la peau aujourd'hui	4
1.1.3	Besoins	6
1.2	L'optique dans les milieux complexes	8
1.2.1	L'absorption de la lumière	9
1.2.2	La diffusion de la lumière	10
1.3	État de l'art des méthodes d'imagerie des milieux biologiques . . .	13
1.3.1	La microscopie confocale	13
1.3.2	La microscopie non-linéaire	17
1.3.3	La microscopie à feuille de lumière	19
1.3.4	La tomographie par cohérence optique (OCT)	20
1.4	Conclusion	21

1.1 Voir sous la peau : un enjeu de santé publique

1.1.1 Le cancer cutané

Le cancer de la peau est une maladie de la peau caractérisée par la prolifération de cellules anormales. À l'origine, une mutation de l'ADN d'une cellule, généralement déclenchée par l'exposition naturelle ou artificielle aux rayons ultraviolets, permettant à celle-ci de se multiplier rapidement de façon non contrôlée.

Aujourd'hui, le cancer de la peau représente un enjeu majeur de santé publique. En effet, le cancer de la peau est le type de cancer présentant le plus fort taux de prévalence et représente environ 40 % des cas de cancer [1]. Le taux d'incidence semble avoir augmenté de manière substantielle pour tous les types de cancers de la peau, bien qu'il ne soit pas clairement établi s'il existe une véritable "épidémie" de cancers de la peau ou si cette augmentation est imputable à un dépistage plus large et plus efficace [2]. Quoiqu'il en soit, la tendance semble être à la hausse, notamment en raison du vieillissement de la population [2].

On distingue deux grandes catégories de cancers de la peau : les carcinomes et les mélanomes. Les carcinomes présentent eux-mêmes deux grandes sous-catégories que sont les carcinomes basocellulaires (BCC) et les carcinomes spinocellulaires (SCC) et font partie de la plus large catégorie des cancers de la peau de type non-mélanome (NMSC pour *non melanoma skin cancer*). Les carcinomes représentent la majorité des cancers cutanés avec plus de 90 % des cas mais présentent un taux de mortalité faible comparé à leur prévalence. Les mélanomes, bien que beaucoup plus rares, sont plus agressifs et sont responsables de la majeure partie des décès imputables aux cancers de la peau. Lorsque le mélanome est détecté de manière précoce, une simple ablation suffit à soigner le patient. Toutefois, le fort potentiel métastatique du mélanome lui permet de s'étendre rapidement à d'autres organes, et complique et alourdit ainsi le traitement du patient qui voit alors ses chances de survie s'amoinrir [3].

Les populations à peau claire sont les plus touchées. En effet, la mélanine, molécule produite par les mélanocytes responsable de la pigmentation de la peau, joue un rôle protecteur contre le rayonnement ultraviolet grâce à une grande efficacité d'absorption. Sans une barrière protectrice, qu'elle soit naturelle grâce à la mélanine ou artificielle comme une crème solaire, le rayonnement ultraviolet, très énergétique, pourrait causer des mutations d'ADN à l'origine de cellules cancéreuses. Si des causes génétiques peuvent également être mises en cause pour expliquer la formation de tumeurs, la principale cause reste l'exposition, naturelle ou artificielle, au rayonnement ultraviolet et le manque de protection [4].

1.1.2 Le diagnostic des cancers de la peau aujourd'hui

Malgré certaines avancées dans le domaine des traitements des cancers cutanés, les facteurs ayant le plus fort impact sur le pronostic des patients restent le diagnostic précoce et l'ablation complète des tumeurs avant le stade métastatique. À titre d'exemple, un mélanome dépisté au stade le plus précoce ne nécessite qu'une simple ablation et est guéri dans 98 % des cas.

Aujourd'hui, la détection des cancers de la peau se fait par un dermatologue grâce à un examen visuel à l'œil nu ou en utilisant un dispositif d'imagerie grossissant appelé dermatoscope. Cet examen se limite donc à la surface de la peau alors que les tumeurs se développent d'abord en profondeur. Dans le cas du mélanome, la règle dite "ABCDE" est suivie afin de différencier une tumeur maligne d'un nævus bénin :

- **Asymétrie.** Un nævus bénin est généralement symétrique, c'est-à-dire que si l'on trace un trait passant par son centre, les deux moitiés sont superposables. Une asymétrie est un avertissement quant à la présence d'un mélanome.
- **Bordure.** Les bords d'un mélanome ont tendance à être irréguliers et dentelés contrairement au nævus bénin dont les bords sont généralement plus lisses.
- **Couleur.** L'inhomogénéité de la couleur est un signe de mélanome. Les mélanomes peuvent

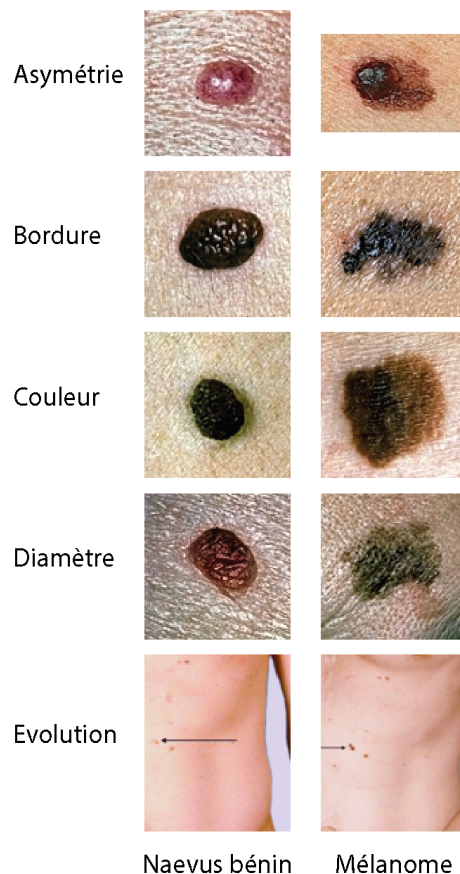


FIGURE 1.1 – Illustration des critères visuels utilisés en dermatologie pour le diagnostic du mélanome selon la règle dite "ABCDE". Images tirées de www.skincancer.org.

en effet présenter plusieurs tons de brun, voire de rouge, de blanc ou de bleu, contrairement au nævus bénin.

- **Diamètre.** Un nævus bénin est en général petit (moins de 6 mm). Le mélanome peut lui être plus étendu en fonction du stade de son développement.
- **Évolution.** Les nævus bénins n'évoluent pas dans le temps. N'importe quelle évolution, qu'elle soit de taille, de couleur, de forme, est un signe de mélanome.

Si la lésion est suspecte, une biopsie est réalisée. Elle est ensuite soumise à un examen histopathologique par un anatomo-pathologiste : la biopsie est tranchée, colorée puis analysée à l'aide d'un microscope conventionnel. Le diagnostic est finalement transmis au dermatologue qui décidera alors du traitement à adopter.

L'examen visuel présente toutefois un défaut de taille : lorsque qu'une lésion présente les critères de taille, de forme et de couleur permettant de diagnostiquer un mélanome, celui-ci est d'ores et déjà à un stade relativement avancé. L'efficacité du traitement est ainsi limitée et le taux de rechute augmente.

Par ailleurs, l'ensemble du processus est long, invasif, coûteux et révèle dans 60 % des cas des résultats bénins. Une part non négligeable des biopsies, et avec celles-ci le stress et la gêne des patients, sont donc évitables. On estime également à 20 % la proportion des cancers non diagnostiqués (1/3 pour les mélanomes) lors de ces examens de routine.

En plus d'être peu efficace et contraignant, l'examen histologique se révèle être également un fardeau économique. Ce processus de dépistage nécessite l'intervention de plusieurs acteurs dont au moins une opération chirurgicale. Si la précocité du dépistage influe sur le taux de survie, elle a également un fort impact sur le coût du traitement. Le graphe présenté dans la figure 1.2

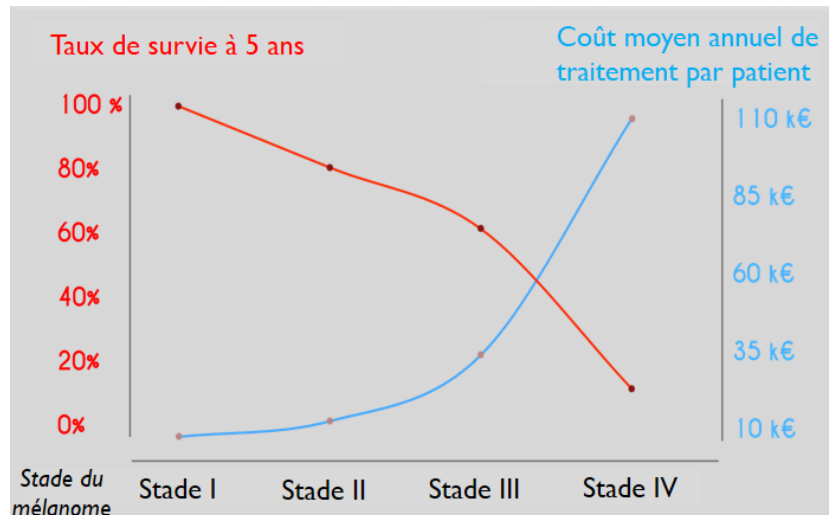


FIGURE 1.2 – Taux de survie à cinq ans et coût annuel moyen de traitement d'un patient atteint d'un mélanome en fonction du stade de développement du mélanome. Dans les stades 1 et 2, le mélanome reste local et commence à se développer et à grossir. Dans le stade 3, le mélanome s'est propagé dans au moins un ganglion lymphatique proche de l'emplacement où le cancer a pris naissance. Dans le stade 4, le cancer a métastasé, c'est-à-dire qu'il s'est propagé à d'autres organes du corps. Modifié de Technavio.com

illustre bien le besoin de diagnostiquer le plus précocement possible le mélanome tant au niveau humain que sur le plan économique.

Finalement, il est à noter que ce même processus est également utilisé lors de la chirurgie de Mohs, technique itérative d'ablation d'une tumeur contrôlée par microscope, afin d'évaluer les marges d'exérèse. Cette méthode permet de s'assurer qu'une tumeur est extraite dans sa totalité tout en retirant le minimum de tissus sains. Pour cela la tumeur est extraite par fines couches qui sont analysées par un examen histologique permettant d'évaluer si elles présentent des résidus de cellules cancéreuses aux bordures. Si tel est le cas, le processus est répété. En l'absence de méthode permettant d'évaluer ces marges d'exérèse en direct, cette intervention peut donc durer jusqu'à plusieurs heures.

1.1.3 Besoins

La précédente section nous a montré les limites de la méthode de diagnostic conventionnelle consistant à examiner visuellement la peau à l'œil nu ou à l'aide d'un dermatoscope suivie d'un examen histologique. Pourtant, faute d'alternatives crédibles, elle reste la référence absolue. En effet, un certain nombre de critères sont indispensables afin de pouvoir proposer un nouvel outil d'imagerie capable de la remplacer. Si la qualité d'imagerie est primordiale, les aspects pratiques ne sont pas à négliger si l'on souhaite développer un dispositif utilisable lors d'examens de routine. Celui-ci doit donc vérifier plusieurs conditions :

- **Résolution spatiale et contraste.** L'image produite doit pouvoir révéler des détails à l'échelle cellulaire. En effet, pour certaines pathologies telles que le mélanome, la taille et la forme des cellules sont des sources importantes d'information. La résolution spatiale doit donc être similaire aux images histologiques soit de l'ordre de $1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m} \times 1\ \mu\text{m}$. Évidemment, outre la résolution le contraste se doit d'être suffisant pour distinguer tous ces détails.
- **Profondeur de pénétration.** Une coupe histologique ne souffre d'aucun problème de pénétration car l'échantillon est tranché avant d'être examiné à plat sous un microscope.

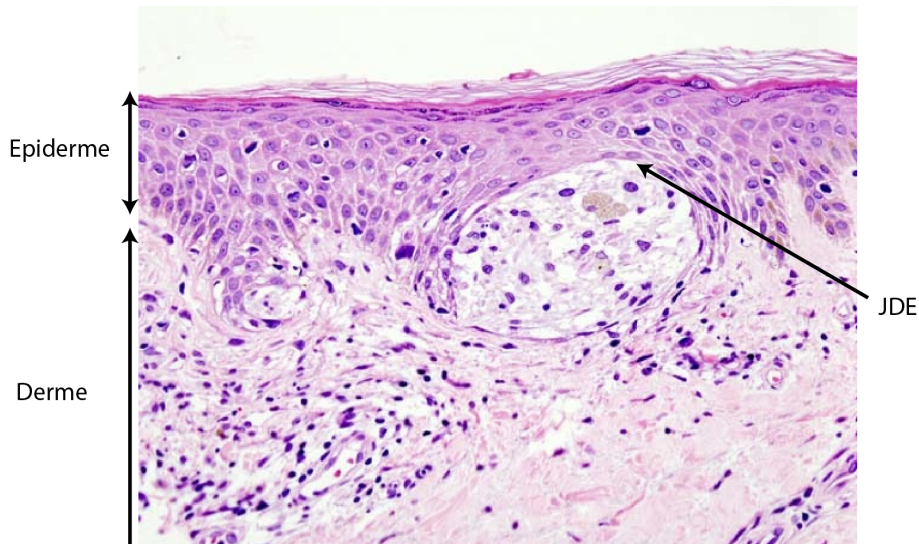


FIGURE 1.3 – Exemple de coupe histologique de la peau. La qualité d'imagerie est excellente mais l'échantillon a dû subir une longue préparation pour cela. JDE : jonction dermo-épidermique.

Cela permet d'accéder à des zones profondes inaccessibles par n'importe quelle méthode optique. Toutefois, il n'est pas toujours nécessaire de sonder les plus profondes couches de la peau. En effet, les tumeurs se développent en général au niveau de la jonction entre les deux couches les plus superficielles que sont le derme et l'épiderme (JDE). Cette jonction se situe typiquement à 200 μm sous la surface de la peau selon la zone examinée. Il suffit donc de pouvoir visualiser confortablement cette jonction pour accéder aux informations les plus essentielles. À noter que c'est cette condition qui sera la plus difficile à vérifier, les autres pouvant être remplies par un simple dermatoscope bien conçu.

- **Imagerie temps réel et *in vivo*.** Un outil de diagnostic dont le temps d'acquisition est trop long n'est généralement pas utilisé car son utilisation lors d'examens de routine deviendrait trop contraignante. L'examen doit également pouvoir être fait sur des échantillons vivants afin de procéder à l'analyse *in situ*.
- **Imagerie non-invasive et non-ionisante.** L'objectif d'une méthode optique pour le diagnostic des cancers cutanés est d'éviter au maximum les biopsies. Se passer d'incisions dans la peau des patients permet d'augmenter le nombre d'analyses sans causer de dommages aux patients et donc d'offrir un meilleur suivi. D'autre part, l'utilisation d'agent de contraste doit être évitée. Enfin, l'outil ne doit pas être dangereux pour la santé du patient. En effet, l'utilisation d'un rayonnement ionisant augmenterait le risque de développement de cancers. Un tel outil ne serait donc probablement pas utilisé en tant qu'assistance quotidienne au diagnostic par les dermatologues.
- **Dispositif compact et maniable.** Pour que l'outil de diagnostic soit utilisé en routine par les dermatologues, il doit être facilement utilisable et permettre d'accéder à toutes les parties du corps.

Cette thèse se propose de présenter un nouveau dispositif d'imagerie optique combinant les avantages de plusieurs techniques déjà existantes afin de remplir tous ces critères. Ceux-ci seront à garder en mémoire lorsque nous nous intéresserons à l'état de l'art des dispositifs d'imagerie en profondeur dans la section 1.3. Mais tout d'abord, étudions la manière dont la lumière se comporte dans les milieux complexes diffusants, tels que la peau, et les raisons pour lesquelles il est si difficile d'imager de tels échantillons en profondeur.

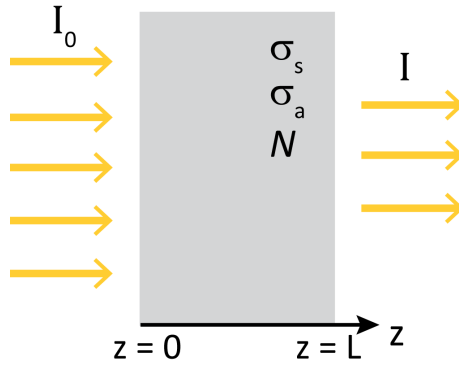


FIGURE 1.4 – Représentation schématique d'un bilan de puissance dans le cas d'un milieu diffusant composé de N particules ayant un coefficient d'extinction σ_e éclairé sur une surface S avec une intensité I .

1.2 L'optique dans les milieux complexes

Les milieux complexes tels que la peau sont constitués d'une multitude de particules variant en tailles, densités et propriétés physico-chimiques. Ces particules peuvent interagir avec une onde électromagnétique incidente, et ainsi provoquer une extinction partielle ou totale de l'onde par le biais de la diffusion et de l'absorption. On appelle "extinction" la somme des effets de la diffusion et de l'absorption et on la définit par sa section efficace σ_e telle que la puissance prélevée par le milieu est égale à $\sigma_e \times I_{inc}$ où I_{inc} est l'intensité de l'onde incidente.

Pour illustrer les effets de l'extinction par un échantillon biologique tel que la peau d'un point de vue macroscopique, procédons à un bilan de puissance pour une onde plane incidente monochromatique pour un échantillon biologique modélisé par une plaque d'épaisseur finie dz mais de section infinie, homogène et composée de N particules identiques, diffusantes et absorbantes de section efficace σ_e (voir figure 1.4).

$$\begin{aligned}
 SI(z + dz) - SI(z) &= S dI = I \sigma_e dN = -I \sigma_e \rho S dz \\
 \Rightarrow \frac{dI}{dz} + \sigma_e \rho I(z) &= 0 \\
 \Rightarrow I(z) &= I_0 \exp(-\rho \sigma_e z)
 \end{aligned} \tag{1.1}$$

L'équation 1.1 est connue sous le nom de loi de Beer-Lambert. Le coefficient d'extinction contient à la fois la diffusion et l'absorption. Cela se manifeste par l'égalité $\sigma_e = \sigma_d + \sigma_a$ où σ_d et σ_a sont respectivement les sections efficaces de diffusion et d'absorption. Nous pouvons également raisonner en termes de libre parcours moyen l_e correspondant à la distance pour laquelle la puissance incidente a été atténuée de $1 - e^{-1} = 63\%$. L'équation 1.1 se transforme alors en $I(z) = I_0 \exp(-z/l_e)$ et on a alors l'égalité suivante : $l_e^{-1} = l_d^{-1} + l_a^{-1}$ où l_d et l_a sont les libres parcours moyens de diffusion et d'absorption. Ces deux grandeurs sont plus intuitives à manipuler et nous permettront par la suite d'estimer la profondeur maximale de pénétration dans un échantillon biologique.

Utilisant un modèle corpusculaire de la lumière, la figure 1.5 récapitule les événements possibles lorsqu'un photon traverse un milieu diffusant et absorbant. La probabilité d'absorption ou de diffusion dépend essentiellement de la distance parcourue dans le milieu comparée aux libres parcours moyen. Nous expliciterons ces différents phénomènes dans la suite de cette section.

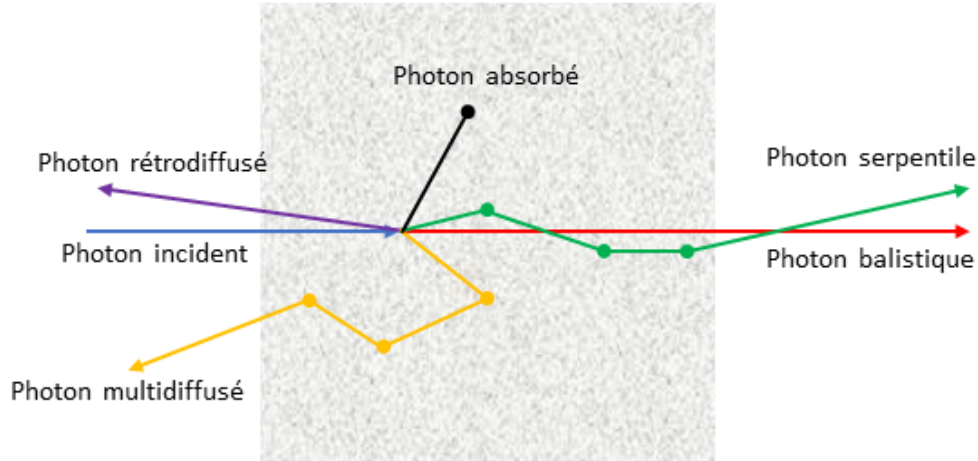


FIGURE 1.5 – Récapitulatif des événements possibles lorsqu'un photon incident rencontre un milieu diffusant et absorbant. Les photons non affectés sont dits "balistiques". Les photons serpente sont les photons diffusés plusieurs fois (multi-diffusés) mais qui gardent tout de même une direction similaire au photon incident.

1.2.1 L'absorption de la lumière

Le premier facteur auquel nous nous intéresserons dans le phénomène d'extinction de la lumière par un milieu est l'absorption. Ce phénomène est dû à l'interaction entre l'onde électromagnétique incidente, ou du photon, et les atomes constituant le matériau, provoquant le transfert de l'énergie électromagnétique vers une autre forme d'énergie. Cela peut être sous forme de chaleur, de lumière dans le cas de la fluorescence, ou encore participer à une réaction photochimique dans le cas de la photosynthèse. Comme pour la diffusion on peut définir une section efficace σ_a et un libre parcours moyen l_a . Ces deux grandeurs sont reliées par la formule $l_a = (N\sigma_a)^{-1}$ où N est le nombre de particules.

D'un point de vue macroscopique, tout milieu non transparent d'indice n et de coefficient d'absorption $\mu_a = l_a^{-1}$ atténue l'onde la traversant selon la loi de Beer-Lambert :

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_a z}$$

Ce phénomène est causé par la partie imaginaire n'' de l'indice optique du milieu. En effet, si l'on considère une onde plane se propageant dans un milieu d'indice $n = n' + in''$ alors le champ électrique de l'onde $\vec{E}(r, t)$ se met sous la forme :

$$E(\vec{r}, t) = \vec{E}_0 e^{-i(n\frac{\omega}{c}r - \omega t)} = \vec{E}_0 e^{-i(n'\frac{\omega}{c}r - i\omega t)} e^{n''\frac{\omega}{c}r}$$

On retrouve le résultat de l'équation 1.2.1 qui est que l'amplitude (ou l'intensité) de l'onde diminue exponentiellement avec la distance parcouru dans le milieu absorbant. Par analogie, le terme $n''\frac{\omega}{c}$ peut s'assimiler au coefficient d'absorption μ_a défini plus haut.

Plusieurs études ont été menées afin de mesurer le coefficient d'absorption moyen dans la peau avec une grande variabilité dans les résultats. L'ordre de grandeur pour le coefficient d'absorption μ_a dans la peau varie entre 0.1 et 1 mm^{-1} , soit une longueur caractéristique d'absorption de 1 à 10 mm [5]. La figure 1.6 présente les coefficients d'absorption de différents constituants d'échantillons biologiques. Cette figure révèle un minimum local d'absorption situé entre 600 et 1300 nm , plus communément appelé "fenêtre thérapeutique". Cette fenêtre est donc naturellement intéressante pour les applications d'imagerie en profondeur d'échantillons biologiques.

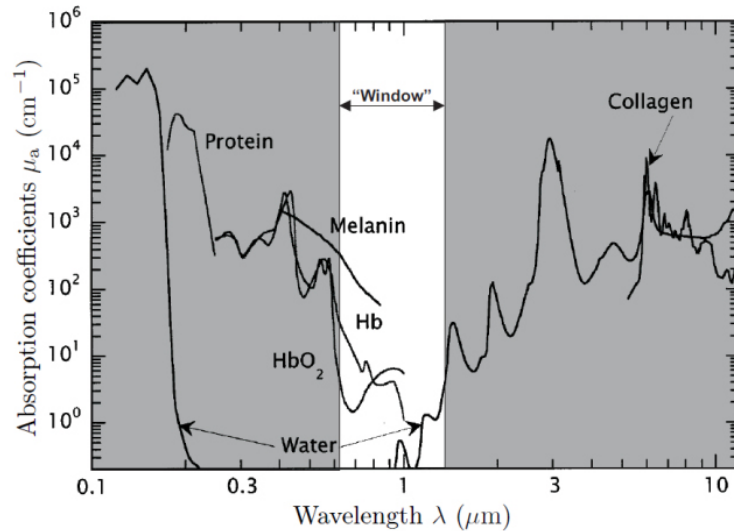


FIGURE 1.6 – Spectres d’absorption des constituants majeurs de la peau. La fenêtre thérapeutique où l’absorption est minimale se situe approximativement entre 600 et 1300 nm, la peau y sera donc plus transparente. Graphe tiré de <http://www.fluomin.org/fr/uv-danger.php>.

1.2.2 La diffusion de la lumière

On distingue trois théories de la diffusion, dont les cas de validité vont essentiellement dépendre de la taille des particules mises en jeu et de la longueur d’onde considérée. Afin d’illustrer ces trois cas, nous considérerons des particules sphériques de rayon a et une onde incidente plane de longueur d’onde λ .

Régime de diffusion spéculaire ($a \gg \lambda$). Nous considérons ici le cas où les diffuseurs sont largement plus grands que la longueur d’onde. Dans ce cas les lois de l’optique géométrique s’appliquent et la direction de l’onde diffusée est donnée par les lois de Descartes. L’onde incidente est interceptée par la particule de section géométrique $S = \pi a^2$ qu’on pourrait penser être égale à la section efficace d’extinction σ_e . Il faut toutefois prendre en compte la diffraction par la particule, quand bien même elle serait de taille macroscopique. Selon le principe de Babinet attestant que la figure de diffraction en champ lointain par une particule opaque est la même, en dehors de l’image géométrique, que celle créée par un trou, de même section que la particule percé dans un plan opaque infini, la section efficace de diffusion est donc également $\sigma_d = \pi a^2$ ce qui nous donne une section efficace d’extinction :

$$\sigma_e = 2\pi a^2$$

Ce résultat peut sembler surprenant car la particule prélève à l’onde le double de l’énergie qu’elle puisse intercepter. Il faut toutefois garder en mémoire que l’on considère ici le champ lointain. Dans ces conditions, la moindre déviation du faisceau par rapport à la direction incidente contribue à l’extinction de l’onde.

Régime de diffusion de Rayleigh ($a \ll \lambda$). Les particules considérées sont ici largement plus petites que la longueur d’onde, nous sommes donc dans le domaine des atomes et des molécules simples. Dans ces conditions, on peut supposer le champ électrique de l’onde uniforme à l’intérieur de la particule¹. Cette onde incidente agit sur les charges de la particule en les

1. En toute rigueur il faut également remplir la condition $a \ll \frac{\lambda}{n}$ où n est l’indice de réfraction de la particule. La longueur $\frac{\lambda}{n}$ représente donc la longueur d’onde effective à l’intérieur de la particule.

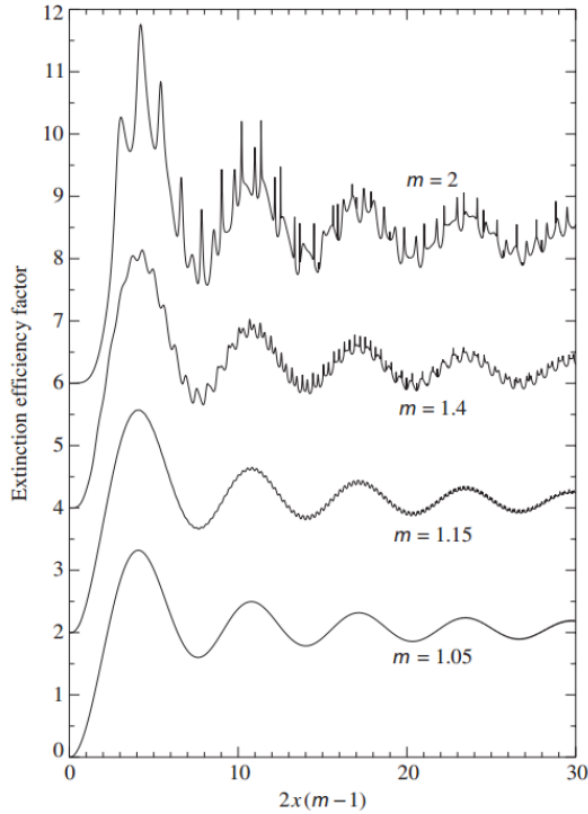


FIGURE 1.7 – Facteur d'efficacité d'extinction en fonction du paramètre de taille x et du rapport m entre les indices du milieu et de la particule. L'efficacité d'extinction est définie comme le rapport entre la section efficace d'extinction et la section physique de la particule $Q_e = \frac{\sigma_e}{\pi a^2}$. Le paramètre de taille décrit le rapport entre le diamètre de la particule diffusante et la longueur d'onde $x = \frac{2\pi n_p a}{\lambda}$ où n_p est l'indice de la particule. L'échelle verticale est valable pour le cas " $m = 1.05$ ".

faisant osciller. Les barycentres des charges positives et négatives se déplacent l'un par rapport à l'autre créant ainsi un moment dipolaire oscillant et transformant ainsi la particule en dipôle rayonnant un champ électrique induit : l'onde diffusée. La diffusion Rayleigh est donc le résultat de la capacité des particules à se polariser et donc à créer un moment dipolaire \vec{p} à partir d'un champ électrique incident \vec{E}_0 selon la formule suivante :

$$\vec{p} = \alpha(\omega)\epsilon_0\vec{E}_0$$

où $\alpha(\omega)$ est la fonction de polarisabilité de la particule et ϵ_0 est la permittivité électrique du vide.

En se plaçant en champ lointain, l'approximation dipolaire nous conduit à une expression simplifiée de la puissance diffusée par une particule :

$$P_d = \frac{\mu_0\omega^4}{12\pi c} \|\vec{p}^2\| \quad (1.2)$$

Si on considère un domaine spectral où la polarisabilité varie peu, alors on aboutit au résultat que les petites particules sont bien plus efficaces pour diffuser les courtes longueurs d'onde. En effet, un doublement de la fréquence résulte en une multiplication par 16 de la puissance diffusée.

Régime de diffusion de Mie ($a \approx \lambda$). Lorsque la taille de la particule et la longueur d'onde sont semblables on ne peut plus négliger les variations de phase à l'intérieur de la particule. La

théorie de Mie, du nom du physicien allemand Gustav Mie, expose les solutions aux équations de Maxwell décrivant la diffusion d'une onde plane par une particule sphérique et homogène de taille quelconque. Ces solutions sont données sous la forme de séries pouvant être calculées numériquement [6].

La figure 1.7 montre les variations de l'efficacité de diffusion, définie comme le rapport de la section efficace sur la section physique de la particule, en fonction du paramètre de taille $x = ka = \frac{2\pi n_p a}{\lambda}$, où a est le rayon de la particule sphérique et k la norme du vecteur d'onde de l'onde incidente, ainsi qu'en fonction du rapport des indices de réfraction entre le milieu est la particule $m = \frac{n_p}{n_m}$. La théorie de Mie ne supposant aucune condition sur le paramètre de taille, on peut retrouver les conclusions des cas précédemment considérés. En effet, les résultats de la théorie de Mie montre une évolution en x^4 de l'efficacité d'extinction pour les faibles paramètres de taille, et une asymptote égale au double de la section physique de la particule. Entre ces deux extrêmes on constate une évolution importante de l'efficacité de diffusion sous la forme d'oscillations amorties.

Outre la puissance diffusée, l'angle de diffusion dépend également fortement du paramètre de taille. En effet, dans le cas de la diffusion de Rayleigh la diffusion est isotrope alors que dans le cas des grandes particules la diffusion est spéculaire. Dans le cas de la diffusion de Mie, la dépendance de la diffusion avec l'angle est plus complexe, mais d'une manière générale on peut établir que plus la particule est grosse plus la diffusion est directionnelle. La figure 1.8 montre les diagrammes de diffusion d'une onde par des particules de tailles différentes pour un même rapport d'indice.

La complexité des tissus biologiques rend difficile l'extraction d'une loi générale et simple pour la diffusion. On peut toutefois, comme pour l'absorption, utiliser une description macroscopique pour laquelle une loi de décroissance exponentielle de type Beer-Lambert est communément admise :

$$I(z) = I_0 e^{-\mu_d z}$$

où I_0 est l'intensité de l'onde incidente, z la profondeur de pénétration dans l'échantillon et μ_d est le coefficient de diffusion. Dans la peau, ce coefficient est de l'ordre de 1 mm^{-1} .

Pour la peau, les valeurs de coefficient de diffusion peuvent varier entre 1 et 10 mm^{-1} [5]. On distingue ici deux régimes de diffusion, cette fois en fonction du libre parcours moyen de diffusion $l_d = \mu_d^{-1}$ (de 0.1 à 1 mm pour la peau) :

1. **Régime balistique ou de diffusion simple.** Lorsque l'épaisseur de l'échantillon est négligeable par rapport au libre parcours moyen de diffusion l_d l'onde n'est que peu diffusée. Les photons ne sont quasiment pas déviés et les informations qu'ils contiennent sont donc bien résolues spatialement. C'est donc ce genre de photons que l'on privilégie pour une bonne qualité d'imagerie dans les méthodes d'imagerie conventionnelle. Toutefois, bien que ces méthodes permettent une bonne résolution spatiale, elles sont bien évidemment limitées en termes de profondeur de pénétration.
2. **Régime de diffusion multiple.** Lorsque la distance traversée par un photon est grande devant le libre parcours moyen de diffusion, il est probable que ce photon subisse plusieurs événements de diffusion et perde complètement l'information de sa direction de départ. Certaines méthodes optiques tirent profit de l'information transportée par les photons multi-diffusés. Elles présentent l'avantage d'offrir une profondeur de pénétration dans les tissus pouvant aller jusqu'à plusieurs centimètres mais au prix d'une plus faible résolution spatiale.

Étant donné le faible libre parcours moyen dans la peau, il est nécessaire de travailler en réflexion et non pas en transmission lorsque l'on veut imager ce genre d'échantillons car il n'existerait aucun photon balistique. Les méthodes d'imagerie en réflexion telle que la LC-OCT utilisent donc principalement les photons rétrodiffusés une seule fois car ce sont eux qui permettent une meilleure localisation de l'information et donc une meilleure résolution spatiale.

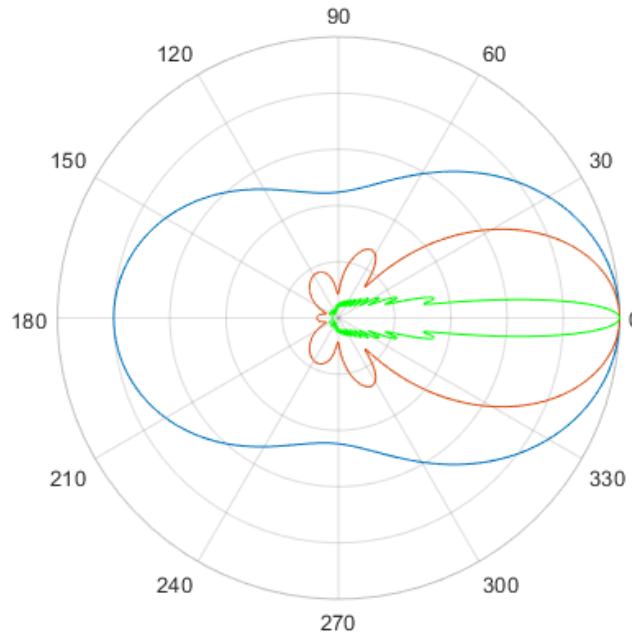


FIGURE 1.8 – Représentation polaire de l'efficacité de diffusion pour des particules sphériques de diamètres différents ($R_1 = 0.1 \mu\text{m}$ (courbe bleue), $R_2 = 1 \mu\text{m}$ (courbe rouge), $R_3 = 5 \mu\text{m}$ (courbe verte)). Pour les particules de diamètres R_2 et R_3 , un gamma de 0.25 est appliqué afin de mettre en évidence les lobes secondaire autrement presque imperceptibles. Toutes les courbes sont normalisées. On constate que plus la particule est petite plus la diffusion est isotrope, et plus elle est grande plus la diffusion se fait vers l'avant. Courbes calculées à partir de [7, 8, 6].

1.3 État de l'art des méthodes d'imagerie des milieux biologiques

1.3.1 La microscopie confocale

La microscopie confocale en réflectance (RCM)

La microscopie confocale en réflectance, proposée pour la première fois en 1957 [9], est la première méthode optique permettant de faire des images en profondeur de tissus biologiques. Cette capacité vient de la présence d'un diaphragme confocal, aussi appelé *pinhole*, en face du détecteur permettant de rejeter la majeure partie de la lumière rétrodiffusée provenant d'un plan hors focus.

En microscopie confocale, l'échantillon est éclairé en un point par un faisceau de lumière focalisé par l'objectif de microscope et le signal est collecté par un monodétecteur. Comme on peut le voir sur la figure 1.9, ce faisceau éclaire également un cône en amont et en aval du point de focalisation. Ces zones éclairées sont susceptibles de réfléchir la lumière et donc d'émettre un signal détectable par le capteur. Cette lumière non désirée peut donc brouiller le signal provenant du point de focalisation si elle n'est pas rejetée. Le fait de placer en face du capteur un diaphragme, dont l'ouverture est suffisamment petite et dont la position est conjuguée au point de focalisation, permet de réaliser cela car les faisceaux hors du plan de focalisation dans l'échantillon seront également défocalisés dans le plan du diaphragme. Le terme "confocal" vient donc du fait que l'on éclaire et que l'on détecte la lumière en un même point grâce à une même optique de focalisation.

Un paramètre important en microscopie confocale est le diamètre du diaphragme. Diminuer ce diamètre permet d'améliorer le filtrage confocal et donc d'améliorer le sectionnement optique

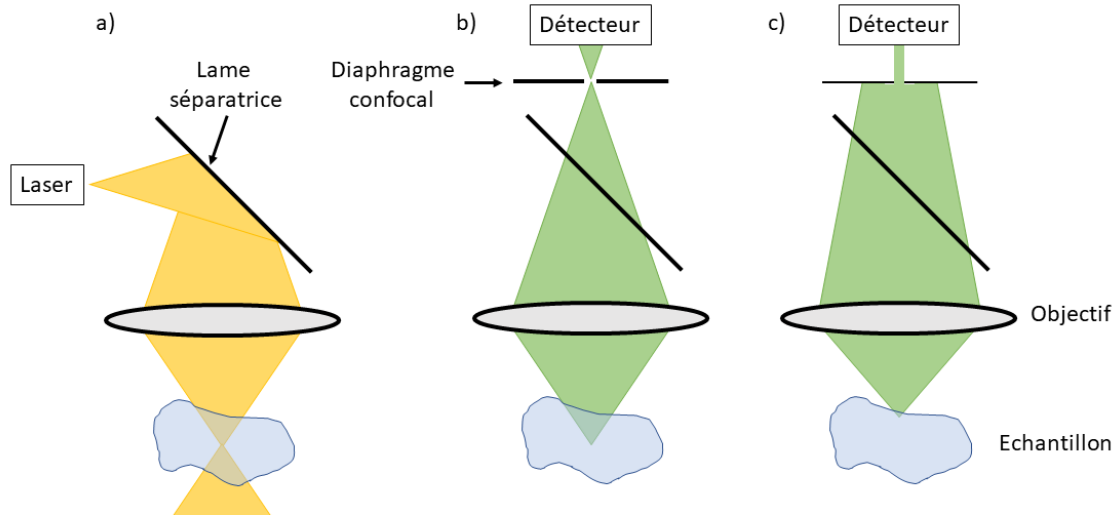


FIGURE 1.9 – Schéma du principe de fonctionnement de la microscopie confocale. Le laser, représenté en a), émet un faisceau focalisé dans l'échantillon par un objectif de microscope. On constate que les zones situées en amont et en aval du point de focalisation sont éclairées et donc susceptibles de diffuser un signal. En b) et en c), on représente la partie détection du microscope confocal. Un diaphragme confocal est placé devant le détecteur de façon à ce qu'il soit à la position conjuguée du point éclairé. Ainsi le signal provenant du point de focalisation de l'éclairage est détecté en totalité (b), alors que le signal diffusé par un point hors focus est en grande partie bloqué par le diaphragme confocal avant d'atteindre le détecteur (c).

de l'échantillon. En effet, l'épaisseur de la section optique est égale à la résolution axiale du microscope qui est également sa profondeur de champ. L'ouverture du diaphragme augmente la profondeur de champ selon la formule suivante [10] :

$$\text{FWHM}_{axial} = 0.67 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{ON}^2}} \sqrt{1 + p^2} \quad (1.3)$$

où λ est la longueur d'onde d'éclairage, n l'indice de réfraction de l'échantillon, $\text{ON} = n \sin \alpha_{max}$ est l'ouverture numérique du système, et où p est une grandeur sans dimension définie comme le rapport entre le diamètre de l'image du diaphragme confocal dans l'espace objet et le diamètre d'une tache d'Airy. Plus le diaphragme est petit, meilleur sera le sectionnement mais la quantité de lumière détectée sera également réduite. Pour des considérations de rapport signal sur bruit, il faut donc trouver un compromis afin de maximiser le signal récolté tout en conservant la meilleure résolution axiale possible. En pratique, on utilise un diaphragme dont le diamètre est légèrement plus grand que la tache d'Airy du système.

La résolution latérale, classiquement définie comme la distance minimale pour séparer deux taches d'Airy (voir figure 1.10), dépend également de la longueur d'onde λ et de l'ouverture numérique ON :

$$\Delta x = \frac{1.22\lambda}{2\text{ON}}$$

En revanche, la double focalisation (éclairage et collection) en microscopie confocale a pour effet d'affiner la PSF transverse du système comparé à un système de microscopie conventionnelle. En effet, il est établi que la PSF latérale en microscopie confocale correspond au carré de la PSF latérale dans le cas de la microscopie conventionnelle [10].

Les résolutions axiales et latérales dépendent des mêmes grandeurs et ne sont donc pas indépendantes, ce qui rend difficile l'obtention d'une résolution spatiale isotrope. La RCM est donc cantonnée à l'imagerie *en face* (dans le plan xy) pour laquelle la résolution est identique

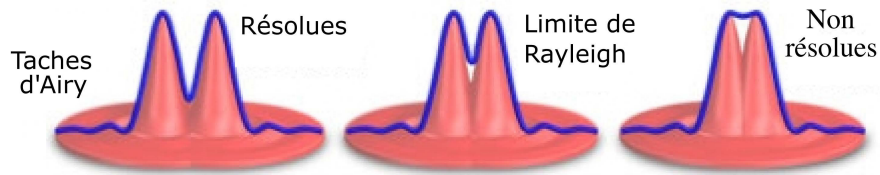


FIGURE 1.10 – Représentation du critère de Rayleigh pour la détermination de la résolution latérale reposant sur la capacité à séparer deux taches d'Airy. Tiré de [11].

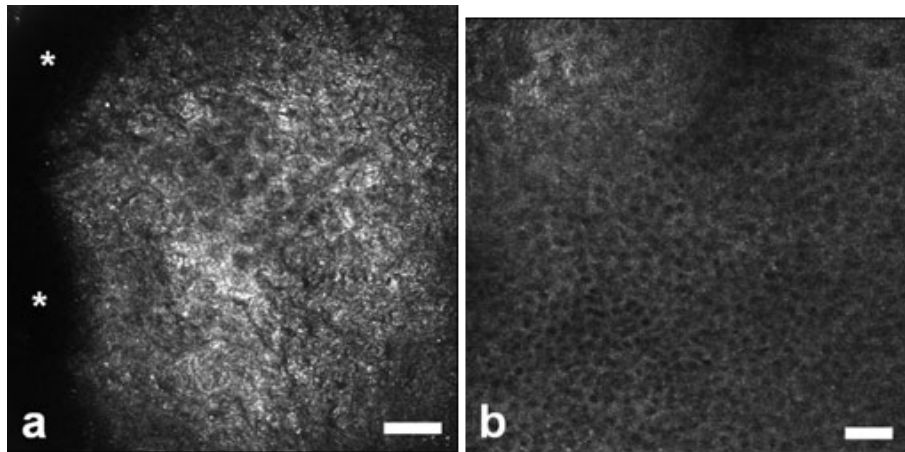


FIGURE 1.11 – Images *en face* de RCM de la couche cornée (a) et de la couche épineuse (b) de la peau [13]. Les barres d'échelles représentent 50 μm .

dans les deux directions de l'image, ce qui ne serait pas le cas pour une image *en coupe* (dans la plan xz).

Cette technique permet d'acquérir le signal en un point et nécessite donc un balayage pour reconstituer une image. Pour augmenter la vitesse d'acquisition ce balayage peut être fait avec une focalisation multi-point en utilisant par exemple un "spinning disk" [12]. Nous verrons dans la sous-section 1.3.3 sur la microscopie à feuille de lumière une géométrie permettant grâce à un éclairage adapté de réaliser des sections optiques sans avoir recours au diaphragme confocal.

Parmi les technologies d'imagerie en dermatologie, la RCM figure parmi les plus utilisées. La figure 1.11 présente deux images de la peau acquises par RCM. La RCM a l'avantage de pouvoir être utilisée directement sur les échantillons sans préparation, ce qui la rend relativement facile d'utilisation. Toutefois, l'impossibilité de restituer des images en coupe verticale peut la pénaliser car les images histologiques sont des coupes verticales. De plus, des objectifs de microscopie à ouvertures numériques relativement élevées doivent être utilisés pour maintenir une épaisseur de sectionnement correcte (typiquement $NA = 0.8$). Cela permet de produire des images bien résolues mais dont le champ est limité (typiquement $0.5 \text{ mm} \times 0.5 \text{ mm}$). Ces objectifs, à cause de leurs grands ouvertures numériques, vont être sensibles aux aberrations lorsque l'imagerie se fait plus profonde dans l'échantillon, limitant ainsi la profondeur maximale avec une bonne qualité d'imagerie.

La microscopie confocale en fluorescence

La microscopie confocale peut également être utilisée en fluorescence. C'est le principe de la microscopie confocale en fluorescence. Cette méthode tire profit du phénomène de fluorescence qui consiste en l'absorption d'un photon incident d'une certaine longueur d'onde suivie de la

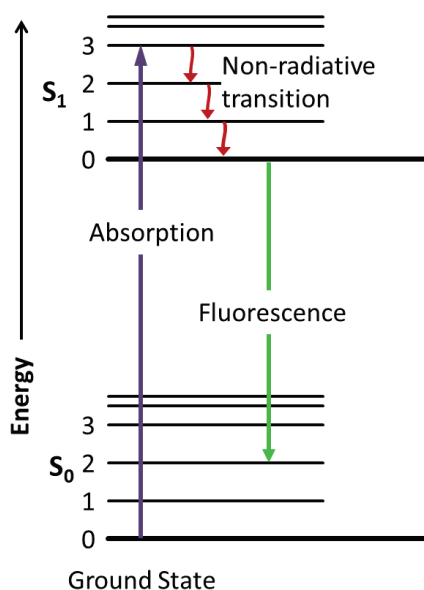


FIGURE 1.12 – Diagramme de Jablonski représentant deux états électroniques d'une molécule ainsi que leurs différents états vibrationnels. Lors de l'absorption d'un photon, la molécule passe à un état de plus haute énergie. La molécule subit une relaxation vibrationnelle et se retrouve rapidement à l'état vibrationnel fondamental par une succession de transitions non radiatives. Finalement, la molécule passe spontanément au niveau d'énergie inférieur par une transition radiative, c'est-à-dire en émettant un photon d'énergie correspondant à la transition. Tiré de www.wikipedia.org.

réémission d'un autre photon à une longueur d'onde plus élevée. Ce phénomène est illustré par le diagramme de Jablonski en figure 1.12. Les états électroniques des molécules étant constitués de plusieurs états vibrationnels, une multitude de transitions radiatives sont possibles. Ainsi les spectres d'excitation et d'émission sont donc en général relativement larges. Le schéma de principe de la microscopie de fluorescence diffère assez peu de celui présenté figure 1.9 en ce qu'un miroir dichroïque est utilisé en lieu et place d'un séparateur de faisceau. Ce miroir dichroïque sert à amener le faisceau d'éclairage vers l'échantillon et à laisser passer le signal de fluorescence vers le capteur tout en bloquant la lumière rétrodiffusée de manière élastique (i.e. à la longueur d'onde de la lumière incidente). La rétrodiffusion élastique étant généralement dominante par rapport à la fluorescence, un filtre passe-haut, appelé filtre d'émission, est également utilisé pour s'assurer que seul le signal de fluorescence soit détecté.

La microscopie de fluorescence présente un avantage de taille en terme de contraste car aucun signal n'est détecté en dehors des particules fluorescentes. Le contraste est donc en théorie toujours maximal. Cependant, le signal de fluorescence étant en général faible, le rapport signal sur bruit peut être désavantageux.

La fluorescence peut être de nature endogène ou exogène selon que la particule fluorescente est naturellement présente dans l'échantillon ou non. Les marqueurs fluorescents exogènes étant rarement biocompatibles et l'auto fluorescence de la peau étant peu spécifique, cette méthode est moins utilisée dans un contexte clinique.

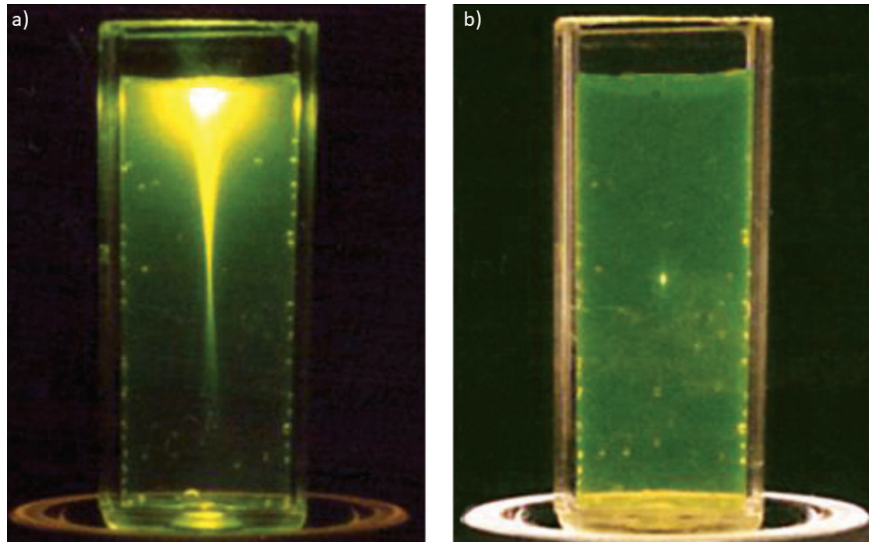


FIGURE 1.13 – a) Excitation à un photon de la fluorescéine avec un laser à 488 nm. b) Excitation à deux photons avec un laser pulsé à 960 nm [14] On constate un confinement de la fluorescence dans le volume confocal dans le cas de l'excitation à deux photons, créant ainsi un effet confocal naturel.

1.3.2 La microscopie non-linéaire

La microscopie non linéaire, proposée en 1990 [15], s'est développée avec l'essor des lasers à impulsions ultra-courtes permettant d'éclairer un échantillon avec une grande quantité d'énergie. La microscopie de fluorescence à deux photons (2PEF pour *two-photon excited fluorescence*) et la microscopie par génération de seconde ou de troisième harmonique (SHG et THG pour *second-harmonic generation* et *third-harmonic generation*) sont des techniques de microscopie non linéaire, c'est-à-dire reposant sur l'interaction simultanée de plusieurs photons avec les particules observées comme source de contraste.

Ces techniques reposent sur l'émission d'un signal à une fréquence double ou triple de la fréquence des photons incidents. Pour émettre un signal dans le domaine visible du spectre lumineux, il est donc nécessaire d'éclairer l'échantillon avec une source de lumière infrarouge. La probabilité d'interaction *simultanée* étant très faible, une intensité lumineuse très élevée est donc nécessaire.

La microscopie non linéaire présente quelques avantages par rapport à la microscopie confocale :

1. Meilleure pénétration du faisceau d'éclairage : l'utilisation de lumière infrarouge, moins sensible à la diffusion que la lumière visible utilisée en microscopie confocale, permet d'atteindre des zones plus en profondeur.
2. Confinement de la fluorescence dans le volume confocal : l'absorption multiphoton, et donc l'émission de fluorescence, dépend quadratiquement de l'intensité lumineuse. La fluorescence ne sera émise que dans les zones où l'intensité est suffisamment importante, c'est-à-dire dans un volume confiné (voir figure 1.13). La résolution axiale est ainsi maintenue malgré l'augmentation de la longueur d'onde.
3. Meilleure détection de la fluorescence : la fluorescence n'étant émise que dans un volume restreint correspondant à un pixel de l'image, la totalité du signal détecté provient de ce point. Cette méthode est donc moins sensible aux phénomènes de diffusions simple ou multiple. En outre, le *pinhole* utilisé en microscopie confocale pour rejeter les photons non balistiques n'est plus nécessaire.

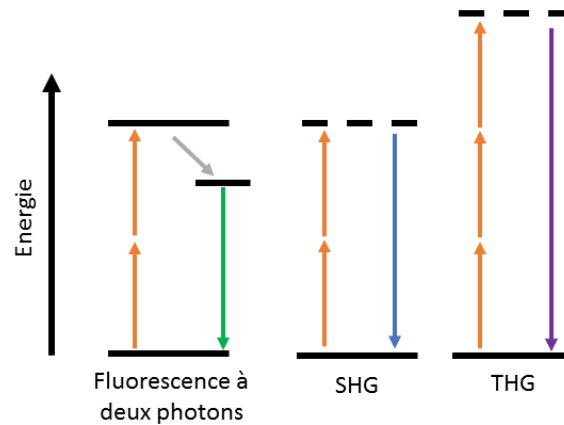


FIGURE 1.14 – Diagramme de Jablonski en microscopie non linéaire représentant les mécanismes de génération de fluorescence à deux photons, de seconde harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG).

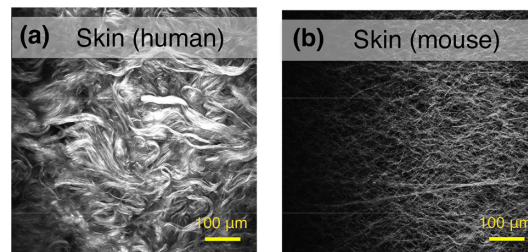


FIGURE 1.15 – Images de microscopie SHG de la couche dermique chez l'humain (a) et chez la souris (b) [16].

La microscopie 2PEF et les microscopies SHG et THG diffèrent par les mécanismes mis en jeu dans la génération du signal et décrits dans le diagramme de Jablonski présenté dans la figure 1.14. Comme pour la microscopie confocale de fluorescence, le signal en microscopie 2PEF découle d'un phénomène d'absorption de deux photons suivi de l'émission d'un photon ayant environ le double d'énergie des photons absorbés. L'énergie du photon émis n'est pas exactement le double de l'énergie des photons incidents car la transition radiative survient environ 10^{-9} s alors que la particule se désexcite d'abord par une transition non radiative dans un temps de l'ordre de 10^{-12} s.

Contrairement à la microscopie 2PEF, les microscopies SHG et THG ne reposent pas sur des mécanismes d'absorption. Dans le cas de la génération multiharmonique, les molécules ou les structures se polarisent sous l'effet d'un champ lumineux incident intense et rayonne un champ "déformé" comprenant des composantes à la fréquence double (SHG) ou triple (THG). Le signal est généré de manière instantanée (de l'ordre de 10^{-16} s) et est cohérent contrairement à la fluorescence. De plus, ces techniques ne reposent pas sur l'excitation de molécules, évitant ainsi les problèmes de photo-blanchiment et de photo-toxicité. Les microscopies SHG et THG présentent également l'avantage de ne nécessiter aucun marquage. Ces deux techniques diffèrent par le type de structures détectables. En microscopie SHG, seules les structures organisées de façon non centrosymétrique comme les fibres de collagène seront détectables (voir figure 1.15). La THG est moins spécifique et s'applique à tout milieu polarisable pourvu qu'il ne soit ni homogène ni isotrope.

Les systèmes de microscopie non linéaire ne sont pas largement utilisés dans le contexte clinique. En cause principalement le coût prohibitif des lasers et un RSB souvent désavantageux.

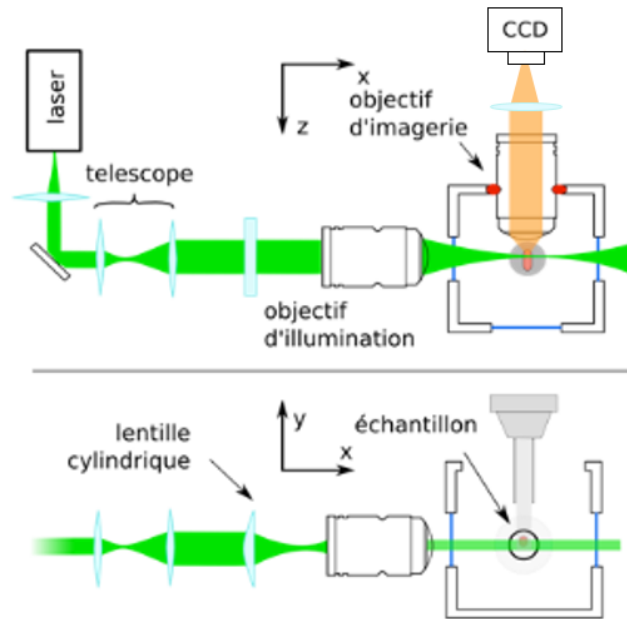


FIGURE 1.16 – Schéma d'un montage de microscopie à feuille de lumière [17].

En effet, il peut y avoir une incompatibilité entre la forte intensité lumineuse nécessaire au déclenchement des effets non linéaires, et la norme médicale imposant une limite de puissance lumineuse afin de respecter la santé du patient.

1.3.3 La microscopie à feuille de lumière

Cette section décrit une variante géométrique de la microscopie. Les processus de fluorescence à un ou deux photons, de génération multiharmonique et de diffusion reste applicables.

Alors que la plupart des systèmes de microscopie utilise une géométrie colinéaire où l'axe de détection est confondu avec l'axe d'éclairage, la microscopie à feuille de lumière utilise une géométrie orthogonale, où l'axe de détection est orthogonal à l'axe d'illumination. L'idée sous-jacente étant d'éclairer uniquement un plan en profondeur de l'échantillon afin de réaliser un sectionnement optique.

Pour ce faire deux objectifs de microscope, pouvant être différents, sont utilisés. L'un servira à éclairer l'échantillon tandis que l'autre récoltera le signal émis. Afin d'éclairer selon une feuille de lumière, on fait passer un faisceau laser, préalablement collimaté et agrandi, au travers d'une lentille cylindrique, le focalisant ainsi selon une ligne. Ce faisceau passe ensuite par un objectif de microscope qui, si sa profondeur de champ est suffisamment grande par rapport à la taille de l'échantillon, crée une feuille de lumière. Le signal diffusé est ensuite récolté par un microscope conventionnel dans la direction orthogonale à l'axe d'éclairage. Grâce à cette géométrie, on s'assure que le signal ne provient que du plan choisi. L'épaisseur de ce plan, qui dépend de la résolution latérale de l'objectif d'éclairage, détermine alors la résolution axiale du système global. Le schéma de fonctionnement est décrit à la figure 1.16.

Pour utiliser cette géométrie, il faut tout de même avoir la capacité d'éclairer l'échantillon par le côté sans que la lumière d'éclairage soit perdue par absorption ou diffusion. Cette méthode sera donc limitée aux petits échantillons biologiques et ne sera pas adaptée à une utilisation clinique. En revanche, elle est aujourd'hui largement utilisée dans les domaines de la biologie cellulaire et de la biologie du développement.

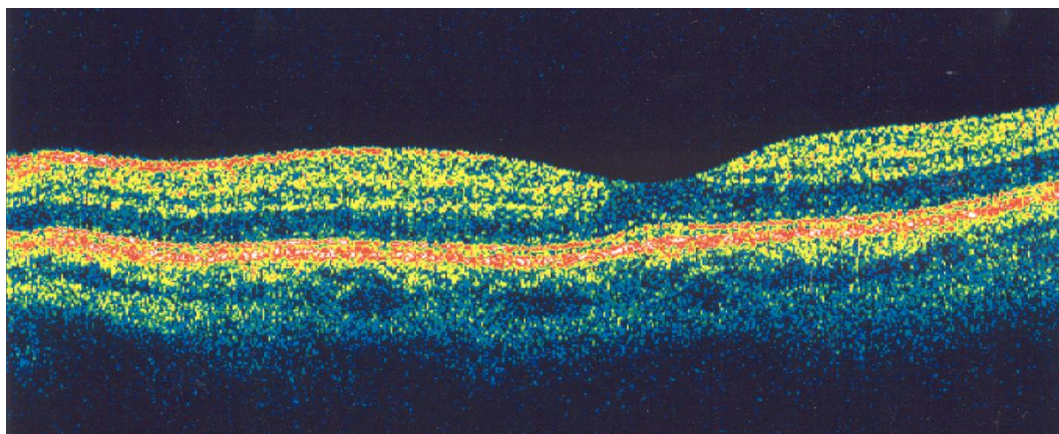


FIGURE 1.17 – Image *en coupe* de la rétine par un système d'OCT. Tiré de www.aao.org.

1.3.4 La tomographie par cohérence optique (OCT)

Inventée en 1991 [18], la tomographie par cohérence optique (OCT pour *Optical coherence tomography*) peut être vue comme une "échographie optique". Tout comme pour l'imagerie ultrasonore, lorsqu'on illumine un échantillon, l'onde incidente est partiellement réfléchiée à chaque interface rencontrée. L'idée derrière l'OCT est de mesurer les amplitudes des ondes rétrodiffusées et leurs temps de parcours afin de restituer leurs positions. L'utilisation d'ondes optiques en lieu et place d'ondes sonores permet d'obtenir une meilleure résolution en raison de leurs longueurs d'onde plus courtes. En revanche, la vitesse de la lumière étant bien plus élevée que celle du son, il est techniquement impossible de fabriquer des capteurs suffisamment rapides pour discriminer deux photons provenant de deux profondeurs différentes comme c'est le cas en échographie.

L'interférométrie en lumière faiblement cohérente, c'est-à-dire en lumière polychromatique, est à l'origine de l'OCT. En pratique, le signal acquis est un signal interférométrique dont on extrait l'enveloppe pour recouvrer l'amplitude du signal. Contrairement à l'interférométrie en lumière monochromatique, les franges d'interférence sont localisées autour du plan de différence de marche nulle (auss appelé "plan de cohérence") avec une extension égale à la longueur de cohérence, ce qui permet de sélectionner la profondeur d'imagerie. En effet, les photons rétrodiffusés par l'échantillon se trouvant en dehors du plan de cohérence n'interféreront pas et ne participeront pas au signal. Cette technique permet de réaliser des sections optiques d'une épaisseur de l'ordre de quelques micromètres avec une résolution latérale allant de $1\ \mu\text{m}$ à $15\ \mu\text{m}$ et ce jusqu'à une profondeur pouvant aller jusqu'à plusieurs millimètres.

L'OCT est aujourd'hui une technique largement utilisée cliniquement notamment dans le domaine de l'ophtalmologie [19], mais aussi en cardiologie en imagerie intravasculaire [20]. Elle est sans contact contrairement à l'échographie, et présente également l'avantage d'être non invasive et de ne nécessiter aucun agent de contraste. Le fait que la résolution axiale des images ne dépendent pas de la qualité des optiques utilisées mais seulement du spectre de la source de lumière rend cette technique particulièrement adaptée à l'étude d'échantillons structurés en couches, comme la rétine donc on peut voir une image en figure 1.17. Des dispositifs médicaux utilisés en dermatologie existent pour la détection des carcinomes mais leurs résolutions latérales sont généralement limitées autour de $10\ \mu\text{m}$ ce qui les rend incapables de détecter les mélanomes qui représentent les cancers de la peau les plus dangereux.

La LC-OCT étant basée sur le principe de l'OCT, nous élaborerons son principe plus en détails dans le chapitre suivant. Notons toutefois que la grande majorité des dispositifs basés sur l'OCT fonctionnent en domaine fréquentiel et diffèrent donc assez fondamentalement de la LC-OCT, basée sur l'OCT en domaine temporel. Les différences entre l'OCT temporelle et l'OCT fréquentielle sont explicitées dans la section 2.2.

1.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons introduit le contexte clinique dans lequel s'insère ce projet de thèse. Nous avons également décrit la méthode de référence actuelle pour le dépistage des cancers de la peau, ainsi que ses avantages et inconvénients. Cette méthode présente le principal désavantage d'être invasive car elle nécessite un échantillon provenant d'un tissu suspect, appelé biopsie, prélevé après un simple examen visuel de la peau du patient. Lors d'une consultation le dermatologue est alors amené à choisir, pour chaque lésion suspecte, entre s'assurer de la malignité et éviter d'entailler la peau du patient. Par conséquent, la précaution est d'une part à l'origine d'un grand nombre de biopsies "inutiles" car le diagnostic se révèle souvent être bénin. D'autre part, un nombre non négligeable de cancers de la peau reste non diagnostiqués car non soupçonnés. Il existe donc un réel besoin pour une méthode d'imagerie non invasive.

L'imagerie optique est incontournable dans le processus de diagnostic du cancer cutané. Les variations locales d'indice de réfraction entre les structures d'un échantillon et la capacité qu'ont les molécules à diffuser ou absorber la lumière permettent de former une image en intensité et ainsi d'obtenir des informations morphologiques cruciales au diagnostic sur l'échantillon en question. Dans le cas de l'histologie, on utilise un microscope optique conventionnel qui reste l'outil idéal pour l'imagerie d'échantillons fins. En effet, les biopsies *ex vivo* peuvent être préparées, c'est-à-dire coupées en tranches fines et colorées, sans problème.

Lorsque les échantillons deviennent trop épais la lumière détectée est susceptible de provenir de plans différents du plan de mise au point, ce qui a pour effet de brouiller l'image formée sur le capteur. Des méthodes de sectionnement optiques ont été inventées pour l'imagerie en profondeur d'échantillons épais. Nous avons pu en voir certaines dans ce chapitre en détaillant l'état de l'art en matière d'imagerie optique non invasive pour une utilisation médicale en dermatologie. L'invention la plus emblématique est la microscopie confocale qui permet de rejeter la lumière en dehors du plan de mise au point en utilisant un diaphragme confocal conjugué au point d'imagerie. Le signal détecté par le capteur ne provient alors que d'un volume restreint appelé volume confocal. La microscopie multiphoton utilise le même principe mais ne requiert pas de diaphragme confocal grâce au phénomène d'absorption à deux photons nécessitant un fort éclairage de l'échantillon et qui est donc naturellement confiné au foyer de l'objectif de microscope. Avec l'OCT un nouveau type de filtrage, par la cohérence temporelle cette fois, a fait son apparition. On ne filtre plus physiquement les photons réfléchies en dehors du plan d'imagerie, mais on distingue les photons cohérents créant des interférences, des photons incohérents par une méthode d'interférométrie en lumière faiblement cohérente.

Le tableau 1.1 résume les caractéristiques des principaux dispositifs commerciaux utilisés dans un contexte clinique en dermatologie. Aujourd'hui aucun de ces dispositifs ne s'est réellement imposé pour apporter une plus-value au processus de diagnostic, et certains ne sont plus commercialisés. Les causes sont généralement dues à un manque concernant au moins un des critères formulés dans la sous-section 1.1.3. Dans la conclusion du chapitre suivant, une analyse plus détaillée de chaque technologie, incluant une comparaison avec la tomographie par cohérence optique confocale en ligne, est fournie. Dans le chapitre suivant, nous cherchons à répondre à aux besoins formulés dans ce chapitre et proposerons une nouvelle technique d'imagerie appelée tomographie par cohérence optique confocale en ligne.

Technologie	Résolution axiale	Résolution latérale	Champ de vue latéral	Profondeur d'imagerie	<i>In vivo</i>
RCM (Vivascope)	5 μm	1 μm	1 mm	200 μm	Oui
Multibeam FD-OCT (Vivosight)	5 μm	7 μm	6 mm	1 mm	Oui
HD-OCT (Skintell)	3 μm	3 μm	1.8 mm	1 mm	Oui
FF-OCM (Light-CT Scanner)	1 μm	1.5 μm	1.3 mm	200 μm	Non
Tomographie multiphoton (DermaInspect)	2 μm	1 μm	350 μm	200 μm	Oui

TABLEAU 1.1 – Récapitulatif des performances de l'état de l'art.

Chapitre 2

La tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT)

Sommaire

2.1	Introduction	24
2.2	La tomographie par cohérence optique à balayage (OCT)	24
2.2.1	Principe général	24
2.2.2	Cohérence temporelle et interférences à deux ondes	25
2.2.3	Implémentations	27
2.3	La microscopie par cohérence optique (OCM)	31
2.3.1	Microscopie par cohérence optique à balayage	31
2.3.2	Microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM)	32
2.4	Caractérisation d'un système d'OCT	34
2.4.1	Résolution axiale	34
2.4.2	Résolution latérale	40
2.4.3	Sensibilité	41
2.4.4	Résolution temporelle	45
2.4.5	Récapitulatif	46
2.5	Tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT)	47
2.5.1	Montage expérimental	47
2.5.2	Ajustement dynamique de la mise au point	58
2.5.3	Interférences en LC-OCT	59
2.5.4	Interférométrie à décalage de phase	61
2.5.5	Acquisition des images en LC-OCT	63
2.5.6	Comparaison avec l'état de l'art	67

2.1 Introduction

La tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT pour *Line-field Confocal Optical Coherence Tomography*) est une nouvelle technique d'imagerie introduite en 2018 [21]. Cette technique permet l'acquisition d'images en coupe verticale (B-scan) à haute résolution, en temps réel et *in vivo*.

Dans un premier temps, nous détaillerons le principe de la tomographie par cohérence optique (OCT), qui est une méthode optique ayant démocratisé l'utilisation de la cohérence temporelle pour réaliser des sections optiques fines tout en permettant une grande profondeur de pénétration dans les tissus biologiques. Ensuite, une section sera dédiée à la microscopie par cohérence optique (OCM), variante de l'OCT se démarquant par l'utilisation d'objectifs de microscope pour produire des images *en face* à haute résolution spatiale. Nous y parlerons également de l'OCM à éclairage plein champ, technique s'affranchissant de balayage latéral grâce à un éclairage et une détection en deux dimensions. Nous nous intéresserons ensuite aux performances des systèmes basés sur l'OCT afin de mettre en évidence les limites des méthodes présentées précédemment et de mieux en connaître les tenants et aboutissants. Finalement, la tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT) sera présentée, et nous nous attacherons à expliquer en quoi elle permet de pallier les limites des méthodes présentées précédemment et de répondre aux besoins et exigences présentés dans le chapitre précédent.

2.2 La tomographie par cohérence optique à balayage (OCT)

2.2.1 Principe général

La tomographie par cohérence optique, plus communément désignée sous l'acronyme OCT pour *Optical Coherence Tomography*, est une technique d'imagerie tridimensionnelle introduite en 1991 [18]. Elle permet de réaliser de manière non-invasive et *in vivo* des images en profondeur d'échantillons semi-transparents sur plusieurs millimètres de profondeur avec des résolutions allant de 1 μm à 15 μm . Elle présente également l'avantage de ne nécessiter aucun agent de contraste, les inhomogénéités d'indice dans l'échantillon étant une source intrinsèque de contraste. Cette méthode d'imagerie a connu un développement rapide en raison de sa capacité à acquérir des images à l'échelle micrométrique sur des profondeurs supérieures aux techniques optiques conventionnelles. Elle est maintenant utilisée cliniquement en ophtalmologie [22], en cardiologie [20], et commence à être utilisée en dermatologie [23], et en gastro-entérologie [24].

Le principe général de l'OCT, schématisé sur la figure 2.1, est analogue à celui de l'imagerie ultrasonore, si ce n'est qu'une onde lumineuse est utilisée en lieu et place de l'onde ultrasonore en échographie. L'onde de lumière incidente est partiellement réfléchiée par les structures internes de l'échantillon donnant lieu à des "échos optiques". Les amplitudes et temps de parcours de ces ondes rétrodiffusées sont mesurés afin de restituer une carte de réflectivité de l'échantillon. En revanche, si l'échographie repose sur la rapidité des détecteurs pour pouvoir différencier des ondes provenant de profondeurs différentes, cela n'est plus possible lorsque l'on utilise de la lumière étant donnée sa vitesse de propagation, bien plus élevée que celle des ondes sonores.

La méthode employée pour contourner le problème consiste à utiliser une technique d'interférométrie en lumière faiblement cohérente. En effet, en tirant bénéfice de la cohérence temporelle d'une source de lumière, il est possible d'obtenir des franges d'interférence dans une zone confinée afin de pouvoir isoler les photons à l'origine des interférences des photons n'interférant pas. On peut ainsi discriminer les photons provenant de différentes profondeurs, autrement dit réaliser des sections optiques. Ce sectionnement se fait avec une précision égale à la longueur de cohérence temporelle de la source. Cette longueur de cohérence est directement liée à la largeur spectrale de la source : plus la source est large spectralement, plus la longueur de cohérence est faible. On privilégie donc en OCT l'utilisation de sources spectralement larges. Le concept d'interférences en lumière faiblement cohérente est détaillé dans la sous-section suivante.

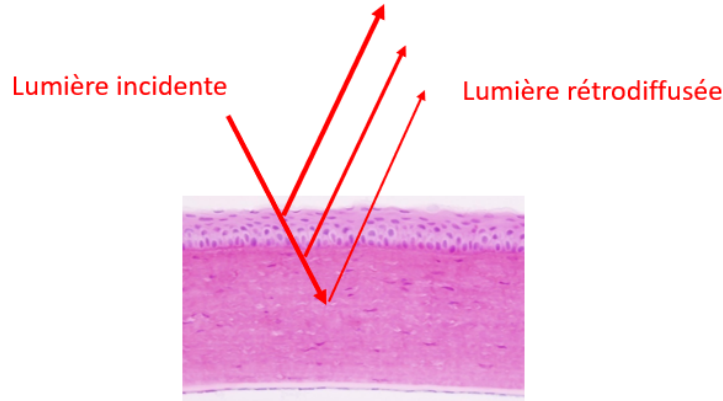


FIGURE 2.1 – Principe général de l’OCT. L’échantillon est éclairé par une onde incidente qui est rétrodiffusée par les structures internes du tissu à diverses profondeurs avec des intensités variables. L’amplitude et le temps de trajet de la lumière rétrodiffusée sont mesurés afin de restituer une carte de réflectivité de l’échantillon.

2.2.2 Cohérence temporelle et interférences à deux ondes

La cohérence temporelle, mise à profit par l’OCT et schématisée sur la figure 2.2, est le degré d’auto-corrélation entre une onde et elle-même à un temps ultérieur. Plus cette corrélation disparaît rapidement, moins l’onde est cohérente. Une onde parfaitement cohérente est une onde monochromatique. La lumière blanche, qui est un exemple de lumière faiblement cohérente, peut être modélisée par une somme d’ondes monochromatiques à différentes longueurs d’onde, ce qui a pour effet de produire des trains d’ondes localisés dans le temps (ou l’espace). On peut alors définir le temps de cohérence, ou la longueur de cohérence, permettant d’évaluer la cohérence temporelle d’une onde par la largeur, temporelle ou spatiale, des trains d’ondes.

La figure 2.3 représente un interféromètre de Michelson et les figures d’interférence créées avec des ondes cohérentes et incohérentes. Dans le cas de la lumière faiblement cohérente, les figures d’interférence ont une extension spatiale finie, liée à la longueur de cohérence, autour du plan de différence de marche nulle, aussi appelé "plan de cohérence". Cette longueur de cohérence permet de quantifier la cohérence temporelle et peut être calculée dans certains cas particuliers simples. Le modèle classique est celui d’un spectre gaussien (en nombre d’onde) pour lequel la longueur de cohérence l_c est inversement proportionnelle à la largeur spectrale en nombre d’onde σ , grandeur inverse de la longueur d’onde, selon :

$$l_c = \frac{2 \ln 2}{n\pi\Delta\sigma} \quad (2.1)$$

On utilise plus généralement une expression approximative utilisant la longueur d’onde, plus commune que le nombre d’onde :

$$l_c = \frac{2 \ln 2}{n\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2.2)$$

où λ_0 est la longueur d’onde centrale du spectre, définie généralement comme le centre de masse de la densité spectrale de puissance, et $\Delta\lambda$ la largeur du spectre.

En sortie de l’interféromètre, l’amplitude du signal est la somme cohérente des deux ondes lumineuses provenant du bras objet et du bras de référence de l’interféromètre. Le détecteur intègre ensuite ce signal moyenné sur une durée égale à son temps d’intégration. Si l’on considère une intensité lumineuse incidente I_0 , les franges d’interférence produite dans la figure 2.3 peuvent

2. Ce phénomène provient de la propriété mathématique des fonctions sinusoïdales $\langle \sin \rangle = 0$. Si on pense en termes d’intensité on a $\langle \sin^2 \rangle = \frac{1}{2}$ et on a un offset de la moitié du maximum des franges.

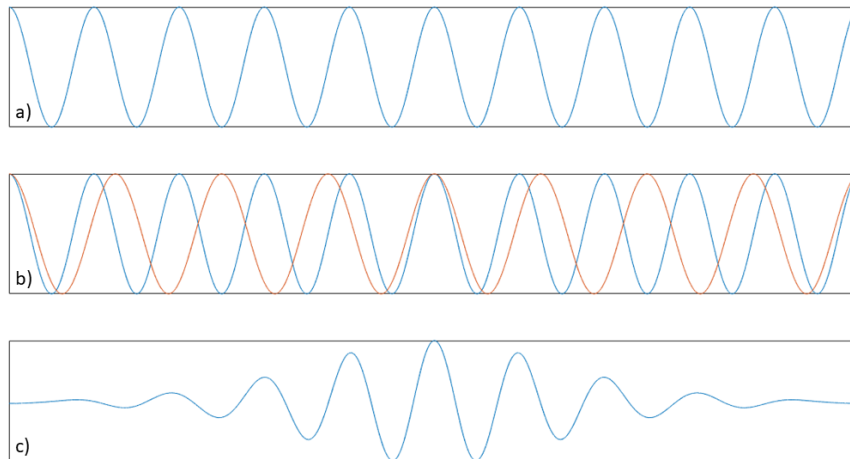


FIGURE 2.2 – Représentation schématique de la cohérence temporelle. a) Onde monochromatique à la longueur d’onde centrale λ_0 ; b) Superposition des ondes aux longueurs d’onde λ_0 (en bleu) et $\lambda_0 + \frac{\Delta\lambda}{2}$ (en rouge) ; c) Somme des ondes entre $\lambda_0 - \frac{\Delta\lambda}{2}$ et $\lambda_0 + \frac{\Delta\lambda}{2}$. On remarque en (b) que les deux ondes se différencient de plus en plus à mesure que l’on s’éloigne du centre. Lorsque l’on a une infinité d’ondes monochromatiques comme en (c), les amplitudes s’annulent en moyenne si l’on se trouve suffisamment loin du centre. ²

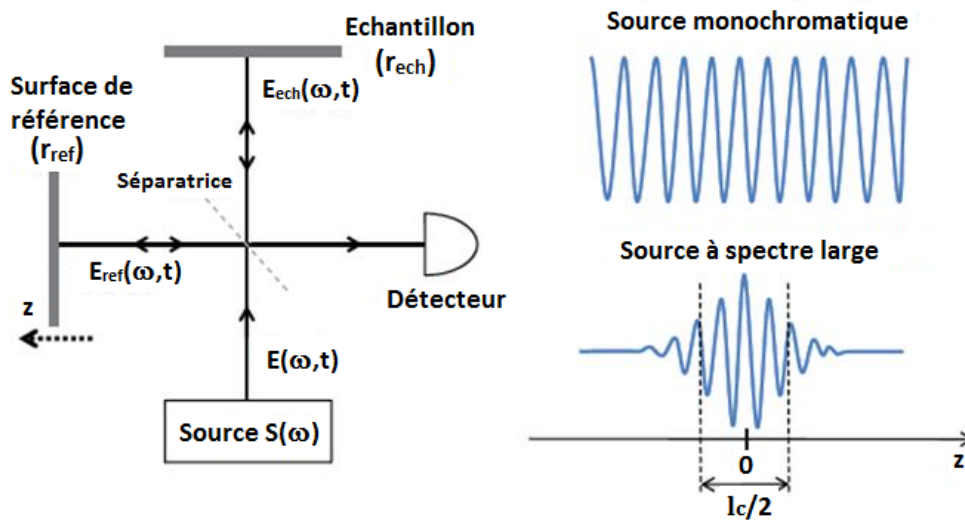


FIGURE 2.3 – Phénomène d’interférences en lumière temporellement cohérente et incohérente. Une onde lumineuse éclaire un interféromètre de Michelson qui sépare le faisceau entre le bras objet et le bras de référence. Les signaux réfléchis par les deux bras est ensuite recombinaison puis détecté par un capteur, créant ainsi une figure d’interférence. Dans le cas monochromatique l’interférogramme s’étend à l’infini, alors qu’il est localisé dans le cas polychromatique. Issu de [11].

être mises sous la forme mathématique suivante en fonction du nombre d'onde σ :

$$I(z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{I_0 S(\sigma)}{4} \left[R_{inc}(z) + R_{coh}(z) + R_{ref} + 2\sqrt{R_{ref} R_{coh}(z)} \cos(\Delta\phi(\sigma, z)) \right] d\sigma \quad (2.3)$$

Le résultat final est la somme des figures d'interférence produites par chaque longueur d'onde de la densité spectrale de puissance $S(\sigma)$. Le coefficient de réflexion de l'échantillon est séparé en deux parties : R_{coh} qui représente la proportion de photons rétrodiffusés de manière cohérente, c'est-à-dire pouvant donner lieu à des interférences, et R_{inc} représentant les photons incohérents, soit ceux rétrodiffusés en dehors du plan de cohérence. On peut souvent omettre le terme cohérent dans la somme car le terme incohérent est en général prédominant. R_{ref} est la réflectivité de la surface de référence et $\Delta\phi$ le déphasage entre les deux bras de l'interféromètre. Dans un souci de simplification pour les calculs ultérieurs, on simplifie l'équation 2.3 en la représentant par une onde monochromatique ayant un nombre d'onde égal au nombre d'onde moyen σ_0 et modulée par une enveloppe gaussienne $V_{coh}(z)$ centrée sur le plan de différence de marche nulle :

$$I(z) = \frac{I_0}{4} \left[R_{inc}(z) + R_{coh}(z) + R_{ref} + 2\sqrt{R_{ref} R_{coh}(z)} V_{coh}(z) \cos(\Delta\phi(\sigma_0, z)) \right] \quad (2.4)$$

Cette approximation sera détaillée dans la sous-section 2.4.1 consacrée à la résolution axiale.

2.2.3 Implémentations

Deux grandes familles de systèmes basés sur l'OCT coexistent : l'OCT en domaine temporel (TD-OCT pour *Time-Domain OCT*) et l'OCT en domaine fréquentiel (FD-OCT pour *Frequency-Domain OCT*). Bien que la LC-OCT soit basée sur l'OCT en domaine temporel, l'OCT fréquentielle représente la majorité des dispositifs commerciaux utilisés dans un contexte clinique et mérite que l'on s'y attarde.

Reprenons la formule 2.3 et explicitions le déphasage en se basant sur le schéma présenté en figure 2.3 :

$$\Delta\phi(\sigma, z) = 2n\pi\sigma z \quad (2.5)$$

où n est l'indice optique du milieu, et z la position du miroir de référence par rapport à la position de différence de marche nulle. Si on intègre l'expression 2.5 dans 2.3, on obtient une somme d'ondes représentées par la fonction sinusoïdale $\cos(2n\pi\sigma z)$. Cette onde peut être vue classiquement comme une onde oscillante à une fréquence spatiale σ , mais on peut également considérer la grandeur z comme fréquence spatiale et σ comme variable. Ces deux approches constituent la différence principale entre l'OCT temporelle et l'OCT fréquentielle.

OCT en domaine temporel (TD-OCT)

Le schéma d'un dispositif d'OCT en domaine temporel est représenté en figure 2.4. Dans une certaine mesure, le schéma ressemble à celui d'un microscope confocal à balayage : une source de lumière éclaire un échantillon et un miroir oscillant assure le balayage latéral. Ici, l'interféromètre de Michelson à fibres optiques assure le rôle de diaphragme confocal. La différence avec la microscopie confocale à balayage réside dans le balayage axial qui se fait en OCT grâce au déplacement d'un miroir de référence. Le plan de cohérence est balayé sur toute la profondeur de l'échantillon, permettant ainsi d'acquérir le signal issu des interférences créées entre la réflexion des structures de l'échantillon et la réflexion sur la surface de référence (voir figure 2.5). L'enveloppe du signal interférométrique est ensuite extraite pour créer un profil d'intensité en profondeur, appelé *A-scan*. Les images en deux dimensions, appelées *B-scans*, sont reproduites par la concaténation des profils grâce un balayage latéral assuré par un miroir oscillant.

Ici le sectionnement optique est assuré par la cohérence temporelle, il n'est donc pas nécessaire d'utiliser des objectifs à forte ouverture numérique dont la profondeur de champ assurerait le

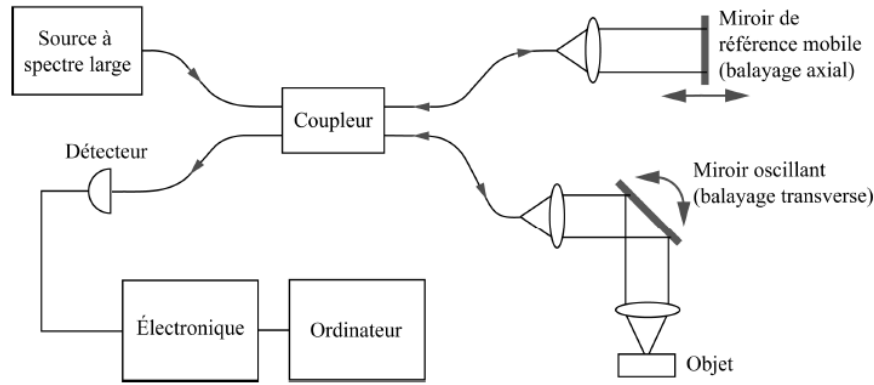


FIGURE 2.4 – Schéma d'un dispositif typique d'OCT. Une source à spectre large est utilisée comme source de lumière temporellement incohérente. Le déplacement du miroir de référence permet de balayer l'objet en profondeur, tandis que le miroir oscillant assure le balayage latéral.

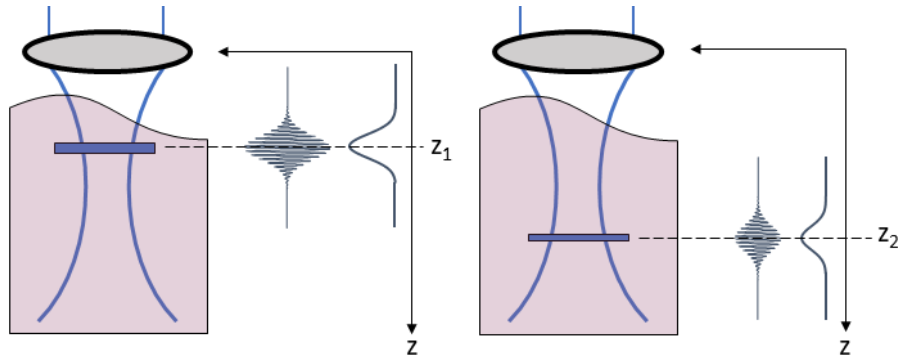


FIGURE 2.5 – Illustration du principe de l'OCT en domaine temporel avec un échantillon présentant deux structures réfléchissantes situées à des profondeurs z_1 et z_2 . Les interférogrammes obtenus par le balayage de la longueur du bras de référence de l'interféromètre permettent de situer la profondeur des structures dans l'échantillon. L'amplitude de l'enveloppe permet de retrouver l'intensité de la réflexion.

filtrage. Afin de ne pas avoir à déplacer les optiques de focalisation, et donc de gagner en vitesse de balayage, les objectifs utilisés ont une grande profondeur de champ pour éclairer le profil sur toute sa profondeur. Bien que le système soit confocal, le filtrage est en général peu efficace et c'est en réalité la cohérence temporelle qui assure en totalité le sectionnement optique.

OCT en domaine fréquentiel (FD-OCT)

Peu après la première apparition de la TD-OCT, l'OCT fréquentielle a vu le jour et a connu un développement spectaculaire depuis lors. Aujourd'hui, la majorité des dispositifs d'OCT utilisés dans un contexte clinique fonctionnent en domaine fréquentiel.

En FD-OCT, ce n'est plus la position du miroir de référence qui varie mais la longueur d'onde. C'est donc le spectre du signal rétrodiffusé qui est mesuré. On peut procéder pour cela de deux manières différentes. On peut d'une part éclairer l'objet avec la totalité du spectre de la source. Dans ce cas, le détecteur utilisé est un spectromètre à réseau au lieu d'un simple monodétecteur. D'autre part, on peut balayer le spectre de la source et reconstruire le spectre longueur d'onde par longueur d'onde via un monodétecteur. Cette variante est nommée SS-OCT pour *swept-source OCT*.

Considérons un objet composé de deux structures semi-réfléchissantes telles que présentées

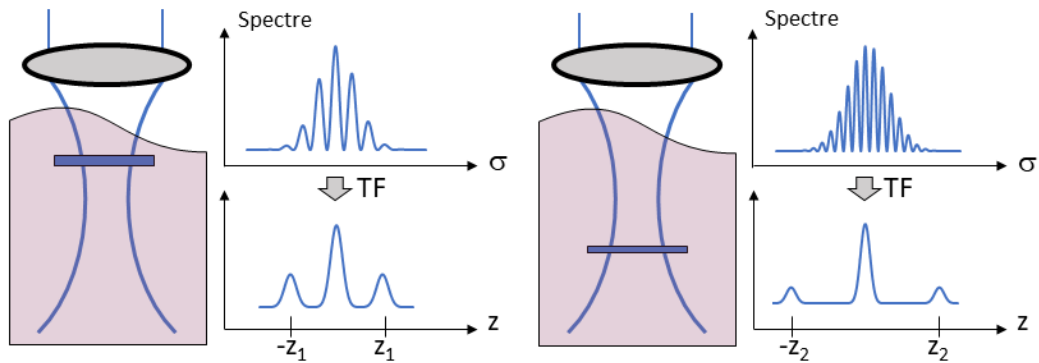


FIGURE 2.6 – Illustration du principe de l’OCT fréquentielle. Le spectre des franges d’interférence présente des cannelures modulées par la distance de l’objet au plan de cohérence. Par transformée de Fourier, on retrouve l’information en fonction de la profondeur comme pour l’OCT temporelle.

dans la figure 2.6. En raison des interférences entre la lumière réfléchiée par les structures et le miroir de référence, le spectre mesuré présente des cannelures. La fréquence de modulation du spectre est proportionnelle à la différence de marche entre les deux bras de l’interféromètre, et donc également proportionnelle à la distance z par rapport au plan de cohérence (voir équation 2.5). Ainsi, pour deux structures placées à différentes profondeurs, le spectre présentera des cannelures avec différents espacements. Par transformée de Fourier, on obtient alors trois composantes : une centrale correspondant au fond constant, une située à la position de la structure, et finalement son symétrique négatif. La hauteur du pic correspond à l’amplitude du signal rétrodiffusé et la largeur est corrélée à l’étendue du signal dans le domaine spectral.

Pour un objet composé d’une multitude de structures, le spectre détecté est évidemment bien plus complexe. Grâce à une transformée de Fourier du spectre, et en ne conversant que les fréquences positives, on retrouve alors le même résultat qu’en TD-OCT après avoir extrait l’enveloppe des franges.

En FD-OCT, la totalité du profil est acquise sans balayage axial, il est donc indispensable d’utiliser des objectifs ayant une grande profondeur de champ afin d’éclairer l’échantillon sur la profondeur souhaitée. Finalement, tout comme en TD-OCT, l’échantillon est balayé latéralement pour reconstruire un B-scan.

Comparaison entre TD-OCT et FD-OCT

Dans les deux méthodes, l’échantillon est éclairé sur l’ensemble de la profondeur d’imagerie pour ne pas avoir à déplacer les optiques de focalisation pendant l’acquisition. Cela permet de gagner en vitesse d’acquisition car le balayage du plan de cohérence peut être bien plus rapide que le déplacement physique des optiques de focalisation. Toutefois, l’OCT fréquentielle présente un avantage intrinsèque par rapport à l’OCT temporelle en termes de rapport signal sur bruit. En effet, en OCT fréquentielle la totalité du signal est utilisée pour reconstruire un A-scan. En OCT temporelle, le signal peut provenir de l’ensemble du profil en profondeur éclairé, mais seule une partie interfère et participe au signal. Cet effet est d’autant plus exacerbé que la longueur de cohérence est courte. Ce phénomène est illustré sur la figure 2.7.

En revanche, comme nous le verrons dans la section 2.4, il existe un compromis entre profondeur d’imagerie et résolution latérale. En effet, la résolution latérale devient meilleure avec l’augmentation de l’ouverture numérique, mais la profondeur d’imagerie, qui doit être maximisée, diminue également. En OCT fréquentielle ce compromis est inhérent à la technique d’imagerie et ne peut être contourné. En OCT temporelle, ce compromis est fait pour des raisons pratiques mais n’est pas obligatoire, ce qui rend cette technique intéressante pour l’imagerie à haute résolution malgré ses défauts.

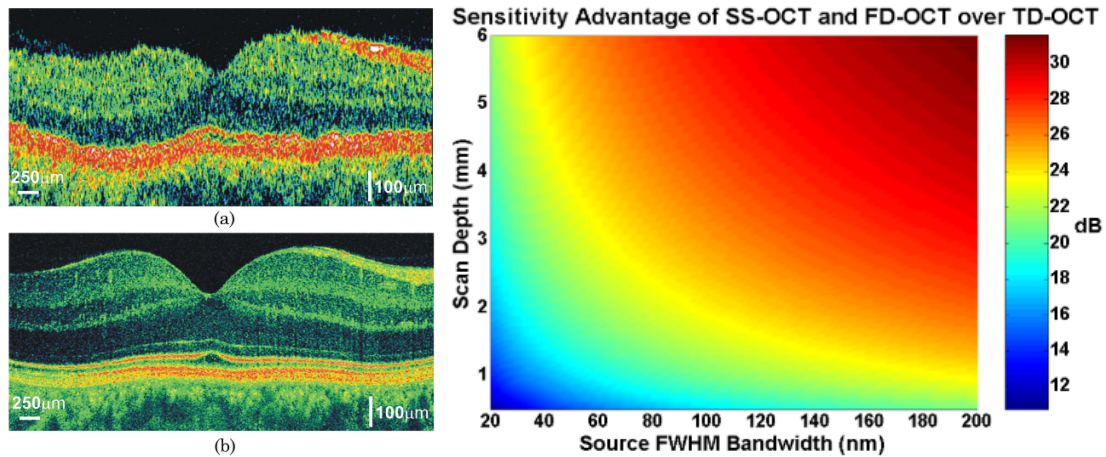


FIGURE 2.7 – Images *in vivo* de cornée humaine : (a) détection temporelle avec un système commercial Zeiss OCT 3 Stratus ; (b) détection fréquentielle avec un dispositif de laboratoire [25]. Les images montrent une meilleure sensibilité pour l'OCT fréquentielle ainsi qu'un temps d'acquisition inférieur (30,000 A-scans/s contre 400 A-scans/s). (c) Avantage en termes de sensibilité de l'OCT fréquentielle sur l'OCT temporelle [26]. Une amélioration typique de l'ordre de 20-30 dB peut être obtenue en passant à l'OCT fréquentielle.

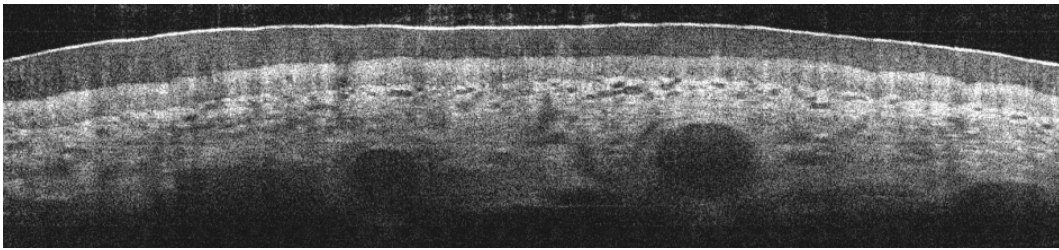


FIGURE 2.8 – Image de peau humaine saine en coupe verticale réalisée avec le dispositif Vivosight de Michelson Diagnostics [28]. Le champ est d'environ 1 mm sur 6 mm.

Multi-Beam OCT

Compte tenu de la supériorité de la FD-OCT par rapport à la TD-OCT en termes de sensibilité de détection mais également de son insuffisance en termes de résolution latérale, une variante intéressante a été développée pour offrir un meilleur compromis entre résolution et rapidité d'acquisition. L'idée derrière la multi-beam OCT est de séparer l'image en plusieurs zones de profondeur afin de pouvoir réduire la profondeur de champ du microscope, et ainsi améliorer la résolution latérale, tout en conservant une vitesse d'acquisition permettant l'imagerie *in vivo*.

Cette technologie a été développée par Michelson Diagnostics et fait l'objet d'un dispositif commercial appelé Vivosight. Il représente un des seuls dispositifs d'OCT conçus pour la dermatologie. Ce dispositif permet de réaliser des coupes verticales de la peau avec une résolution de $5 \mu\text{m} \times 7 \mu\text{m}$ (axiale \times verticale) avec un champ d'observation de ~ 6 mm et une profondeur de ~ 1 mm. La figure 2.8 représente une image en coupe verticale de peau humaine acquise avec ce dispositif. Sa résolution lui permet d'être utilisé cliniquement pour le dépistage des carcinomes [27], mais reste trop insuffisante pour la détection des mélanomes.

2.3 La microscopie par cohérence optique (OCM)

2.3.1 Microscopie par cohérence optique à balayage

On parle de *microscopie* par cohérence optique (OCM pour *optical coherence microscopy*) lorsque les objectifs utilisés ont une ouverture numérique suffisamment importante pour révéler des détails à l'échelle microscopique, en opposition à la *tomographie* par cohérence optique dont la résolution latérale maximale se situe typiquement autour de $10\ \mu\text{m}$. Par analogie à la microscopie confocale ou conventionnelle, on fait référence à la microscopie par cohérence optique pour des dispositifs produisant des images *en face* (en coupe horizontale), bien qu'il soit possible d'utiliser l'OCM pour de l'imagerie en coupe verticale. Les systèmes d'OCM se rapprochent alors de la microscopie confocale en réflectance (RCM) à balayage. La différence se situe au niveau du sectionnement optique, qui se fait par une combinaison de filtrage confocal et de filtrage par la cohérence temporelle. Comme nous le verrons dans la sous-section 2.4.1, il est possible d'utiliser des sources de lumière dont la longueur de cohérence est plus petite que la profondeur de champ des objectifs, permettant ainsi de réaliser des coupes plus fines qu'en microscopie confocale. Nous verrons également que l'interférométrie offre une meilleure sélectivité du signal, et ainsi un meilleur rapport signal sur bruit, comparé à la RCM.

Bien qu'il soit possible d'implémenter l'OCM en domaine fréquentiel [29], une implémentation en domaine temporel est plus naturelle. La grande ouverture numérique des objectifs utilisés limite l'entendue axiale des coupes et réduit ainsi significativement les avantages de l'OCT fréquentielle sur l'OCT temporelle. En effet, le rapport signal sur bruit d'une image en face n'est pas meilleur en OCM fréquentielle qu'en OCM temporelle [30]. Si une image en coupe horizontale est souhaitée, alors le domaine temporel est plus indiqué car il suffit de choisir la profondeur voulue en adaptant la longueur du bras de référence. Le signal interférométrique est alors modulé par un modulateur de phase dans le bras de référence pour ensuite obtenir le signal en intensité grâce à un algorithme à décalage de phase (voir sous-section 2.5.4). Nous nous intéresserons donc par la suite à des systèmes d'OCM exclusivement en domaine temporel.

L'imagerie *en face* est la plus indiquée lorsque l'on s'intéresse à l'OCM. Tout d'abord, la résolution dans le plan transverse présente l'avantage d'être par nature isotrope. La résolution dans le plan vertical, quant à elle, n'est en général pas isotrope sans un choix judicieux des différents composants du système de la part du concepteur, ce qui peut entraver l'interprétation des images en coupes verticales. Par ailleurs, si l'on souhaite acquérir une coupe verticale dans l'échantillon, voire une pile tridimensionnelle, il est nécessaire d'adapter dynamiquement la focalisation des objectifs. En effet, en OCM la profondeur de champ est faible et implique que l'on sort rapidement du plan de focalisation si on balaye le plan de cohérence en laissant les optiques de focalisation fixes. Cela impose le déplacement des objectifs qui, lorsqu'ils ont une grande ouverture numérique, peuvent être lourds et encombrants. Il n'est donc pas envisageable d'adapter la focalisation des objectifs suffisamment rapidement pour de l'imagerie *in vivo* sur une profondeur convenable. Des techniques ont été développées pour optimiser la vitesse d'acquisition en TD-OCM pour l'imagerie verticale, comme par l'utilisation de miroirs MEMS [31], ou de multiples fibres focalisant simultanément à différentes positions dans l'objet [32], mais leurs implémentations restent toutefois compliquées.

Si l'on se restreint à l'imagerie *en face*, le faisceau d'éclairage est balayé par des miroirs galvanométriques pouvant osciller à des fréquences suffisamment grandes pour rendre l'imagerie temps réel et *in vivo* possible [33]. Bien que la limitation due au manque de modulateurs de phase suffisamment rapides ou fonctionnant dans une gamme de longueurs d'onde suffisamment large soit dépassée, la nécessité d'un double balayage latéral limite toujours la vitesse d'acquisition. En effet, si l'imagerie *in vivo* à haute résolution est possible, le champ de vue est en général limité. On perd alors l'avantage de l'OCM sur la RCM concernant la contrainte sur l'ouverture numérique des objectifs. En effet, les objectifs de microscope ayant une forte ouverture numérique (au minimum 0.5) offre une résolution (axiale et latérale) supérieure, indispensable en RCM pour

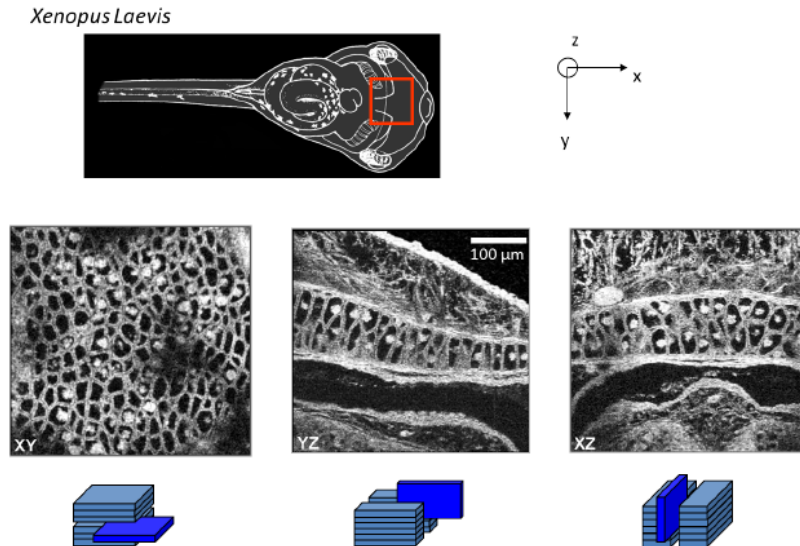


FIGURE 2.9 – Images d’un têtard de grenouille (*Xenopus Laevis*) par OCM plein champ. L’image 3D est reconstruite à partir d’une pile d’images dans le plan XY (images en face). Les coupes verticales (YZ et XZ) sont extraites numériquement de cette pile [11].

le sectionnement, mais ont en général un champ de vue réduit en contrepartie. En OCM, le sectionnement étant accompli grâce à la cohérence temporelle, des objectifs moins ouverts (0.3 - 0.5) peuvent être utilisés pour atteindre une résolution latérale de 1 à 2 μm tout en conservant un champ maximal de 1 à 2 mm et un sectionnement efficace. Toutefois, comme nous venons de le voir, ce champ peut être limité selon la vitesse d’acquisition souhaitée.

2.3.2 Microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM)

En 1998 apparaît l’idée de paralléliser l’éclairage et la détection afin de s’affranchir du balayage latéral [34]. On parle dans ce cas d’OCM plein champ (FF-OCM pour *full-field optical coherence microscopy*) car on éclaire la totalité du champ de l’objectif de microscope. Le signal est alors détecté par un capteur matriciel, collectant ainsi le signal provenant de tous les points du champ de vue. On peut ainsi acquérir une image *en face* sans balayage et un stack tridimensionnel par un unique déplacement axial de l’objectif de microscope couplé à une adaptation de la longueur du bras de référence. On parle parfois, par abus de langage, de FF-OCT bien qu’il s’agisse toujours d’un système OCM car les images acquises sont des coupes *en face*. Des images en coupe verticale peuvent être reproduites mais elles sont toujours issues d’un stack 3D. La FF-OCM peut être vue comme une adaptation de la microscopie optique conventionnelle, capable de réaliser des sections optiques grâce au filtrage par la cohérence temporelle.

La différence avec un système d’OCM temporelle conventionnel réside dans l’éclairage plein champ de l’échantillon à l’aide d’un système Köhler et non plus point par point³. Le signal est alors détecté par un capteur matriciel sans balayage. L’OCM plein champ est donc strictement une méthode d’imagerie en coupe horizontale. Des piles d’images 3D peuvent également être acquises par compilation d’images *en face*. Des images en coupe verticale peut enfin être reconstituées à partir de cette pile 3D (voir figure 2.9).

Le montage typique de FF-OCM, représenté sur la figure 2.10, est composé d’un interfé-

3. L’éclairage Köhler permet d’illuminer de manière uniforme tous les points du champ. Cette uniformité vient du fait que l’image de la source est rejetée à l’infini dans l’espace objet. Un diaphragme, dit de champ, conjugué avec le plan focal de l’objectif sert à régler les dimensions de champ de vue dans l’objet. Un autre diaphragme, dit d’ouverture, conjugué avec la source, permet de régler le degré de cohérence spatiale de l’éclairage.

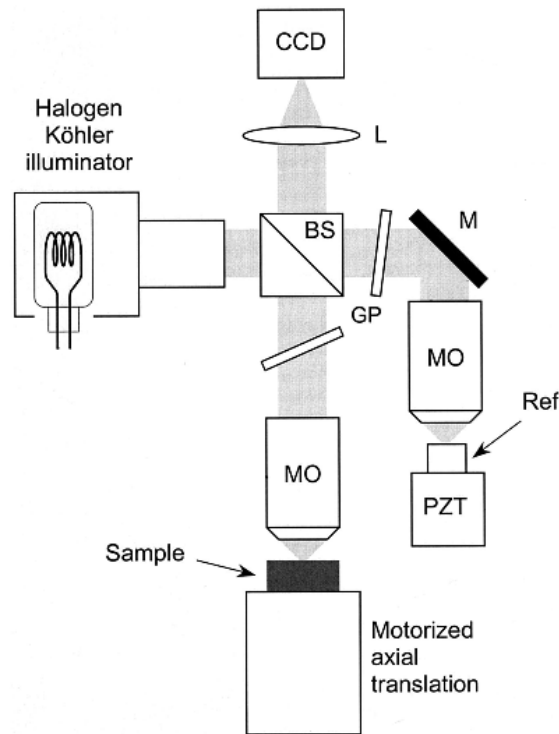


FIGURE 2.10 – Schéma de principe d'un dispositif d'OCM plein champ. Une source thermique associée à un système d'éclairage Köhler (*Halogen Köhler illumination*) éclaire un interféromètre de Linnik composé d'un cube séparateur 50/50 (BS) et de deux objectifs de microscope identiques (MO). Une lame de verre (GP) est placée dans chacun des deux bras de l'interféromètre afin de corriger d'éventuels écarts de dispersion. L'objectif de microscope dans le bras objet éclaire l'échantillon (*Sample*) qui est placé sur une platine motorisée (*Motorized axial translation*) permettant de choisir la profondeur d'imagerie, et collecte le signal rétrodiffusé. Le miroir de référence (*Ref*) est placé sur une platine piézoélectrique (PZT) permettant de moduler la phase et ainsi d'extraire le signal par une méthode à décalage de phase. Les images 2D sont finalement formées sur un capteur matriciel (CCD) par une lentille de tube (L) [35].

romètre de Michelson en espace libre en configuration Linnik. Un cube séparateur 50/50 fonctionnant sur une large bande spectrale divise le faisceau d'éclairage entre le bras objet et le bras de référence. La configuration de Linnik⁴ signifie qu'un objectif de microscope est placé dans chacun des deux bras. Dans le bras de référence, l'objectif de microscope dirige le faisceau d'éclairage sur une surface dite de référence. Dans le bras objet, l'objectif éclaire et collecte le signal provenant de l'échantillon sur la totalité du champ. Les faisceaux sont ensuite recombinés par le cube pour finalement former l'image sur un capteur matriciel grâce à une lentille de tube.

La source de lumière doit être de faible cohérence temporelle, comme pour tout système basé sur l'interférométrie en lumière faiblement cohérente, mais également de faible cohérence spatiale. En effet, en raison de la parallélisation de l'éclairage et de la détection, l'utilisation d'une source spatialement cohérente entraînerait l'apparition d'un bruit de speckle, détériorant significativement les images acquises. Bien que des techniques permettant d'utiliser des sources spatialement cohérentes tout en limitant le bruit de speckle aient été étudiées [36, 37, 38, 39], la méthode la plus efficace reste d'utiliser des sources spatialement incohérentes car elles éliminent naturellement ce phénomène [40].

4. D'autres configurations existent et seront mentionnées par la suite. La configuration de Linnik reste pour autant le plus fréquente car la plus simple à mettre en place.

Typiquement, la source utilisée est une lampe halogène car c'est une technologie simple, peu chère et dont le spectre est large [41, 42]. Le spectre, suivant une loi de type corps noir, est d'ailleurs tellement large qu'aucun détecteur n'est sensible sur l'ensemble de la gamme. L'utilisation de lampes halogènes est bien établi en FF-OCM et a permis d'obtenir des images d'une excellent qualité avec la meilleure résolution axiale à ce jour [43]. Toutefois, ces sources sont fragiles, peu efficaces car elles dissipent beaucoup de chaleur, et peuvent manquer de flux, ce qui peut être handicapant pour l'imagerie rapide. Récemment, des images d'une qualité similaire à ce que est typiquement faisable avec une lampe halogène, en termes de résolution axiale et de sensibilité, ont été obtenues avec une source à LED [44].

En OCM plein champ, il est indispensable que les deux objectifs dans chaque bras soient identiques. Premièrement, cela limite les écarts de dispersion optique entre les deux bras de l'interféromètre. La dispersion causée par un matériau est le résultat de la dépendance de la vitesse de phase avec la longueur d'onde à travers ce même matériau, ayant pour effet de déformer les trains d'onde. Si la dispersion est dissymétrique, alors les deux trains d'onde interférant ne sont plus identiques, ce qui provoque une perte de résolution et de contraste sur la figure d'interférences. Plus fondamentalement, l'incohérence spatiale des sources de lumière en FF-OCM impose l'utilisation d'objectifs identiques. Avec une source incohérente, il est indispensable pour obtenir des interférences que les photons proviennent du même point de la source, ce qui leur impose de suivre exactement le même chemin dans les deux bras de l'interféromètre.

La FF-OCM est intéressante à étudier car elle présente des similitudes avec la LC-OCT, notamment dans l'utilisation d'objectifs de microscope et dans la façon de reconstituer les images à partir du signal interférométrique. Bien que la parallélisation bidimensionnelle permette d'obtenir des images en une seule acquisition, l'effet confocal est perdu ce qui réduit la profondeur de pénétration dans les tissus biologiques. Ce défaut constitue la principale limitation de la FF-OCM.

2.4 Caractérisation d'un système d'OCT

Aujourd'hui, aucun dispositif d'imagerie optique ne donne entière satisfaction dans un contexte clinique en dermatologie pour la détection de tous les types de cancer de la peau. Cette section nous permettra de mieux comprendre les paramètres influençant la qualité des images produites par un système basé sur l'OCT, et donc d'être mieux armé pour concevoir un nouveau dispositif respectant toutes les conditions mentionnées dans la section 1.1.3.

2.4.1 Résolution axiale

La résolution axiale d'un dispositif d'imagerie définit sa capacité à réaliser des sections optiques plus ou moins fines dans l'objet. En OCT conventionnelle, c'est uniquement la cohérence temporelle qui permet de réaliser ce sectionnement car l'ouverture numérique des objectifs est généralement faible. En réalité, comme nous le verrons par la suite, le sectionnement optique est le résultat de la combinaison du filtrage par la cohérence temporelle et de la profondeur de champ des objectifs. Cette dernière n'est en effet plus négligeable si la profondeur de champ n'est plus grande devant la longueur de cohérence.

Ouverture numérique négligée

Dans la sous-section 2.2.2, nous avons défini la longueur de cohérence comme la longueur des trains d'onde émis par la source de lumière. En OCT temporelle, la réponse impulsionnelle axiale, définie comme l'interférogramme créé lorsque l'on utilise un dioptré comme objet, a une largeur égale à la moitié de la longueur de cohérence, qu'on assimilera alors à la résolution axiale du système. Pour l'OCT fréquentielle, le signal détecté est le spectre modulé par la distance du dioptré au plan de cohérence. Le profil en intensité selon la profondeur z est le résultat de la

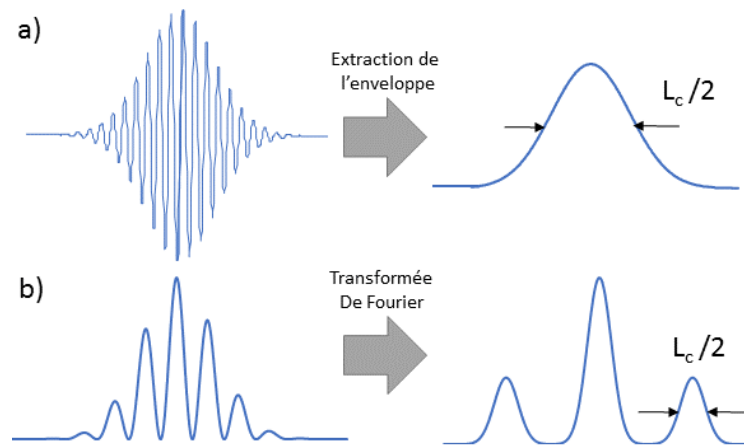


FIGURE 2.11 – Illustration de la résolution axiale en domaine temporel (a) et fréquentiel (b) à partir du signal acquis pour un objet composé d'une unique surface réfléchissante.

transformée de Fourier de ce spectre cannelé. La résolution en z est alors directement liée à la largeur du spectre en nombre d'onde σ d'après les propriétés de la transformée de Fourier. La propriété qui nous intéresse ici est celle dictant que la contraction du signal dans un domaine (spatial ou fréquentiel) implique une dilatation dans l'autre⁵. On peut également invoquer le principe d'incertitude affirmant que pour deux variables complémentaires, par exemple z et σ , il existe une limite fondamentale à la précision avec laquelle il est possible de connaître simultanément ces deux grandeurs. Ainsi, si l'on souhaite connaître précisément la position z alors il est nécessaire d'avoir une grande incertitude sur le nombre d'onde σ , c'est-à-dire avoir un spectre large. Les réponses impulsionnelles en OCT temporelle et en OCT fréquentielle sont représentées sur la figure 2.11.

En réalité, ces deux définitions sont identiques car la forme des trains d'onde dans l'espace (ou le temps), dont on a représenté un exemple sur la figure 2.3, est également directement liée à la transformée de Fourier du spectre. En effet, un tel train d'onde est le résultat de la somme des contributions de chaque longueur d'onde du spectre. On peut exprimer mathématiquement ces ondes par leurs champs électriques scalaires :

$$E(\sigma, z) = E_0 e^{2ni\pi\sigma z} \quad (2.6)$$

où n est l'indice du milieu. Si l'on prend la somme de ces ondes pondérées par la densité spectrale de puissance $S(\sigma)$, on obtient alors l'expression suivante :

$$E(\sigma, z) = E_0 \int_{-\infty}^{+\infty} S(\sigma) e^{2ni\pi\sigma z} d\sigma \quad (2.7)$$

On reconnaît alors la transformée de Fourier de $S(\sigma)$ qu'on notera $\hat{S}(z)$. C'est donc la largeur à mi-hauteur de $\hat{S}(z)$ qu'on définira comme la longueur de cohérence du système.

La longueur de cohérence, et donc la résolution axiale, peut alors être calculée analytiquement dans des cas simples. Considérons le cas d'un spectre gaussien en nombre d'onde $S(\sigma)$:

$$S(\sigma) = \exp\left(-\frac{4 \ln 2 \sigma^2}{\Delta\sigma^2}\right) \quad (2.8)$$

où $\Delta\sigma$ représente la largeur à mi-hauteur du spectre. Notons bien qu'ici σ représente le nombre d'onde et non l'écart-type de la distribution gaussienne comme on peut le voir habituellement.

5. $TF[f(a \times \sigma)] = \frac{1}{|a|} \hat{f}(z/a)$ où \hat{f} est la transformée de Fourier de la fonction f .

On calcule alors la transformée de Fourier de ce spectre pour retrouver la réponse impulsionnelle axiale :

$$\hat{S}(z) = \exp\left(-\frac{n^2\pi^2\Delta\sigma^2 z^2}{4\ln(2)}\right) \quad (2.9)$$

On constate directement le déplacement de $\Delta\sigma$ du dénominateur au numérateur, illustrant ainsi le phénomène de contraction/dilatation de la transformée de Fourier. La longueur de cohérence est définie comme la largeur à mi-hauteur (ou FWHM pour *full-width at half maximum*) de la distribution gaussienne dans le milieu d'indice n . Pour la trouver il suffit de chercher la valeur de z telle que $\hat{S}(z) = 1/2$. La gaussienne étant centrée, la FWHM est le double de cette valeur. On peut donc exprimer simplement la résolution axiale par :

$$\Delta z = \frac{l_c}{2} = \frac{2\ln(2)}{n\pi\Delta\sigma} \approx \frac{2\ln 2}{n\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2.10)$$

Si la longueur d'onde centrale et la largeur spectrale de la source sont des éléments importants pour la résolution, la forme du spectre n'est pas à négliger. En effet, la réponse impulsionnelle étant déterminée par la transformée de Fourier du spectre de la source, on peut rapidement dégrader la qualité des images. Nous verrons un exemple concret dans le chapitre 3 où l'on utilise un laser supercontinuum présentant un pic intense à 1064 nm superposé à un spectre extrêmement large (de ~ 400 nm à ~ 2400 nm). Si l'on ne prend aucune précaution pour filtrer ce pic, alors on retrouve dans la réponse impulsionnelle une composante sinusoïdale, correspondant à la transformée de Fourier d'un pic de Dirac, s'étendant sur toute la profondeur de l'image. Dans le cas d'un objet biologique, toutes les réponses des structures de l'objet présenteront cette composante, dégradant ainsi fortement les images.

Prise en compte de l'ouverture numérique

La définition proposée ci-dessus est commune à tous les systèmes d'OCT et est utile afin de les comparer entre eux. En revanche, pour les dispositifs utilisant des objectifs à forte ouverture numérique, la contribution du filtrage par l'ouverture numérique à la résolution axiale ne peut plus être négligée. En effet, on comprend intuitivement que si la longueur de cohérence est plus grande que la profondeur de champ, alors celle-ci ne peut plus être utilisée seule pour définir la résolution axiale du système.

Lorsque l'on ne peut plus négliger l'effet de l'ouverture numérique, le signal interférométrique détecté peut se mettre sous la forme suivante en fonction de la position z [45] :

$$I(z) = \int_{-\infty}^{+\infty} S(\sigma) \int_0^{\theta_{max}} \cos(4\pi\sigma z \cos\theta) \cos\theta \sin\theta d\theta d\sigma \quad (2.11)$$

L'angle θ_{max} représente ici l'angle d'incidence maximal de l'éclairage sur l'objet. Cet angle est relié à l'ouverture numérique ON du microscope par l'expression $ON = n \sin\theta_{max}$ où n est l'indice de réfraction de l'objet. On peut vérifier que si l'on néglige l'angle θ_{max} alors on retrouve la partie réelle de la transformée de Fourier $\hat{S}(z)$ et donc une réponse impulsionnelle purement dictée par la cohérence temporelle de la source. Comme précédemment, $S(\sigma)$ représente la densité spectrale de puissance de la source.

On nomme I_{ON} l'intégrale intérieure sur l'angle θ qui peut être précisément approximée par [45] :

$$I_{ON}(z) = \text{sinc}[2\pi\sigma z(1 - \cos\theta_{max})] \cos[2\pi\sigma z(1 + \cos\theta_{max})] \quad (2.12)$$

La fonction $I_{ON}(z)$ peut alors être vue comme une fonction oscillante à la fréquence $(1 + \cos\theta_{max})\sigma$ modulée par une enveloppe variant comme une fonction sinus cardinal⁶. Puisque l'enveloppe de

6. La fonction sinus cardinal est définie comme $\text{sinc}(x) = \sin(x)/x$.

$I_{\text{ON}}(z)$ varie lentement comparée à la porteuse, l'équation 2.11 peut alors être réexprimée en :

$$I(z) \approx \text{sinc}[2\pi\sigma_0 z(1 - \cos\theta_{\text{max}})] \int_{-\infty}^{+\infty} S(\sigma) \cos[2\pi\sigma z(1 + \cos\theta_{\text{max}})] d\sigma \quad (2.13)$$

où σ_0 est le centre de masse de la densité spectrale de puissance $S(\sigma)$. On remarque alors la présence de la partie réelle d'une transformée de Fourier dans l'intégrale de l'équation 2.13, moyennant un changement de variable $\sigma' = (1 + \cos\theta_{\text{max}})\sigma$. Grâce à cela et si l'on considère un spectre gaussien $S(\sigma)$ de largeur à mi-hauteur $\Delta\sigma$, la réponse impulsionnelle axiale se met sous la forme suivante :

$$I(z) = \text{sinc}[2\pi\sigma_0 z(1 - \cos\theta_{\text{max}})] \exp\left[-\frac{n^2\pi^2(1 + \cos\theta_{\text{max}})^2\Delta\sigma^2}{4\ln 2} z^2\right] \cos[2\pi\sigma_0(1 + \cos\theta_{\text{max}})z] \quad (2.14)$$

Pour des valeurs faibles de l'ON, la dépendance de la fonction gaussienne en θ_{max} peut être négligée. Pour des valeurs élevées, la fonction sinus cardinal devient plus fine que la gaussienne, ce qui implique que la dépendance de la gaussienne avec l'angle θ_{max} peut également être négligée sans modification significative de l'enveloppe globale. Finalement, on peut donc exprimer $I(z)$ par :

$$I(z) = V_{\text{coh}}(z) \times V_{\text{ON}}(z) \times \cos[2\pi\sigma_0(1 + \cos\theta_{\text{max}})z] \quad (2.15)$$

avec

$$V_{\text{coh}}(z) = \exp\left[-\frac{n^2\pi^2\Delta\sigma^2}{\ln 2} z^2\right] \quad (2.16)$$

et

$$V_{\text{ON}}(z) = \text{sinc}[2\pi\sigma_0 z(1 - \cos\theta_{\text{max}})] \quad (2.17)$$

Le produit $V_{\text{coh}} \times V_{\text{ON}}$ représente l'enveloppe globale de la figure d'interférence oscillant à une fréquence spatiale $\sigma_0(1 + \cos\theta_{\text{max}})$. On peut finalement exprimer les FWHM de ces deux enveloppes :

$$\Delta z_{\text{coh}} = \frac{2\ln(2)}{n\pi\Delta\sigma} \approx \frac{2\ln 2}{n\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2.18)$$

$$\Delta z_{\text{ON}} = \frac{1}{2n\sigma_0(1 - \cos\theta_{\text{max}})} \quad (2.19)$$

La valeur de Δz_{ON} est définie comme la distance séparant la première annulation de V_{ON} de son centre, et représente la profondeur de champ des objectifs de microscope qu'on assimile à la résolution axiale d'un système de microscopie optique. Elle peut être approximée à l'aide d'un développement limité à l'ordre 3 selon l'angle d'incidence :

$$\Delta z_{\text{ON}} \approx \frac{n\lambda_0}{\text{ON}^2} \quad (2.20)$$

La résolution axiale du système prenant en compte à la fois la cohérence temporelle et la profondeur de champ des objectifs s'exprime alors ainsi :

$$\Delta z = \left(\frac{1}{\Delta z_{\text{ON}}^2} + \frac{1}{\Delta z_{\text{coh}}^2} \right)^{-\frac{1}{2}} \quad (2.21)$$

On représente sur la figure 2.12 l'évolution de la résolution axiale Δz en fonction de l'ouverture numérique pour différentes longueurs de cohérence. On retrouve le résultat énoncé au début de cette sous-section : lorsque l'ouverture numérique est négligeable, la résolution axiale est totalement déterminée par la cohérence temporelle. L'augmentation de l'ouverture numérique permet dans tous les cas d'améliorer la résolution axiale mais avec une efficacité variable

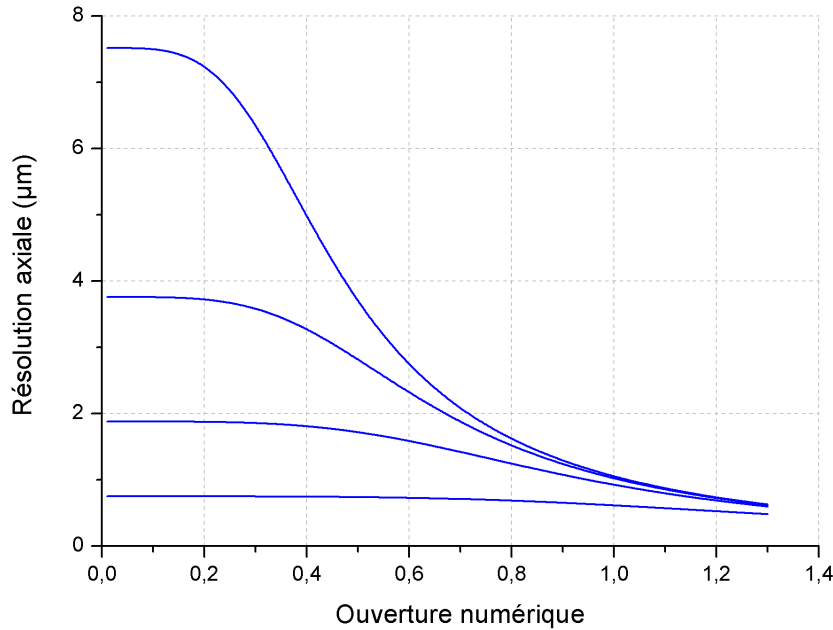


FIGURE 2.12 – Simulation numérique de la résolution axiale en fonction de l’ouverture numérique pour différentes longueurs de cohérence l_c (20 μm , 10 μm , 5 μm , et 2 μm , de haut en bas). La longueur d’onde centrale est de 800 nm et le milieu est l’eau ($n = 1.33$).

selon la longueur de cohérence. Si la longueur de cohérence est déjà faible, il sera difficile d’améliorer la résolution grâce à l’augmentation de l’ouverture numérique comme on peut le voir sur la courbe du bas de la figure 2.12. Il est même préférable d’utiliser des objectifs à ouverture numérique modérée lorsque le filtrage par la cohérence temporelle est suffisant. En effet, une forte ouverture numérique implique généralement une diminution du champ de vue latéral, et une sensibilité accrue aux aberrations optiques ayant pour effet de limiter la qualité d’imagerie lorsque l’on s’enfonce en profondeur dans l’objet. De plus, la longueur de cohérence et la résolution latérale étant indépendantes, il est possible grâce au filtrage par la cohérence d’obtenir une bonne résolution axiale et latérale sans recourir à des objectifs trop ouverts. En effet, la résolution axiale étant moins bonne que la résolution latérale pour des ouvertures numériques classiques, chercher à réaliser un sectionnement fin en microscopie confocale peut aboutir à un surdimensionnement de la résolution transverse.

Effet de la dispersion

La dispersion est un phénomène affectant les ondes se propageant dans un milieu dit dispersif. Un milieu dispersif est un milieu dans lequel la vitesse de propagation d’une onde dépend de sa fréquence. Ainsi, une onde polychromatique verra ses différentes fréquences se propager à différentes vitesses, résultant en une déformation de la forme de l’onde au fur et à mesure de la propagation.

En interférométrie, c’est l’écart de dispersion entre les deux bras de l’interféromètre qui pose problème. S’il existe une différence de dispersion entre les deux bras de l’interféromètre alors les deux trains d’onde issus de la séparation du front d’onde par le cube séparateur se déforment l’un par rapport à l’autre. Cela a pour effet d’élargir la figure d’interférences créée et de réduire son amplitude, ce qui aboutit à une perte de résolution ainsi qu’une diminution du contraste [46].

On peut exprimer la résolution axiale effective en fonction de la résolution axiale sans dispersion Δz_0 et la dispersion de la vitesse de groupe GVD (pour *group velocity dispersion*) [46] :

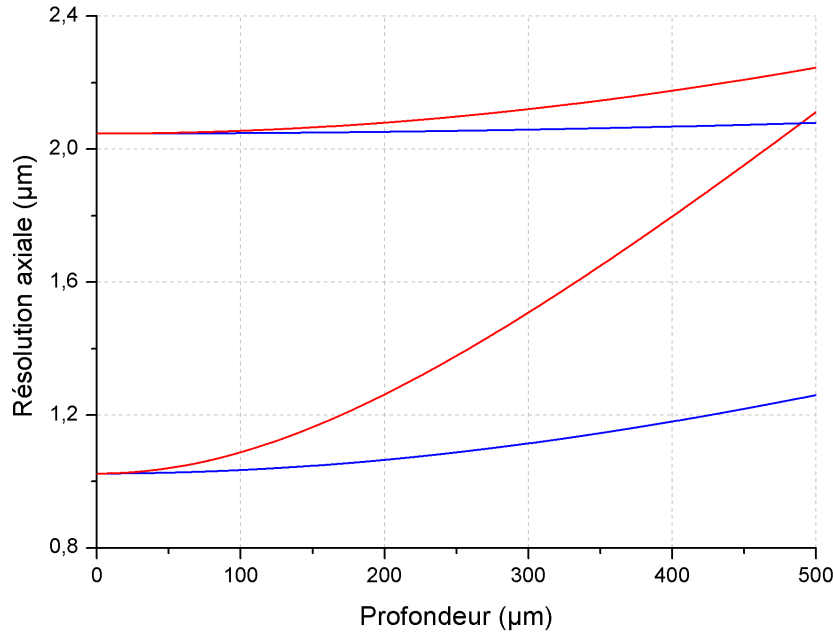


FIGURE 2.13 – Simulation numérique de la résolution axiale en fonction de la profondeur en présence d’un écart de dispersion entre les deux bras de l’interféromètre basée sur l’équation 2.22. Les milieux d’immersion sont soit de l’air (rouge), soit de l’eau (bleu). Les deux courbes du bas partant de $\sim 1 \mu\text{m}$ correspondent à une largeur spectrale de 200 nm alors que celles du haut correspondent à un spectre de largeur 100 nm. La longueur d’onde centrale est $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$.

$$\Delta z = \Delta z_0 \sqrt{1 + 4 \left(\frac{c}{n \Delta z_0} \right)^4 \left(\text{GVD} - \frac{n_{im}}{n} \text{GVD}_{im} \right)^2 z^2} \quad (2.22)$$

où

$$\text{GVD} = \frac{\partial}{\partial \omega} \left(\frac{1}{v_g(\omega)} \right)_{\omega=\omega_0} \quad (2.23)$$

Les grandeurs n et n_{im} sont respectivement les indices de réfraction de l’objet et du milieu d’immersion, c représente la célérité de l’onde dans le vide, et $v_g(\omega)$ désigne la vitesse de groupe de l’onde.

Selon l’équation 2.22, la résolution axiale décroît progressivement en fonction de la profondeur. Elle dépend également de la GVD de l’échantillon et de l’immersion. Par un choix judicieux du milieu d’immersion, il est donc théoriquement possible de limiter cette dégradation de la résolution en adaptant son indice optique et sa GVD à l’objet étudié. Toutefois, une adaptation parfaite est illusoire et probablement inutile. Afin de quantifier cette dégradation, simulons l’évolution de la résolution axiale avec la profondeur à partir de l’équation 2.22, pour des milieux d’immersion connus et en estimant des valeurs moyennes de l’indice et de la GVD de la peau. Les propriétés de la peau varient en fonction de la zone et de la personne étudiée, mais on connaît son constituant principal : l’eau ($n = 1.33$ et $\text{GVD} = 25 \text{ fs}^2 \text{ mm}^{-1}$ à $\lambda_0 = 800 \text{ nm}$ [47]). À titre de comparaison, le verre BK-7 possède une GVD de $45 \text{ fs}^2 \text{ mm}^{-1}$ et un indice de 1.51 pour cette même longueur d’onde [48]. On supposera dans notre exemple que la peau a un indice $n = 1.38$ [49], et une GVD autour de $40 \text{ fs}^2 \text{ mm}^{-1}$. En figure 2.13, on représente l’évolution de la résolution axiale pour un tel objet avec un objectif travaillant soit dans l’air (courbes rouges) soit dans l’eau (courbes bleues).

On constate dans un premier temps que lorsque l’on adapte l’immersion à l’objet imagé (dans ce cas une immersion à eau pour imager de la peau, soit les courbes bleues), la dégradation de

la résolution est bien moins prononcée. Ainsi lorsque l'on travaille avec un spectre large, il devient indispensable d'utiliser des objectifs à immersion sous peine de fortement limiter la profondeur d'imagerie. D'autre part, on remarque que la détérioration de la résolution dépend de la résolution à la surface et qu'elle est moins marquée quand on utilise une source moins large spectralement. Ainsi, s'il est impossible, pour des raisons techniques, d'utiliser des objectifs à immersion, il est tout de même possible de restreindre la dégradation en limitant la résolution à la surface et donc la largeur spectrale de la source. Dans ce cas, la résolution axiale est dans l'ensemble moins bonne, mais elle reste relativement constante sur toute la profondeur d'imagerie. Dans tous les cas, si l'on souhaite des images à très haute résolution axiale ($\sim 1 \mu\text{m}$), il reste indispensable d'adapter la dispersion dans les deux bras de l'interféromètre.

Dans l'optique de constamment optimiser la résolution du système, on peut également faire le raisonnement inverse et chercher le spectre optimal pour une profondeur choisie [43]. Le spectre optimal est un spectre qui n'est ni trop large pour réduire les effets de la dispersion, ni trop fin pour ne pas dégrader inutilement la résolution sous prétexte que l'on veut limiter la dispersion. On arrive alors au résultat contre intuitif que, pour conserver une résolution correcte en profondeur, il peut être judicieux de limiter la largeur spectrale de la source.

2.4.2 Résolution latérale

La résolution latérale d'un système d'imagerie optique est définie comme étant la largeur de la PSF latérale (*point spread function*, soit fonction d'étalement du point en français). Comme pour n'importe quel système de microscopie classique, la résolution latérale en OCT dépend des optiques de focalisation utilisées. Plus précisément, elle dépend de leur ouverture numérique, et de la longueur d'onde.

Si on suppose un système optique dénué d'aberrations ainsi qu'un éclairage uniforme sur toute la pupille, l'intensité transverse de la PSF est donnée par la fonction d'Airy :

$$I(r) = \left[\frac{2J_1(2\pi r \text{ON} / \lambda_0)}{2\pi r \text{ON} / \lambda_0} \right]^2 \quad (2.24)$$

où J_1 désigne la fonction de Bessel de premier ordre, ON l'ouverture numérique, λ_0 la longueur d'onde centrale. Il existe plusieurs critères pour définir la résolution latérale. Ces différents critères ne font en réalité que varier le coefficient multiplicateur en face d'un rapport entre la longueur d'onde et l'ouverture numérique. Le plus commun pour une tache d'Airy est la distance entre le centre et la première annulation :

$$\Delta r = \frac{1.22\lambda_0}{2\text{ON}} \quad (2.25)$$

Un autre cas également fréquent est celui de l'éclairage à profil gaussien. En effet, dans le cas d'un éclairage provenant d'une fibre optique monomode, le profil de l'éclairage est gaussien. Dans ce cas, la PSF n'est plus une tache d'Airy mais une tache présentant également un profil gaussien conformément aux propriétés de la transformée de Fourier. En effet, selon les lois de l'optique de Fourier, l'amplitude de l'image formée dans le plan focal arrière d'une lentille est égale à la transformée de Fourier de l'amplitude de l'objet (c'est-à-dire la source dans notre cas) au niveau du plan focal avant, c'est-à-dire en pratique l'endroit où se trouve la pupille. D'après la figure 2.14 et en utilisant les lois de propagation des faisceaux gaussiens, on trouve un *waist* w_0 (largeur du faisceau gaussien) égal à :

$$w_0 = \frac{\lambda_0}{n\pi \tan \theta_{max}} \quad (2.26)$$

Dans la limite des angles modérément élevés, on peut donc donner une valeur approximative de la résolution latérale :

$$\Delta r = \frac{\lambda_0}{\pi \text{ON}} \quad (2.27)$$

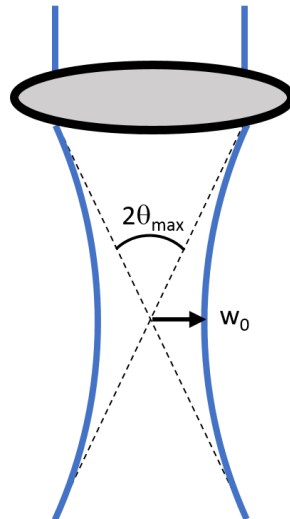


FIGURE 2.14 – Largeur du faisceau d’éclairage dans l’objet dans le cas d’un faisceau gaussien.

En pratique il est intéressant d’avoir une résolution spatiale isotrope, en particulier pour l’imagerie en coupe verticale. Dans la direction transverse, il est tout à fait possible d’obtenir une résolution de l’ordre de $1\ \mu\text{m}$ avec des ouvertures numériques modérées (0.3 - 0.5). Pour obtenir une telle résolution dans la direction longitudinale toute chose égale par ailleurs, l’ouverture numérique doit être bien plus élevée. En revanche, grâce au filtrage par la cohérence temporelle utilisé en OCT, il est possible d’obtenir une résolution isotrope dans toutes les directions sans utiliser d’objectifs très ouverts, limitant ainsi les aberrations causées par la propagation de la lumière dans les milieux turbides tels que la peau.

2.4.3 Sensibilité

Comparaison avec la microscopie

Quelque soit le dispositif d’OCT, la sensibilité de détection est toujours définie comme étant le plus faible signal de réflectivité mesurable R_{min} . L’expression de la sensibilité peut cependant varier selon que l’on soit en domaine temporel ou fréquentiel. On peut tout de même, dans un premier temps, comparer les systèmes d’OCT avec les dispositifs de microscopie. En effet, on a vu qu’il existait une différence fondamentale dans la manière de sectionner l’objet, modifiant radicalement l’expression de la résolution axiale. Cependant, quand bien même la longueur de cohérence serait approximativement égale, voire supérieure, à la PSF axiale d’un système de microscopie confocal, la figure 2.15 montre que le filtrage temporel en OCT est bien plus sélectif qu’un filtrage confocal simple. Si on reprend les expressions des enveloppes de la PSF axiale des équations 2.16 et 2.17 et qu’on les trace sur une échelle logarithmique en présence de bruit additif, on constate que la fonction $V_{coh}(z)$ atteint bien plus rapidement le seuil de bruit que la fonction $V_{ON}(z)$. La combinaison des deux effets reste toutefois toujours plus efficace que chaque filtrage individuellement, permettant ainsi d’améliorer le contraste et la profondeur de pénétration dans les échantillons biologiques [50]. En effet, on comprend intuitivement que même si le filtrage par la cohérence temporelle est plus sélectif, il reste utile d’avoir un fort filtrage confocal afin de limiter la quantité de lumière incohérente détectée ne participant pas au signal. Cette capacité de sélection permet aux systèmes d’OCT de pénétrer plus profondément dans les échantillons que les systèmes de microscopie.

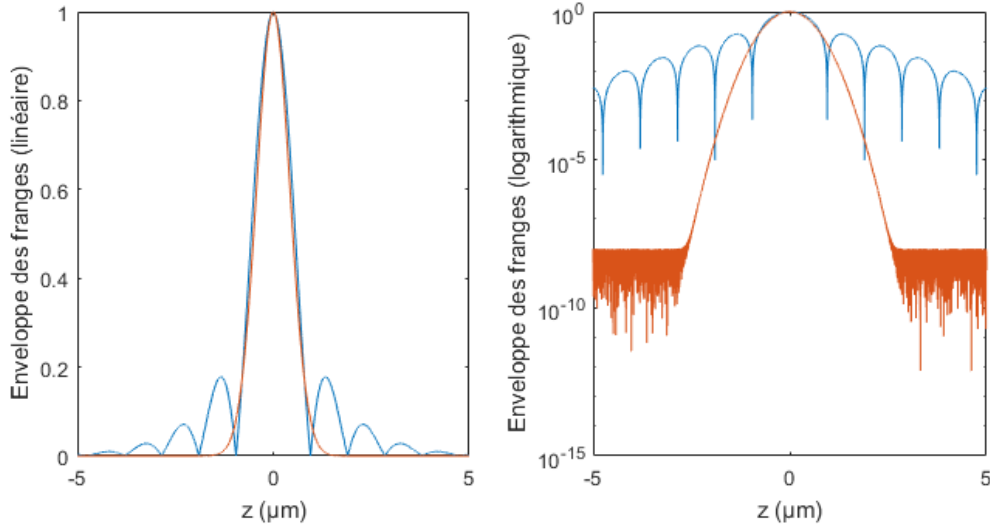


FIGURE 2.15 – Simulation numérique de l’enveloppe des franges en échelles linéaire (gauche) et logarithmique (droite) en présence de bruit additif. La courbe rouge ($l_c = 2 \mu\text{m}$ et $\text{ON} = 0.3$) présente une largeur à mi-hauteur similaire à la courbe bleue ($l_c = 10 \mu\text{m}$ et $\text{ON} = 0.8$) mais elle atteint bien plus rapidement le niveau de bruit.

En domaine temporel

Pour une source lumineuse d’intensité I_0 et un objet dont le coefficient de réflexion est R_{ech} , la sensibilité d’un dispositif d’OCT peut se formuler de la façon suivante [51] :

$$S = \frac{\rho I_0 R_{ech}}{4eB} \quad (2.28)$$

où ρ est la sensibilité spectrale du capteur, e est la charge élémentaire, et B la bande passante de détection.

En OCT temporelle, la bande passante de détection s’exprime en fonction de la fréquence Doppler créée par le balayage axial de la surface de référence [51] :

$$B = 2\Delta f = \frac{4\Delta\sigma z_{max}}{\Delta t} \quad (2.29)$$

où Δt est le temps d’intégration d’un A-scan, z_{max} est la profondeur maximale d’imagerie, et $\Delta\sigma$ la largeur spectrale de la source. Finalement, la sensibilité d’un système d’OCT conventionnelle en domaine temporel peut se mettre sous la forme [51] :

$$S_{TD-OCT} = \frac{\rho I_0 R_{ech} \Delta t}{16e\Delta\sigma z_{max}} \quad (2.30)$$

Comme il est mentionné dans la sous-section 2.2.3, la sensibilité est détériorée par une forte résolution axiale, ici représentée par $\Delta\sigma$. En effet, la lumière rétrodiffusée par la totalité du profil est détectée mais seule une partie à l’intérieur du plan de cohérence participe au signal, le reste pouvant être considéré comme un bruit additif. On a également une dépendance avec le temps d’intégration Δt et la profondeur maximale d’imagerie z_{max} impliquant que pour augmenter la sensibilité il faut réduire la vitesse de balayage de profil. En d’autres termes, cela signifie que plus on passe de temps à intégrer le signal provenant d’un point du profil pendant le balayage axial, meilleur sera le rapport signal sur bruit.

En domaine fréquentiel

En OCT fréquentielle, la bande passante est égale au temps d'intégration d'un A-scan $B = \Delta t$ [26], d'où l'expression de la sensibilité :

$$S_{FD-OCT} = \frac{\rho I_0 R_{ech} \Delta t}{4e} \quad (2.31)$$

La sensibilité est ici indépendante de la profondeur maximale d'imagerie et de la longueur de cohérence. En revanche, la sensibilité en OCT fréquentielle varie en fonction de la profondeur de l'objet contrairement à l'OCT temporelle. En effet, la période des cannelures dans le spectre mesuré dépend de la distance au plan de cohérence : plus on s'éloigne du plan de cohérence, plus les cannelures se resserrent. Il arrive donc un moment où la résolution spectrale du spectromètre n'est plus suffisante pour échantillonner correctement les cannelures, ce qui limite la profondeur d'imagerie et dégrade la qualité du signal détecté.

Le rapport entre S_{FD-OCT} et S_{TD-OCT} est proportionnel à $\Delta \sigma z_{max}$. La largeur spectrale est en général de l'ordre de $1 \mu\text{m}^{-1}$ et la profondeur peut typiquement aller jusqu'à plusieurs millimètres. Il n'est donc pas rare d'avoir un gain de l'ordre de 20 dB à 30 dB en OCT fréquentielle par rapport à l'OCT temporelle (voir figure 2.7).

Expression à partir d'un algorithme à décalage de phase

Dans le cas de l'OCT plein champ, et de la LC-OCT, travaillant en domaine temporel, la sensibilité peut s'exprimer grâce à l'expression 2.28. Toutefois, le signal interférométrique étant démodulé grâce à des algorithmes d'interférométrie à décalage de phase (voir sous-section 2.5.4), il est possible de formuler plus simplement la valeur de R_{coh} telle que le rapport signal sur bruit est unitaire. Pour cela, il faut d'une part exprimer analytiquement le signal obtenu grâce aux algorithmes de démodulation, et d'autre part le bruit de détection. Prenons le cas d'un algorithme de démodulation de type Larkin utilisant cinq images pour lequel le signal Γ se formule de la façon suivante [52] :

$$\Gamma(x, y) = \alpha(x, y)^2 - \beta(x, y) \times \gamma(x, y) \quad (2.32)$$

avec

$$\alpha(x, y) = I_2(x, y) - I_4(x, y) \quad (2.33)$$

$$\beta(x, y) = I_1(x, y) - I_3(x, y) \quad (2.34)$$

$$\gamma(x, y) = I_3(x, y) - I_5(x, y) \quad (2.35)$$

où I_{p+1} est une image interférométrique déphasée de $\pi/2$ par rapport à I_p . L'expression de I_p est détaillée dans l'équation 2.63 dans le cas où on intègre le signal interférométrique dont la phase est modulée de manière linéaire.

Le signal $\Gamma(x, y)$ obtenu pour un tel algorithme, dont le calcul est détaillé dans la sous-section 2.5.4 et aboutissant à l'expression 2.67, se met sous la forme suivante :

$$\Gamma(x, y) = \left(\frac{NI_0T}{\sqrt{2\pi}} \right)^2 R_{ref} R_{coh}(x, y) \quad (2.36)$$

où T est la période temporelle de l'onde et N le nombre d'accumulations du signal interférométrique. Afin que cette expression soit plus intuitive, il peut être utile d'y intégrer la capacité de charge du capteur e_{sat} . En négligeant la contribution de R_{coh} devant celle du flux continu proportionnel à $R_{inc} + R_{ref}$ dans la formule 2.4, on peut déduire que $e_{sat} = I_0T(R_{inc} + R_{ref})/16$.

On aboutit alors à une nouvelle expression du signal dépendant uniquement des coefficients de réflexion, de la capacité de charge du capteur et du facteur d'accumulation :

$$\Gamma(x, y) = \left(\frac{8\sqrt{2}e_{sat}N}{\pi(R_{inc} + R_{ref})} \right)^2 R_{ref}R_{coh}(x, y) \quad (2.37)$$

Exprimons maintenant, de manière analytique, le bruit détecté. On suppose que le signal brut détecté est tel que les pixels de la caméra sont en limite de saturation, et donc que le bruit est dominé par le bruit de photons. Le bruit de photons suit une distribution de Poisson, c'est-à-dire que sa variance est égale au nombre moyen de photons détectés P qu'on identifie à la capacité de charge du capteur e_{sat} :

$$\sigma_{ph}^2 = P \approx e_{sat} \quad (2.38)$$

Si l'on se place dans une zone sans signal, les intensités $I_p(x, y)$ sont en moyenne égales mais tout de même entachées d'un bruit variable supposé additif :

$$\Gamma(x, y) = (I + \nu_2 - (I + \nu_4))^2 - (I + \nu_1 - (I + \nu_3))(I + \nu_3 - (I + \nu_5)) \quad (2.39)$$

$$\Gamma(x, y) = \nu_2^2 + \nu_4^2 - 2\nu_2\nu_4 - [\nu_1\nu_3 - \nu_1\nu_5 - \nu_3^2 + \nu_3\nu_5] \quad (2.40)$$

avec

$$\left\{ \begin{array}{l} \langle \nu_p \rangle = 0 \\ \langle \nu_p^2 \rangle = \sigma_{ph}^2 \\ \langle \nu_p \nu_{q \neq p} \rangle = 0 \end{array} \right.$$

On obtient finalement une formule pour le bruit détecté :

$$B = 3\sigma_{ph}^2 = 3e_{sat} \quad (2.41)$$

La plus petite valeur de réflectivité détectable peut alors être exprimée comme étant la valeur de R_{coh} telle que $\Gamma = B$:

$$R_{min} = \frac{3\pi^2 (R_{inc} + R_{ref})^2}{128 N e_{sat} R_{ref}} \quad (2.42)$$

qu'on retrouve plus souvent sous une forme logarithmique :

$$S = 10 \cdot \log(R_{min}) \quad (2.43)$$

On peut remarquer plusieurs choses de l'expression 2.42. Premièrement, la grandeur R_{min} est inversement proportionnel au nombre de photons détectés par le pixel du capteur. En effet, bien que le bruit détecté soit proportionnel à la capacité de charge du capteur, le signal évolue quadratiquement avec cette grandeur. On retrouve là une propriété classique des systèmes optiques limités par le bruit de photons. On remarque également la présence du terme d'accumulation N en face de la capacité de charge. Ce dernier agit en effet comme une multiplication virtuelle de la dynamique du capteur. La majorité du signal étant incohérent et le signal réellement utile, provenant du plan de cohérence, ne constituant qu'une petite partie de la lumière détectée, il est parfois indispensable d'accumuler beaucoup de photons cohérents afin d'extraire le meilleur signal possible.

La seconde remarque porte sur la présence des coefficients de réflexion de la surface de référence et de la réflexion incohérente dans l'expression. La sensibilité évoluant de manière quadratique avec le coefficient de réflexion incohérente, il convient toujours de limiter la quantité de lumière incohérente détectée. Ce résultat intuitif rappelle le compromis entre résolution axiale

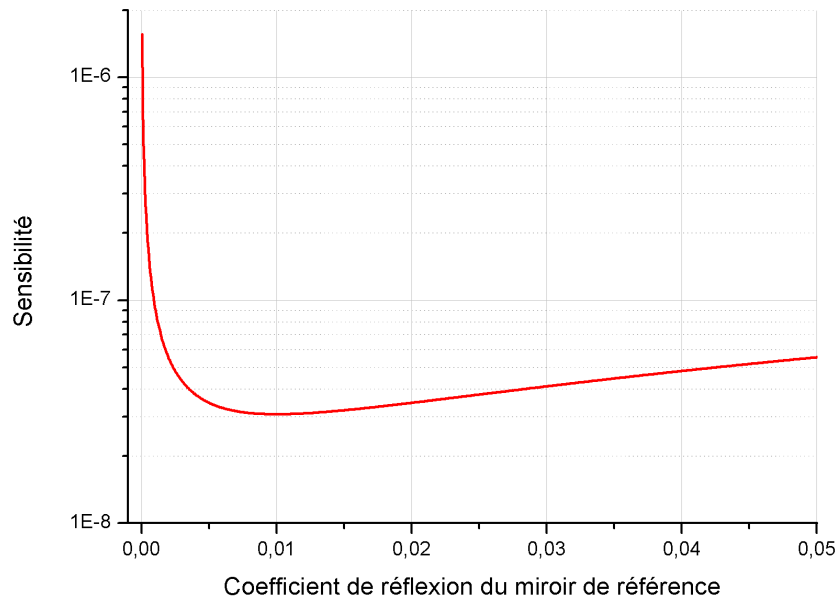


FIGURE 2.16 – Sensibilité de détection en fonction du coefficient de réflexion de la surface de référence. La sensibilité est représentée sur une échelle logarithmique et le coefficient de réflexion sur une échelle linéaire. La valeur de R_{inc} est de 1 % et correspond à l’optimum pour R_{ref} .

et sensibilité en OCT temporelle vu au début de cette sous-section. La dépendance avec R_{ref} est plus complexe. En dérivant l’équation 2.42 en fonction de R_{ref} on trouve un minimum pour

$$R_{ref} = R_{inc}. \quad (2.44)$$

Cela signifie qu’il est possible de choisir judicieusement le matériau pour la surface de référence afin d’adapter le coefficient de réflexion et ainsi optimiser la sensibilité de détection. La figure 2.16 présente l’évolution de la sensibilité en fonction de R_{ref} pour $R_{inc} = 1\%$. On remarque immédiatement que l’on a bien un optimum pour $R_{ref} = R_{inc}$. On constate toute de même que si on se déplace vers les valeurs supérieures à R_{inc} l’évolution est faible et lente. En revanche dans la direction des plus faibles valeurs, les dommages peuvent être bien plus substantiels.

En OCT conventionnelle la sensibilité peut atteindre -100 dB et même de -120 dB à -130 dB en OCT fréquentielle. En FF-OCM, ces valeurs sont en général moins élevées à cause de l’éclairage non confocal, ainsi qu’une capacité de charge des capteurs matriciels moins grande que les monodétecteurs. Avec plusieurs accumulations, il est toutefois possible d’atteindre entre -80 dB à -90 dB.

2.4.4 Résolution temporelle

Nous avons vu jusqu’alors les caractéristiques des systèmes d’OCT liées à la qualité d’imagerie. Étant donné que l’on s’intéresse à l’imagerie *in vivo*, il est souvent nécessaire de faire des compromis sur la qualité d’imagerie pour privilégier la vitesse d’acquisition. Si la rapidité d’imagerie peut être un critère important pour certaines applications d’imagerie fonctionnelle comme le Doppler, ici l’important est d’acquérir les images suffisamment rapidement pour "figer" l’objet et éviter les artefacts liés aux mouvements.

En interférométrie, des variations dans la longueur du chemin optique, même aussi faible qu’une fraction de la longueur d’onde, peuvent créer des changements significatifs de la phase et ainsi dégrader la figure d’interférence [53]. Typiquement, le mouvement dans l’axe longitudinal

ne doit pas dépasser un quart de longueur d'onde sur le temps d'intégration d'une image. Il existe donc une limite de vitesse, au-delà de laquelle il n'est théoriquement plus possible d'imager un objet, égale à $v_{max} = \lambda_0/4\Delta t$. À titre d'exemple, le flux sanguin a une vitesse de quelques centaines de $\mu\text{m s}^{-1}$, ce qui impose un temps d'intégration inférieur à 2 ms si la longueur d'onde centrale est de 800 nm. En OCT conventionnelle, l'image étant balayée point par point, le temps passé sur une structure particulière de l'objet est en général suffisamment faible pour éviter les artefacts liés aux mouvements. Des systèmes d'OCT sont d'ailleurs utilisés en cardiologie où les mouvements peuvent atteindre 100 mm s^{-1} . En FF-OCM, le temps d'intégration est en général plus élevé à cause du manque de sensibilité causé par l'absence de filtrage confocal. Elle est donc particulièrement touchée par ce phénomène.

La durée d'acquisition dépend également du champ de vue et de la profondeur maximale d'imagerie. Les images en OCT sont reconstruites grâce à un balayage latéral (et axial en OCT temporelle) : plus le champ souhaité est grand plus le temps d'acquisition sera long. La période avec laquelle un objet doit être échantillonné dépend, quant à elle, de la résolution latérale (ou axiale) et augmente le nombre de profils (ou le nombre de points dans un profil) pour un champ (ou profondeur) donné. La FF-OCM présente ici un avantage car la totalité du champ est éclairé et détecté d'un seul coup. L'OCT fréquentielle est également avantagée par rapport aux méthodes en domaine temporel car elle ne nécessite pas de balayage axial. Plus prosaïquement, la vitesse d'acquisition peut également être limitée par la fréquence maximale de la caméra. On privilégiera donc des capteurs ayant un taux de rafraîchissement court. À titre d'information, la fréquence d'acquisition d'une caméra dépend généralement du nombre de pixels qu'elle contient. Les monodétecteurs sont donc plus rapides que les capteurs linéaires qui sont eux-mêmes plus rapides que les capteurs matriciels.

Si chaque modalité est techniquement capable d'acquérir des images rapidement, il faut tout de même que le contraste soit suffisamment bon. Comme cela est expliqué dans la sous-section 2.4.3, le contraste des images, lié à la sensibilité de détection, dépend souvent du temps d'intégration. En FF-OCM par exemple, il est en général nécessaire d'accumuler plusieurs fois le signal interférométrique, multipliant ainsi par un facteur N le temps nécessaire à l'acquisition d'une image. Pour cette raison, la parallélisation de l'OCM plein champ ne s'accompagne par nécessairement d'une augmentation de la vitesse d'acquisition comparée à l'OCT conventionnelle, bien au contraire. Plus généralement, comme cela est exprimé dans les équations 2.28 et 2.31, la sensibilité augmente linéairement avec le temps passé à acquérir une image. On a donc toujours un compromis entre rapidité d'acquisition et RSB.

Finalement, un élément pouvant réduire la vitesse d'imagerie, notamment pour l'imagerie en coupe verticale à haute résolution, est le déplacement des optiques de focalisation. En effet, les objectifs à haute ouverture numérique ont une faible profondeur de champ et impose donc une refocalisation dynamique si l'on souhaite sonder un objet en profondeur. En général, l'augmentation de l'ouverture numérique s'accompagne d'un poids et d'un encombrement supérieurs, ce qui rend plus difficile leur mise en mouvement. En OCM temporelle, l'augmentation de l'ouverture numérique des objectifs améliore la résolution latérale mais également la sensibilité en rejetant la lumière incohérente. Pourtant il n'existe pas de dispositifs d'OCM temporelle à balayage commerciaux utilisant des objectifs très ouverts en raison du double balayage (voire triple pour l'imagerie 3D) qui imposerait une vitesse de déplacement des objectifs de l'ordre de plusieurs mètres par seconde.

2.4.5 Récapitulatif

Les différents systèmes basés sur l'OCT ont tous en commun l'utilisation de l'interférométrie en lumière faiblement cohérente comme méthode de sectionnement optique. La résolution axiale, qui ne dépend que de la cohérence temporelle de la source choisie, est donc le point commun à tous les systèmes que nous venons de présenter. En revanche, la sensibilité à la dispersion peut être plus ou moins grande selon la largeur du spectre. Pour les systèmes d'OCT à balayage

conventionnels fonctionnant en général sans contact, c'est-à-dire sans immersion, la résolution axiale doit être limitée afin de restreindre la détérioration de la résolution axiale en profondeur due à la dispersion. Ces systèmes-là sont donc des dispositifs dont la résolution (axiale et latérale) reste limitée. Les systèmes d'OCM, étant quant à eux des dispositifs conçus pour acquérir des images à haute résolution, doivent nécessairement être utilisés avec une immersion adaptée à l'objet imagé.

L'OCT à balayage présente en pratique des limites en termes de résolution latérale, que ce soit en domaine temporel ou fréquentiel, en raison du fait que la focalisation des objectifs n'est pas ajustée dynamiquement pendant l'acquisition d'un profil. Bien qu'en OCT temporelle l'utilisation d'objectifs très ouverts soit possible, cela n'est pas fait pour des raisons pratiques. L'OCT temporelle et l'OCT fréquentielle se démarquent par une sensibilité de détection importante (typiquement supérieure à 100 dB). L'OCT fréquentielle est toutefois meilleure en termes de RSB car la totalité du signal détecté provenant d'un profil de l'objet est utile. La supériorité de la FD-OCT en termes de sensibilité n'est pas contrebalancée par l'avantage de la TD-OCT en termes de résolution car celui-ci n'est pas utilisé en pratique. Pour ces raisons, la quasi-totalité des dispositifs commerciaux d'OCT fonctionnent dans le domaine spectral.

En FF-OCM, la parallélisation de l'acquisition permet de s'affranchir du balayage latéral. Comparée aux systèmes d'OCT conventionnels, elle permet d'acquérir des images *en face* (ou 3D par concaténation d'images *en face*) avec une résolution latérale supérieure. En revanche, l'éclairage plein champ augmente la proportion de lumière incohérente détectée et réduit la sensibilité de détection. Cette sensibilité peut être améliorée mais au prix d'une réduction significative de la vitesse d'acquisition, ce qui ne la rend pas adapté à l'imagerie *in vivo*.

En conclusion, on constate que chaque modalité proposée présente un défaut, que ce soit de résolution, de sensibilité ou de vitesse d'acquisition. Dans la suite de ce chapitre nous présenterons une nouvelle technique d'imagerie cherchant à combler ces manques et qui serait donc adapté à l'imagerie dermatologique *in vivo* pour le diagnostic de tous les types de cancer de la peau.

2.5 Tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT)

Dans cette section, nous décrirons une nouvelle technique, basée sur l'OCT temporelle, pour l'imagerie en coupe verticale à haute résolution spatiale en temps réel et *in vivo*. La figure 2.17 montre une image *in vivo* de peau acquise par LC-OCT. Le champ est de 1 mm et la profondeur de 400 μm , permettant ainsi de voir confortablement l'épiderme, la jonction dermo-épidermique (JDE) et le haut du derme. La résolution spatiale d'environ 1 μm permet de révéler des détails à l'échelle des cellules.

Grâce à un éclairage et une détection en ligne, l'acquisition des profils (A-scans) se fait en parallèle le long d'une ligne horizontale. Ainsi, avec un seul balayage axial, il est possible de reconstituer une image en coupe verticale (B-scan) entière. Par conséquent, la contrainte de vitesse de balayage pour l'imagerie *in vivo* passe de quelques m s^{-1} à quelques mm s^{-1} . Il est alors tout à fait possible de trouver des moteurs capables de faire osciller des objectifs de microscope classiques à ces vitesses-là, et ainsi d'ajuster dynamiquement la focalisation des objectifs.

2.5.1 Montage expérimental

Le montage d'un système de LC-OCT, schématisé sur la figure 2.18, se rapproche de celui de la FF-OCM, car il est également constitué d'un interféromètre de Michelson en espace libre dans une configuration Linnik, c'est-à-dire dans lequel on a placé un objectif de microscope dans chacun des deux bras. La différence se situe dans les blocs d'éclairage et de détection. En effet, comme son nom l'indique, l'échantillon est, en LC-OCT, éclairé selon une ligne et non sur la

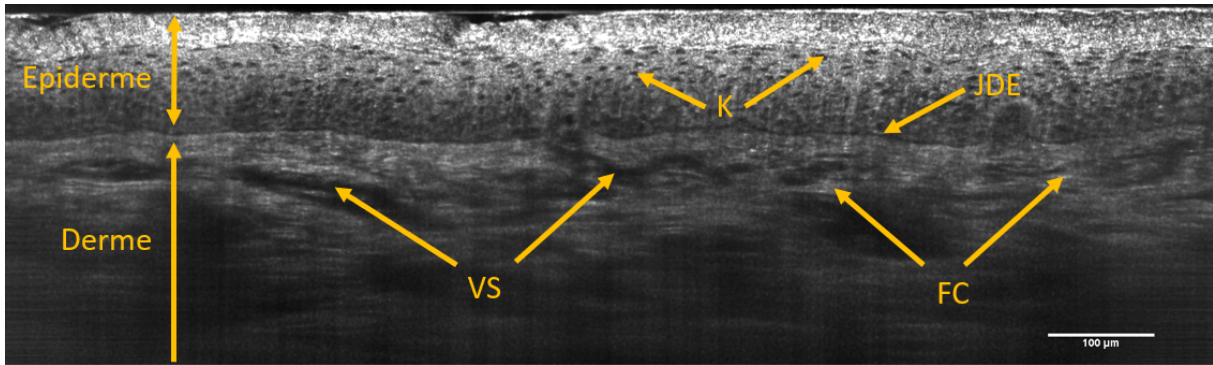


FIGURE 2.17 – Image de LC-OCT *in vivo* du dos de la main acquise avec un dispositif de laboratoire à une longueur d’onde centrale de ~ 800 nm. On peut distinguer les deux couches les plus superficielles de la peau : l’épiderme et le derme. L’épiderme est densément constitué de cellules appelées kératinocytes (K) dont on peut distinguer les noyaux sous forme de points sombres. Dans le derme, on trouve des vaisseaux sanguins (VS) et des fibres de collagène (FC). Ces deux couches sont séparées par la jonction dermo-épidermique (JDE). Échelle : 100 μm .

totalité du champ des objectifs. Pour cela, une lentille cylindrique est placée dans le faisceau d’éclairage collimaté en amont de l’objectif de microscope. Le signal émis par l’échantillon sur cette ligne est ensuite collecté par ce même objectif de microscope et finalement focalisé par une lentille de tube sur un capteur linéaire. Pour reconstituer une coupe verticale complète, la longueur du bras de référence est modifiée afin de balayer le plan de cohérence au sein de l’échantillon. La focalisation de l’objectif dans le bras objet est également adaptée afin de superposer le plan de mise au point au plan de cohérence. Pour cela, plusieurs configurations sont possibles : soit chaque objectif est placé sur un moteur piézoélectrique leur permettant de se déplacer indépendamment l’un de l’autre, soit un moteur piézoélectrique déplace l’ensemble de l’interféromètre. Nous spécifierons les avantages et inconvénients de chacune de ces deux configurations.

Choix de la source

Comme pour tout système utilisant la cohérence temporelle comme méthode de sectionnement, la source doit être spectralement large. La LC-OCT étant une méthode d’imagerie *in vivo*, la source doit également être suffisamment puissante pour que le signal puisse être détecté suffisamment rapidement avec un bon rapport signal sur bruit. Dans [21], la source utilisée est un laser supercontinuum permettant d’illuminer l’échantillon avec une puissance de ~ 10 mW.

Les lasers supercontinuum (SC) sont des sources laser tirant bénéfice de l’effet supercontinuum qui est un phénomène optique non linéaire correspondant à un élargissement du spectre à partir d’une onde quasi-monochromatique. La plupart des lasers SC utilisent un laser à 1064 nm passant à travers une fibre à cristal photonique (PCF pour *Photonic-Crystal Fiber* en anglais) où l’effet supercontinuum se produit. Ces sources sont particulièrement intéressantes en LC-OCT car elles présentent des spectres extrêmement larges (typiquement de 400 nm à 2400 nm) et des puissances optiques pouvant aller jusqu’à plusieurs watts. Il est également possible d’utiliser des diodes super luminescentes (SLD) mais leurs spectres ne sont en général pas suffisamment larges pour l’imagerie à très haute résolution.

Un autre propriété fondamentale est la cohérence spatiale. La cohérence spatiale, de manière analogue à la cohérence temporelle, représente le degré de corrélation spatiale des ondes émises par la source. Ainsi, une source ponctuelle est spatialement cohérente car tous les photons

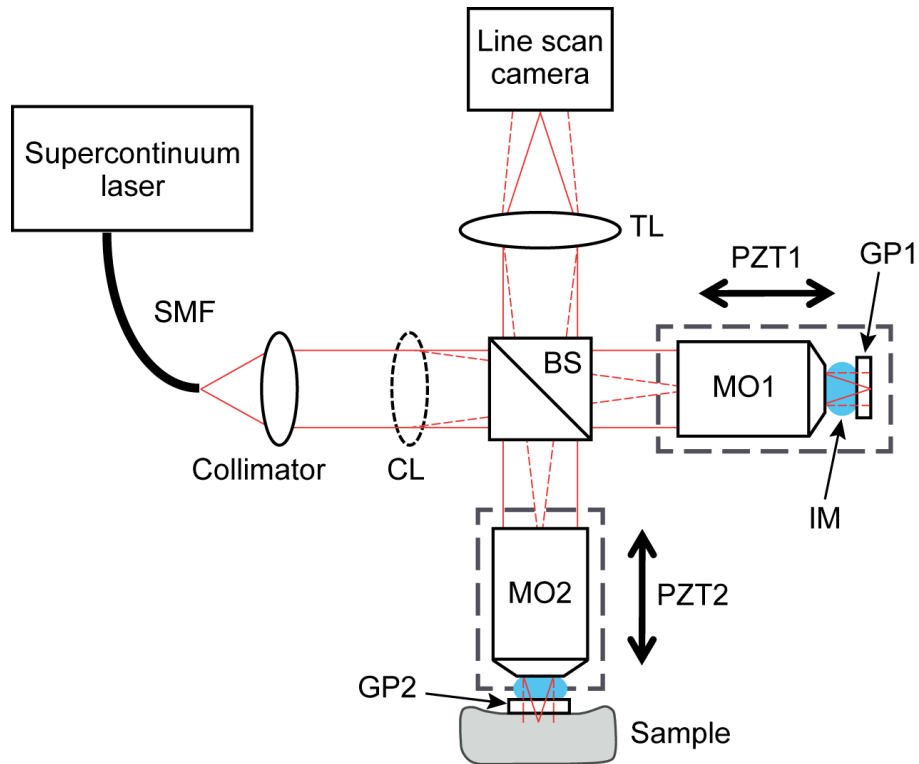


FIGURE 2.18 – Schéma typique d’un montage de LC-OCT présenté dans [21]. Un laser supercontinuum est utilisé comme source de lumière de faible cohérence temporelle. La lumière du laser est acheminée par une fibre monomode (SMF) puis collimatée par un miroir parabolique hors d’axe (Collimator). Une lentille cylindrique (CL) de 50 mm permet d’illuminer l’échantillon selon une ligne. Le faisceau est divisé en deux par un cube séparateur 50/50 (BS) et envoie le faisceau d’éclairage dans le bras objet et le bras de référence de l’interféromètre. Deux objectifs identiques (MO1 et MO2) à immersion (IM) sont placés dans chaque bras sur deux moteurs piézoélectriques indépendants (PZT1 et PZT2) permettant d’ajuster la focalisation dans l’échantillon et la longueur du bras de référence. L’immersion est maintenue par des lames en verre (GP1 et GP2) La lame GP1 est également utilisée comme surface de référence permettant de réfléchir $\sim 4\%$ de la lumière. La lame GP2 permet d’égaliser la dispersion dans les deux bras et offre une surface de contact plane à l’échantillon. Les faisceaux sont ensuite recombinés par le cube séparateur pour être enfin focalisés par une lentille de tube (TL) sur une caméra linéaire (Line scan camera).

proviennent du même point de l'espace. En pratique, la lumière provenant d'une fibre monomode peut être considérée comme spatialement cohérente. Cette propriété est importante pour la focalisation de l'éclairage dans l'objet et donc pour le filtrage confocal. En effet, plus la source est étendue spatialement, plus son image dans l'échantillon à travers l'objectif de microscope sera large. La zone éclairée sera donc plus grande, diminuant ainsi l'efficacité du filtrage confocal.

Commentaire sur la cohérence spatiale de la source

La cohérence spatiale diminue les contraintes instrumentales sur la symétrie des bras de l'interféromètre. Avec une source spatialement cohérente, tous les photons sont susceptibles d'interférer entre eux, contrairement à l'OCM plein champ utilisant une source thermique. Théoriquement, il n'est donc pas indispensable que ces photons suivent exactement le même parcours dans les deux bras de l'interféromètre pour interférer. Il suffirait donc en théorie d'adapter le chemin optique du bras de référence, et de compenser la dispersion de l'objectif de microscope du bras objet pour obtenir des interférences. Il serait alors possible de s'affranchir de l'objectif de microscope dans le bras de référence et ainsi de gagner en légèreté et en compacité.

Il est donc possible de faire interférer le signal alors que les images dans les deux bras sont légèrement différentes. Ainsi, si la focalisation sur la surface de référence n'est pas parfaite, le système sera quand même capable de produire des figures d'interférence. Grâce à cela, on peut concevoir de défocaliser légèrement l'image sur la surface de référence pour réduire la quantité de lumière détectée, et ainsi réduire la valeur de R_{ref} . Comme cela est présenté dans la sous-section 2.4.3, il est optimal de choisir une surface de référence réfléchissant une quantité de lumière égale à la quantité de lumière incohérente, ce qui a été évalué à 0.1 % en LC-OCT. Cette valeur est évaluée en mesurant l'intensité réfléchie par un échantillon de peau et en la comparant à un objet de réflectivité connu. On assimile alors le résultat au coefficient de réflexion incohérente en estimant que la réflexion cohérente est négligeable.

Avec une source spatialement cohérente, il est donc possible d'affiner la valeur de R_{ref} afin d'optimiser la sensibilité du système. Grâce à cela, nous avons pu retrouver expérimentalement les résultats théoriques présentés dans la sous-section 2.4.3. Le graphe en figure 2.19 représente l'évolution du rapport signal sur bruit spatial en fonction de R_{ref} . On retrouve la forme du graphe théorique avec une évolution lente pour les valeurs de R_{ref} supérieures à l'optimum et une évolution très rapide pour les valeurs inférieures. On retrouve également un optimum autour de 0.1 % confirmant la valeur estimée plus haut. On constate tout de même qu'en pratique, la plage de valeurs proches de l'optimum est relativement large.

Choix des composants optiques

Dans un montage de LC-OCT, trois types de composants optiques sont utilisés. Le plus important est l'objectif, formant un microscope lorsqu'il est couplé à une lentille de tube. Une lentille cylindrique convergente est utilisée pour éclairer l'échantillon sur une ligne.

La caractéristique fondamentale de l'objectif est son pouvoir de résolution, lié à son ouverture numérique. Dans notre cas, la résolution doit être suffisamment bonne pour révéler des détails à l'échelle de la cellule. À titre d'exemple, les noyaux des cellules de la peau ont des dimensions de l'ordre de 5 μm . Pour imager à une résolution cellulaire, nous avons trouvé expérimentalement qu'une résolution de 1 μm à 2 μm était nécessaire. Au-delà, l'image se brouille et les détails cellulaires sont perdus. À 800 nm, une ouverture numérique de 0.3 ou 0.5 est satisfaisante.

Comme il est expliqué dans la sous-section 2.4.1, l'imagerie à haute résolution nécessite de travailler avec des objectifs à immersion. Les objectifs utilisés dans [21] et dans la suite

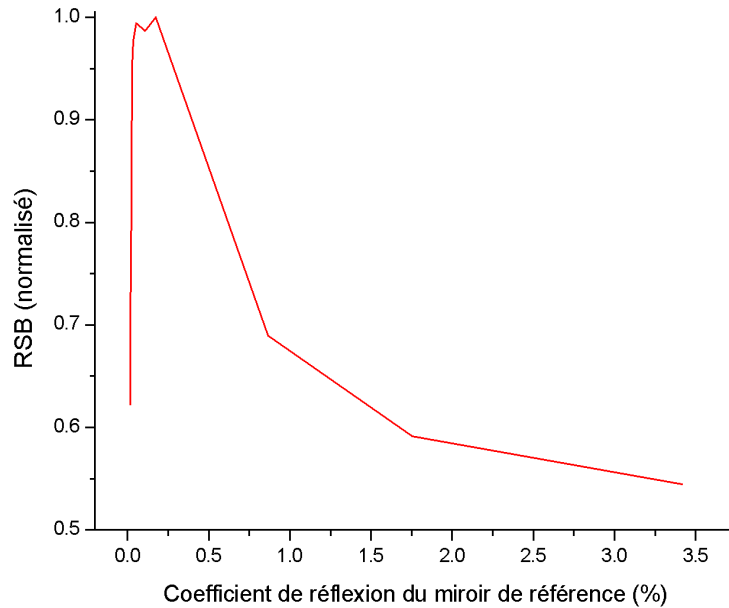


FIGURE 2.19 – Représentation graphique de l'évolution du RSB spatial en fonction de R_{ref} . Le signal est évalué en mesurant l'intensité d'une interface verre/huile dans une image dans laquelle on a pris soin d'intégrer un signal incohérent. Le bruit est évalué en mesurant la variance des pixels d'une zone sans signal.

Objectif	Eau	Huile + verre	Dégradation
10x/0.3	2.45 μm	2.52 μm	3 %
20x/0.5	1.44 μm	1.66 μm	13 %
40x/0.8	0.81 μm	1.40 μm	42 %

TABLEAU 2.1 – Mesures de la PSF transverse pour différents objectifs dans le cas idéal (immersion à eau) et dans le cas réel (huile et lame de verre d'épaisseur 500 μm).

de ce manuscrit ont été conçus pour être immergés dans l'eau. Toutefois, la peau possède un indice plus élevé que celui de l'eau [49]. On utilisera alors plutôt des huiles dont l'indice est de 1.38 ou 1.40, les deux produisant des résultats satisfaisants et similaires. L'utilisation d'une immersion différente de l'eau n'est évidemment pas optimale, mais la résolution latérale reste tout de même satisfaisante. Notons également que l'on utilise des lames de verre qui peuvent également détériorer la PSF transverse. Le tableau 2.1 récapitule l'évolution de la largeur de la PSF en fonction de l'ouverture numérique et de l'immersion. Dans le cas idéal où l'eau est utilisée comme milieu d'immersion, on constate que la largeur de la PSF évolue de manière inversement proportionnelle avec l'ouverture numérique, comme on peut s'y attendre selon la théorie. Cela n'est plus le cas lorsque l'on utilise une huile d'indice différent de celui de l'eau et qu'on intègre une lame de verre d'épaisseur 500 μm . On note effectivement que plus l'ouverture numérique est élevée, plus l'objectif est sensible aux aberrations.

La lentille de tube est associée à l'objectif pour produire une image sur le capteur. Sa focale détermine le grandissement du système global. Celui-ci doit être adapté à la taille du capteur mais également à la taille des pixels afin d'assurer un échantillonnage correct. La valeur de grandissement affichée sur les objectifs se base sur une certaine focale de lentille de tube qui varie en fonction du fabricant. Les focales des lentilles de tube vont en général de 160 mm à 200 mm. Dans ce manuscrit on utilisera une lentille de tube de 200 mm de focale. Notons également que la focale impose un certain encombrement qu'il convient parfois de limiter selon

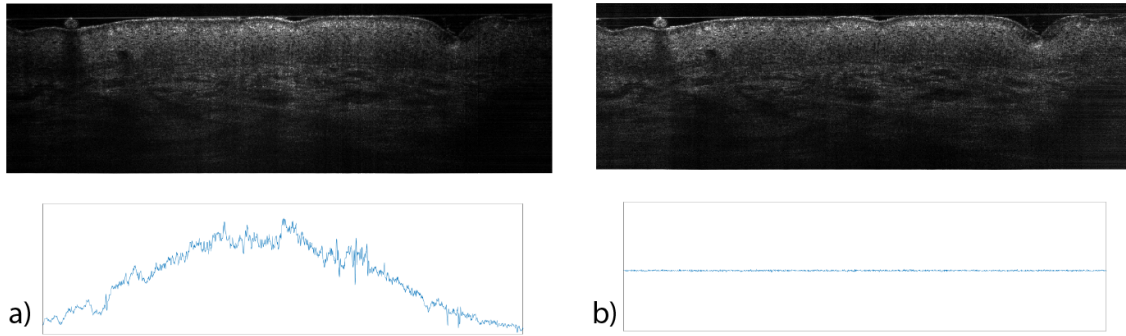


FIGURE 2.20 – Correction numérique de la non-uniformité de l'éclairage. (a) Image sans traitement et son profil moyen. (b) Image après traitement et son profil moyen. La correction permet de révéler des détails presque imperceptibles sur les côtés de l'image.

l'application désirée.

La lentille cylindrique est utilisée pour élargir le faisceau et le façonner selon une ligne. Dans une direction, la lentille cylindrique agit comme une lentille sphérique, dans l'autre elle n'a aucun effet sur le faisceau. Idéalement, la lentille est placée de façon à ce que son foyer image soit confondu avec le plan focal arrière de l'objectif, où se trouve en général la pupille, afin d'éclairer l'échantillon de manière uniforme. La focale doit également être choisie pour éclairer l'échantillon sur une ligne suffisamment large en prenant en compte le profil gaussien de l'éclairage. En effet, la source provenant d'une fibre monomode, son profil d'illumination est gaussien. Il convient alors de légèrement surestimer le grandissement voulu afin de bien éclairer les bords. Toutefois, étant donné qu'il restera toujours impossible d'obtenir un éclairage uniforme, on corrige numériquement cette non-uniformité après acquisition du signal. Pour cela, chaque colonne est divisée par sa moyenne afin de normaliser l'intensité. La figure 2.20 illustre l'effet de l'éclairage à profil gaussien sur une image de peau et sur son profil moyen, ainsi que le résultat obtenu après la correction.

Choix de la caméra

Le caméra est un composant primordial dans un système de LC-OCT. C'est avec la source laser le composant du système qui influence le plus le spectre détecté. Sa réponse spectrale doit en effet être large tout en étant la plus lisse possible pour favoriser la résolution axiale. Évidemment, celle-ci doit également être adaptée au spectre d'émission de la source.

La caméra influence également les caractéristiques du système par les dimensions de son capteur. Cela concerne le champ de vue maximal, l'échantillonnage de la PSF transverse, et le filtrage confocal. En premier lieu, la largeur de la barrette doit être adaptée au champ de vue des objectifs de microscope. Ensuite, la largeur des pixels doit être suffisamment petite pour que la PSF soit bien échantillonnée. Au-delà de deux pixels par PSF, on considère que l'échantillonnage est optimal selon le critère de Shannon. Finalement, la barrette de pixels joue le rôle de fente et assure le filtrage confocal, plus ou moins efficacement selon sa hauteur. Celle-ci doit être suffisamment fine afin de restreindre le volume confocal en rejetant la lumière hors focus, tout en maximisant le flux collecté. Typiquement, on choisit une fente dont la hauteur est approximativement égale à la dimension d'une tache d'Airy [10].

La caméra doit également être relativement rapide. En LC-OCT, un B-scan est le résultat de la concaténation de lignes horizontales espacées, dans l'objet, d'une distance telle que deux images lignes successives sont déphasées de $\pi/2$. En général, cette distance est de l'ordre de la centaine de micromètres. Si l'on veut imager un objet jusqu'à une profondeur de plusieurs centaines de micromètres, il est nécessaire d'acquérir plusieurs milliers d'images lignes par B-

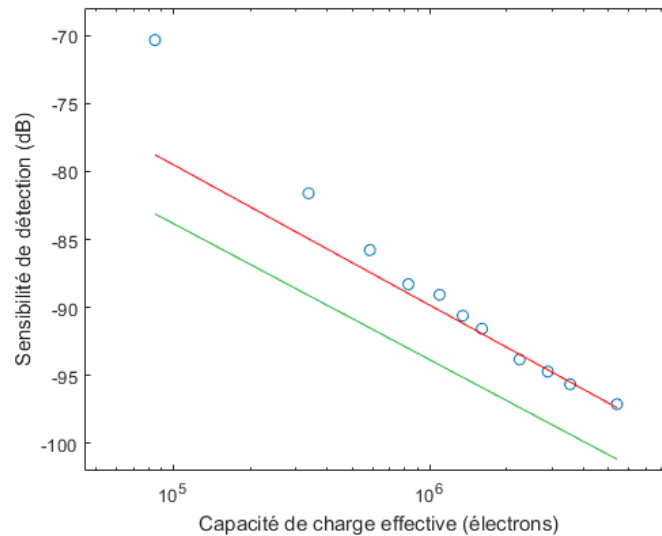


FIGURE 2.21 – Sensibilité de détection en fonction de la capacité de charge effective du capteur. Les points représentent les données expérimentales. La courbe rouge représente la régression linéaire utilisant les cinq derniers points pour lesquels le taux de remplissage des puits électroniques des pixels des capteurs est au moins de 20 %. La pente de la courbe est de -1.031 avec un coefficient de détermination $R^2 = 98\%$. La courbe verte représente les valeurs théoriques calculées à partir de l'équation 2.42 pour des capacités de charge équivalents et en supposant $R_{inc} = 0$. Ces courbes sont espacées de 3.8 dB à cause du fort bruit électronique de la caméra InGaAs utilisée.

scan. Cette valeur doit être multipliée par la fréquence d'affichage souhaitée pour les B-scans pour finalement obtenir le taux de répétition nécessaire pour la caméra. Celui-ci se situe en général autour de 100000 lignes par seconde.

La sensibilité de détection du système étant inversement proportionnelle à la capacité de charge du capteur (voir équation 2.42), la caméra est un composant jouant un rôle essentiel dans la qualité d'un système de LC-OCT. En LC-OCT, le signal détecté résulte de la contribution des bras objet et référence. Quand bien même aucun signal ne serait rétrodiffusé par l'objet, la caméra détecte en permanence beaucoup de photons provenant du bras de référence. La figure 2.21 représente la valeur de la sensibilité de détection, mesurée à partir d'une interface verre/huile, pour différents taux de remplissage des puits électroniques des pixels dans les zones de bruit. En faisant cela, on simule différentes valeurs effectives de capacités de charge. On trouve bien une dépendance quasi-linéaire en échelle logarithmique entre la sensibilité et la nombre moyen de photons détectés. Cela dit, on constate tout de même un écartement de la droite pour les taux de remplissage plus faibles, signifiant probablement que les bruits autres que le bruit photonique ne sont plus négligeables. Lorsque l'on se trouve proche de la saturation du capteur, la sensibilité mesurée expérimentalement reste toutefois inférieure à la courbe théorique, d'environ 3.8 dB dans ce cas particulier. Ces mesures ont été effectuées avec une caméra utilisant une technologie InGaAs qui présente généralement un fort bruit électronique pouvant expliquer en grande partie cet écart. Une autre source de biais dans la mesure vient du fait que l'on considère pour la simulation numérique de la sensibilité que la réflexion incohérente est nulle. Or, bien que l'objet soit ici une simple interface entre deux milieux, il existe toujours une certaine quantité de lumière parasite détectée. Toutefois, celle-ci reste négligeable et contribue, dans ce cas précis, à hauteur de seulement 0.4 dB selon nos estimations.

Bien que la sensibilité de détection ne soit qu'un indicateur du niveau de bruit, celui-ci se révèle assez efficace pour donner des indications sur la qualité d'imagerie. Ainsi, un système ayant une grande sensibilité de détection offrira une plus grande profondeur d'imagerie et des

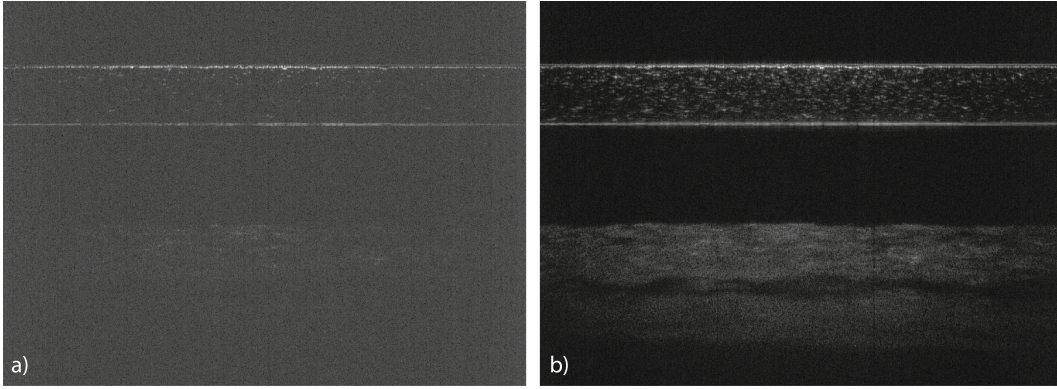


FIGURE 2.22 – Images d’une carte de détection d’infrarouge acquises avec une capacité de charge effective très faible (a) et une capacité de charge effective quasi-maximale (b).

images apparaissant plus contrastées. En figure 2.22 sont représentées deux images d’un objet fixe avec une faible (a) et une forte (b) capacité de charge effective. On distingue sur ces images trois choses. La première est que le fond de l’image (b) est d’un noir plus profond, signifiant que le niveau de bruit a été réduit. Deuxièmement, certaines structures invisibles dans l’image (a) sont révélées dans l’image (b), ce qui est permis par l’augmentation de la sensibilité. En effet, ces structures émettent un signal en-deçà du niveau de bruit en (a) mais supérieur à ce dernier en (b). Enfin, concernant les structures déjà visibles dans l’image (a), il est difficile de percevoir un effet lié à l’augmentation de la capacité de charge. Pour évaluer cela, on mesure le rapport signal sur bruit temporel de chaque pixel d’une image fixe et on le compare à son intensité moyenne pour différentes capacités de charge effectives (voir figure 2.23). Dans un premier temps, on y remarque un régime où le RSB semble stagner et duquel on sort plus rapidement quand la capacité de charge augmente. Cela correspond au niveau au-delà duquel on sort du bruit, ce qui donne une information équivalente à la sensibilité. Pour des valeurs d’intensité plus élevées, le RSB croît de manière linéaire (en échelle logarithmique), mais l’écart de RSB entre les courbes semble se réduire lorsque l’on se dirige vers les pixels les plus intenses. En effet, les pentes des parties linéaires des courbes ne sont pas les mêmes (jaune : 0.31 ; rouge : 0.35 ; bleu : 0.43). Le RSB ne semble donc pas suivre une loi en racine carrée de la moyenne du nombre de photons détectés comme pour les systèmes purement limités par le bruit de photons. Pour autant, le RSB reste supérieur, quel que soit l’intensité du pixel, pour une capacité de charge supérieure. Nous aurions en effet pu trouver une asymptote, limitant le RSB maximal, causée par un bruit extérieur à la caméra (laser, mouvements mécaniques, etc.) mais cela n’est pas le cas dans nos régimes d’utilisation.

Dans [21], on utilise un capteur CCD au Silicium. Son spectre d’absorption s’étend d’une longueur d’onde inférieure à 400 nm jusqu’à 1000 nm. Ce capteur contient 2048 pixels de $14\ \mu\text{m} \times 28\ \mu\text{m}$ (largeur \times hauteur). La largeur à mi-hauteur de la PSF transverse étant de $1.3\ \mu\text{m}$ dans l’espace objet et le grandissement du système étant de 22.2, la PSF transverse s’étale théoriquement sur 2.1 pixels au niveau du capteur, ce qui assure un bon échantillonnage de la PSF. La largeur à mi-hauteur de la ligne de lumière à elle été mesurée à $27\ \mu\text{m}$ dans l’espace image, soit à peu près la hauteur des pixels. Ainsi, on capte l’essentiel du flux rétrodiffusé tout en assurant un filtrage confocal relativement efficace. Enfin, sa fréquence d’acquisition est de 70 kHz, soit suffisamment pour acquérir 12.5 images de $400\ \mu\text{m}$ de profondeur par seconde.

Configurations possibles pour le balayage axial

Le schéma en figure 2.18 présente une configuration (1) à deux moteurs piézoélectriques. Cette implémentation présente l’avantage de pouvoir faire varier indépendamment les deux bras

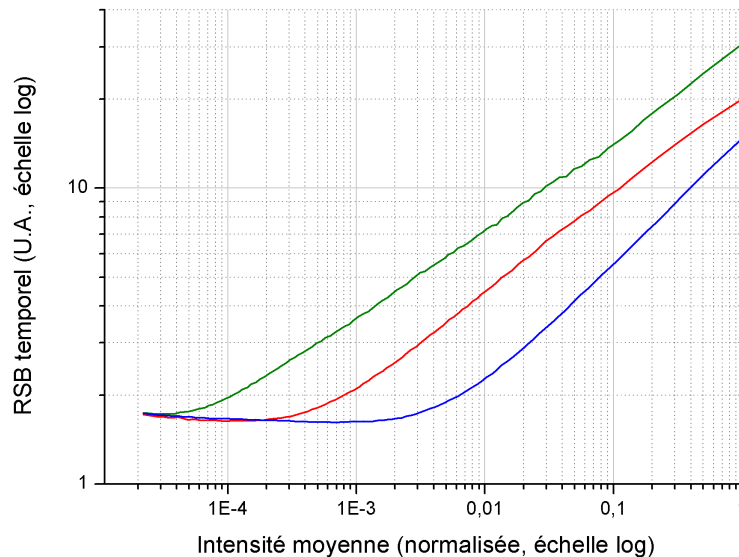


FIGURE 2.23 – Représentation du RSB temporel en fonction de l'intensité moyenne. Les courbes sont obtenues à partir d'images de carte de détection d'infrarouge pour différentes capacités de charge (croissantes du bas vers le haut). Les pixels entre deux centiles d'intensité sont isolés pour calculer leurs valeurs moyennes et leurs variances temporelles moyennes. On calcule le RSB qu'on affiche en fonction de l'intensité moyenne pour chaque part de données divisée par deux centiles successifs. Afin de pouvoir comparer les jeux de données on choisit l'intensité moyenne de la courbe verte comme abscisse commune, en supposant que l'ordre des pixels en intensité ne change pas entre deux images.

de l'interféromètre. En effet, le bras de référence agit classiquement sur la position du plan de cohérence, alors que le bras objet agit sur le plan de mise au point. Dans la sous-section 2.5.2, nous verrons que les plans peuvent se séparer en cas de non égalité entre l'indice du liquide d'immersion et celui de l'objet. Il faut alors déplacer l'objectif de référence différemment de l'objectif échantillon pour compenser ce phénomène.

Cependant, il est dit dans la sous-section 2.4.1 qu'une immersion adaptée à l'indice de la peau devait être utilisée afin de produire des images à très haute résolution en profondeur. On supposera alors en général que les indices sont strictement égaux. Cela implique donc que les déplacements des deux objectifs sont identiques. Dans ce cas, il est possible d'utiliser une seconde configuration (2) n'utilisant qu'un seul moteur piézoélectrique sur lequel est fixé l'ensemble de l'interféromètre. La figure 2.24 représente schématiquement les deux configurations mentionnées.

La configuration (2) offre l'avantage de ne nécessiter qu'un seul moteur piézoélectrique et permet donc de simplifier le montage expérimental, et de réduire le coût du dispositif ainsi que son encombrement. En revanche, les bras objet et référence ne peuvent être modifiés indépendamment alors qu'il faut, pour balayer correctement l'échantillon en profondeur, faire varier le plan de cohérence *et* le plan de focalisation. Il est donc impératif que ces deux plans se déplacent de la même manière lorsque l'on translate l'interféromètre. C'est d'ailleurs effectivement le cas lorsque l'on suppose l'égalité des indices de l'objet et du liquide d'immersion, comme cela est expliqué dans la sous-section 2.5.2. La configuration (2) est donc bien adaptée à l'imagerie à haute résolution.

Configurations possibles pour l'interféromètre de Michelson

Il existe trois différentes configurations pour l'interféromètre d'un système de LC-OCT schématisées en figure 2.25 : Linnik, Michelson et Mirau. La configuration dite de Linnik est utilisée

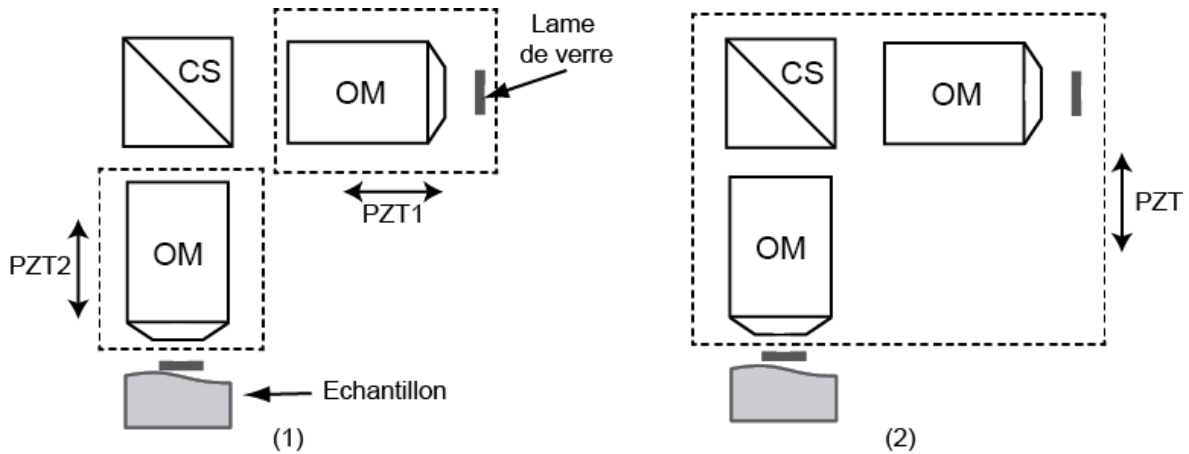


FIGURE 2.24 – Différentes méthodes de balayage axial pour un système de LC-OCT en configuration Linnik. (1) Les objectifs sont chacun placés sur un moteur piézoélectrique pouvant se déplacer indépendamment l'un de l'autre. Le moteur piézoélectrique PZT1 permet de changer la longueur du bras de référence et donc de déplacer le plan de cohérence dans l'échantillon. Le moteur piézoélectrique PZT2 permet d'ajuster la mise au point de l'objectif de façon à la superposer au plan de cohérence. Une éventuelle séparation des plans de mise au point et de cohérence due à un écart d'indice de réfraction entre l'objet et l'immersion peut alors être corrigée. (2) L'ensemble de l'interféromètre est fixé à un unique moteur piézoélectrique (PZT), ce qui impose le même déplacement pour les deux objectifs par rapport à l'échantillon. Cette configuration ne peut être utilisée qu'en cas d'égalité des indices.

dans le montage présentée en figure 2.18. Celle-ci présente l'avantage d'être simple à mettre en œuvre. En revanche, elle utilise deux objectifs de microscope contrairement aux autres configurations n'en utilisant qu'un seul. Elle est donc plus volumineuse et plus onéreuse. À noter que seul l'interféromètre de Linnik permet de déplacer indépendamment le plan de cohérence et le plan de focalisation. Cette capacité lui permet de compenser des écarts d'indice entre l'immersion et l'échantillon.

Configuration de Michelson Dans la configuration dite de Michelson, le cube séparateur se situe en aval d'un unique objectif de microscope. Tout comme dans la configuration de Linnik, le faisceau est séparé entre le bras objet et le bras de référence, puis le signal réfléchi est recombinaé et collecté par ce même objectif de microscope. Historiquement, c'est avec cette configuration que le premier montage d'OCM plein champ a été fabriqué [34].

Une telle configuration n'emploie qu'un seul objectif, ce qui a l'avantage d'optimiser l'espace utilisé et de réduire les instabilités mécaniques. En revanche, la position du cube séparateur exige une grande distance de travail pour l'objectif de microscope, ce qui se fait en général au prix d'une ouverture numérique diminuée et donc d'une résolution latérale plus faible. De plus, la limitation de l'ouverture numérique permet de modérer les éventuelles aberrations géométriques susceptibles d'être causées par la présence d'un cube de verre entre l'objectif et son foyer objet.

Configuration de Mirau À l'instar de la configuration de Michelson, l'interféromètre de Mirau n'emploie qu'un seul objectif de microscope, à la différence que le bras de référence est replié dans l'axe de l'objectif. Une lame séparatrice, orientée orthogonalement à l'axe optique, y remplace le cube séparateur.

Le faisceau du bras de référence subit donc deux réflexions par la lame séparatrice tandis que le faisceau du bras objet subit deux transmissions. On peut donc choisir le rapport de division entre réflexion et transmission à 50/50 pour être équivalent aux deux configurations précédentes.

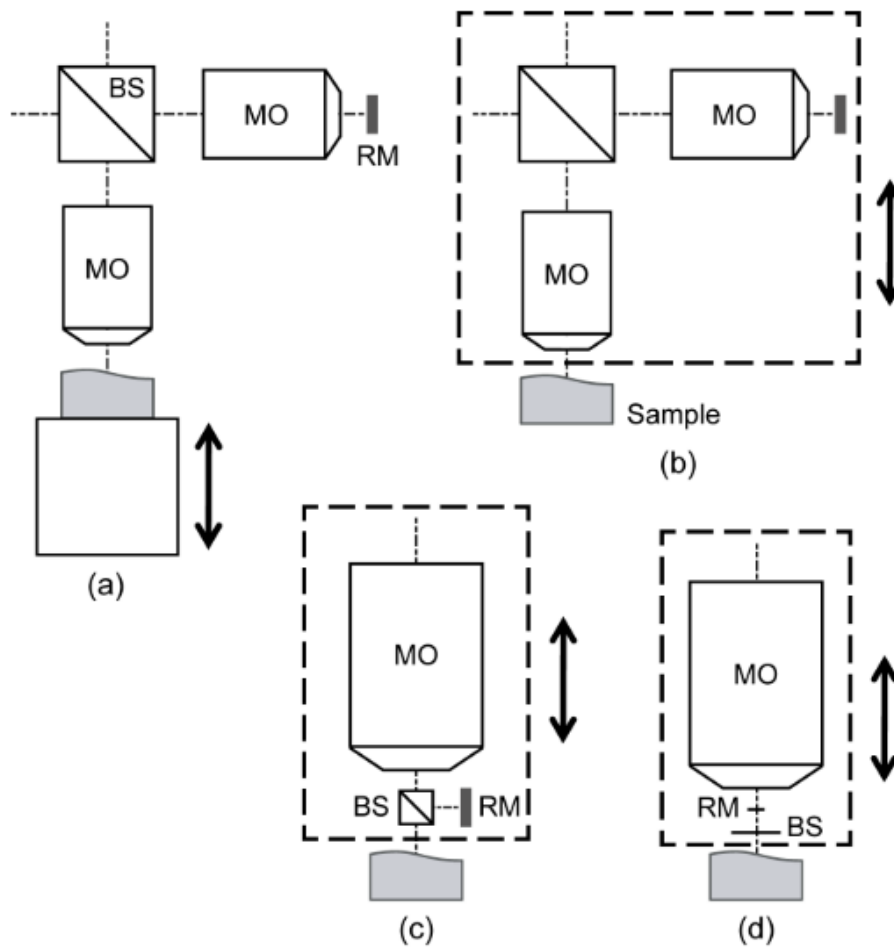


FIGURE 2.25 – Différentes configurations pour l’interféromètre dans un système de LC-OCT utilisant des objectifs de microscope à immersion. Configurations de Linnik (a) et (b), configuration de Michelson (c), configuration de Mirau (d) [46]. BS : cube séparateur de faisceau ; MO : objectif de microscope ; RM : miroir de référence ; Sample : échantillon.

Toutefois, lorsque le rapport de division est de 50/50 il est indispensable de choisir une surface de référence réfléchissant peu de lumière pour s’adapter à la peau qui réfléchit elle-même peu de lumière. En effet, il est optimal en LC-OCT d’utiliser une surface de référence dont le coefficient de réflexion est égal à celui de la réflexion incohérente de la peau, évaluée autour de 0.1% (voir sous-section 2.4.3). Dans le cas de la configuration de Mirau, on pourrait donc utiliser un miroir, réduire le coefficient de réflexion de la lame séparatrice et augmenter son coefficient de transmission. Ainsi, on optimiserait l’éclairage de l’échantillon tout en conservant un bon contraste des franges.

Grâce à la finesse de la lame séparatrice, des objectifs à forte ouverture numérique peuvent être utilisés. Le miroir de référence étant dans le chemin du faisceau lumineux, celui-ci bloque une partie des rayons. Toutefois, ses dimensions peuvent être adaptées à la taille de la ligne. Ainsi, il n’affecte que faiblement le flux transmis. Cette configuration est donc tout à fait adaptée à l’imagerie à très haute résolution. Notons que pour imager un échantillon en profondeur avec un tel système, il est nécessaire d’adapter l’indice de l’immersion à celui de l’échantillon.

2.5.2 Ajustement dynamique de la mise au point

Un des avantages de la LC-OCT réside dans son utilisation d'objectifs offrant une bonne résolution transverse. Dans ce cas, la profondeur de champ est réduite et il faut alors, si l'on souhaite faire varier la profondeur d'imagerie, ajuster le plan de mise au point en plus du plan de cohérence. Quelque soit le système basé sur l'OCT, le plan d'imagerie se situe au niveau du plan de cohérence car c'est le plan duquel les photons réfléchis peuvent créer des interférences. Le plan de mise au point indique quant à lui le plan d'éclairage et de détection maximale. En dehors de cette fenêtre de mise au point, le signal détecté est défocalisé, causant ainsi une réduction du contraste et de la résolution des images tomographiques [42, 54]. Il faut donc s'attacher à ce que ces deux plans restent superposés lors du balayage en profondeur de l'objet.

La figure 2.26 illustre le phénomène de séparation des plans de focalisation et de cohérence lorsque l'on déplace l'échantillon par rapport à l'interféromètre. Selon les règles de l'optique géométrique, on trouve que si l'objet, d'indice optique n , est surélevé d'une distance z , le plan de focalisation se trouve à une distance

$$z_{foc} = \frac{n}{n_{im}} z \quad (2.45)$$

où n_{im} est l'indice d'immersion de l'objectif. Le plan de cohérence se trouve quant à lui à une distance z_{coh} telle que la différence de marche δ est nulle :

$$\delta = 2 [n_{im} (d - z) + n z_{coh} - n_{im} d] \quad (2.46)$$

$$\delta = 2 [n z_{coh} - n_{im} z] \quad (2.47)$$

où d est la distance de travail des objectifs. La position du plan de cohérence est alors :

$$z_{coh} = \frac{n_{im}}{n} z \quad (2.48)$$

Si la position de l'objectif dans le bras objet et la longueur du bras de référence ne sont pas adaptés, alors les plans se séparent inévitablement et les images se dégradent au fur et à mesure que l'on s'enfonce dans l'objet. Dans le cas où les indices ne seraient pas égaux, il faut rétablir dynamiquement la superposition des plans. Il faut par conséquent faire deux ajustements : un pour le plan de mise au point, un pour le plan de cohérence. En configuration de Linnik, cette étape est relativement aisée car les objectifs peuvent être déplacés indépendamment l'un de l'autre, ce qui n'est pas le cas pour les configurations n'utilisant qu'un seul objectif. Premièrement, l'objectif dans le bras objet est déplacé de manière à compenser le décalage du plan de mise au point lors du passage à travers un dioptre. Dans un second temps, il faut faire varier la longueur du bras de référence pour superposer le plan de cohérence au plan de focalisation. La distance entre le miroir de référence et l'objectif étant fixée par la distance de travail de l'objectif il ne reste que l'épaisseur d'air entre l'objectif et le cube séparateur pour faire varier la longueur du bras. Une étude géométrique de la situation permet de rapidement déterminer que, si l'on souhaite imager un objet à une profondeur z , il est nécessaire de déplacer l'objectif du bras objet de :

$$z_{obj} = \frac{n_{im}}{n} z \quad (2.49)$$

et l'objectif du bras de référence de :

$$z_{ref} = \frac{n^2 - n_{im}^2 + n_{im}}{n} z \quad (2.50)$$

On constate tout de même un cas particulier intéressant, lorsque les indices sont égaux, où les plans de cohérence et de focalisation restent superposés. Dans ce cas, les déplacements sont simplifiés car on a $z_{obj} = z_{ref} = z$. Si en pratique il est difficile, voire impossible, d'obtenir cette égalité car l'indice d'un échantillon biologique n'est pas connu et n'est pas uniforme, on peut

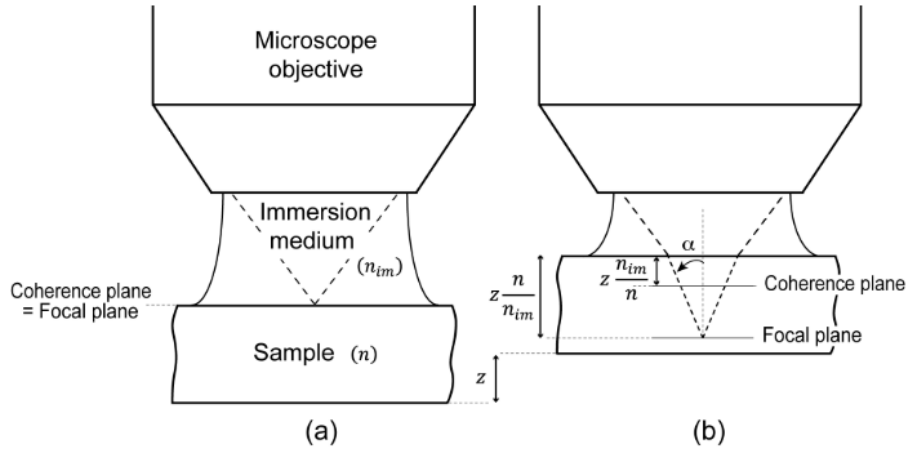


FIGURE 2.26 – Représentation du décalage des plans de focalisation d'un objectif de microscope et de cohérence avec la profondeur d'imagerie. (a) On suppose que le système est réglé tel que les plans sont superposés à la surface de l'échantillon. (b) Si l'indice de l'objet n est différent de l'immersion n_{im} , les plans se séparent lorsque l'on augmente la profondeur d'imagerie z . En revanche, lorsque $n = n_{im}$ les plans restent superposés [55].

s'en approcher en estimant l'indice moyen de l'objet. Si on considère un objet d'indice $n = 1.40$ et un liquide d'immersion d'indice $n_{im} = 1.38$ alors l'écart entre les deux plans $\left| z \left(\frac{n_{im}}{n} - \frac{n}{n_{im}} \right) \right|$ est inférieur à $3 \mu\text{m}$, soit inférieur à la profondeur de champ d'un objectif d'ouverture numérique égale à 0.5, à une profondeur de $100 \mu\text{m}$. Les plans de cohérence et de focalisation n'étant pas infiniment fins, il suffit en effet que le plan de cohérence soit toujours inclus dans le plan de mise au point de l'objectif de microscope, ce qui peut être le cas même si l'égalité des indices n'est pas parfaite.

Ce cas est intéressant car il implique qu'un objet peut être sondé en profondeur en déplaçant l'ensemble de l'interféromètre, soit en un seul mouvement au lieu de deux. Il est donc possible d'utiliser un seul moteur piézoélectrique au lieu de deux, ce qui simplifie le montage. Cette option n'est valable que si les indices optiques sont adaptés. Dans le cas contraire, le décalage des plans aboutira à une forte et rapide dégradation de la qualité d'imagerie en profondeur.

2.5.3 Interférences en LC-OCT

La LC-OCT est basée sur l'OCT en domaine temporel. On retrouve alors, si on néglige l'ouverture numérique des objectifs de microscope, l'équation 2.3 pour l'ensemble des points x du champ de vue des objectifs à une profondeur z :

$$I(x, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{I_0 S(\sigma)}{4} \left[R_{inc}(x, z) + R_{coh}(x, z) + R_{ref}(x) + 2\sqrt{R_{ref}(x)R_{coh}(x, z)} \cos(\Delta\phi(\sigma, z)) \right] d\sigma \quad (2.51)$$

Pour simplifier l'expression, on peut dans un premier temps raisonnablement supposer le coefficient de réflexion de la surface de référence indépendant de la position latérale. Le sectionnement optique par la cohérence temporelle implique qu'une quantité importante de lumière provient de zones en dehors du plan de cohérence et est donc détectée de manière incohérente. Pour cette raison, le terme R_{inc} est en général bien supérieur au terme R_{coh} . On peut donc omettre le terme cohérent dans la somme de l'équation 2.51 et également négliger la dépendance de R_{inc} avec la position. On s'intéresse de toute manière aux valeurs moyennes de R_{inc}

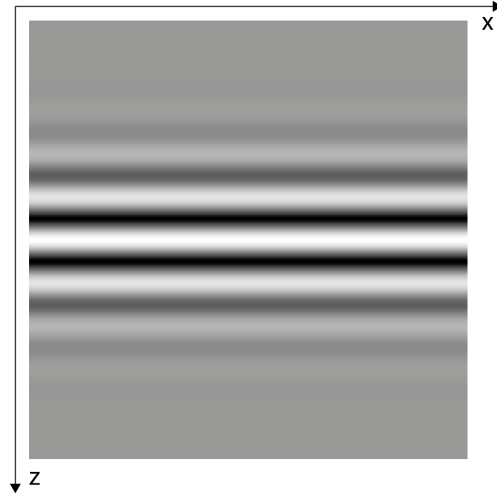


FIGURE 2.27 – Figure d’interférence créée par une surface plane et détectée par le capteur.

en fonction de l’échantillon considéré. L’équation 2.51 devient alors :

$$I(x, z) = \int_{-\infty}^{+\infty} \frac{I_0 S(\sigma)}{4} \left[R_{inc} + R_{ref} + 2\sqrt{R_{ref} R_{coh}(x, z)} \cos(\Delta\phi(\sigma, z)) \right] d\sigma \quad (2.52)$$

Simplifions encore un peu plus l’expression en approximant l’onde détectée par une onde oscillante à une fréquence correspondant à la longueur d’onde centrale du spectre, modulée par une enveloppe $V_{coh}(z)$ dont la forme dépend du spectre, comme nous l’avons dans la sous-section 2.4.1. On utilisera par la suite l’expression simplifiée :

$$I(x, z) = \frac{I_0}{4} \left(R_{inc} + R_{ref} + 2\sqrt{R_{coh}(x, z) R_{ref}} V_{coh}(z) \cos(\Delta\phi(\sigma_0, z)) \right) \quad (2.53)$$

ou encore

$$I(x, z) = I_b + A(x, z) V_{coh}(z) \cos(\Delta\phi(\sigma_0, z)) \quad (2.54)$$

avec

$$I_b = \frac{I_0}{4} (R_{ref} + R_{inc}) \quad (2.55)$$

et

$$A(x, z)^2 = \frac{I_0^2}{4} R_{ref} R_{coh}(x, z) \quad (2.56)$$

L’intensité détectée par le capteur en fonction de la profondeur z est représentée sur la figure 2.27. Ce signal est entaché d’un fond I_b qu’il convient d’éliminer ainsi que d’un terme de phase qui rend impossible l’interprétation du signal brut tel quel. Pour extraire l’amplitude du signal proportionnel à la réflectivité $R_{coh}(x)$, on utilisera des algorithmes de démodulation basés sur l’interférométrie à décalage de phase (voir sous-section 2.5.4).

En pratique, si l’on considère que les plans de mise au point et de cohérence sont parfaitement orthogonaux à l’axe optique, le signal détecté est le même sur tout le capteur. C’est le cas par exemple sur la figure 2.27. Ainsi, on passe d’une frange brillante à une frange sombre sur l’ensemble du capteur de manière uniforme selon l’écart de phase entre les bras $\Delta\phi(z) = 4\pi n \sigma_0 d$ où d est la distance au plan de différence de marche nulle et n l’indice du milieu. En réalité, il existe toujours un angle α entre ces deux plans. Cela implique que le déphasage est également une fonction du champ de vue. L’écart entre les deux plans en fonction de la position x dans l’objet est schématisé en figure 2.28. On suppose que les plans sont confondus au centre de l’image, alors, en présence d’un angle α entre les plans, le déphasage s’exprime ainsi :

$$\Delta\phi(x) = 4\pi n \sigma_0 \tan(\alpha) x \quad (2.57)$$

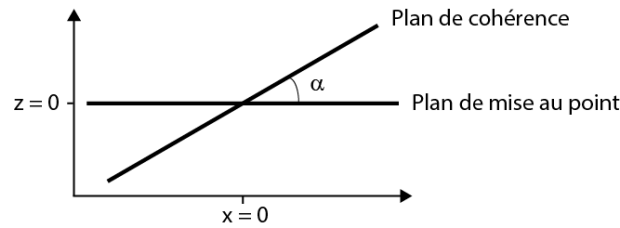


FIGURE 2.28 – Écart angulaire entre plan de focalisation et plan de cohérence.

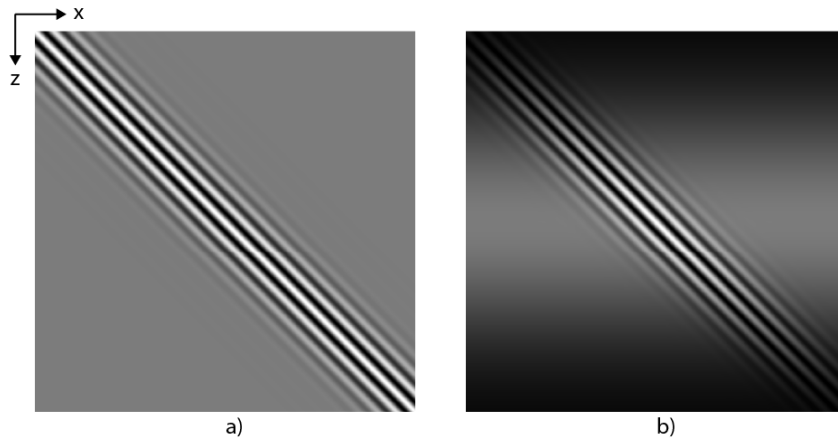


FIGURE 2.29 – Figures d'interférence créées en présence d'un angle entre les plans de focalisation et de cohérence en négligeant l'impact de la profondeur de champ des objectifs (a), et en la prenant en compte (b). Les fenêtres de cohérence et de mise au point sont supposées de forme gaussienne. Dans (b) le signal est partiellement perdu sur les bords de l'image en raison de la séparation des plans.

Dans ce cas le signal n'est plus uniforme sur le capteur et crée une figure d'interférence dont l'interfrange varie avec l'angle α :

$$i = \frac{1}{4n\sigma_0 \tan(\alpha)} \quad (2.58)$$

Le signal détecté par le capteur prend alors la forme représenté sur la figure 2.29a. En LC-OCT, le plan d'imagerie correspond au plan de cohérence. L'angle doit donc être réduit au minimum afin de ne pas entraver l'interprétation des images à cause d'un effet de cisaillement. Cet écart angulaire peut devenir problématique lorsque l'on prend en compte la profondeur de champ des objectifs. La figure 2.29 représente le signal détecté par le capteur lorsque les plans de focalisation et de cohérence forme un angle de 45° . Si on néglige dans un premier temps l'ouverture numérique des objectifs la surface est détectée avec un angle alors qu'elle est plate mais le contraste des franges reste bon sur toutes les colonnes de l'image. Si on prend en compte la décroissance de l'intensité détectée autour du plan de mise au point, les interférences perdent en contraste dans les zones où la fenêtre de cohérence ne chevauche plus la fenêtre de mise au point, c'est-à-dire sur les côtés de l'image. Il devient alors impossible de superposer les plans sur toute la largeur de l'image, limitant ainsi le champ de vue accessible.

2.5.4 Interférométrie à décalage de phase

L'enjeu est, à partir du signal interférométrique détecté, d'isoler le terme de réflexion cohérente inclus dans le terme d'amplitude. Pour cela, on emploie des méthodes interférométriques

dités à décalage de phase. L'idée est de combiner astucieusement différentes images déphasées⁷ les unes par rapport aux autres afin de supprimer le signal de fond et le terme de phase. Il existe une multitude d'algorithmes employant différents déphasages et différents nombres d'images. Nous prendrons en exemple l'algorithme dit de Larkin car c'est celui qui est utilisé en pratique par notre équipe. En effet, cet algorithme offre le meilleur compromis entre qualité de démodulation et complexité [52]. Il est particulièrement robuste aux erreurs de déphasage. L'algorithme de Larkin utilise 5 images avec un déphasage de $\pi/2$ et prend la forme suivante :

$$\Gamma(x, z) = \alpha(x, z)^2 - \beta(x, z) \times \gamma(x, z) \quad (2.59)$$

avec

$$\alpha(x, z) = I_2(x, z) - I_4(x, z) \quad (2.60)$$

$$\beta(x, z) = I_1(x, z) - I_3(x, z) \quad (2.61)$$

$$\gamma(x, z) = I_3(x, z) - I_5(x, z) \quad (2.62)$$

où I_p sont les images déphasées, exprimées à partir de l'équation 2.53 :

$$I_p(x, z) = I_b + A(x, z) \cos(\phi + p\pi/2) \quad (2.63)$$

Le déphasage peut se faire pas à pas, c'est-à-dire qu'on "saute" directement d'une phase à l'autre. Cependant, on utilise plus souvent une modulation dynamique de la phase. En OCM, la modulation se fait par une puce piézoélectrique placée contre la surface de référence, faisant ainsi osciller l'écart de phase entre les deux bras de l'interféromètre entre $-\pi/2$ et $\pi/2$. La modulation la plus commune est la modulation sinusoïdale car le mouvement sinusoïdal est celui qui offre le moins de contraintes mécaniques lorsque l'on fait osciller la puce à haute vitesse [56].

En LC-OCT, le déplacement du plan de cohérence nécessaire au balayage axial de l'objet peut également servir pour la modulation de la phase. Lorsque l'on oscille sur une amplitude de plusieurs centaines de microns à des fréquences autour de 10 Hz correspondant respectivement à la profondeur maximale d'imagerie et à la fréquence d'acquisition des images, il devient possible et aisé d'utiliser une course linéaire. Dans ce cas, la modulation de la phase suit une loi linéaire, plus facile à étudier. Le signal varie alors en fonction du temps selon la formule suivante :

$$I(x, z, t) = I_b + A(x, z) \cos(\phi + 2\pi t/T) \quad (2.64)$$

où T désigne la période temporelle des oscillations de la phase. Les images étant déphasées de $\pi/2$, elles doivent être acquises avec un espacement temporel de $T/4$. En supposant que l'on intègre le signal sur tout le quart de période on a :

$$I_p(x, z) = N \int_{\frac{pT}{4}}^{\frac{(p+1)T}{4}} I(x, z, t) dt \quad (2.65)$$

En utilisant les équation 2.64, 2.55 et 2.56 on obtient :

$$I_p(x, y) = \frac{NI_0T}{16} \left[R_{inc} + R_{ref} + \frac{4}{\pi} \sqrt{R_{coh}(x, z)R_{ref}} \left(\cos\left(\phi + p\frac{\pi}{2}\right) - \sin\left(\phi + p\frac{\pi}{2}\right) \right) \right] \quad (2.66)$$

où N est le nombre d'accumulations réalisées. En effet, pour améliorer le rapport signal sur bruit, il est habituel en OCT d'intégrer plusieurs fois le signal pour chaque déphasage. Si on intègre l'équation 2.66 dans 2.59, on obtient alors :

$$\Gamma(x, z) = \left(\frac{NI_0T}{\sqrt{2}\pi} \right)^2 R_{ref} R_{coh}(x, z) \quad (2.67)$$

7. En LC-OCT le signal brut détecté par la caméra est un signal unidimensionnel. Ici le terme "image" désigne donc une ligne horizontale dans l'objet et non un B-scan entier.

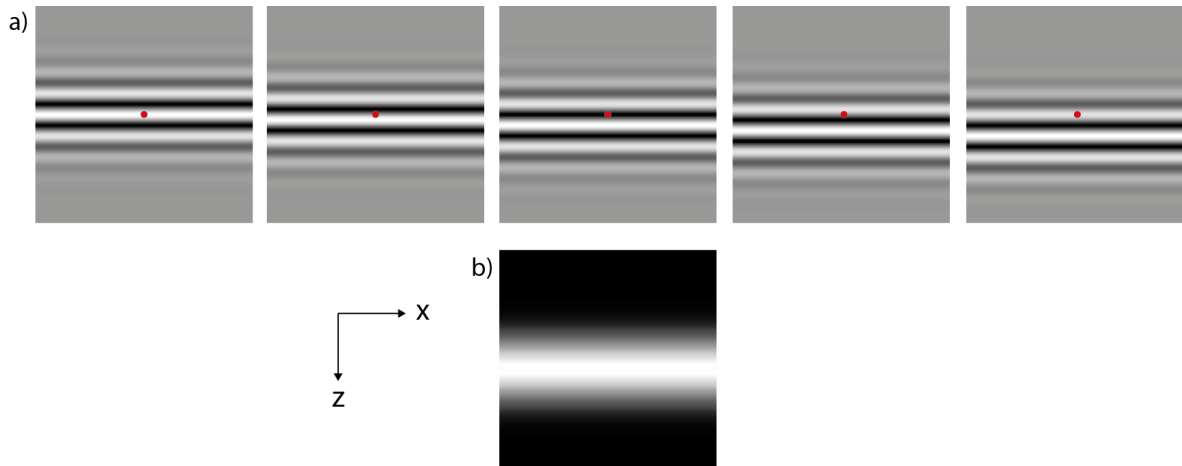


FIGURE 2.30 – Démodulation d’une surface réfléchissante par interférométrie à décalage de phase utilisant un algorithme de type Larkin.

L’expression du signal démodulé est finalement bien proportionnel à $R_{coh}(x, z)$ et donc au signal rétrodiffusé par l’objet au sein de la fenêtre de cohérence à une position (x, z) . La figure 2.30 représente la démodulation pour un échantillon constitué d’une simple surface réfléchissante plane. L’enveloppe extraite est centrée sur l’image médiane. Elle est également affinée par la mise au carré des images interférométriques.

2.5.5 Acquisition des images en LC-OCT

Nous avons vu précédemment comment s’exprimer le signal interférométrique détecté en LC-OCT et comment retrouver le signal utile à partir d’un algorithme de démodulation par interférométrie à décalage de phase. Pour cela, il est nécessaire d’acquérir des images lignes proprement déphasées et de les combiner entre elles.

Les images utilisées dans l’algorithme de démodulation étant des lignes, le résultat $\Gamma(x, z)$ de l’équation 2.67 est également une ligne suivant la dimension de x à une profondeur z . Le B-scan est ensuite reconstitué en concaténant ces images lignes dans la direction de z . Le schéma présenté en figure 2.31 illustre le principe de création d’un B-scan à partir d’une image interférométrique.

Le déphasage se fait en pratique en faisant varier la longueur du bras objet. Essentiellement, un déphasage de $\pi/2$ revient à faire varier l’ordre d’interférence de $1/4$ ou bien la différence de marche de $\lambda_0/4$:

$$\Delta p = \frac{\Delta\phi}{2\pi} = \frac{\Delta\delta}{\lambda_0} = \frac{1}{4} \quad (2.68)$$

Exprimons alors la variation de la différence de marche lorsque l’on déplace les objectifs selon les lois formulées dans les équations 2.49 et 2.50. Nous étudierons les deux configurations présentées en figure 2.24 en commençant par la configuration (1). Les grandeurs utiles pour l’expression de la différence de marche sont explicitées sur le schéma en figure 2.32

Supposons dans un premier temps que les plans de cohérence et de focalisation sont superposés à une profondeur z . La différence de marche s’exprime alors de la façon suivante :

$$\delta_1(z) = 2 \left[L_{ref} + n_{im}L - \left(L_{obj} + n_{im} \left(L - \frac{n_{im}}{n} z \right) + nz \right) \right] = 0 \quad (2.69)$$

Ce qui nous donne l’égalité

$$L_{ref} - L_{obj} + \frac{n_{im}^2}{n} z + nz = 0 \quad (2.70)$$

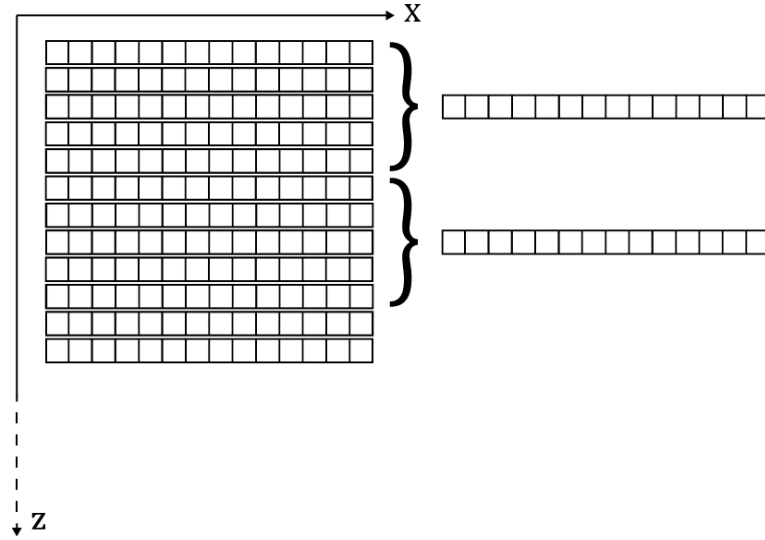


FIGURE 2.31 – Principe de création d'un B-scan en LC-OCT à partir d'une image interférométrique. Les grilles représentent les pixels du capteur. Des images interférométriques lignes sont acquises de manière séquentielle avec un certain déphasage puis combinées par groupe de cinq pour reconstituer une image ligne démodulée. La concaténation de ces lignes permet de reconstituer un B-scan.

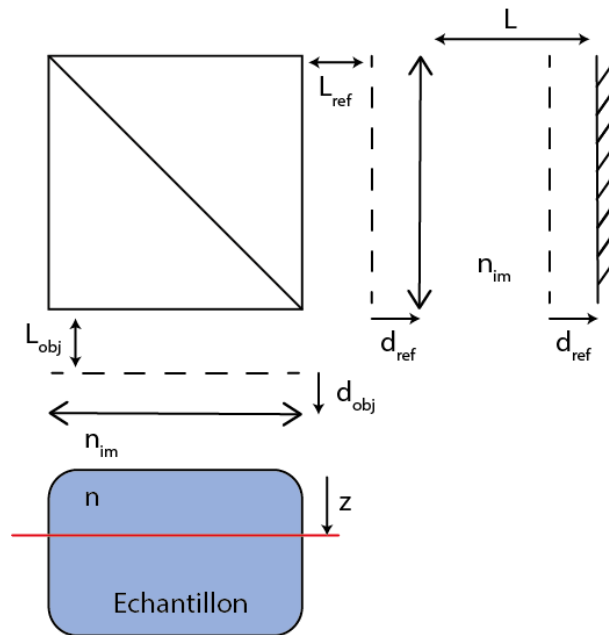


FIGURE 2.32 – Grandeurs utiles pour l'expression de la différence de marche. L_{obj} et L_{ref} sont respectivement les épaisseurs d'air entre le cube séparateur et les objectifs échantillon et référence. L est la distance de travail des objectifs. Les objectifs sont immergés dans un liquide d'indice n_{im} . L'objet considéré a un indice n . Les lignes en pointillés représentent les positions de départ des objectifs, telles que les plans de cohérence et de mise au point sont confondus dans le plan à la profondeur z . Pour créer un déphasage, les objectifs sont déplacés d'une distance d_{obj} et d_{ref} . La différence de marche au plan z est alors de $\lambda_0/4$.

Déplaçons maintenant les objectifs d'une longueur d_{obj} et d_{ref} . La différence de marche $\delta(z)$ doit alors être égale à $\lambda_0/4$ et s'exprime ainsi :

$$\delta_2(z) = 2 \left[L_{ref} + d_{ref} - n_{im}L - \left(L_{obj} + d_{obj} + n_{im} \left(L - d_{obj} - \frac{n_{im}}{n}z \right) + nz \right) \right] = \frac{\lambda_0}{4} \quad (2.71)$$

La position z correspond ici à la même profondeur que précédemment bien que le plan de différence de marche nulle se soit déplacé. Le plan à la position z reste en réalité inclus dans la fenêtre de cohérence et contribue donc toujours aux interférences détectées. Grâce à l'équation 2.70, on obtient une formule générale pour le déphasage :

$$\left| d_{ref} - d_{obj} + n_{im}d_{obj} \right| = \frac{\lambda_0}{8} \quad (2.72)$$

Si on exprime l'équation ci-dessus en fonction du déplacement d du plan de cohérence dans l'échantillon à partir des équations 2.49 et 2.50, on obtient :

$$d = \frac{\lambda_0}{8n} \quad (2.73)$$

En pratique il faut alors déplacer les moteurs piézoélectriques de :

$$d_{obj} = \frac{n_{im}}{n^2} \frac{\lambda_0}{8} \quad (2.74)$$

et

$$d_{ref} = \frac{n^2 - n_{im}^2 + n_{im}}{n^2} \frac{\lambda_0}{8} \quad (2.75)$$

Si on suppose l'égalité des indices, les objectifs se déplacent de la même distance et on obtient finalement une expression simplifiée qu'on utilisera le plus souvent en pratique :

$$d = d_{obj} = d_{ref} = \frac{\lambda_0}{8n} \quad (2.76)$$

Dans la configuration (2), le déplacement de l'interféromètre translate le plan de mise au point dans l'échantillon, mais également le plan de cohérence. En effet, si la longueur du bras de référence reste fixe, le fait que le cube séparateur de l'interféromètre se déplace avec les objectifs permet quand même de déplacer le plan de différence de marche nulle à l'intérieur de l'échantillon. On sait déjà que dans cette configuration il est indispensable d'adapter l'indice optique du liquide d'immersion à celui de l'objet pour assurer la superposition des plans de cohérence et de focalisation sur toute la profondeur d'imagerie. On supposera alors que $n = n_{im}$. Dans ce cas, un déplacement d de l'interféromètre déplace également le plan de mise au point et le plan de cohérence de d . La différence de marche s'exprime alors de la façon suivante :

$$\delta(z) = 2 \left[L_{ref} - \left(L_{obj} + n(L - d) \right) \right] = \frac{\lambda_0}{4} \quad (2.77)$$

Les longueurs L_{ref} et L_{obj} devant être égales pour que $\delta(z = 0) = 0$, on obtient finalement un déplacement d égal à celui de la configuration (1).

Si on reprend l'équation générale 2.72, et que l'on impose un déplacement égal des objectifs ($d_{obj} = d_{ref}$), on constate que l'on obtient :

$$d = \frac{\lambda_0}{8n_{im}} \quad (2.78)$$

Le déplacement apparait donc indépendant de l'indice de l'objet, ce qui est intéressant car celui peut varier en fonction de l'échantillon et n'est pas uniforme au sein d'un échantillon.

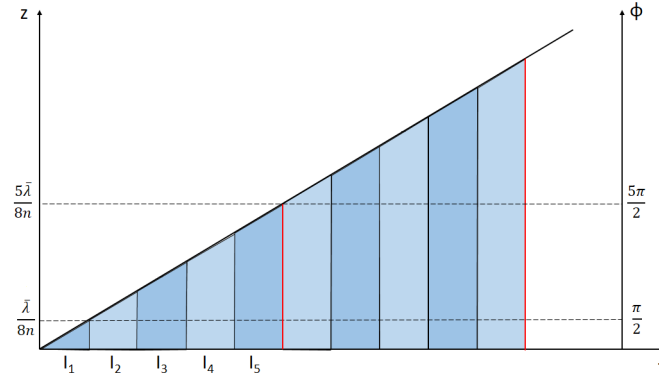


FIGURE 2.33 – Représentation schématique de la modulation linéaire de la phase. La position du plan de cohérence ainsi que la phase évoluent linéairement avec le temps. L’acquisition des images interférométriques lignes est régulièrement espacée d’une durée Δt ne devant jamais dépasser Δt_{max} (voir équation 2.79). Modifié de [17].

La configuration (2) imposant le même déplacement aux objectifs, on y retrouve également le même résultat. En effet, si on exprimait rigoureusement la différence de marche en fonction de n et de n_{im} , on verrait que le déplacement d est associé à l’indice de l’immersion et non pas à celui de l’objet. Intuitivement cela peut se comprendre car, bien que l’on déplace le plan de cohérence dans l’échantillon, on s’intéresse toujours au même plan à une profondeur z avant et après le déphasage. On traverse donc la même épaisseur d’échantillon et seule l’épaisseur de liquide d’immersion varie lorsque l’on crée ce déphasage. Par conséquent, la variation de chemin optique causée par le déplacement d de l’interféromètre ne dépend que de n_{im} . Connaissant la longueur d’onde centrale et l’indice du liquide d’immersion, et supposant que les déplacements des objectifs sont identiques, on aura toujours le bon pas de déphasage d .

Dans [21], la longueur d’onde centrale est de 800 nm, l’indice de 1.40, ce qui donne un pas de déphasage de 71.4 nm. Le déplacement d est donc en général très faible devant la longueur de cohérence, ce qui assure un échantillonnage correct de la PSF axiale. Typiquement, la profondeur d’imagerie est de $\sim 500 \mu\text{m}$ et la fréquence d’affichage de 10 images par seconde, soit une durée d’acquisition de 100 ms. Pour une profondeur d’imagerie donnée, le nombre d’images interférométriques lignes est déterminé par le rapport z_{max}/d . Pour un seul B-scan, un grand nombre d’images lignes (7000 pour $z_{max} = 500 \mu\text{m}$ et $d = 71.4 \text{ nm}$) doivent alors être acquises, imposant ainsi l’utilisation d’une caméra ayant une fréquence d’acquisition élevée. Si la durée d’acquisition d’un B-scan est de 100 ms, celle-ci doit donc être au minimum de 70 kHz.

L’échantillonnage va donc bien au-delà de la limite de Shannon. On pourrait essayer d’imaginer un système acquérant des blocs d’images lignes plus espacés de façon à relâcher les contraintes sur le caméra, mais la vitesse d’acquisition reste limitée par le pas de déphasage et la vitesse de déplacement des moteurs piézoélectriques $v = z_{max}/T$ où T est la durée d’acquisition d’un B-scan. Notons toutefois qu’il est tout de même intéressant de suréchantillonner l’objet en profondeur pour moyenniser le signal et ainsi améliorer la qualité d’imagerie. La période d’acquisition maximale du détecteur doit alors être de :

$$\Delta t_{max} = \frac{d}{v} = \frac{d \cdot T}{z_{max}} \quad (2.79)$$

En reprenant les paramètres mentionnés plus haut, on trouve $\Delta t_{max} = 14.28 \mu\text{s}$ soit une fréquence d’acquisition identique à celle trouvée plus haut de 70 kHz. La figure 2.33 illustre la modulation linéaire de la phase et l’acquisition séquentielle des images interférométrique lignes avec le déplacement du plan de cohérence.

Technologie	Résolution axiale	Résolution latérale	Champ de vue latéral	Profondeur d'imagerie	<i>In vivo</i>
RCM (Vivascope)	5 μm	1 μm	1 mm	200 μm	Oui
Multibeam FD-OCT (Vivosight)	5 μm	7 μm	6 mm	1 mm	Oui
HD-OCT (Skintell)	3 μm	3 μm	1.8 mm	1 mm	Oui
FF-OCM (Light-CT Scanner)	1 μm	1.5 μm	1.3 mm	200 μm	Non
Tomographie multiphoton (DermaInspect)	2 μm	1 μm	350 μm	200 μm	Oui
LC-OCT	1.2 μm	1.3 μm	1.2 mm	500 μm	Oui

TABLEAU 2.2 – Comparaison des performances de l'état de l'art avec la LC-OCT.

2.5.6 Comparaison avec l'état de l'art

Le tableau 2.2 résume les caractéristiques principales des modalités présentées dans ce chapitre mais également celles abordées dans le chapitre précédent. Les valeurs présentées sont des valeurs typiques correspondant aux performances des dispositifs utilisés cliniquement pour la peau. Elles ne représentent en aucun cas les multiples variantes pouvant privilégier un paramètre plutôt qu'un autre.

Le système de LC-OCT présenté dans [21], ayant un spectre centré à 800 nm et utilisant des objectifs ouverts à 0.5, permet d'atteindre une résolution de 1.2 μm \times 1.3 μm (axiale \times latérale) avec un champ de vue de 1.2 mm et une profondeur d'imagerie de 500 μm .

Comparée aux systèmes d'OCT, la LC-OCT se démarque par une amélioration de la résolution latérale, grâce aux objectifs de microscope comme optiques de focalisation, et axiale, due à l'utilisation d'une immersion dont l'indice est adapté à celui de l'objet, permettant ainsi d'utiliser des spectres très étendus (voir sous-section 2.4.1). Comme nous l'avons vu depuis le début de ce manuscrit, ceci était une condition *sine qua none* pour la détection des mélanomes car ceux-ci se développent à l'échelle de cellules uniques et métastasent très rapidement.

D'autres modalités permettent l'imagerie cellulaire comme la RCM, l'OCM et l'imagerie multiphoton. En revanche, la LC-OCT rivalise en termes de sensibilité de détection qui se caractérise par une profondeur de pénétration accrue. Nous avons déjà vu dans la sous-section 2.4.3 que le filtrage par la cohérence supplantait le filtrage confocal en termes de sélectivité. En OCM plein champ, le manque de sensibilité provient de l'absence de filtrage confocal. La quantité de lumière incohérente détectée par le capteur oblige à accumuler le signal interférométrique un grand nombre de fois, rendant la FF-OCM moins bien adaptée à l'imagerie *in vivo*. La HD-OCT est le nom de la technologie donné au dispositif Skintell, mais c'est en réalité un système de FF-OCM. Celui-ci est capable de reproduire des images *in vivo* avec une profondeur correcte grâce à l'utilisation d'un spectre autour de 1300 nm. Cependant, la résolution est moins bonne que pour d'autres systèmes de microscopie par cohérence optique et le temps d'exposition doit être réduit au minimum pour réduire les artéfacts liés aux mouvements. Quant à l'imagerie multiphoton, elle repose sur une excitation à deux photons nécessitant un fort éclairage de l'échantillon qu'il est toutefois nécessaire de limiter afin de préserver l'échantillon et de respecter les normes sanitaires.

En LC-OCT, la quantité de lumière détectée de manière incohérente est réduite grâce au filtrage confocal. Cette réflexion incohérente peut être évaluée en mesurant l'intensité détectée par un échantillon et en la comparant à un objet de réflectivité connue, comme une interface verre/air réfléchissant $\sim 4\%$. On peut donc mesurer une valeur moyenne de la réflectivité de l'échantillon qu'on assimilera à la réflectivité incohérente, la réflectivité cohérente étant négligeable. Celle-ci a été mesurée en LC-OCT pour la peau autour de 0.1%. À titre de comparaison,

elle a été évaluée entre 1 % et 10 % en OCM plein champ. Le filtrage confocal permet donc de gagner quelques décibels en sensibilité de détection sans avoir besoin d'accumuler le signal.

En comparant ces différentes modalités, on constate que l'imagerie à haute résolution, avec une fréquence d'acquisition permettant l'imagerie *in vivo*, et un champ de vue correct est permise par plusieurs dispositifs. On peut donc dire que la LC-OCT se démarque des autres technologies par sa capacité à acquérir des images avec une bonne sensibilité de détection sans avoir besoin de moyennner le signal, et donc de perdre en rapidité. Ces modalités d'imagerie fonctionnant toute en détectant les photons balistiques (*i.e.* photons rétrodiffusés une seule fois), le signal détecté décroît inévitablement avec la profondeur d'imagerie. Une meilleure sensibilité permet de détecter des signaux plus faibles, donc des signaux provenant de zones plus profondes. Cette capacité est indispensable pour l'interprétation d'images de peau présentant une lésion. En effet, les cancers de la peau apparaissent en général au niveau de la jonction dermo-épidermique située aux alentours de 200 μm (selon les zones étudiées).

Chapitre 3

Dispositif de LC-OCT à deux bandes

Sommaire

3.1	Introduction	70
3.2	Principe général	71
3.2.1	Montage expérimental	71
3.2.2	Superposition du plan de cohérence et des plans de focalisation	73
3.2.3	Acquisition des images en pratique	74
3.3	Caractérisation du système	76
3.3.1	Bandes spectrales	76
3.3.2	Résolution axiale	78
3.3.3	Résolution latérale	79
3.3.4	Sensibilité	79
3.3.5	Fusion des images	81
3.4	Applications à l'imagerie de la peau	83
3.4.1	Comparaison entre les bandes	83
3.4.2	Amélioration du ratio résolution/pénétration	86
3.4.3	Amélioration du contraste et différenciation d'échantillons	87
3.5	Conclusion	88

3.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté un système de LC-OCT à une seule bande spectrale et fonctionnant à une longueur d'onde centrale autour de 800 nm. Cette partie du spectre offre en effet un compromis entre résolution et profondeur de pénétration bien adapté à l'imagerie de la peau à haute résolution. La résolution spatiale inférieure à 2 μm permet de visualiser clairement les cellules de la peau, tandis que la profondeur de pénétration pouvant aller jusque 500 μm permet l'observation de l'ensemble de l'épiderme et le haut du derme, zones desquelles émergent la plupart du temps les cellules cancéreuses. Par conséquent, cette bande spectrale est particulièrement adaptée pour le diagnostic des cancers cutanés et en particulier des mélanomes.

Il peut toutefois être intéressant de travailler dans d'autres régions du spectre lumineux afin de privilégier la résolution ou la pénétration. L'OCT conventionnelle appliquée à l'imagerie de la peau utilise en général un spectre centré à 1300 nm. Plus récemment, des systèmes d'OCT fonctionnant dans le spectre visible (vis-OCT pour *visible-light OCT*) ont été développés afin d'atteindre de meilleures résolutions [57, 58].

Dans la plupart des tissus biologiques, la profondeur de pénétration est principalement limitée par la diffusion de la lumière [59]. Puisqu'en général la diffusion faiblit lorsqu'on augmente la longueur d'onde, il est possible, tant que l'absorption n'est pas limitante, d'augmenter significativement la profondeur de pénétration en augmentant la longueur d'onde de travail [60]. Il a été démontré qu'en OCT conventionnelle la bande spectrale autour de 1300 nm est optimale pour maximiser la profondeur de pénétration dans la peau [61]. Imager à une profondeur supérieure au système présenté dans la section 2.5 peut être intéressant pour des applications en dermatologie ou en cosmétologie. Par exemple, en chirurgie de Mohs il est particulièrement important d'avoir une grande profondeur d'imagerie afin d'évaluer au mieux les marges d'exérèse. Voir plus profondément dans le derme permettrait également de distinguer le derme papillaire du derme réticulaire, ou d'examiner la structure des fibres de collagène, et ainsi étudier plus précisément les effets de l'âge sur la peau.

Toutefois, améliorer la profondeur de pénétration par le biais de l'augmentation de la longueur d'onde se fait au détriment de la résolution spatiale. Il peut alors être intéressant d'imager simultanément dans plusieurs bandes spectrales pour bénéficier de la pénétration ainsi que de la résolution, ce qui a déjà été démontré avec des systèmes à deux ou trois bandes en OCT et en OCM [62, 63, 64, 65].

Dans ce chapitre, nous présentons un système de LC-OCT à deux bandes centrées autour de 770 nm et de 1250 nm. Par souci de simplicité et de clarté, on appellera ces deux bandes "bande VIS" et "bande IR" respectivement.¹ Ce dispositif permet d'acquérir simultanément des B-scans *in vivo* dans les deux bandes avec un unique laser supercontinuum comme source de lumière et deux capteurs différents. La bande VIS produit des images à très haute résolution tandis que la bande IR permet d'atteindre des zones plus profondes. Les deux images produites peuvent ensuite être fusionnées pour produire deux types d'images. D'une part, on peut fusionner les images en intensité selon la profondeur, permettant ainsi de créer une image bénéficiant d'une haute résolution en superficie et d'une grande profondeur de pénétration. D'autre part, la fusion des deux images peut être représentée en couleur afin d'améliorer le contraste et d'acquérir des informations spectrales sur l'échantillon.

1. Bien que les deux bandes se situent principalement dans le proche infrarouge, une partie du spectre de la bande à 770 nm est visible. C'est pour cette raison qu'on l'appelle "bande visible". Notons toutefois qu'il ne s'agit pas d'un système de vis-OCT tel qu'on l'a mentionné plus haut car ceux-ci fonctionnent en général à des longueurs d'onde centrales inférieures à 600 nm.

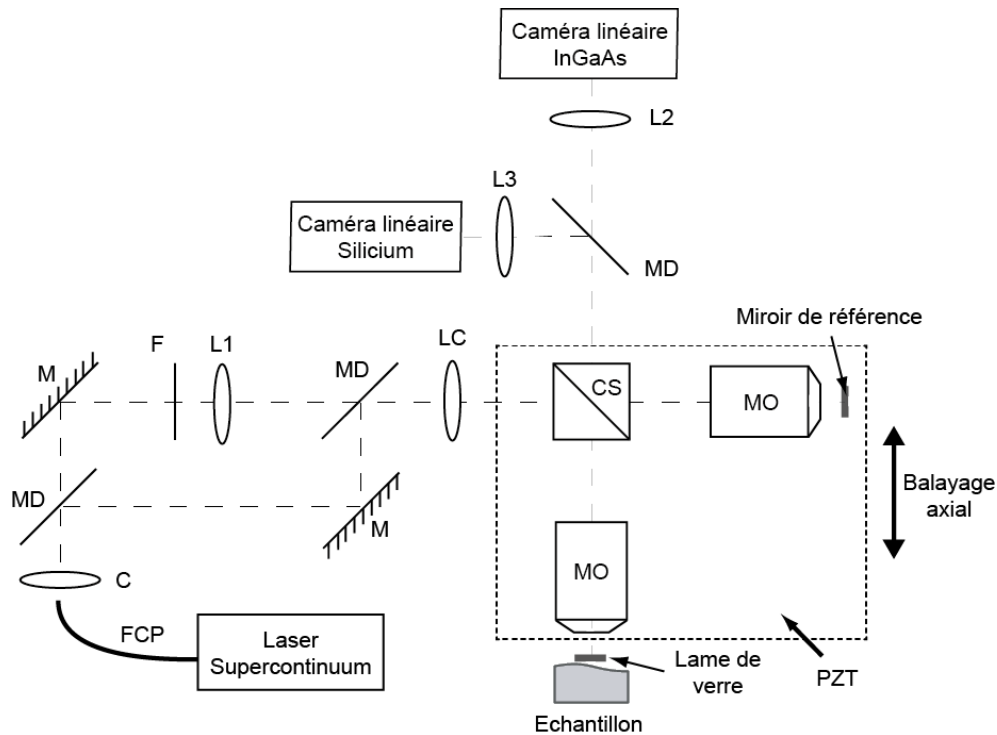


FIGURE 3.1 – Schéma d'un montage de LC-OCT à deux bandes. FCP : fibre à cristal photonique ; C : collimateur achromatique ; MD : miroir dichroïque passe-haut à 950 nm ; F : filtre ; L1 : système optique à focale ajustable ; LC : lentille cylindrique ; CS : cube séparateur de faisceau ; OM : objectif de microscope ; PZT : moteur piézoélectrique ; L2, L3 : lentilles de tube.

3.2 Principe général

3.2.1 Montage expérimental

Le schéma de montage d'un système de LC-OCT à deux bandes est présenté en figure 3.1. Dans l'essence, celui-ci diffère d'un montage de LC-OCT (figure 2.18) dans les parties d'éclairage et de détection, l'interféromètre de Linnik restant identique.

Un laser supercontinuum (SC) est utilisé comme source de lumière temporellement incohérente et spatialement cohérente. Celui-ci est capable d'émettre un spectre lumineux allant de 400 nm à 2400 nm avec une puissance pouvant atteindre 2 W . La fréquence d'émission des impulsions est de 78 MHz , si bien qu'on peut l'assimiler à un laser continu compte tenu du fait que plusieurs milliers d'impulsions sont détectés pendant le temps d'intégration de la caméra. Le faisceau est acheminé du laser au dispositif par une fibre à cristal photonique dans laquelle se produit l'effet supercontinuum élargissant le spectre. Ce faisceau est collimaté puis spectralement divisé à 950 nm . Dans le faisceau contenant les longueurs d'onde supérieures à 950 nm on place un filtre passe-haut coupant les longueurs d'ondes inférieures à 1100 nm de façon à éliminer le pic à 1064 nm du laser SC (voir sous-section 3.3.1). La lentille L1 sur le schéma en figure 3.1 permet de compenser l'écart de focalisation dans l'échantillon entre les deux bandes à cause du chromatisme des objectifs de microscope. Cette étape est détaillée dans la sous-section 3.2.2. Les faisceaux sont ensuite recombinaés avant l'entrée dans l'interféromètre par un miroir dichroïque à 950 nm , puis une lentille cylindrique de focale 50 mm façonne le faisceau d'éclairage selon une ligne.

L'interféromètre de Linnik est composé d'un cube séparateur de faisceau et de deux objectifs de microscope identiques. Le cube séparateur transmet et réfléchit environ 50% et est traité anti-reflet dans la bande entre 1100 nm et 1600 nm . En dehors de cette bande spectrale, le rapport

de division entre réflexion et transmission n'est plus de 50/50, signifiant que plus de la moitié du flux entrant est perdu à la sortie de l'interféromètre. Le flux provenant de chaque bras reste tout de même identique car le faisceau subit dans les deux cas une réflexion et une transmission. Pour les composants optiques communs aux deux bandes, on aura tendance dans la mesure du possible à privilégier l'efficacité de transmission dans la bande IR car il est plus difficile de saturer la caméra InGaAs en raison d'une capacité de charge beaucoup plus importante que la caméra Silicium utilisée pour la voie VIS. Les objectifs de microscope (Olympus 20x/0.5 W) sont immergés dans une huile dont l'indice de réfraction est approximativement égal à celui de la peau et transparente sur la totalité de la bande spectrale utile du système (Cargille Laboratories, code S1050, $n = 1.4035$ à 583.3 nm). L'objectif dans le bras de référence focalise sur la face externe d'une lame de verre en silice fondue d'épaisseur $500\ \mu\text{m}$. Le coefficient de réflexion du miroir de référence R_{ref} est de 3.4% dans la bande VIS et de 3.3% dans la bande IR. Une lame de verre identique à celle servant de miroir de référence est également placée dans le bras objet afin de compenser les écarts de dispersion entre les bras et d'offrir une surface de contact plane et stable pour l'échantillon. L'ensemble de l'interféromètre est placé sur un moteur piézoélectrique de façon à balayer l'objet en profondeur en déplaçant le plan de cohérence tout en adaptant la focalisation de l'objectif de microscope du bras objet.

Le moteur piézoélectrique permettant le balayage axial de l'objet se déplace selon un mouvement en dents de scie représenté en figure 3.2. Afin de respecter les contraintes mécaniques du moteur limitant la vitesse de déplacement, le rapport cyclique choisi est de 80% . L'acquisition des images se fait sur la partie dont la pente est plus faible. Une fois que le moteur a parcouru la totalité de son amplitude, il revient le plus rapidement possible à sa position initiale pour reprendre son mouvement. De fait, deux images successives sont prises avec le même déplacement du moteur, ce qui garantit leur exacte similitude. Par ailleurs, les points d'inflexion de la courbe sont en réalité lissés à cause de l'inertie de la dalle piézoélectrique, ce qui réduit l'amplitude de la partie linéaire de la courbe. Cette courbure est amplifiée par la vitesse de déplacement du moteur. Les images lignes étant acquises sur la partie linéaire, ce phénomène limite donc l'amplitude maximale d'imagerie. Dans la pratique, on prend $50\ \mu\text{m}$ de marge au début et à la fin des $800\ \mu\text{m}$ de course du moteur, soit une profondeur d'imagerie maximale de $700\ \mu\text{m}$.

Remarque

On pourrait acquérir deux images sur une période d'oscillation de rapport cyclique 50% : une pendant la descente, une pendant la montée. Cela permettrait en effet d'optimiser la vitesse d'acquisition. Toutefois, bien que les paramètres d'asservissement du moteur soient réglés de façon à ce que la course réelle soit la plus similaire possible à la course cible, il existe toujours une légère différence notamment à cause de la gravité. Ainsi, les pentes montante et descendante ne sont jamais identiques, et une image sur deux se retrouve distordue par rapport à l'autre.

La détection du signal se fait par deux caméras linéaires adaptées au spectre correspondant. Pour la bande VIS, un capteur au Silicium dont le spectre de détection s'arrête aux environ de $950\ \text{nm}$ est utilisé. Ce capteur possède 2048 pixels de $14\ \mu\text{m}$ de largeur et $28\ \mu\text{m}$ de hauteur, pour une longueur totale de $28.7\ \text{mm}$. Pour la bande IR, on utilise une caméra InGaAs sensible entre $900\ \text{nm}$ et $1700\ \text{nm}$. Les pixels, au nombre de 1024 , sont carrés et font $25\ \mu\text{m}$ de côté, soit une longueur totale de $25.6\ \text{mm}$. La ligne de pixels des caméras joue le rôle de diaphragme confocal permettant de rejeter la lumière rétrodiffusé des zones situées en dehors du volume confocal. Dans les deux cas, les hauteurs des pixels sont inférieures aux dimensions d'une tache d'Airy dans l'espace image définie par la formule $\gamma 1.22 \frac{\lambda_0}{ON}$ où λ_0 est la longueur d'onde centrale de la bande spectrale, ON est l'ouverture numérique des objectifs de microscope et γ est le grandissement du microscope constitué par l'association de l'objectif et de la lentille de tube. On trouve alors que l'épaisseur de la ligne de lumière sur les capteurs est de $20.9\ \mu\text{m}$ dans la bande VIS et de

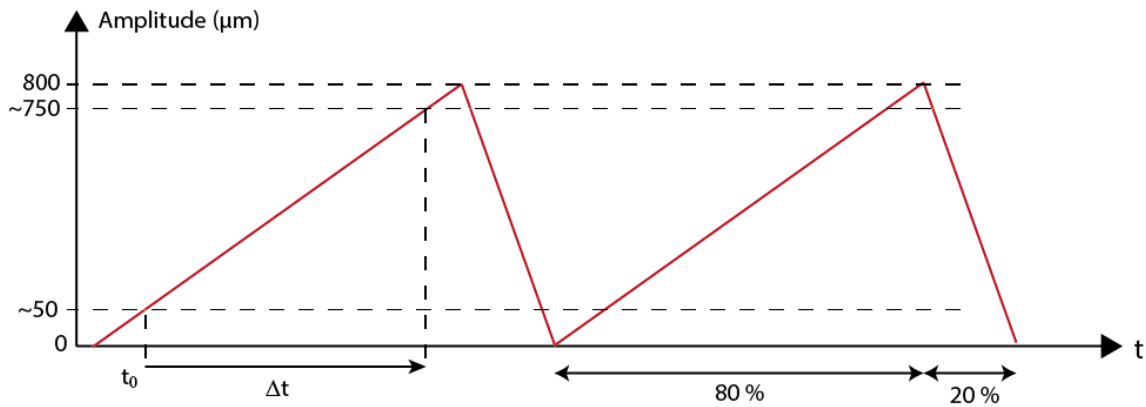


FIGURE 3.2 – Courbe de déplacement du moteur piézoélectrique suivant un mouvement en dents de scie de rapport cyclique 80%/20%. Les images sont acquises sur la pente descendante du déplacement uniquement. Cela assure que deux images successives soient bien identiques contrairement à une acquisition sur les pentes descendantes et ascendantes. Le déclenchement de l'acquisition se fait avec un léger retard t_0 par rapport au début de la descente de façon à commencer la prise de vue vers 50 μm . Le temps de d'acquisition Δt est calculé pour que l'image soit acquise sur 700 μm .

33.9 μm dans la bande IR. On peut donc considérer le filtrage confocal comme réel et efficace. Le signal est focalisé, après division du faisceau par un miroir dichroïque passe-haut présentant une coupure à 950 nm, sur ces deux capteurs par deux lentilles de tube distinctes de focale 200 mm, chacune avec un traitement anti-reflet adapté.

3.2.2 Superposition du plan de cohérence et des plans de focalisation

Du fait du chromatisme des objectifs de microscope, les plans de mise au point ne se trouvent pas à la même profondeur pour les deux bandes. En effet, nous avons mesuré un écart de focalisation Δf de 22 μm dans l'échantillon, ce qui est supérieur à la profondeur de champ des objectifs de microscope ($\sim 10 \mu\text{m}$). Si aucun ajustement n'est fait, on a schématiquement deux plans de mise au point distincts. Le plan de cohérence étant quant à lui unique car indépendant de la longueur d'onde, cet écart de focalisation est critique pour la qualité d'imagerie car il est impossible de superposer le plan de cohérence avec les deux plans de mise au point. Ce phénomène est illustré en figure 3.3.

Pour corriger cela, il est nécessaire d'adapter la conjugaison du microscope pour une des deux bandes. En pratique on fait cela en déplaçant un des deux capteurs jusqu'à ce que les deux capteurs soient conjugués au même plan dans l'objet. Pour une des deux bandes, les objectifs de microscope ne sont plus dans la configuration "infini-foyer" dans laquelle ils ont été conçus. Cet ajustement nous écarte donc de la configuration optimale et dégrade quelque peu la résolution spatiale. En pratique, on fait le choix de déplacer la caméra de la bande IR car c'est la bande spectrale qui offre de toute manière la moins bonne résolution. Les objectifs de microscope étant mieux optimisés dans la bande VIS, on préfère conserver une résolution optimale dans la bande VIS. Pour superposer les plans de mise au point, on déplace la caméra InGaAs d'une distance $D = \Delta f \times \gamma^2$ où γ^2 est le grandissement longitudinal du microscope. En pratique, on éloigne donc la caméra de 11 mm de sa lentille de tube.

Cette étape n'est toutefois pas suffisante car les plans d'éclairage sont également dissociés par le chromatisme, également représentés sur la figure 3.3. Il est donc également nécessaire d'ajuster le faisceau d'éclairage de la voie IR pour le ramener au niveau du plan conjugué avec la caméra, sans quoi seule une fraction du signal rétrodiffusé sera détecté. Pour cela, le spectre

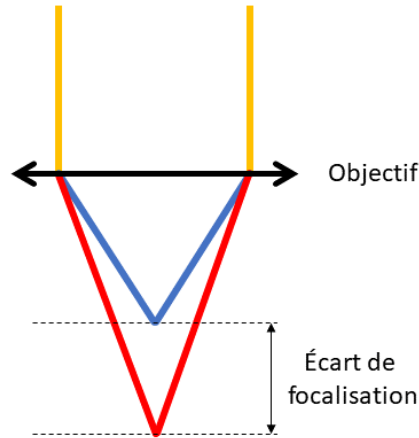


FIGURE 3.3 – Effet du chromatisme des objectifs de microscope sur la position du plan d’éclairage et du plan de mise au point dans les deux bandes. Du fait du chromatisme, lors du passage dans l’objectif de microscope, les différentes longueurs d’onde du faisceau d’éclairage (en jaune) sont plus ou moins déviées. Les longueurs plus courtes focalisent en amont des longueurs d’onde plus longues. Bien que le décalage du plan de mise au point avec la longueur d’onde soit continu, on considère schématiquement que le bande VIS (en bleu) et la bande IR (en rouge) ont chacune un plan de mise au point bien distinct séparé d’une distance Δf l’un de l’autre. Ce schéma permet d’illustrer à la fois la séparation des plans d’éclairage dans l’échantillon, et l’écart entre les plans conjugués aux deux capteurs si ceux-ci sont bien au foyer de leurs lentilles de tube respectives.

du laser SC est séparé et le faisceau de la partie IR est rendu légèrement convergent de façon à ce qu’il soit focalisé dans le même plan que le faisceau d’éclairage de la voie VIS. En pratique, on utilise un agrandisseur de faisceau composé de deux lentilles dont les positions relatives sont réglables, permettant ainsi de créer un système dont la focale est ajustable. Pour déplacer le plan d’éclairage de $-22\ \mu\text{m}$, la focale doit être d’environ $3500\ \text{mm}$.

Habituellement, pour régler un dispositif de LC-OCT, en supposant que le faisceau d’éclairage est parfaitement collimaté par le miroir parabolique utilisé comme collimateur achromatique, on commence par positionner le capteur au foyer de la lentille de tube en se basant sur des lignes parasites créées par le cube séparateur. Pour cela, on place le capteur dans une direction orthogonale à la ligne de lumière et on cherche la position où les lignes apparaissent les plus fines. Cela fait, on peut chercher la focalisation des objectifs en déplaçant les lames de verre jusqu’à obtenir les lignes les plus fines sur le capteur. On remarque alors que les positions des lames de verre sont différentes entre les deux bandes. Le chemin optique dans le bras de référence est ensuite adapté jusqu’à ce que des interférences soient visibles sur le capteur. Si l’on déplace la caméra IR de la distance calculée plus haut, et qu’on adapte l’éclairage de façon à maximiser le flux sur le capteur, on trouve finalement les plans de mise et point et de cohérence des deux bandes simultanément.

3.2.3 Acquisition des images en pratique

Comme expliqué dans la section 2.5 dédiée à la présentation de la LC-OCT, l’image est reconstruite grâce à l’interférométrie à décalage de phase. La phase du signal est alors modulé par un déplacement linéaire du plan de cohérence. Selon l’algorithme utilisé un certain nombre d’images interférométriques déphasées entre elles sont combinées de façon à extraire l’amplitude du signal interférométrique. On utilise dans ce chapitre un algorithme utilisant cinq images déphasées de $\pi/2$ [52].

Les longueurs d’onde centrales ont été mesurées à $770\ \text{nm}$ et $1250\ \text{nm}$. Selon l’équation 2.78,

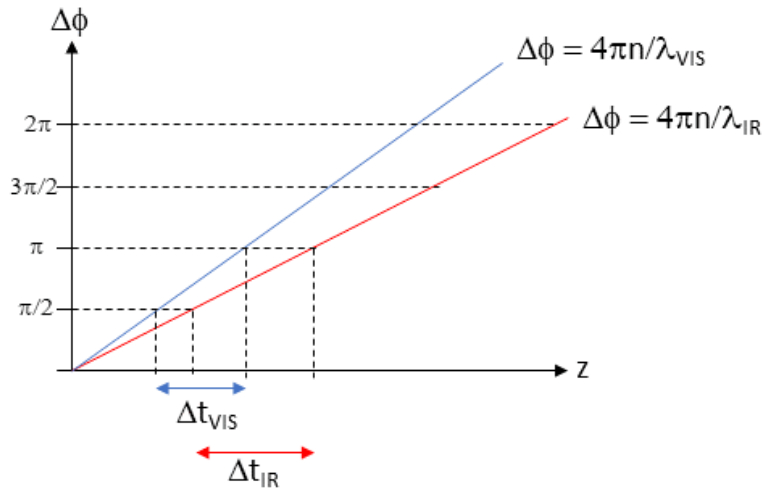


FIGURE 3.4 – Illustration du déphasage induit par le déplacement du plan de cohérence pour un système à deux bandes. La pente de la courbe de déphasage $\Delta\phi$ en fonction du déplacement z du plan de cohérence (bleue pour la bande VIS, rouge pour la bande IR) dépend de la longueur. Ainsi un même déplacement n'aboutit pas au même déphasage dans les deux bandes. En pratique, les acquisitions des images lignes sont plus espacées dans le temps pour la bande IR que la bande VIS.

le déplacement du plan de cohérence pour induire un déphasage de $\pi/2$ est de 69.7 nm et 113 nm respectivement, pour un indice $n = 1.38$. Le déplacement des objectifs étant continu et linéaire, il suffit de déclencher la prise d'images avec des fréquences différentes pour les deux caméras. Avec ce dispositif à deux bandes, nous acquérons des images jusqu'à 700 μm de profondeur à une cadence de 4 images par seconde : les fréquences d'acquisition sont donc de 46 kHz et 28 kHz respectivement.

Le schéma bloc en figure 3.5 illustre le fonctionnement du système global. La sonde optique est composée de l'interféromètre, de tous les composants optiques et du moteur piézoélectrique. Premièrement, le laser fournit l'éclairage nécessaire. Le signal créé est ensuite acquis par la caméra Silicium et la caméra InGaAs. Ces signaux sont ensuite transmis, sous la forme d'images interférométriques lignes, à une carte électronique FPGA (pour *field-programmable gate array*, aussi appelée *frame grabber*) via un câble Camera Link. Ces lignes sont concaténées pour former une image interférométrique bidimensionnelle, puis celle-ci est transmise à un ordinateur par une connexion PCI express. Cette unité s'occupe alors de traiter les images pour finalement les visualiser sur un écran. Les traitements numériques comprennent essentiellement le redimensionnement des images pour que le ratio hauteur/largeur corresponde à la réalité, la correction de la non-uniformité de l'éclairage (voir figure 2.20), et finalement l'application d'un gamma² permettant de comprimer la dynamique du signal. En parallèle, l'ordinateur permet de déclencher la prise d'images. Celui-ci envoie au contrôleur du moteur piézoélectrique la course souhaitée pour le moteur. Ce contrôleur transmet ensuite la course au moteur, et déclenche son mouvement lorsqu'il reçoit le signal de l'ordinateur. Le contrôleur est également programmé pour envoyer périodiquement un signal TTL à une fréquence correspondant à la fréquence d'acquisition des B-scans. Ce signal est aussi envoyé à la carte électronique qui, à sa réception, commence le déclenchement de l'acquisition des images interférométriques lignes par les caméras. La carte électronique envoie donc des signaux d'impulsion TTL à chaque caméra, espacés de Δt_{VIS} et Δt_{IR} (voir figure 3.4), jusqu'à ce que le nombre de lignes souhaité soit atteint. La carte et les

2. La fonction gamma est définie comme suit : $\Gamma(x; \gamma) = x^\gamma$. Lorsque $\gamma < 1$ cette fonction permet de comprimer l'histogramme de l'image en faisant ressortir les faibles valeurs et en atténuant les fortes valeurs. On utilise typiquement un γ de 0.25.

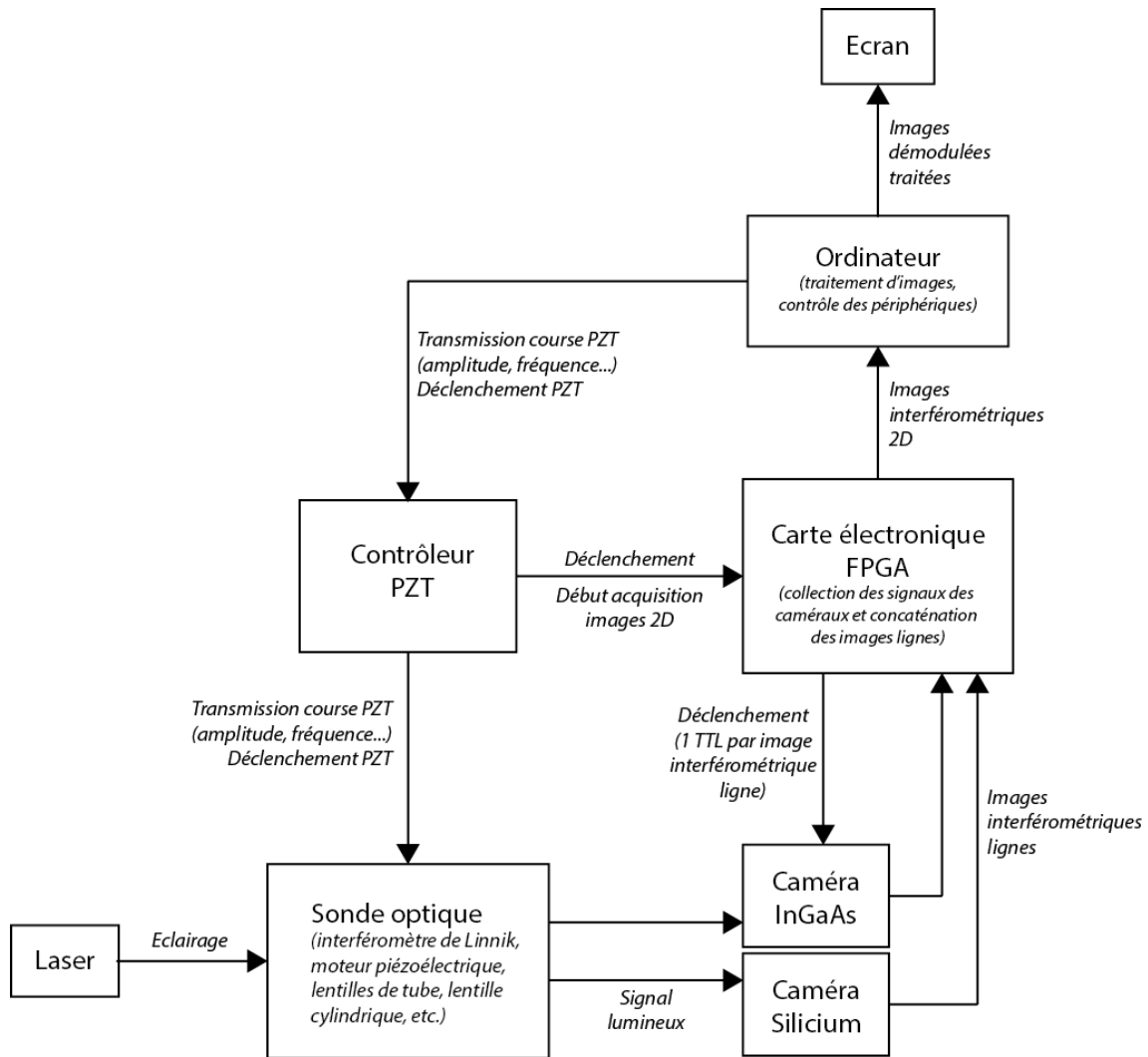


FIGURE 3.5 – Schéma fonctionnel du prototype de LC-OCT à deux bandes.

caméras doivent alors attendre un nouveau signal du contrôleur du moteur piézoélectrique pour reprendre une nouvelle acquisition. Le nombre de lignes dans une image correspond au nombre de pas de déphasage nécessaires pour atteindre la profondeur d'imagerie souhaitée. On a donc $700 \mu\text{m}/69.7 \text{ nm} = 10036$ lignes dans une image VIS et $700 \mu\text{m}/113 \text{ nm} = 6180$ dans une image IR.

3.3 Caractérisation du système

3.3.1 Bandes spectrales

Afin de caractériser le système, nous avons commencé par mesurer les spectres des deux bandes et ainsi évaluer les longueurs d'onde centrales et les largeurs spectrales. Le spectre détecté par la caméra correspond au spectre d'émission de la source, pondéré par les spectres de transmission et de réflexion des composants optiques rencontrés par le faisceau de lumière et finalement par la réponse spectrale du capteur. Il peut être calculé par transformée de Fourier de la figure d'interférence créée par un dioptre, dans notre cas il s'agit d'une interface entre une lame de verre et l'air. En effet, il est expliqué dans la sous-section 2.4.1 que le spectre et la réponse impulsionnelle du système sont liés par une transformée de Fourier.

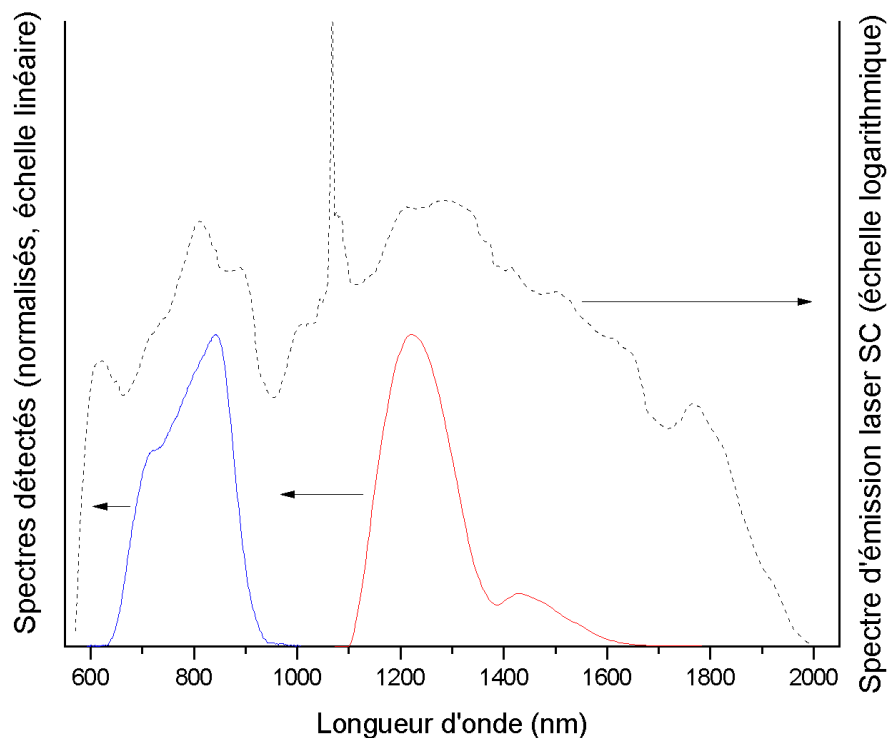


FIGURE 3.6 – Spectres détectés des bandes VIS (bleu) et IR (rouge) dérivés des figures d’interférence présentées en figure 3.7. Le spectre d’émission d’un laser supercontinuum (noir) est représenté. Un pic important à 1064 nm, qu’il convient de filtrer sous peine de fortement dégrader les images, est présent. Les spectres détectés sont affichés sur une échelle linéaire, tandis que le spectre du laser est affiché sur une échelle logarithmique.

La figure 3.6 représente les spectres obtenus de cette manière, ainsi que le spectre typique d’un laser supercontinuum à titre indicatif. Pour séparer spectralement les deux bandes avant détection on utilise un miroir dichroïque dont la longueur de coupure se situe à 950 nm. Un filtre coupant les longueurs d’onde inférieures à 1100 nm est placé dans la partie IR du faisceau d’éclairage de façon à supprimer le pic du laser à 1064 nm.

La longueur d’onde centrale λ_0 est définie comme le centre de masse de la densité spectrale de puissance $S(\lambda)$ et est exprimée comme suit :

$$\lambda_0 = \frac{\int_0^{\infty} \lambda S(\lambda) d\lambda}{\int_0^{\infty} S(\lambda) d\lambda} \quad (3.1)$$

Selon cette définition, on mesure des longueurs d’onde centrales à 770 nm et 1250 nm pour les bandes VIS et IR respectivement.

La largeur spectrale est évaluée à partir de l’écart-type σ_λ de la distribution spectrale de puissance défini de la façon suivante :

$$\sigma_\lambda^2 = \frac{\int_0^{\infty} (\lambda - \lambda_0)^2 S(\lambda) d\lambda}{\int_0^{\infty} S(\lambda) d\lambda} \quad (3.2)$$

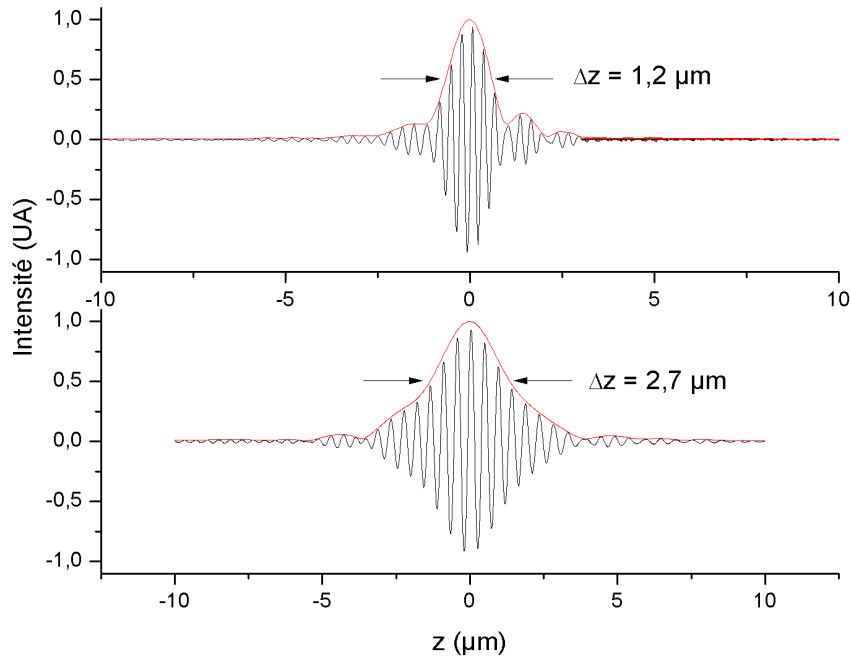


FIGURE 3.7 – Figures d’interférence expérimentales (normalisées) créées par une interface verre/air dans la bande VIS (a) et dans la bande IR (b).

Et la largeur spectrale :

$$\Delta\lambda = 2\sqrt{2\ln(2)}\sigma_\lambda \quad (3.3)$$

Les largeurs spectrales des bandes VIS et IR sont respectivement de 150 nm et 210 nm. À noter qu’avec cette définition, dans le cas d’un spectre gaussien, la largeur spectrale correspond à la largeur à mi-hauteur (FWHM) de la distribution spectrale. Cette définition est plus appropriée dans notre cas que la simple largeur à mi-hauteur en raison de la forme des spectres, en particulier celui de la bande IR qui présente un rebond non négligeable.

3.3.2 Résolution axiale

La largeur à mi-hauteur de l’enveloppe de la figure d’interférence créée par une interface définit la résolution axiale du système. En pratique, on utilise l’interface entre une lame de verre et de l’air. Pour cela, la figure d’interférence est aplatie de façon à supprimer la réflexion confocale de l’interface, et l’enveloppe est ensuite extraite selon la méthode proposée dans [66]. La résolution axiale a été mesurée à 1.2 μm dans la bande VIS, et 2.7 μm dans la bande IR. La figure 3.7 représente les figures d’interférence et leurs enveloppes.

La résolution axiale théorique, calculée en supposant un spectre de forme gaussienne dont la longueur d’onde centrale et la largeur à mi-hauteur sont supposées être les valeurs mesurées précédemment, donnent respectivement 1.3 μm et 2.4 μm. Le désaccord entre les résolutions théoriques et expérimentales dans les deux bandes peut être attribué à la forme non-gaussienne des spectres mesurés expérimentalement. La résolution axiale expérimentale est également en général dégradée par un écart résiduel de dispersion entre les bras de l’interféromètre. Dans le cas de la bande VIS, où la résolution expérimentale semble meilleure que la théorie, on peut mettre en cause la présence de rebonds non négligeables dans la figure d’interférence, aboutissant à une estimation optimiste de la résolution axiale lorsqu’elle est définie par la largeur à mi-hauteur.

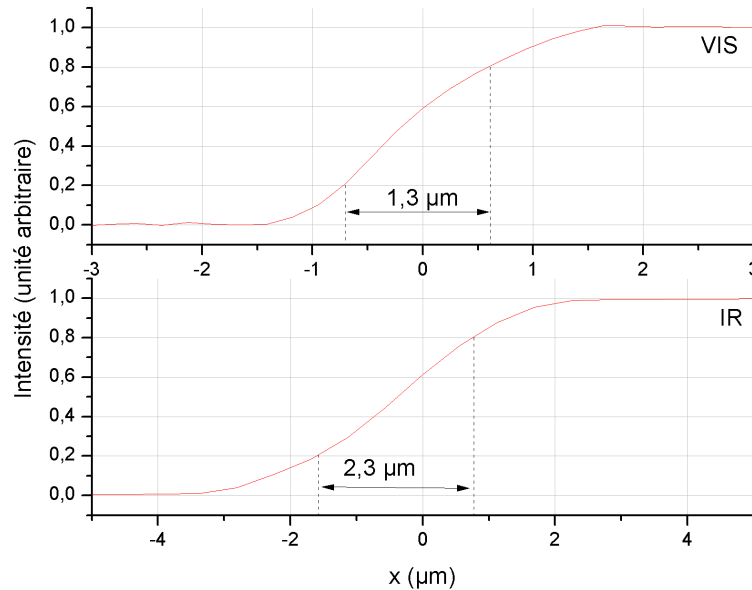


FIGURE 3.8 – Profils d’intensité expérimentaux créés par une lame fendue de silice fondue dans la bande VIS et dans la bande IR. L’écart entre les positions à 20 % et 80 % de l’intensité maximale du profil définit la résolution latérale.

3.3.3 Résolution latérale

La résolution latérale est quant à elle évaluée à partir du profil d’intensité d’un objet présentant un bord abrupt. Ces profils sont représentés en figure 3.8. On définit comme résolution latérale l’écart entre les positions à 20 % et 80 % de l’intensité maximale du profil. Les valeurs mesurées sont respectivement de $1.4 \mu\text{m}$ et $2.3 \mu\text{m}$ dans la bande VIS et la bande IR.

Ces valeurs sont cohérentes avec les longueurs d’onde centrales mesurées plus haut. En effet, le rapport des résolutions latérales est similaire au rapport des longueurs d’onde centrales, ce qui est attendu lorsque la résolution latérale est proportionnelle à la longueur d’onde (voir sous-section 2.4.2). En revanche, les valeurs obtenues ne sont pas aussi bonnes que ce qui est attendu dans le cas d’un système d’imagerie limité par la diffraction. En effet, ces valeurs théoriques sont respectivement de $1.0 \mu\text{m}$ et $1.6 \mu\text{m}$, ce qui correspond à une dégradation de 40 %. Cela pourrait vraisemblablement être expliqué par les aberrations optiques créés à cause de l’utilisation d’un liquide d’immersion différent de l’eau et de la présence d’une lame de verre dans le chemin des rayons lumineux entre l’objet et l’objectif.

Notons pour finir que la résolution latérale étant décorrélée de la résolution axiale, il a été possible d’obtenir une résolution spatiale quasi-isotrope dans les deux bandes sans recourir à des objectifs très ouverts.

3.3.4 Sensibilité

Les avantages de la LC-OCT en termes de sensibilité sont développés dans le chapitre 2. Pour rappel, l’éclairage et la détection selon une ligne, couplés à l’utilisation d’objectifs de microscope ayant une ouverture numérique relativement grande, permettent de rejeter une grande partie du signal incohérent, et donc d’augmenter la proportion de signal détecté réellement utile [67].

La sensibilité est définie comme le plus petit coefficient de réflexion détectable R_{min} . En pratique, la mesure se fait à partir d’une image contenant un objet de réflectivité connu, en général une interface entre deux milieux d’indices de réfraction connus. On mesure ensuite le niveau de bruit et, par une règle de trois, on en déduit un coefficient de réflexion équivalent qu’on assimile à R_{min} . Dans notre cas, l’objet imagé s’agit d’une interface entre du verre et une

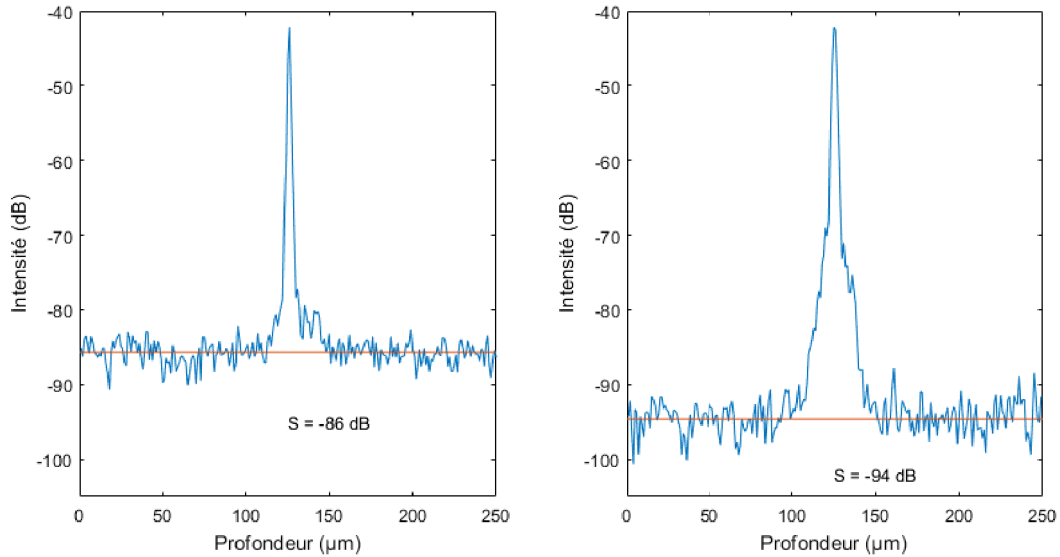


FIGURE 3.9 – Enveloppes des franges d’interférence en échelle logarithmique d’une interface verre/huile réfléchissant $\sim 8 \cdot 10^{-5}$. La valeur de la sensibilité est définie comme étant la moyenne du fond bruité de l’image.

huile dermoscopique commerciale ayant un coefficient de réflexion évalué à $\sim 8 \cdot 10^{-5}$. L’huile dermoscopique a été choisie pour son indice proche de celui de la peau afin de se rapprocher le plus possible des conditions réelles d’expérimentation. La sensibilité de détection a été évaluée à 86 dB dans la bande VIS, et à 94 dB dans la bande IR (voir figure 3.9).

L’efficacité du filtrage confocal étant ici établi dans les deux bandes, c’est essentiellement la capacité de charge des capteurs qui crée la différence de sensibilité entre les deux bandes. En effet, celui-ci est de $312500e^-$ pour la caméra Si alors qu’il est de $8.7 \cdot 10^6e^-$ pour le capteur InGaAs. Toutefois en ne prenant en compte que la capacité de charge, la différence devrait être de 14.4 dB. La différence mesurée est plus faible à cause d’un niveau de bruit électronique moyen des caméras InGaAs plus élevé [68].

Remarque

Les valeurs de sensibilité mentionnées dans la littérature peuvent parfois prêter à confusion et ne pas être tout à fait représentatives du système réel. Le fait d’imager une unique surface réfléchissante simule en réalité un filtrage confocal parfait, aucune lumière ne provenant de plans différents de celui de l’objet. Ainsi si on considère que $R_{inc} = 0$, l’expression de la plus petite réflexion détectable devient :

$$R_{min} = \frac{3\pi^2 R_{ref}}{128 N e_{sat}} \quad (3.4)$$

où R_{ref} est le coefficient de réflexion de la surface de référence, N le facteur d’accumulation, et e_{sat} la capacité de charge du capteur. Le coefficient R_{min} devient proportionnel à R_{ref} (l’optimum devenant dans ce cas $R_{ref} = R_{inc} = 0$). Contrairement au cas réel, où la diminution du coefficient R_{ref} peut avoir des effets dramatiques (voir figure 2.16), on peut ici améliorer artificiellement la sensibilité de détection. Pour être représentatif de la réalité, on choisit donc un coefficient R_{ref} tel qu’il soit proche de R_{inc} . C’est pour cela que nous choisissons une interface verre/eau réfléchissant $\sim 0.2\%$.

Bande spectrale	VIS	IR
Longueur d'onde centrale	770 nm	1250 nm
Largeur spectrale	150 nm	210 nm
Résolution axiale	1.2 μm	2.7 μm
Résolution latérale	1.3 μm	2.3 μm
Sensibilité de détection	86 dB	94 dB

TABLEAU 3.1 – Récapitulatif des caractéristiques du système de LC-OCT à deux bandes.

La bande IR, en plus de profiter de la réduction de la diffusion dans les échantillons biologiques, offre une meilleure sensibilité que la bande VIS. Cela permet d'atteindre des profondeurs allant de 700 μm à 800 μm dans la peau contre environ 400 μm pour la bande VIS.

3.3.5 Fusion des images

Les images dans les deux bandes sont acquises avec deux caméras linéaires différentes n'ayant pas le même champ de vue. Le capteur en Silicium a une largeur de 28.7 mm (2048 pixels de 14 μm), tandis que le capteur InGaAs mesure 25.6 mm de large (1024 pixels de 25 μm). Par conséquent, il est nécessaire de recalibrer les images afin de faire coïncider les champs de vue des deux capteurs et ainsi pouvoir comparer et fusionner les images des deux bandes. L'étape de recalage est faite grâce à une calibration du système en utilisant un objet de référence représenté en figure 3.10. Cet objet est constitué de fines lames de verre disposées en forme d'escalier dont les arêtes sont utilisées pour repérer précisément les points communs aux deux images. On peut alors, grâce à la correspondance entre ces points communs, calculer une transformation linéaire permettant aux pixels des deux images de correspondre aux mêmes longueurs dans l'espace objet. Finalement, les bords de l'image la plus large (celle de la bande VIS dans notre cas) sont rognés afin que les images aient exactement les mêmes dimensions. Le grandissement du système étant de 22.2, le champ de vue final du système dans l'espace objet est de 1.15 mm. La profondeur, déterminée par l'amplitude de la course du moteur piézoélectrique, est quant à elle de 0.7 mm.



Remarque

La figure 3.10 illustre également l'importance de l'adaptation des indices de l'immersion et de l'échantillon. En effet, les lignes horizontales créées par la surface des lames de verre apparaissent discontinues, ce qui n'est pas le cas en réalité. Cela vient du fait que certaines zones des lames inférieures sont recouvertes d'une ou plusieurs autres lames d'indice n_1 (à gauche de l'image), tandis que d'autres parties ne sont recouvertes que d'huile dermoscopique d'indice n_2 (à droite). Si $n_1 \neq n_2$ alors le plan de différence de marche nulle ne se situe pas à la même profondeur selon que l'on traverse du verre ou de l'huile. Le plan de cohérence étant le plan d'imagerie, car il s'agit du plan duquel les photons rétrodiffusés sont capables de créer des interférences, les surfaces des lames de verre apparaissent discontinues. La localisation en profondeur d'un objet peut donc être faussée par un écart d'indice entre le liquide d'immersion et l'échantillon.

Le tableau 3.1 récapitule les caractéristiques et performances du système dans les deux bandes.

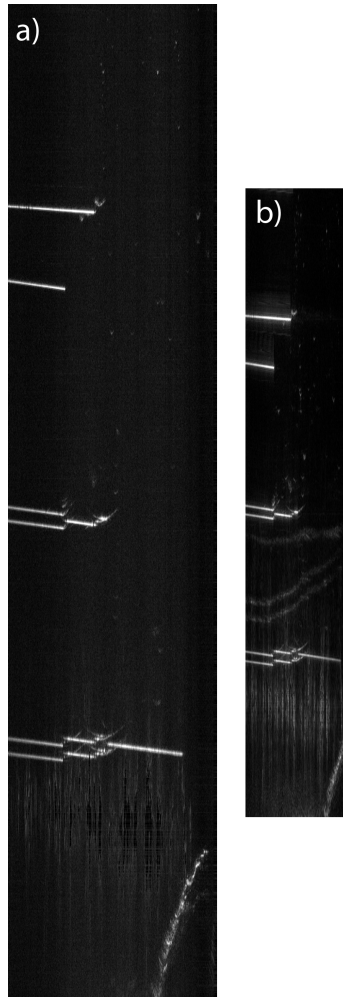


FIGURE 3.10 – B-scans avant redimensionnement d'un objet de calibration pour le recalage d'images. En largeur, un pixel de l'image correspond à un pixel de la caméra soit $14\ \mu\text{m}$ pour la bande VIS (a) et $25\ \mu\text{m}$ pour la bande IR (b). En profondeur, chaque pixel est espacé d'une distance correspondant à un déphasage de $\pi/2$, soit $69.7\ \text{nm}$ pour la bande VIS, et $113\ \text{nm}$ pour la bande IR. Les points communs aux deux images sont repérés grâce aux bordures nettes. En tout, une dizaine de points communs sont sélectionnés pour un recalage efficace.

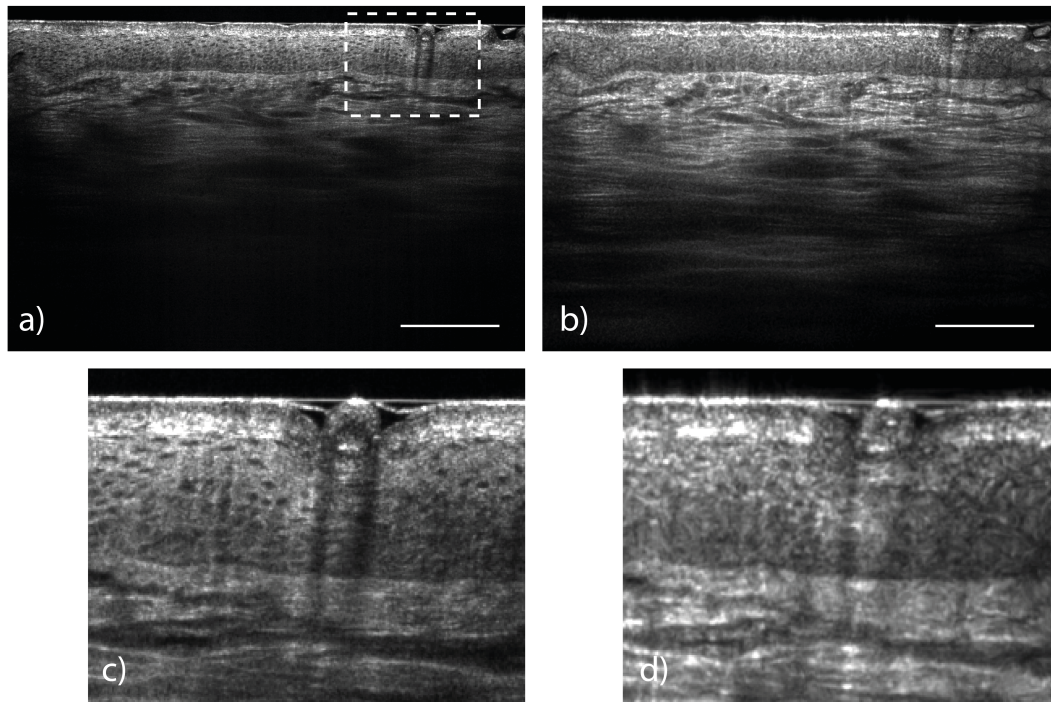


FIGURE 3.11 – B-scans *in vivo* de peau humaine (phototype II) acquis simultanément dans la bande VIS centrée à 770 nm (a) et dans la bande IR centrée à 1250 nm (b) à une fréquence de 4 images par seconde. (c) et (d) sont des images zoomées provenant des zones encadrées dans (a) et (b) respectivement. Barre d'échelle : 200 μm .

3.4 Applications à l'imagerie de la peau

3.4.1 Comparaison entre les bandes

Ce système a été utilisé pour l'imagerie de la peau. Des images *in vivo* de peau humaine sont présentées en figure 3.11. On constate tout d'abord que, dans les deux bandes, la profondeur est suffisante pour distinguer les deux couches les plus superficielles de la peau (l'épiderme et le derme) et que la jonction dermo-épidermique (JDE) est clairement visible. L'épiderme est divisé en différentes sous-couches : la couche cornée en surface composée de cellules mortes et responsable de la rugosité de la peau, la couche granuleuse, la couche épineuse contenant les kératinocytes dont les noyaux apparaissent comme des points noirs sur les images, la couche basale formée de cellules basales séparant l'épiderme du derme. Le derme est principalement composé de fibres de collagène et contient les vaisseaux sanguins.

L'image IR, comparée à l'image VIS, permet de significativement augmenter la profondeur de pénétration d'environ 400 μm à 700 μm et ainsi de capter plus d'informations provenant du derme profond. Cette capacité est intéressante, par exemple en dermatologie pour mieux évaluer les marges d'exérèse lors d'une intervention de chirurgie de Mohs, ou en dermo-cosmétique où il est parfois nécessaire de distinguer le derme papillaire du derme réticulaire, plus profond. Cependant, les figures 3.11c et 3.11d montrent que la résolution spatiale est dégradée dans la bande IR, en particulier lorsque l'on s'intéresse à la couche épineuse où les noyaux de cellules sont moins bien résolus.

Ce système a plus particulièrement été utilisé pour révéler la présence de mélanine en mettant en évidence des différences d'absorption entre la bande VIS et la bande IR. La mélanine est une molécule présente dans la peau, produite par les mélanocytes, qui est largement responsable de la coloration de la peau. Cette molécule est un absorbeur très efficace du rayonnement

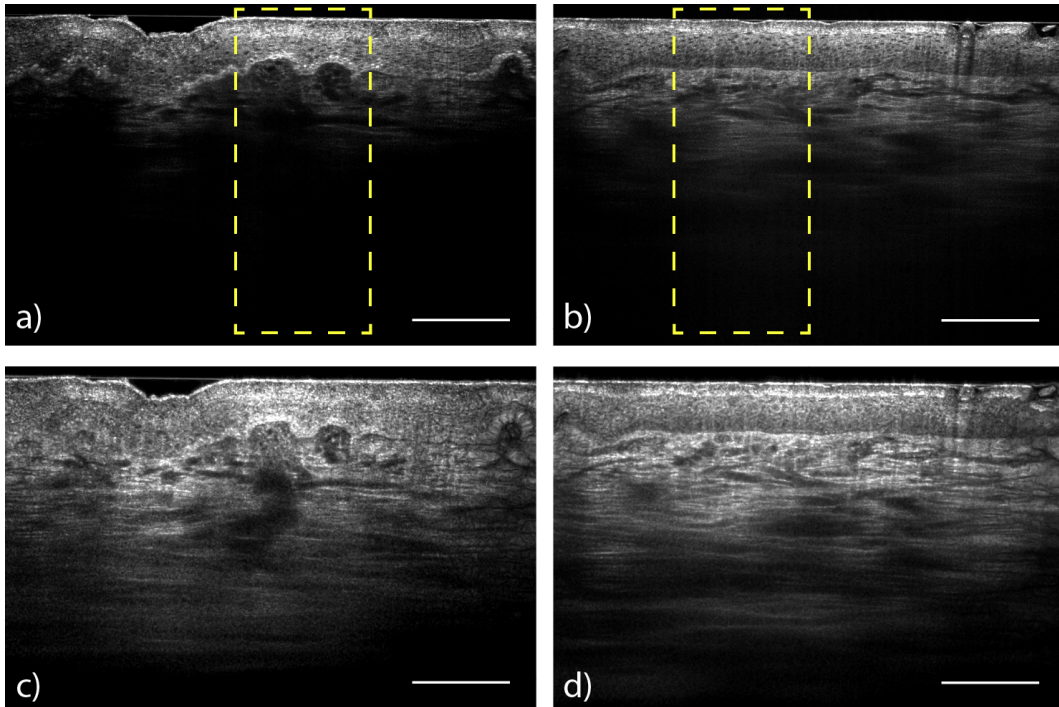


FIGURE 3.12 – B-scans *in vivo* de peau humaine (phototype VI) acquis simultanément dans la bande VIS centrée à 770 nm (a) et dans la bande IR centrée à 1250 nm (c) à une fréquence de 4 images par seconde. Les images (b) et (d) sont reprises de la figure 3.11 à titre de comparaison. Barre d'échelle : 200 μm .

ultraviolet mais son spectre d'absorption s'étend jusque dans le proche infrarouge. Étant donnée la décroissance exponentielle avec la longueur d'onde de l'absorption de la mélanine, les deux bandes du système devraient réagir différemment aux peaux concentrées en mélanine [69]. Cette capacité du système pourrait être mise à profit pour la détection de pathologies impliquant une forte concentration de mélanine comme le mélanome.

Pour cela deux personnes ont été imagées : un homme de 25 ans de phototype II³ (voir figure 3.11), et une femme de 20 ans de phototype VI. Les images acquises avec le système de LC-OCT à deux bandes sur l'individu de phototype VI sont présentées sur les figures 3.12a et 3.12c. À titre de comparaison, les images de l'individu de phototype II sont disposées à côté sur les figures 3.12b et 3.12d.

La mélanine, entre autres à cause de son fort indice de réfraction ($n = 1.7$ [70]), apparaît comme une couche brillante au niveau de la JDE [71]. Cette présence constitue le principal indicateur permettant de différencier les phototypes par une image de LC-OCT. On constate également une forte absorption dans la bande VIS caractérisée par la perte de signal dans le derme dans la figure 3.12a comparée à la figure 3.12b. La bande IR ne semble pas autant affectée par la présence de mélanine. Cette différence de comportement entre les deux bandes causée par la présence de mélanine est mise en évidence par les graphes en figure 3.13. Ces graphes comparent les profils en profondeur de l'intensité dans les deux bandes pour les individus de phototype II et VI. Ces profils sont le résultat de la moyenne des colonnes incluses dans les zones délimitées par les lignes pointillées sur la figure 3.12. Cela constitue environ 500 pixels pour la voie VIS et 250 pixels pour la voie IR.

3. Le phototype, ou classification de Fitzpatrick, permet de classer les individus en fonction de la réaction de leur peau lors d'une exposition au Soleil. Celui-ci peut aller de I, pour les peaux très claires et très sensibles à l'exposition solaire, à VI, pour les peaux très foncées et très résistantes au rayonnement ultraviolet.

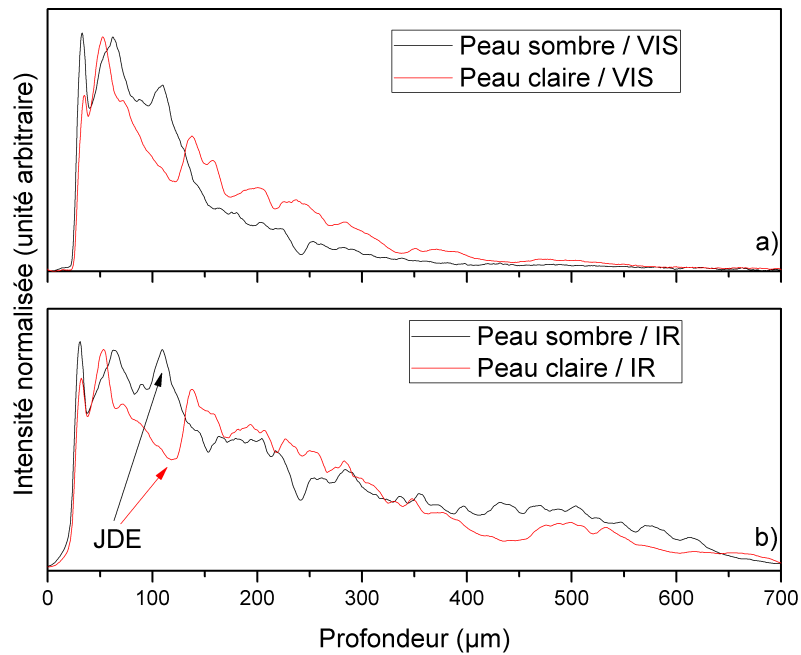


FIGURE 3.13 – Profils d’intensité en profondeur obtenus à partir des images présentées en figure 3.12. Ces profils comparent les profondeurs de pénétration dans la peau sombre et dans la peau claire pour la bande VIS (a) et la bande IR (b). La position de la JDE (jonction dermo-épidermique) est facilement repérable grâce aux pics causés par la présence de mélanine dans la peau sombre (flèche noire) et les creux pour la peau claire (flèche rouge) aux environs de 100 μm de profondeur. La profondeur de pénétration est substantiellement réduite pour la peau sombre dans la bande VIS (a) à cause d’une chute abrupte du profil d’intensité après la JDE. Sur le graphe (b), on remarque également une baisse de l’intensité après la JDE pour la peau sombre mais la profondeur de pénétration reste similaire à celle pour la peau claire. L’échelle d’intensité est identique à celle des images de LC-OCT présentées auxquelles on applique un facteur gamma de 0.25.

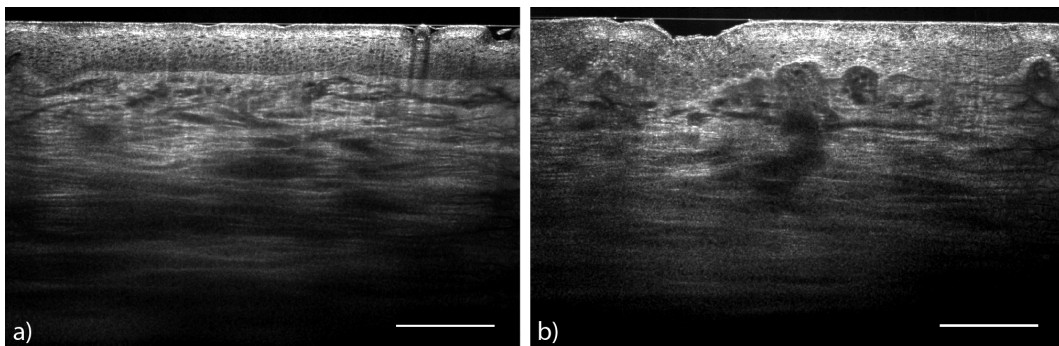


FIGURE 3.14 – (a) Images résultant de la fusion en niveau de gris des images de (a) peau claire (figure 3.11), et (b) de peau foncée (figure 3.12). Barre d’échelle : 200 μm .

3.4.2 Amélioration du ratio résolution/pénétration

Les images obtenues dans les deux bandes ont chacune leurs forces et leurs faiblesses. Il peut alors être intéressant de les associer afin de former une nouvelle image, en niveau de gris, combinant les avantages des deux images, à savoir la résolution en superficie de la bande VIS et la profondeur de pénétration de la bande IR.

La méthode la plus simple de fusion d'images en niveau de gris est l'addition des deux images. Cependant, cette méthode réduit la résolution en superficie car elle somme l'image VIS avec l'image IR moins résolue, et prend en compte l'image VIS en profondeur bien qu'elle n'apporte aucune information. Une méthode plus efficace mais toujours relativement simple consiste à sommer les deux images en appliquant un poids variable selon la profondeur d'imagerie. Un poids corrélé à la profondeur de pénétration de la bande VIS, c'est-à-dire plus fort pour l'image VIS en superficie et plus important pour l'image IR en profondeur, permet de mieux conserver les caractéristiques importantes de chaque image. Cette méthode a été utilisée pour produire les images présentées en figure 3.14. Les images obtenues présentent bien une résolution cellulaire en superficie et une profondeur de pénétration étendue.

On peut justifier l'utilisation de cette méthode utilisant la moyenne pondérée par la profondeur d'imagerie par le fait que l'image VIS affichera toujours une meilleure résolution en superficie, et y sera donc à privilégier, et que l'image IR pénétrera toujours plus en profondeur. Il se peut dans certains cas que la profondeur de pénétration ne soit pas uniforme sur toute la largeur de l'image. C'est le cas par exemple dans la figure 3.11 à cause de la présence d'un poil à la surface de la peau. Avec cette méthode, la zone sans signal sous le poil reste dans l'image fusionnée car l'image IR contribue peu au résultat final dans l'épiderme. Toutefois, cette limite peut être acceptable dans la mesure où la mise en exergue des différences entre les deux bandes étant plutôt du ressort de la fusion en couleur (voir sous-section 3.4.3).

Par ailleurs, le résultat de cette fusion étant une combinaison linéaire des deux images, le bruit de speckle peut être réduit dans une certaine mesure grâce à une méthode dite de *frequency compounding* (combinaison de fréquences en français) [72, 73, 74]. Le speckle est un bruit commun pour les méthodes d'imagerie cohérente. Ce bruit granulaire est dû à des interférences parasites entre différents diffuseurs. La figure de speckle créée n'est, malgré son apparence, pas aléatoire. Ainsi, elle ne peut pas être lissée par une simple moyenne temporelle, comme c'est le cas pour le bruit photonique par exemple. Les méthodes de *frequency compounding* combinent des images produites à différentes longueurs d'onde créant ainsi différentes figures de speckle qui peuvent alors être lissées grâce à une moyenne des différentes images obtenues. En pratique, cette méthode est légèrement différente de notre cas car il ne s'agit en général pas de combiner plusieurs spectres relativement larges, mais plutôt de diviser un spectre en plusieurs spectres plus étroits. La réduction du speckle se fait alors au prix d'une dégradation de la résolution axiale. De manière analogue au *frequency compounding* des méthodes de *spatial compounding* ou de *angular compounding* existent. Celles-ci consistent par exemple à déplacer légèrement le plan d'imagerie [75], ou à faire varier l'angle d'éclairage [76, 77]. On peut également utiliser tout simplement une source partiellement cohérente [78]. Enfin, l'analyse en ondelettes est également utilisée pour la réduction du bruit de speckle en OCT [79, 80]. Notons que dans le cas de la LC-OCT, et plus généralement de l'imagerie *in vivo*, une simple moyenne temporelle d'images successives permet de réduire dans une certaine mesure le bruit de speckle par *spatial compounding* grâce aux micro-mouvements internes à l'intérieur de l'échantillon durant l'acquisition.

Une autre méthode de fusion plus sophistiquée et basée sur la décomposition en ondelettes est aussi couramment utilisée, notamment pour la fusion d'images panchromatiques à haute résolution avec des images multispectrales à faible résolution [81, 82]. Par analogie à la transformée de Fourier permettant de décomposer un signal, ou une image dans notre cas, en une somme d'ondes infinies et délocalisées, c'est-à-dire sur une base de sinusoides, la transformée en ondelettes décompose une image sur une base d'ondes finies et localisées, appelées *ondelettes*. Les coefficients de la transformée en ondelettes sont obtenus par la translation de l'ondelette le

long du signal à analyser. Ainsi pour chaque point d'une image, on peut calculer un coefficient permettant de quantifier les fluctuations du signal en ce point. Cette opération peut être répétée avec une ondelette dilatée de façon à faire varier la précision sur la mesure des fluctuations du signal. En effet, en vertu du principe d'incertitude, l'analyse d'une image en ondelettes permet d'obtenir un compromis entre informations spatiales et informations spectrales, contrairement à la transformée de Fourier qui fournit une information purement fréquentielle. L'analyse par une ondelette très confinée affichera donc une bonne résolution spatiale mais une mauvaise résolution spectrale, et inversement. On peut donc dire schématiquement que la transformée en ondelettes permet d'analyser localement les fluctuations d'un signal.

En figure 3.15 est représentée la transformation en ondelettes d'une image de LC-OCT. La transformée en ondelettes se décompose en quatre parties : une qu'on appelle image approximative, et trois qu'on appelle images détaillées. Les trois images détaillées sont le résultat de la décomposition en ondelettes dans les directions horizontale, verticale, et diagonale. Lorsque la décomposition est amenée à un niveau supplémentaire celle-ci est effectuée sur l'image dite approximative. Cela revient à une contraction d'un facteur deux de l'ondelette et à ainsi analyser l'image avec une résolution spatiale plus fine. L'image originale peut finalement être retrouvée par l'opération inverse.

Avant cette reconstruction, il est possible de fusionner indépendamment les différentes décompositions des images VIS et IR. Les images "approximatives" et "détaillées" ne contenant pas le même type d'information, celles-ci pourraient être fusionnées selon des lois différentes de façon à conserver toutes les caractéristiques importantes tout en réduisant de manière maximale le bruit des images. Cette méthode de fusion basée sur les ondelettes n'a, à ce jour, pas donné de résultats significativement meilleurs que la moyenne pondérée par la profondeur. Il reste toutefois des pistes à explorer car il existe une multitude d'ondelettes pouvant être utilisées. Le nombre de couches dans la décomposition joue également un rôle important, qui n'a pas encore été tout à fait compris, dans le rendu final. Enfin, les images des bandes VIS et IR ayant des résolutions spatiales différentes, il peut être intéressant de décomposer ces images à des niveaux différents pour rendre compte de cette différence.

3.4.3 Amélioration du contraste et différenciation d'échantillons

Afin de mettre en évidence les différences des propriétés spectroscopiques de l'échantillon entre les deux bandes, des images en couleur ont été créées en utilisant l'espace de couleur RVB. Le résultat de la fusion en couleur pour les images en figures 3.11 et 3.12 est présenté dans la figure 3.16. La couleur rouge est assignée à la bande IR, tandis que la couleur verte est assignée à la bande VIS. Les images sont préalablement lissées par un filtre gaussien pour corriger les écarts de résolution entre les images et réduire le bruit haute fréquence. Cette correction est nécessaire pour éviter, par exemple, que la bande IR soit mise en évidence autour de structures bien résolues dans la bande VIS parce que la bande IR "déborde" autour en raison de sa moins bonne résolution.

Les zones où la bande VIS prédomine en termes de diffusion apparaissent en vert, les zones où la bande IR prédomine apparaissent en rouge, tandis que celles où elles sont équivalentes apparaissent en jaune. Les zones où rien n'est rétrodiffusé restent sombres. En effet, avec cette méthode, la brillance d'un pixel dépend de l'intensité des images individuelles. Par conséquent, l'image en couleur est, en intensité, équivalente à la somme pixel à pixel des deux images individuelles.

Pour la peau claire (figure 3.16a), l'épiderme apparaît principalement jaune car les deux bandes y sont équivalentes. Le derme, quant à lui, affiche un gradient de couleur de l'orange clair au rouge, conformément à l'évolution de la diffusion avec la longueur d'onde. Pour la peau sombre, la bande VIS est presque entièrement absorbée lors du passage à travers la JDE. Par conséquent, la fusion en couleur (figure 3.16b) présente une nette segmentation de couleur entre l'épiderme (vert-jaune) et le derme (rouge).

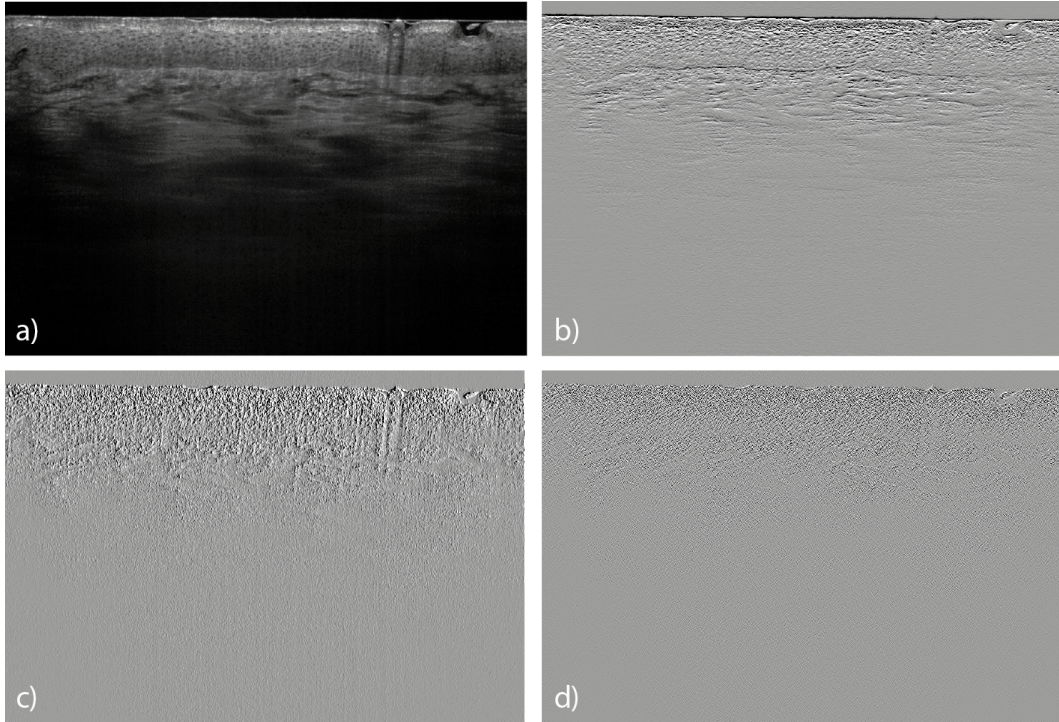


FIGURE 3.15 – Décomposition en ondelettes d’une image de peau acquise par un système de LC-OCT (voir figure 3.11). (a) coefficients approximatifs, (b) coefficients détaillés dans la direction horizontale, (c) coefficients détaillés dans la direction verticale, (d) coefficients détaillés dans la direction diagonale.

Cette méthode de fusion des images en couleur pourrait fournir un outil utile pour l’amélioration du contraste et la mise en évidence d’information spectroscopique. Cependant, l’interprétation des images en couleur peut s’avérer difficile, en particulier en profondeur. En effet, le spectre de la lumière rétrodiffusée dépend fortement de l’absorption et de la diffusion des couches superficielles à travers lesquelles la lumière doit d’abord passer. Par exemple, à cause de la dépendance avec la longueur d’onde de l’efficacité de diffusion, un décalage vers le rouge se produit naturellement au fur et à mesure que la lumière pénètre dans l’échantillon [83]. L’information provenant du derme dans l’image fusionnée doit être interprétée en conséquence afin d’éviter tout contresens. La différence entre les résolutions spatiales dans les deux bandes peut également mener à des erreurs lorsque l’on s’intéresse aux structures présentant des hautes fréquences spatiales. Pour corriger cet effet les images sont lissées, ce qui dégrade la résolution de l’image finale jusqu’à au moins la résolution spatiale de la bande IR.

3.5 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons adressé le problème du choix de la longueur d’onde qui est important dans la conception d’un dispositif de LC-OCT selon que l’on privilégie la résolution ou la profondeur de pénétration. Nous avons présenté dans ce chapitre un dispositif de LC-OCT à deux bandes permettant de dépasser dans une certaine mesure ce compromis entre résolution et profondeur de pénétration. En effet, avec une bande centrée autour de 770 nm nous avons pu acquérir des images avec une forte résolution ($1.2\ \mu\text{m} \times 1.3\ \mu\text{m}$, axial \times latéral) mais une profondeur de pénétration limitée à environ 400 μm . L’utilisation d’une deuxième bande spectrale centrée autour de 1250 nm permet d’étendre la profondeur de pénétration à environ 700 μm mais au prix d’une dégradation de la résolution ($2.7\ \mu\text{m} \times 2.3\ \mu\text{m}$, axial \times latéral). En

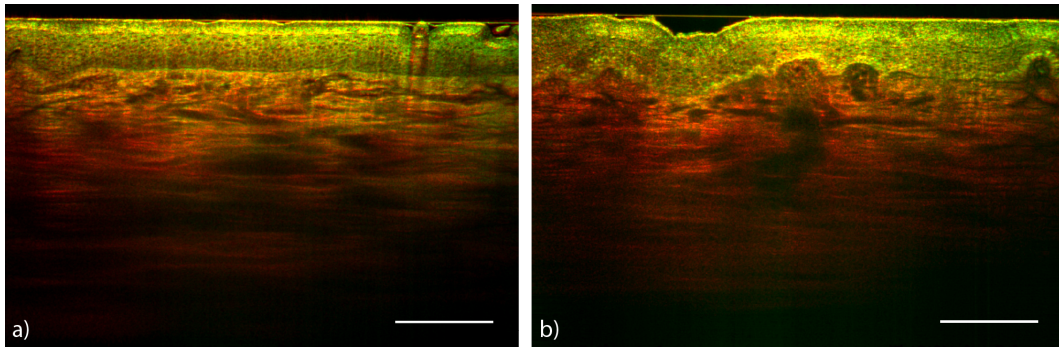


FIGURE 3.16 – Image en couleur dans l’espace RVB où l’on a assigné la couleur rouge à l’image IR et la couleur verte à l’image VIS pour les individus de phototype II (a) et de phototype VI (b).

fusionnant les deux images, il est possible de créer une image présentant à la fois une bonne résolution dans les zones superficielles et une grande profondeur de pénétration.

Par ailleurs, grâce à une représentation en couleurs mêlant les deux images, il a été possible d’apporter du contraste aux images et de mettre en évidence des propriétés spectroscopiques des échantillons, notamment concernant la mélanine. La quantité d’informations obtenues est toutefois limitée en raison du fait que l’on n’utilise que deux bandes spectrales. Malgré une certaine complexification du montage instrumental, il peut donc être intéressant de développer un dispositif de LC-OCT à trois bandes. Cela permettrait en outre d’obtenir trois images correspondant aux trois canaux de l’espace de couleur RVB. La bande supplémentaire pourrait alors être à des longueurs d’onde plus grandes autour de 1600 nm comme dans [84] et permettrait d’atteindre des zones plus profondes grâce au minimum local d’absorption de l’eau dans cette zone du spectre [85].

Il est toutefois possible qu’en raison d’aberrations chromatiques trop fortes nous soyons dans l’obligation d’utiliser des objectifs de microscope en réflexion [65]. Cependant, les objectifs à miroir ne sont en général pas compatibles avec l’utilisation d’un liquide d’immersion qui est pourtant crucial pour le bon fonctionnement du système. De plus, la longueur d’onde centrale étant grande il serait nécessaire de travailler avec une large bande spectrale pour maintenir une résolution correcte. Toutefois, comme nous l’avons vu, l’utilisation d’une bande spectralement large augmente le risque d’un écart de dispersion entre les bras objet et référence de l’interféromètre, ce qui dégrade inévitablement la résolution en profondeur. Travailler avec un spectre situé entre 500 nm et 700 nm comme certains dispositifs d’OCT [86], pourrait alors être une meilleure option. D’une part, une caméra au Silicium pourrait être utilisée au lieu d’une caméra InGaAs dont le prix est souvent élevé. D’autre part, une bonne résolution pourrait être obtenue sans recourir à un spectre large. Cependant, la faible profondeur de pénétration dans la peau pourrait alors restreindre l’analyse des images en couleurs contenant les informations spectroscopiques à l’épiderme, limitant ainsi l’intérêt d’un dispositif à trois bandes.

Chapitre 4

Dispositif de LC-OCT couplé à la microscopie Raman

Sommaire

4.1	Introduction	92
4.2	La diffusion Raman	93
4.2.1	Interprétation quantique de l'effet Raman	93
4.2.2	Interprétation classique de l'effet Raman	95
4.3	Spectroscopie Raman	97
4.3.1	Spectre Raman	97
4.3.2	Instrumentation	99
4.4	Dispositif de LC-OCT couplé à la spectroscopie Raman	104
4.4.1	Montage expérimental	104
4.4.2	Effet de l'ouverture numérique	107
4.4.3	Calibration et acquisition des spectres	108
4.5	Résultats	111
4.5.1	Résolution spatiale	111
4.5.2	Spectre Raman de la peau	112
4.5.3	Différentiation entre l'épiderme et le derme	114
4.6	Conclusion	115

4.1 Introduction

La diffusion Raman a été découverte en 1928 par Sir Chandrasekhara Venkata Raman et Sir Kariamanickam Srinivasa Krishnan [87, 88]. Celle-ci se différencie de la diffusion dite de Rayleigh en ce que la lumière est diffusée à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde incidente. On dit que la diffusion est inélastique. La spectroscopie Raman est une méthode de spectroscopie tirant profit de l'effet Raman, et a commencé à véritablement être utilisée pour des examens de routine avec l'apparition du laser. Plus récemment, il a été montré que la spectroscopie Raman pouvait être utilisée pour le diagnostic du cancer cutané avec de bonnes sensibilités et spécificités [89], notamment pour la distinction entre mélanocytes et mélanomes [90]. Toutefois, la spectroscopie Raman reste difficile à utiliser pour des échantillons biologiques *in vivo*, principalement en raison de la faible puissance d'émission de la diffusion inélastique comparée aux autres processus radiatifs. Nous nous intéresserons ici spécialement à la microscopie confocale Raman, qu'on abrégera souvent en microscopie Raman, qui est un dispositif de spectroscopie Raman couplée à la microscopie confocale.

Dans ce chapitre nous présentons un prototype couplant la LC-OCT avec la microscopie Raman dans le but d'améliorer la précision de diagnostic des cancers de la peau. Le couplage peut alors être vu de deux manières différentes. D'une part, on peut voir l'ajout de la modalité Raman comme un moyen de confirmer ou d'infirmer un diagnostic réalisé grâce à la LC-OCT. En effet, la LC-OCT permet d'acquérir des images d'une qualité suffisante pour diagnostiquer un grand nombre de cas mais, comme toute modalité de diagnostic, elle reste imparfaite. La microscopie confocale Raman peut atteindre de grandes sensibilités et spécificités et permettrait ainsi de lever d'éventuels doutes. D'autre part, on peut voir la LC-OCT comme un viseur pour la microscopie Raman. En effet, la microscopie Raman est efficace quand l'analyse est ponctuelle [89]. Les dispositifs commerciaux de spectroscopie Raman pour l'analyse d'échantillons *in vivo* éclairent en général l'échantillon sur une large surface dans laquelle on suspecte la présence d'une lésion. La zone d'éclairage peut alors mesurer jusqu'à plusieurs millimètres de diamètre. Ainsi, le signal caractéristique de la lésion est noyé dans le signal des tissus environnants sains. La précision de tels dispositifs chute considérablement comparé à un microscope confocal focalisant précisément sur la lésion. Dans [91], les auteurs présentent un tel dispositif dont l'avantage est d'acquérir des spectres rapidement. En effet, analyser un échantillon dans sa totalité en microscopie confocale nécessite un balayage qui est coûteux en temps. Cela est d'autant plus vrai en microscopie Raman où la faible puissance d'émission du signal Raman requiert de longs temps d'intégration. Bien que plus rapide, le système présenté dans [91] atteint une sensibilité entre 95 % et 98 % avec une spécificité chutant entre 15 % et 54 %.

La LC-OCT, en offrant des images morphologiques de bonne qualité, pourrait alors permettre d'identifier au sein de l'échantillon les zones d'intérêt à analyser par spectroscopie Raman. Ainsi, il serait possible d'obtenir un signal Raman "pur" ne contenant aucun autre signal provenant des tissus sains alentours tout en limitant le temps d'acquisition total en n'analysant que les points d'intérêt identifiés grâce à la LC-OCT.

Des tentatives de couplage ont déjà été initiées entre la spectroscopie Raman et différentes techniques d'imagerie optique comme l'OCT [92, 93]. Cependant, la relativement faible ouverture numérique des objectifs utilisés en OCT conventionnelle n'est pas optimale pour la collection du faible signal Raman. La microscopie confocale en réflectance a également été utilisée comme guide pour l'acquisition en spectroscopie Raman [94, 95]. En revanche, les limites de l'imagerie confocale en termes de pénétration dans les tissus épithéliaux reste un sérieux handicap. Nous pensons donc que combiner la microscopie Raman à la LC-OCT pourrait créer un outil efficace pour la détection précoce des cancers de la peau, y compris le mélanome. En effet, la LC-OCT offre une meilleure profondeur de pénétration que la microscopie confocale et permet l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique, ce qui permet d'optimiser à la fois la résolution latérale et la collection de signal Raman.

4.2 La diffusion Raman

Quand un rayon de lumière traverse un milieu, une partie de l'énergie lumineuse est diffusée par le milieu. Le rayonnement diffusé a en grande majorité la même longueur d'onde que le rayonnement incident. Ainsi l'énergie des photons est conservée. On parle alors de *diffusion élastique* ou *diffusion Rayleigh*. Le spectre du rayonnement diffusé possède, en plus d'une raie à la fréquence d'excitation, des raies à des fréquences discrètes au-delà et en-deçà de la fréquence du rayonnement incident : c'est la *diffusion inélastique* ou *diffusion Raman*. Dans cette section, nous présentons le phénomène de diffusion inélastique selon une interprétation quantique et une interprétation classique.

4.2.1 Interprétation quantique de l'effet Raman

L'apparition de l'effet Raman, c'est-à-dire d'une diffusion de la lumière avec changement de la longueur d'onde, peut s'expliquer dans les grandes lignes par la théorie quantique de la lumière. Le rayonnement de fréquence ν est ici considéré comme un flux de photons d'énergie $h\nu$ où h est la constante de Planck. Ces photons, lorsqu'ils traversent un milieu, entrent en collision avec des molécules. Si ces collisions sont parfaitement élastiques, c'est-à-dire qu'elles se produisent sans transfert d'énergie, alors les photons sont déviés avec la même énergie. Ainsi, le rayonnement diffusé conserve sa fréquence. On est alors dans le régime de la diffusion Rayleigh. La diffusion élastique des photons peut être comparée à une bille frappant une surface rigide sur laquelle elle peut rebondir sans aucune perte d'énergie.

Il est toutefois possible que de l'énergie soit transférée lors de la collision entre le photon et la molécule. Une telle collision est dite *inélastique*. La molécule peut alors gagner ou perdre de l'énergie selon les lois de la mécanique quantique, c'est-à-dire que le transfert d'énergie ΔE doit correspondre à l'écart d'énergie entre deux états quantiques autorisés. La grandeur ΔE représente alors la variation de l'énergie vibrationnelle et/ou rotationnelle de la molécule lors de la collision. Si la molécule gagne de l'énergie lors de la collision, le photon est dévié avec une énergie $h\nu - E$ et l'onde diffusée rayonne à une fréquence $\nu - E/h$. Inversement, si la molécule perd de l'énergie, la fréquence de l'onde diffusée est de $\nu + E/h$. Pour reprendre l'analogie du paragraphe précédent, la diffusion inélastique peut être schématiquement représentée par une bille frappant un tambour. D'une part, si le tambour est immobile alors il se mettra à osciller à une certaine fréquence lorsqu'il sera frappé par la bille. Par conséquent, la bille sera réfléchiée avec une énergie plus faible car une partie de son énergie initiale est transmise au tambour. D'autre part, si le tambour est déjà en mouvement et que le moment où la bille atteint le tambour coïncide avec la bonne phase de l'oscillation du tambour, la bille sera comme "catapultée" et elle rebondira avec une énergie supérieure à son énergie de départ.

Les trois régimes de diffusion possibles lors de la diffusion sont représentés sur le diagramme de Jablonski en figure 4.1. On distingue deux cas lors de la diffusion Raman. Le rayonnement peut, d'une part, être diffusé avec une fréquence plus faible que le rayonnement incident. On parle alors de *décalage Stokes*, ce qui correspond à un transfert d'énergie du photon vers la molécule. Inversement, on parle de *décalage anti-Stokes* lorsque la fréquence du rayonnement diffusé est supérieure à la fréquence du rayonnement incident. La diffusion Raman Stokes implique un gain d'énergie de la molécule, ce qui la rend en théorie toujours possible tant que les règles de sélection sont respectées. La diffusion Raman anti-Stokes est quant à elle plus rare car elle requiert une perte d'énergie de la part de la molécule, qui doit alors déjà être dans un état vibrationnel/rotationnel excité au moment de la collision. Par conséquent, les raies Stokes apparaîtront toujours plus intenses que les raies anti-Stokes dans un spectre de diffusion. Cependant, la diffusion à une fréquence différente de la fréquence d'excitation reste dans l'ensemble extrêmement faible par rapport à la diffusion Rayleigh. Afin de détecter les raies Raman d'un spectre, il est donc nécessaire d'utiliser un appareil très sensible et de filtrer la longueur d'onde excitatrice.

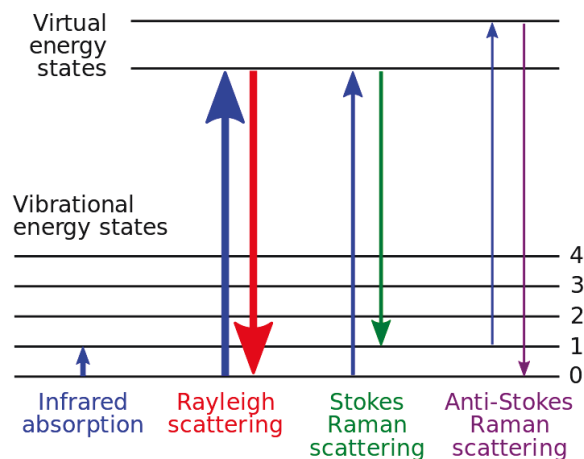


FIGURE 4.1 – Diagramme de Jablonski des niveaux d'énergie impliqués dans la diffusion Raman, la diffusion Rayleigh, et la diffusion infrarouge. L'épaisseur des lignes représente qualitativement l'intensité de chaque processus. Dans le cas de la diffusion Raman Stokes, la molécule est initialement dans l'état d'énergie fondamentale et se relaxe à un état vibrationnel excité, ce qui correspond à un gain d'énergie pour la molécule et une perte d'énergie pour le photon. Pour la diffusion Raman anti-Stokes, la molécule est déjà dans un état vibrationnel excité, ce qui est plus rare, et elle se relaxe directement à l'état fondamental. Toutefois, c'est la diffusion Rayleigh, n'impliquant aucun échange d'énergie entre la molécule et le photon, qui prédomine. Une transition impliquée dans la spectroscopie IR est également représentée à titre indicatif car elle est souvent associée à la spectroscopie Raman. La spectroscopie IR utilise un rayonnement situé dans l'IR moyen et donc peu énergétique. Seules les faibles transitions entre états vibrationnels sont donc possibles. La fluorescence n'est pas représentée mais elle diffère de ces phénomènes en ce que le photon est réellement absorbé et la molécule passe par un état électronique d'énergie supérieure, avant de se désexciter vers l'état d'énergie initial en émettant un photon. Tiré de <https://www.wikipedia.org/>.

4.2.2 Interprétation classique de l'effet Raman

Pour l'interprétation classique de l'effet Raman, nous nous intéresserons à la polarisabilité des molécules. Quand une molécule est placée dans un champ électrique, les particules chargées qui la constituent se déplacent. Cela peut alors séparer le barycentre des charges positives et négatives et créer un moment électrique dipolaire induit. La molécule est alors dite *polarisée*. La norme du moment dipolaire p dépend de l'amplitude de l'onde incidente E et de la capacité de la molécule à se polariser, c'est-à-dire la polarisabilité α :

$$p = \alpha E \quad (4.1)$$

Si la molécule est soumise à un rayonnement monochromatique $E = E_0 \cos(2\pi\nu t)$ alors le dipôle induit subit également des oscillations à la fréquence ν :

$$p = \alpha E_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (4.2)$$

Un tel dipôle rayonne également un champ électrique induit à la fréquence ν . L'équation 4.2 permet donc de décrire le phénomène de la diffusion Rayleigh.

Supposons maintenant que la molécule subisse des modifications périodiques de sa polarisabilité par des vibrations et/ou des rotations. La polarisabilité de la molécule se met alors sous la forme suivante :

$$\alpha = \alpha_0 + \beta \sin(2\pi\nu_{int} t) \quad (4.3)$$

où α_0 est la polarisabilité à l'équilibre, β représente l'amplitude de l'évolution de la polarisabilité, et ν_{int} est la fréquence à laquelle les mouvements internes de la molécule font varier la polarisabilité. On a donc un moment dipolaire induit comme suit :

$$p = (\alpha_0 + \beta \sin(2\pi\nu_{int} t)) E_0 \cos(2\pi\nu t) \quad (4.4)$$

En développant l'expression et en utilisant des relations trigonométriques on trouve finalement :

$$p = \alpha_0 E_0 \cos(2\pi\nu t) + \frac{1}{2} \beta E_0 [\cos(2\pi(\nu - \nu_{int})t) - \cos(2\pi(\nu + \nu_{int})t)] \quad (4.5)$$

Ainsi, en plus de la fréquence d'excitation ν , le dipôle oscillant possède des composantes fréquentielles à $\nu - \nu_{int}$ et $\nu + \nu_{int}$, correspondant aux raies Raman Stokes et anti-Stokes respectivement.

Pour que l'effet Raman puisse se produire, il est donc nécessaire que les vibrations et/ou rotations en jeu provoquent une variation de la polarisabilité. C'est en général le cas pour des molécules n'ayant pas ou peu de symétries. En revanche, il arrive souvent, pour des molécules hautement symétriques, que des vibrations ne causent aucun changement de polarisation.

La polarisabilité d'une molécule est souvent représentée par un ellipsoïde dont la distance au centre vaut $1/\sqrt{\alpha}$. La surface est un ellipsoïde car la polarisabilité n'est pas la même dans toutes les directions. Pour une molécule diatomique comme le dihydrogène, il est plus facile de déplacer les charges électriques grâce un champ électrique colinéaire à la liaison covalente entre les deux atomes, qu'avec un champ électrique orthogonal. L'ellipsoïde de polarisabilité du dihydrogène a donc une forme de sphère aplatie dans la direction de la liaison moléculaire car c'est dans cette direction que la polarisabilité est la plus forte.

Prenons maintenant l'exemple de la molécule d'eau dont on a représenté les ellipsoïdes de polarisabilité ainsi que les trois modes vibrationnels fondamentaux en figure 4.2. Premièrement, nous avons l'étirement symétrique où les atomes d'hydrogène s'éloignent ou se rapprochent de manière symétrique de l'atome d'oxygène. On comprend intuitivement qu'il devient plus facile de polariser la molécule d'eau lorsque les liaisons sont étirées que lorsqu'elles sont comprimées. Ce mouvement induit bien une variation de la polarisabilité de l'eau et est donc dite *active en Raman*. Le mouvement de flexion cause, quant à lui, des variations dans la forme de l'ellipsoïde.

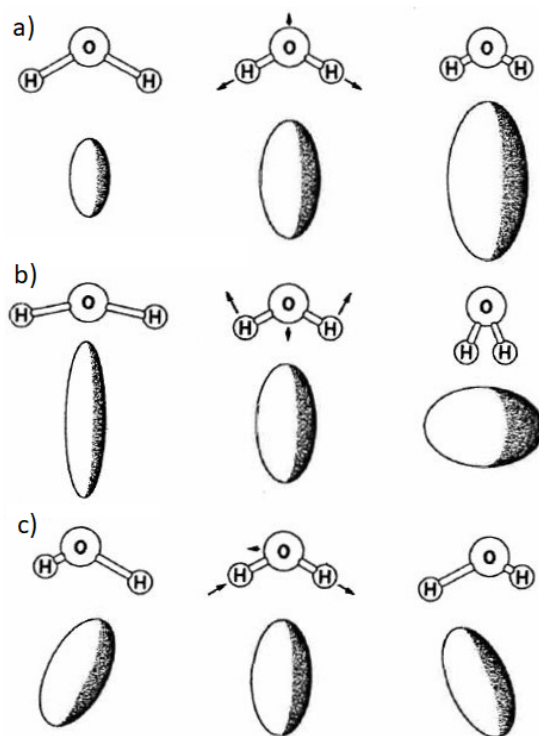


FIGURE 4.2 – Ellipsoïdes de polarisabilité de l'eau pour différents modes vibrationnels : (a) étirement symétrique, (b) flexion, (c) étirement asymétrique [96].

Enfin, l'étirement asymétrique induit une inclinaison de l'ellipsoïde sans changer sa forme ni son amplitude. Tous ces mouvements provoquent, chacun à leur manière, des changements dans la polarisabilité de la molécule. Elles sont donc toutes actives en Raman.

Le dioxyde de carbone possède, comme l'eau, deux atomes identiques liés à un atome central à la différence que ceux-ci sont arrangés de manière linéaire. Ses trois modes vibrationnels fondamentaux et leurs ellipsoïdes sont représentés en figure 4.3. Tout comme pour l'eau, l'étirement symétrique implique un changement d'amplitude de l'ellipsoïde et est donc active en Raman. Il est en effet plus facile de polariser la molécule lorsque les atomes d'oxygène sont éloignés de l'atome de carbone. Le mouvement de flexion, qu'il se fasse dans un sens ou dans l'autre, entraîne la même variation de la polarisabilité. Celle-ci peut être négative ou positive (elle est positive) mais elle se fait en tous cas dans le même sens et de manière symétrique. Par conséquent, la dérivée, et donc la variation, de la polarisabilité en fonction du déplacement causé par la flexion est nulle autour de la position d'équilibre. On a donc affaire à un mode vibrationnel inactif en Raman. Il en va de même pour l'étirement asymétrique : que l'étirement se fasse dans un sens ou dans l'autre, la polarisabilité varie de manière symétrique. La variation de la polarisabilité est nulle autour de la position d'équilibre et la vibration est inactive en Raman.

De manière générale, les vibrations symétriques donnent lieu à des raies Raman intenses alors que les vibrations asymétriques, même si elles sont théoriquement actives, sont souvent faibles et parfois inobservables. La spectroscopie Raman est souvent associée à la spectroscopie infrarouge grâce au principe d'exclusion mutuel stipulant que pour une molécule présentant une symétrie, les modes vibrationnels inactifs en spectroscopie Raman sont actifs en spectroscopie IR et inversement. Il faut toutefois nuancer cette règle car un mode vibrationnel actif en Raman n'est pas nécessairement observable.

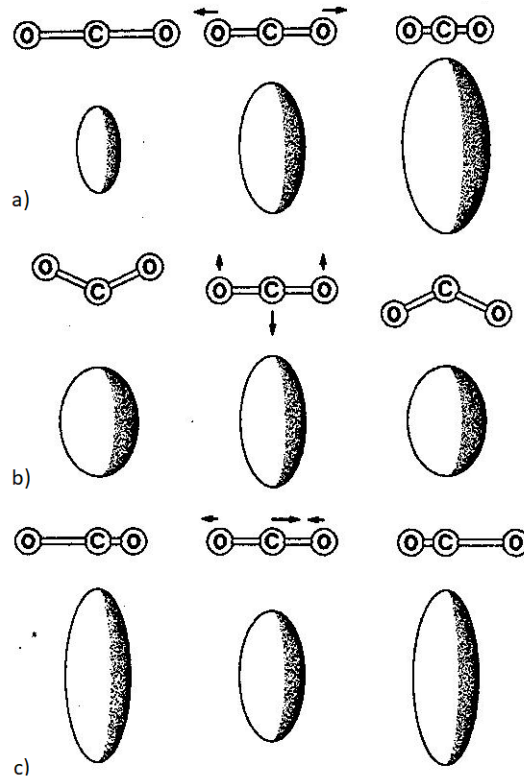


FIGURE 4.3 – Ellipsoïdes de polarisabilité du dioxyde de carbone pour différents modes vibrationnels : (a) étirement symétrique, (b) flexion, (c) étirement asymétrique [96].

4.3 Spectroscopie Raman

La spectroscopie Raman est une technique de spectroscopie mettant à profit le phénomène de diffusion Raman. Elle est en outre utilisée pour l'analyse de composés chimiques par identification des liaisons chimiques présentes. On dit que la spectroscopie Raman mesure l'empreinte digitale des molécules. Nous décrirons ici un système de microscopie confocale Raman.

4.3.1 Spectre Raman

Un échantillon éclairé par une onde monochromatique diffuse la lumière de manière élastique et inélastique. Comme nous l'avons vu, la diffusion inélastique est due aux vibrations des liaisons chimiques causées par une onde électromagnétique incidente. Chaque liaison chimique d'une molécule est donc susceptible d'être à l'origine d'ondes diffusées avec un certain écart de fréquence par rapport à l'onde incidente. Le spectre Raman représente donc l'ensemble des fréquences des ondes diffusées de manière inélastique.

L'écart entre l'onde diffusée et l'onde incidente est un écart en énergie. On n'utilise donc pas une représentation du spectre en fonction de la longueur d'onde, qui est inversement proportionnelle à l'énergie de l'onde. Traditionnellement, on utilise une représentation du spectre Raman selon le nombre d'onde σ . On appelle alors *décalage Raman*, l'écart $\Delta\sigma$ entre les nombres d'onde de l'onde excitatrice et de l'onde diffusée, exprimé en cm^{-1} et donné par la formule suivante :

$$\Delta\sigma = \frac{1}{\lambda_{ex}} - \frac{1}{\lambda_{em}} \quad (4.6)$$

où λ_{ex} est la longueur d'onde d'excitation et λ_{em} est la longueur d'émission de l'onde diffusée. Le décalage Raman $\Delta\sigma$ correspond à une énergie ΔE prélevée ou ajoutée à l'onde incidente

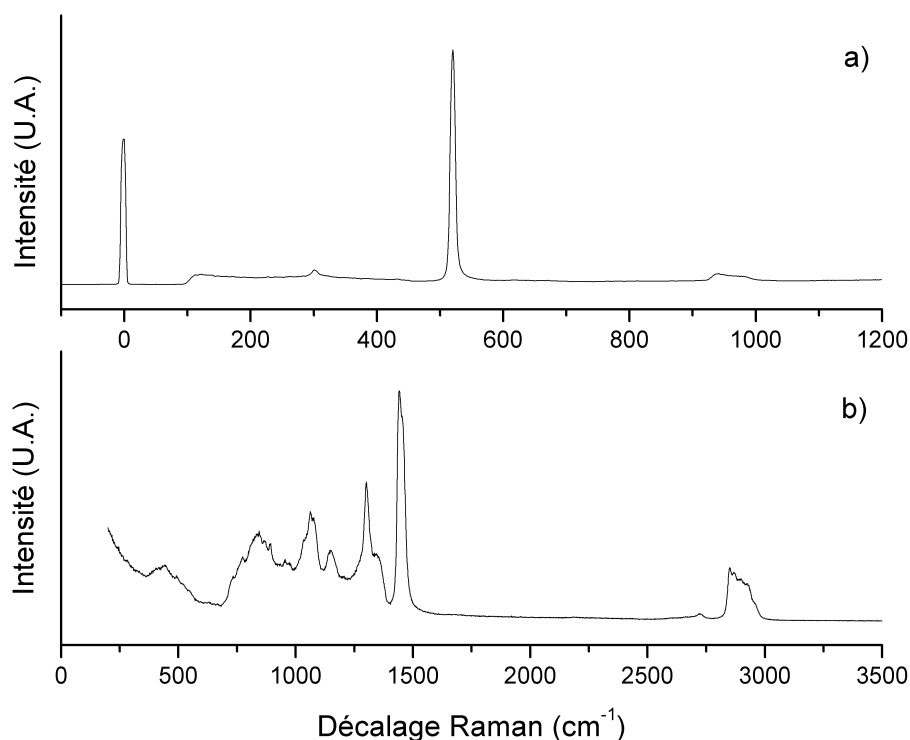


FIGURE 4.4 – Spectres Raman expérimentaux du silicium cristallin pur (a) et de l’huile de paraffine (b) avec une longueur d’onde d’excitation de 785 nm. Sur le graphique (a) on trouve une raie intense à 521 cm^{-1} correspondant au pic du silicium et une raie à 0 cm^{-1} qui est résidu de la raie d’excitation. On constate alors que même en prenant soin de filtrer la longueur d’onde d’excitation (le filtre passe-haut utilisé a un coefficient d’atténuation de 10^{-7} à 785 nm), celle-ci est toujours détectable. Sans ce filtre, on risquerait alors d’éblouir l’ensemble du capteur². On constate également qu’en dehors de la raie d’excitation on ne détecte du signal qu’à partir de 100 cm^{-1} environ, ce qui signifie que les décalages Raman inférieurs à 100 cm^{-1} sont indétectables avec ce système car le filtre passe-haut coupe les longueurs d’onde correspondantes.

avec $\Delta E = hc\Delta\sigma$ où h est la constante de Planck et c est la vitesse de la lumière dans le vide. Cette différence d’énergie correspond elle-même à une transition entre deux états vibrationnels de la molécule. Ainsi, le décalage est donc indépendant de la fréquence de l’onde incidente. Cette propriété est intéressante car, pour une même molécule, les positions des pics dans le spectre Raman (selon le nombre d’onde) seront identiques quelque soit la longueur d’onde de la source utilisée. Cela permet en outre d’utiliser une source adaptée au problème et de pouvoir comparer les spectres même si ceux-ci ont été produits par des sources différentes. Nous détaillerons ces points dans la sous-section dédiée au montage d’un spectromètre Raman.

La complexité d’un spectre Raman dépend donc de la complexité des molécules constituant l’échantillon et de leur nombre de liaisons chimiques. Les graphes représentés sur la figure 4.4 sont les spectres Raman du silicium cristallin et de l’huile de paraffine mesurés avec notre dispositif. Le silicium étant un composé chimique pur et cristallisé, il ne présente qu’un seul pic correspondant à un décalage Raman bien défini. En revanche, le spectre de l’huile de paraffine est plus complexe car la molécule l’est également.

Enfin, même si le décalage Raman est indépendant de la longueur d’excitation, l’apparence des spectres présentés dépend d’un ensemble de facteurs que nous détaillerons dans la sous-section suivante.

2. On parle d’éblouissement, ou de *blooming*, d’un capteur quand un photon atteignant un pixel saturé se "déverse" dans un pixel adjacent, créant ainsi une tache lumineuse plus large que le faisceau éblouissant.

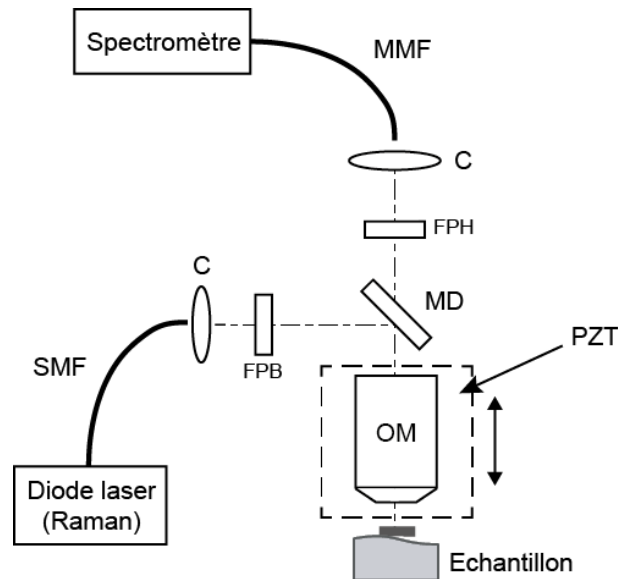


FIGURE 4.5 – Schéma du dispositif de microscopie confocale Raman conçu au laboratoire. La lumière d’une source laser monochromatique est transmise par une fibre monomode (SMF) puis collimatée par un miroir parabolique (C) et purifiée par un filtre passe-bande (FPB) afin de supprimer d’éventuelles raies parasites. Elle est ensuite dirigée vers un échantillon par un miroir dichroïque passe-haut (MD) puis focalisée par un objectif de microscope (OM). Le signal diffusé est collecté par ce même objectif de microscope puis focalisé dans une fibre multimode (MMF) par un miroir parabolique (C). Le miroir dichroïque et le filtre passe-bande (FPH) permettent de rejeter la raie d’excitation et de ne conserver que le signal diffusé de manière inélastique.

4.3.2 Instrumentation

Le schéma d’un montage de microscopie confocale Raman est représenté dans la figure 4.5. Celui-ci ressemble dans sa structure à un montage de microscopie confocale en épi-illumination, et est essentiellement composé d’une source de lumière, d’un objectif de microscope, d’un jeu de filtres et d’un spectromètre.

Source

L’apparition des sources laser dans les années 1960 a révolutionné l’usage de la spectroscopie Raman [97]. Auparavant, les sources utilisées étaient des lampes à décharge dont les puissances étaient relativement faibles. L’effet Raman étant faible par nature, plusieurs heures pouvaient être nécessaires pour acquérir un unique spectre. On estime en effet que seul un photon sur dix millions est diffusé de manière inélastique.

Une source de lumière optimale pour une utilisation en spectroscopie Raman doit respecter plusieurs critères qui font que les sources laser sont idéales pour cette technique. Premièrement, nous l’avons déjà mentionné, le flux émis doit être suffisamment élevé pour permettre une acquisition relativement rapide des spectres mais pas excessif car cela pourrait causer des dommages aux échantillons analysés. Par ailleurs, la puissance du laser ne doit pas fluctuer dans le temps afin de pouvoir comparer des spectres acquis à différents moments. La monochromaticité est également importante car elle intervient dans la résolution spectrale du système. En effet, chaque longueur d’onde produisant sa propre diffusion inélastique avec un décalage Raman constant, la résolution spectrale ne peut être inférieure à la largeur spectrale de la raie du laser. Naturellement, la longueur d’onde d’émission du laser doit également être stable dans le temps. Finalement, la cohérence spatiale permet de focaliser le faisceau à la limite de la diffraction et

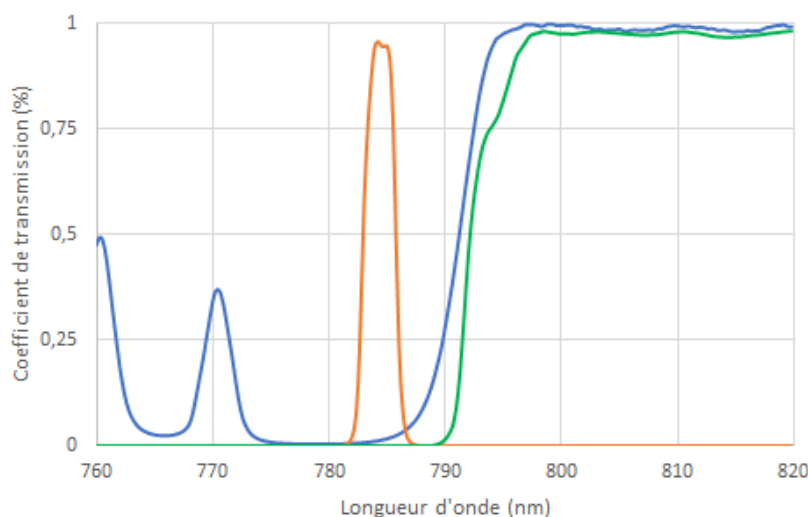


FIGURE 4.6 – Transmission du jeu de filtres du système de microscopie Raman : filtre passe-bande laser (rouge), miroir dichroïque (bleu), filtre passe-haut (vert).

ainsi d'étudier de petits échantillons. La grande puissance combinée au pouvoir de focalisation permet également d'atteindre de très fortes intensités dans l'échantillon et donc de fortement exciter l'effet Raman. Ainsi, le choix de la source se porte généralement vers des lasers continus et stabilisés en longueur d'onde.

Filtres

La spectroscopie Raman étant une méthode de spectroscopie précise et sensible, elle nécessite beaucoup de précautions. En particulier, il est nécessaire de bien contrôler le spectre d'excitation provenant du laser et illuminant l'échantillon, et le spectre transmis jusqu'au spectromètre. Pour cela, un jeu de filtres est nécessaire. Les spectres de transmission des filtres utilisés pour le montage de LC-OCT couplée à la microscopie Raman sont présentés dans la figure 4.6.

Premièrement, un filtre passe-bande étroit est utilisé pour purifier le faisceau laser. En effet, celui-ci peut présenter, notamment après un passage dans une fibre optique, des pics secondaires à des longueurs d'onde différentes de la longueur d'onde d'excitation. Si ces pics parasites ne sont pas filtrés, il est possible que la diffusion Rayleigh créée par ces longueurs d'onde parasites vienne brouiller le signal Raman.

Deuxièmement, Un miroir dichroïque est utilisé pour diriger le faisceau d'excitation vers l'échantillon et transmettre le signal diffusé vers le spectromètre. Pour cela on choisit une longueur d'onde de coupure suffisamment proche de la longueur d'onde d'excitation pour pouvoir mesurer de faibles décalages Raman, mais également suffisamment éloignée pour que le signal Rayleigh soit le moins transmis vers le spectromètre.

L'atténuation de la longueur d'onde d'excitation par le miroir dichroïque n'est toutefois pas suffisante en général. Le signal diffusé de manière élastique risque alors de saturer le capteur du spectromètre si celui-ci n'est pas plus efficacement filtré. Pour cela on utilise un filtre passe-haut ou un filtre coupe-bande dont la courbe de transmission suit celle du miroir dichroïque en respectant les mêmes critères que pour le miroir dichroïque.

Objectif de microscope

Comme pour un microscope confocal classique, l'objectif de microscope a pour rôle de focaliser le faisceau d'éclairage dans l'échantillon et de collecter le signal rétrodiffusé. L'analyse

spectrale étant dans notre cas cantonnée à un seul point dans l'échantillon, c'est l'ouverture numérique de l'objectif de microscope qui a le plus d'influence sur le système. Celle-ci agit en effet à la fois sur les dimensions du volume confocal dans l'échantillon, et donc sur la résolution spatiale, et sur l'angle de collection de la lumière. Ce dernier paramètre est particulièrement important en microscopie Raman car l'effet Raman est par nature très faible.

La résolution spatiale est définie par les largeurs à mi-hauteur de la PSF (de l'anglais *point spread function*, *i.e.* fonction d'étalement du point) dans les directions axiales et latérales [10] :

$$\text{FWHM}_{axiale} = 0.67 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{ON}^2}} \sqrt{1 + p^2} \quad (4.7)$$

$$\text{FWHM}_{latérale} = \frac{1.22\lambda}{2\text{ON}} \quad (4.8)$$

où λ est la longueur d'onde, n l'indice de l'objet, ON l'ouverture numérique de l'objectif. Le terme p est une grandeur sans dimension définie comme étant le rapport entre le diamètre du diaphragme confocal dans *l'espace objet* et le diamètre d'une tache d'Airy définie par l'expression $1.22\lambda/\text{ON}$.

L'ouverture numérique agit également sur l'efficacité de collection du signal diffusé. L'échantillon illuminé par le faisceau laser émet un signal de diffusion de manière isotrope. Il est donc nécessaire d'utiliser des objectifs de microscope dont l'angle de collection est le plus grand possible afin de maximiser le signal mesuré, qui rappelons-le est en général faible dans le cas de la diffusion Raman, et ainsi optimiser le rapport signal sur bruit du spectre.

L'angle solide du cône de collection de l'objectif de microscope est donné par la formule suivante :

$$\Omega = 2\pi (1 - \cos(\alpha)) \quad (4.9)$$

où α est l'angle maximal de collection. Cet angle intervient également dans le calcul de l'ouverture numérique :

$$\text{ON} = n \sin(\alpha) \quad (4.10)$$

où n est l'indice de l'objet. La proportion de signal collecté par rapport à la totalité du signal diffusé supposé isotrope, c'est-à-dire dans un angle solide de 4π est donc donnée par la formule suivante :

$$\phi = \frac{1}{2} \left(1 - \cos \left(\arcsin \left(\frac{\text{ON}}{n} \right) \right) \right) \quad (4.11)$$

On privilégie donc en microscopie Raman des objectifs à forte ouverture numérique (typiquement > 0.8).

La figure 4.7 représente la proportion du flux collecté comparé au flux total diffusé en fonction de l'ouverture numérique. On constate qu'aux ouvertures numériques habituellement utilisées par les systèmes de microscopie, la quantité de lumière collectée est relativement faible. Toutefois, on constate également que pour optimiser la collection du flux, il faut utiliser des ouvertures numériques très proches du maximum.

Spectromètre

En général, le signal collecté par l'objectif est acheminé vers le spectromètre par une fibre multimode. Celle-ci joue par ailleurs le rôle de diaphragme confocal permettant de rejeter la lumière hors focus. Sans entrer dans les détails, un spectromètre est essentiellement composé des éléments suivants :

- **Un réseau de diffraction.** Il s'agit d'un dispositif optique composé de structures périodiques (appelées "traits") permettant de décomposer un faisceau de lumière polychromatique selon les longueurs d'onde qu'il contient. En pratique, chaque longueur d'onde

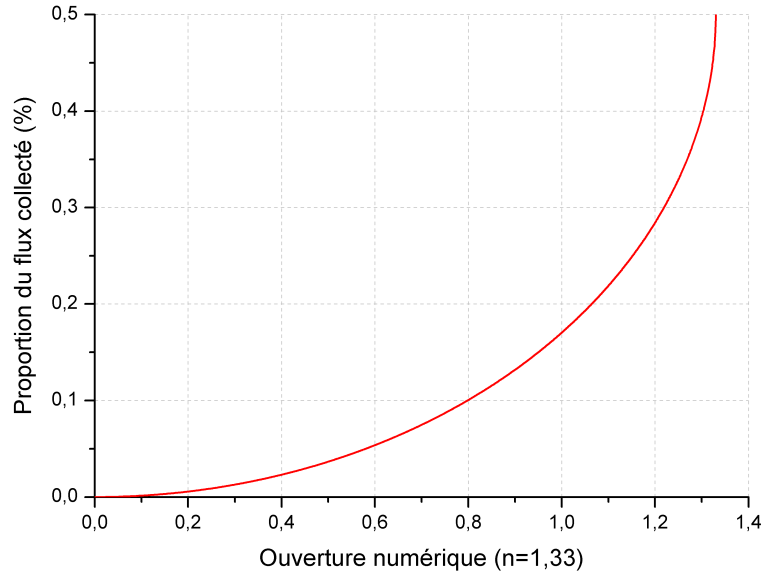


FIGURE 4.7 – Évolution du flux collecté, en proportion du flux total diffusé en supposant une diffusion isotrope, par un objectif en fonction de son ouverture numérique (indice du milieu $n = 1.33$). Courbe basée sur l'équation 4.11.

du faisceau incident est déviée avec un angle différent. Le pouvoir de résolution du réseau dépend du nombre de traits éclairés par le faisceau, et dépend donc indirectement du pas du réseau (mesuré en nombre de traits par millimètre) et de la taille du faisceau. La dispersion évolue linéairement avec le nombre de traits. Ainsi, diviser par deux le pas du réseau permet de doubler la résolution spectrale du spectromètre. Pour un système fonctionnant dans l'infrarouge, le réseau peut typiquement aller de $300 \text{ tr} \cdot \text{mm}^{-1}$ (faible résolution) à $1800 \text{ tr} \cdot \text{mm}^{-1}$ (haute résolution).

- **Une lentille.** Celle-ci a pour but de convertir les différents angles du faisceau après passage par le réseau de diffraction en distances sur un capteur. Plus la distance focale de la lentille est grande, plus les longueurs d'onde seront séparées sur le capteur, améliorant ainsi l'échantillonnage du spectre. Les longueurs focales varient typiquement entre 200 mm (faible résolution) et 800 mm (haute résolution). Comme pour le réseau, la dispersion évolue également de manière linéaire avec la longueur focale de la lentille.
- **Un capteur.** Celui-ci est en général linéaire et détecte la lumière dispersée. Aujourd'hui et depuis les années 1970 et 1980, les capteurs utilisés sont de type CCD [98], et doivent être refroidis pour permettre une sensibilité de détection suffisamment grande pour détecter le faible signal Raman. Un capteur ayant de petits pixels permet la plupart du temps d'atteindre de meilleures résolutions spectrales en raison d'une plus grande capacité d'échantillonnage.

Toujours dans le souci d'optimiser la collection du signal diffusé inélastiquement, ces éléments doivent évidemment être choisis de façon à transmettre ou détecter le signal le plus efficacement possible afin d'éviter les pertes au maximum. L'effet de ces éléments sur la résolution est plus facilement quantifiable. Les paramètres influençant la résolution spectrale sont essentiellement le nombre de traits par millimètre du réseau, la longueur focale de la lentille et la taille des pixels du capteur. La figure 4.8 représente l'effet du pouvoir de résolution du réseau et de la longueur focale de la lentille sur la résolution spectrale du système. Notons que de manière analogue à la résolution spatiale, une augmentation de la résolution se fait souvent au prix d'une réduction du champ spectral. Toutefois, il est ici facile d'étendre le champ spectral en multipliant les acquisitions à différents angles du réseau dispersif.

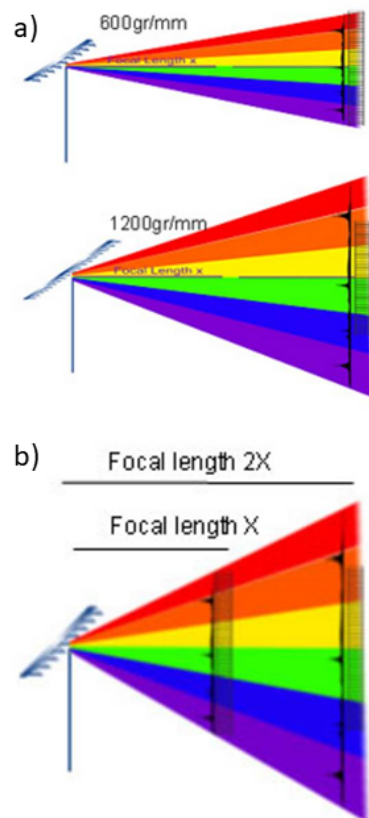


FIGURE 4.8 – Effet du nombre de traits éclairés du réseau (a) et de la longueur focale de la lentille (b) sur la résolution spectrale d'un spectromètre. Tiré de <http://www.horiba.com>.

La résolution du système global ne dépend pas uniquement de la résolution du spectromètre. La largeur spectrale du faisceau d'excitation y joue également un rôle important. En effet, une raie du spectre Raman ne peut pas être plus fine que la raie d'excitation car chaque longueur d'onde produit son propre effet Raman. La largeur de la raie d'excitation agit de manière analogue à une PSF avec les points d'un échantillon en "étalant" la réponse spectrale de l'échantillon. Le faisceau diffusé est finalement dispersé par le système "réseau-lentille" puis échantillonné par le capteur. En général, on choisit une source laser dont la largeur spectrale est très fine. En effet, il est techniquement faisable de fabriquer des lasers continus dont la largeur spectrale est bien en-dessous de 1 cm^{-1} . Dans ce cas, on peut assimiler la résolution spectrale du système à la résolution spectrale du spectromètre et on réduit au minimum l'élargissement des raies Raman. À titre indicatif, le laser utilisé dans la suite de ce chapitre a une largeur spectrale inférieure à 0.001 cm^{-1} . À titre de comparaison, un spectromètre dont le capteur aurait des pixels de $10 \mu\text{m}$, la lentille une focale de 400 mm et le réseau $300 \text{ tr} \cdot \text{mm}^{-1}$ permettrait d'obtenir une résolution de 1.34 cm^{-1} à 785 nm . Les raies Raman les plus fines ayant une largeur autour de 2 à 3 cm^{-1} , une résolution de 1 cm^{-1} paraît être suffisante pour s'adapter à tous les cas de figure [99].

4.4 Dispositif de LC-OCT couplé à la spectroscopie Raman

4.4.1 Montage expérimental

Le schéma du prototype développé pour ce chapitre est représenté sur la figure 4.9. Les blocs "LC-OCT" et "microscopie Raman" n'ont en commun que l'objectif de microscope dans le bras objet de l'interféromètre. En effet, dans le but de corrélérer les informations acquises avec les deux modalités, il est indispensable d'utiliser un même dispositif optique pour éclairer et collecter le signal provenant de l'échantillon dans les deux modalités.

La partie "LC-OCT" de ce prototype est identique au dispositif présenté dans la figure 2.18 dans le chapitre 2 dédié à la LC-OCT. En revanche, les objectifs de microscope utilisés doivent être adaptés à une utilisation en microscopie Raman. Dans les chapitres 2 et 3, les objectifs de microscope utilisés sont toujours des $20\times/0.5$. En microscopie Raman, on utilise typiquement des objectifs ayant une grande ouverture numérique et pouvant être supérieure à 1.0 . En effet, le signal Raman étant généralement très faible, il est nécessaire d'augmenter au maximum l'angle solide du cône de collection des objectifs pour récolter le plus de signal possible (voir équation 4.11 et figure 4.7). La sous-section 4.4.2 est dédiée à l'effet de l'ouverture numérique sur les images de LC-OCT mais on peut d'ores et déjà donner quelques arguments contre une trop forte augmentation de l'ouverture numérique en LC-OCT. Premièrement, le champ de vue est en général réduit quand on augmente l'ouverture numérique. Deuxièmement, la distance de travail, c'est-à-dire la distance frontale de l'objectif, est faible pour des objectifs très ouverts ce qui limiterait la profondeur maximale d'imagerie. Troisièmement, le poids et l'encombrement sont en général accrus et pourraient limiter la cadence d'imagerie. Pour ces raisons, un compromis a été fait en choisissant un objectif $40\times/0.8 \text{ W}$ au lieu d'un $20\times/0.5 \text{ W}$, ce qui réduit le champ de vue par un facteur deux mais triple la capacité de collection du signal. L'objectif de microscope est le seul élément changeant dans ce prototype comparé aux dispositifs précédemment décrits. On pourra donc se reporter aux chapitres précédents concernant le reste du montage du bloc "LC-OCT".

Le spectromètre utilisé pour le bloc "Raman" est un dispositif commercial (Horiba LabRAM HR Evolution) sur lequel nous n'avons que peu de contrôle. Sa résolution spectrale peut aller jusque 1 cm^{-1} ce qui a été défini comme suffisant pour la majorité des applications. On s'assure alors que le spectromètre n'est pas un élément limitant, que ce soit en termes de résolution spectrale ou de flux. En dehors de l'objectif de microscope, le reste du montage ne concerne donc que le jeu de filtres qui est choisi uniquement en fonction la longueur d'onde d'excitation utilisée. Cela nous amène au choix de la longueur d'onde d'excitation, qui dépend d'un certain nombre de phénomène :

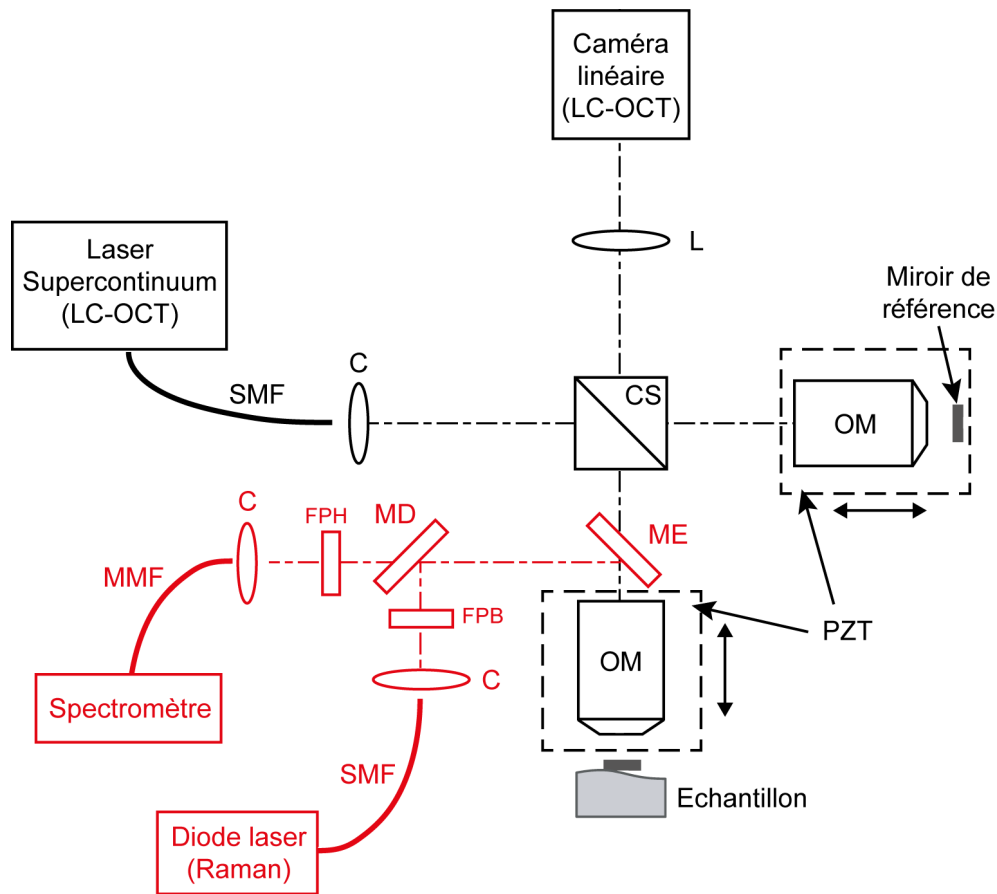


FIGURE 4.9 – Schéma du prototype de LC-OCT couplé à la microscopie Raman. La partie "LC-OCT" est représentée en noir et est identique au schéma de LC-OCT présenté dans les chapitres précédents. La lumière d'un laser supercontinuum est acheminée vers le montage par une fibre optique monomode (SMF) et collimatée par un collimateur achromatique (C ; miroir parabolique en Argent, $f' = 33$ mm) pour éclairer un interféromètre de Linnik composé d'un cube séparateur de faisceau 50/50 (CS) et de deux objectifs de microscope identiques (OM ; 40x/0.8 W). Les objectifs de microscope sont chacun montés sur une platine piézoélectrique (PZT) permettant de balayer l'échantillon en profondeur. La lumière provenant des deux bras de l'interféromètre est recombinaée par le cube et l'image est finalement formée par une lentille de tube (L) sur un capteur linéaire CCD au Silicium.

Pour coupler ce dispositif à la microscopie Raman, on intègre le bloc optique représenté en rouge. La lumière d'une diode laser continue et stabilisée en fréquence ($\lambda_{ex} = 785$ nm) est acheminée par une fibre monomode (SMF) et collimatée (C ; miroir parabolique en Argent, $f' = 33$ mm) avant d'être purifiée par un filtre passe-bande (FBP) étroit supprimant d'éventuelles raies parasites. Le faisceau est dirigé vers l'échantillon par un miroir dichroïque passe-haut (MD) puis par un miroir escamotable (ME). Un objectif de microscope (MO ; 40x/0.8 W) commun avec la dispositif de LC-OCT focalise et collecte le signal diffusé par l'échantillon. Le faisceau est filtré par le miroir dichroïque et suivi d'un filtre passe-haut (FPH) afin de supprimer la raie d'excitation et les longueurs d'onde inférieures. Le faisceau est finalement injecté dans une fibre multimode (105 μ m de cœur) par une parabole hors d'axe (C ; miroir parabolique en Argent, $f' = 33$ mm) pour être transmis au spectromètre.

- **Puissance de diffusion.** Comme pour la diffusion Rayleigh, le phénomène de diffusion inélastique est le résultat de la création d'un dipôle oscillant par une onde électromagnétique incidente. En revanche, le dipôle n'oscille plus à la fréquence de l'onde incidente ν_{ex} mais à une fréquence $\nu_{ex} - \nu_{em}$ (on ne considère ici que les radiations Stokes, voir équation 4.5) où ν_{em} est la fréquence de l'onde diffusée. La puissance diffusée de manière inélastique est alors proportionnelle à $(\nu_{ex} - \nu_{em})^4$. Ici le terme ν_{ex} ne donne aucune information sur l'échantillon mais agit quand même sur la quantité de signal diffusée. En conclusion, si on souhaite privilégier l'efficacité de diffusion il faut choisir une faible longueur d'onde d'excitation.
- **Autofluorescence.** Lorsque l'on s'intéresse à des échantillons biologiques, il est nécessaire de prendre en compte le fait qu'ils contiennent généralement des fluorophores endogènes. Le signal d'autofluorescence émis par ces fluorophores se caractérise en général par un spectre d'émission relativement large et lisse (voir figure 4.10). Lors de l'acquisition d'un spectre Raman, le signal d'autofluorescence s'ajoute aux raies Raman et peut les éclipser s'il est trop puissant. Il convient alors de limiter au maximum ce phénomène. La bande d'excitation de la fluorescence de la plupart des fluorophores endogènes se situe dans une bande entre 250 nm et 500 nm [100], et la puissance d'émission de la fluorescence décroît avec la longueur d'onde [101]. Pour réduire au maximum l'autofluorescence des tissus, il faut donc privilégier les longueurs d'onde d'excitation dans le rouge ou l'infrarouge.
- **Profondeur de pénétration.** Tout comme en LC-OCT, si l'on souhaite augmenter la profondeur maximale de pénétration dans l'échantillon, cela passe en général par une augmentation de la longueur d'onde. En effet, en augmentant la longueur d'onde on réduit l'efficacité de diffusion (voir sous-section 1.2.2) mais cela laisse alors la capacité à la lumière de pénétrer profondément dans l'échantillon. Cela est bien entendu valable si l'absorption ne devient pas prédominante et requiert donc que la longueur d'onde soit choisie à l'intérieur de la fenêtre de transparence des milieux biologiques, aussi appelée fenêtre thérapeutique (voir figure 1.6).
- **Réponse spectrale du capteur.** Les capteurs utilisés sont en général des capteurs CCD au silicium dont la réponse spectrale s'arrête vers 1000 nm. Le signal diffusé de manière inélastique contenant des longueurs supérieures à la longueur d'onde d'excitation, il faut veiller à ce que cette dernière ne soit pas trop proche de la borne supérieure de la réponse spectrale du capteur. En général, le champ spectral ne dépasse pas 3000 cm^{-1} , ce qui correspond à des décalages maximaux en longueur d'onde bien différents selon la longueur d'onde d'excitation. Par exemple, un décalage Raman de 3000 cm^{-1} à $\lambda_0 = 785 \text{ nm}$ correspond à une longueur d'onde d'émission de 1027 nm. On évitera donc les longueurs d'onde d'excitation trop grandes sous peine de devoir changer de matériau pour le capteur.

Pour ce prototype de LC-OCT couplé à la microscopie Raman, nous avons choisi une diode laser monomode TEM00 émettant à 785 nm car cette longueur d'onde semble offrir un bon compromis entre toutes les conditions énoncées plus haut. C'est également une longueur d'onde qui est souvent utilisée dans la littérature pour des applications à la peau et au diagnostic des cancers cutanés [102, 103, 95]. La longueur d'onde de la diode est stabilisée par un réseau de diffraction de Bragg permettant de limiter les fluctuations à 1 pm. La largeur spectrale inférieure à 0.001 cm^{-1} assure la non-dégradation de la résolution spectrale. La puissance maximale est de 120 mW avec une variabilité inférieure à 1 %.

Pour conclure, le prototype est constitué d'un dispositif de LC-OCT fonctionnant avec une longueur d'onde centrale de 800 nm environ et d'un microscope Raman à 785 nm. Les spectres utiles des deux modalités se chevauchent donc et elles ne peuvent donc pas être utilisées simultanément. Il aurait été toutefois impossible de réaliser les acquisitions totalement simultanément car la spectroscopie Raman impose de longs temps d'acquisition et donc l'arrêt du moteur piézo-électrique permettant le balayage axiale de l'échantillon en LC-OCT. Le passage de la LC-OCT

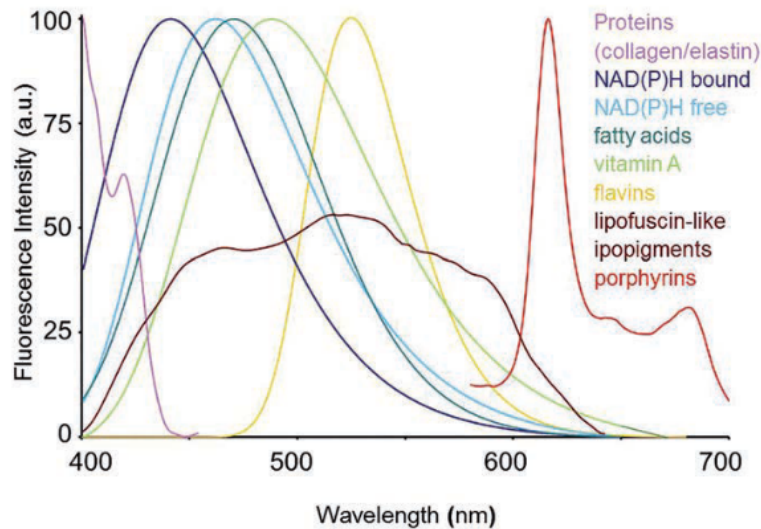


FIGURE 4.10 – Spectres d'émission de fluorescence de quelques fluorophores endogènes typiques. Longueur d'onde d'excitation : 366 nm. Tiré de [100].

à la spectroscopie Raman se fait donc par un miroir escamotable situé entre le cube séparateur de l'interféromètre et l'objectif du bras objet. Si les spectres avaient été séparés on aurait pu imaginer remplacer le miroir escamotable par un miroir dichroïque fixe. Cela permettrait de faciliter le passage d'une modalité à l'autre. Toutefois, un miroir dichroïque n'est pas équivalent à un miroir plan en métal, et peut introduire des aberrations notamment à cause de défauts de planéité du substrat [104].

4.4.2 Effet de l'ouverture numérique

La partie "LC-OCT" du système diffère légèrement des systèmes présentés dans les chapitres 2 et 3 de par l'objectif de microscope utilisé. En effet, afin d'augmenter la capacité de collection du signal rétrodiffusé en Raman, il a été décidé d'utiliser des objectifs de microscope avec une ouverture numérique supérieure, à savoir 0.8 au lieu de 0.5. Ce changement, fait pour la partie "spectroscopie Raman" du système, n'est pas sans effet sur les images de LC-OCT. La figure 4.11 présente une image de LC-OCT prise avec un objectif de microscope dont l'ouverture numérique est de 0.8 (40x/0.8 W). On y représente également pour comparaison une image de LC-OCT tel que décrit dans les chapitres 2 et 3, c'est-à-dire utilisant un objectif de 0.5 d'ouverture numérique (20x/0.5 W), toute chose étant égale par ailleurs.

Dans le tableau 2.1, nous montrons l'effet de l'ouverture numérique sur la résolution latérale pour des ouvertures numériques de 0.3, 0.5, et 0.8. Si la résolution latérale s'améliore bien avec l'ouverture numérique, elle s'écarte également de plus en plus de la valeur théorique au fur et à mesure qu'on augmente l'ouverture numérique. En effet, l'utilisation d'un milieu d'immersion différent de l'eau, pour lequel les objectifs ont été conçus, et la présence d'une lame de verre de 500 μm dans le chemin du faisceau créent des aberrations optiques qui sont amplifiées par une forte ouverture numérique. En pratique, il est difficile de percevoir une amélioration de la résolution sur les images de LC-OCT entre un système à 0.8 et un système à 0.5. L'utilisation d'un objectif de microscope ouvert à 0.8 ne semble donc pas améliorer la qualité d'imagerie par rapport à un objectif ouvert à 0.5, et réduit de surcroît le champ de vue par deux.

Au-delà de la résolution spatiale, l'image de la figure 4.11a semble présenter un contraste plus faible que l'image de la figure 4.11b. La profondeur de pénétration est comparable dans les deux images mais cela est à nuancer car le signal en profondeur dans (a) semble peu résolu

et peu contrasté. Cela peut s'expliquer par la diminution de la profondeur de champ lors du passage d'une ouverture numérique de 0.5 à 0.8. Les objectifs de microscope utilisés en LC-OCT sont immergés dans un liquide d'immersion de façon à garder les plans de focalisation et de cohérence superposés tout au long du balayage axial de l'échantillon (voir sous-section 2.5.2). Une superposition parfaite suppose l'égalité des indices de l'échantillon et du milieu d'immersion, ce qui n'est rigoureusement jamais le cas. L'effet de la séparation des plans de cohérence et de focalisation est principalement de dégrader le contraste des franges d'interférence résultant en une dégradation du contraste des B-scans. Les plans peuvent se déplacer l'un par à l'autre selon la formule suivante d'après les équations 2.49 et 2.50 :

$$\delta z = z \left(\frac{n}{n_{im}} - \frac{n_{im}}{n} \right) \quad (4.12)$$

où z est la profondeur dans l'échantillon, n est l'indice de l'échantillon, et n_{im} est l'indice du milieu d'immersion. Notons que ce décalage peut être négatif ou positif. Ainsi, il est possible que le décalage reste dans des bornes acceptables si l'indice de réfraction de l'échantillon est tantôt inférieur tantôt supérieur à celui du milieu d'immersion. Il existe effectivement une tolérance plus ou moins large selon l'ouverture numérique des objectifs utilisés. En effet, le plan de focalisation possède une épaisseur égale à la profondeur de champ pouvant être exprimée ainsi :

$$\text{PDC} = \frac{n\lambda_0}{\text{ON}^2} \quad (4.13)$$

où λ_0 est la longueur d'onde centrale du système, n l'indice de l'objet, et ON l'ouverture numérique de l'objectif. Pour une longueur d'onde centrale de 800 nm et un indice de réfraction de 1.40, la profondeur de champ est donc de 1.8 μm pour une ouverture numérique de 0.8 et 4.5 μm à 0.5 d'ouverture numérique. Supposons maintenant que la peau a un indice moyen de 1.40 et que le milieu d'immersion a un indice de 1.38. À 100 μm de profondeur l'écart entre le centre des plans de cohérence et de focalisation est alors de 3.9 μm . Cela resterait dans des bornes acceptables pour une ouverture numérique de 0.5 mais pas pour une ouverture numérique de 0.8. Cet exemple théorique n'est pas nécessairement représentatif de la réalité et il était évident qu'il était plus facile de séparer les plans de cohérence et de focalisation avec un objectif 40x/0.8 qu'avec un objectif 20x/0.5. Mais on constate ici qu'il est tout à fait possible, à des profondeurs d'imagerie usuelles en LC-OCT, de perdre du signal à cause de ce phénomène si la profondeur de champ des objectifs est trop étroite. Ce phénomène amplifié par l'ouverture numérique agit donc sur la qualité d'imagerie en profondeur mais peut également dégrader la qualité sur les bords des images à cause d'un éventuel angle entre les plans de cohérence et de focalisation (voir figure 2.29).

Pour conclure, l'augmentation de l'ouverture numérique au-delà de 0.5 ne semble pas optimale pour la LC-OCT. Tout d'abord, le champ de vue est réduit et passe à environ 0.6 mm avec un objectif 40x/0.8. De plus, cette réduction du champ ne s'accompagne pas d'une amélioration visible de la résolution spatiale. Finalement, la réduction de la profondeur de champ semble impliquer une détérioration du contraste de l'image à cause d'une amplification des contraintes concernant la superposition des plans de cohérence et de focalisation. Pour un système de LC-OCT seul, on privilégiera des objectifs de microscope dont l'ouverture numérique est limitée à 0.5. Toutefois, dans le but de coupler les deux modalités qui nous intéressent dans ce chapitre, il a semblé nécessaire d'augmenter la capacité de collection des objectifs et d'accepter une légère dégradation des images de LC-OCT.

4.4.3 Calibration et acquisition des spectres

Lorsque l'on cherche à analyser des tissus biologiques, les spectres détectés sont généralement entachés d'un fond d'autofluorescence. Avant l'analyse du spectre il est donc nécessaire d'isoler le signal Raman de ce signal d'autofluorescence. Sur la figure 4.12 on représente un spectre

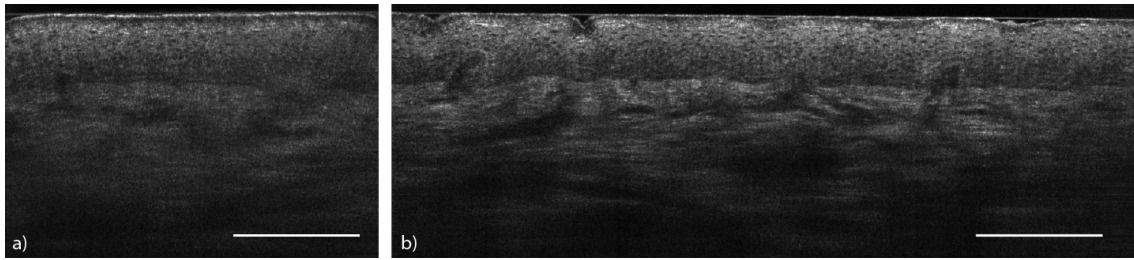


FIGURE 4.11 – Images de peau acquises avec un dispositif de LC-OCT utilisant un objectif de microscope ouvert à 0.8 (a) et un objectif de microscope ouvert à 0.5 (b).

Raman de peau avant et après suppression de l'auto fluorescence. Pour faire cela on utilise les méthodes décrites dans [105] ou [106]. Dans [105], les auteurs proposent une méthode itérative simple et rapide permettant d'extraire le signal de fond basse fréquence. L'algorithme consiste à approximer la courbe du spectre par une fonction polynomiale dont on peut choisir le degré. Les points du spectre dont la valeur est inférieure à la courbe d'ajustement sont considérés comme appartenant au signal de fond. Pour les nombres d'onde où l'intensité du spectre est supérieure à la courbe d'ajustement, cette dernière est considérée comme étant le signal de fond. Ce processus est ensuite répété un certain nombre de fois sur le signal de fond extrait lors de l'itération précédente. Dans [106], les auteurs proposent une version améliorée arguant que la méthode précédente offre une mauvaise prise en compte du bruit. En effet, si le bruit du signal Raman est supérieur à la courbe d'ajustement, celui-ci est inexactement considéré comme du signal Raman et se propage à chaque itération. Les auteurs proposent alors une approche statistique pour réduire les effets du bruit. Toutefois, les gains de cette méthode semblent marginaux quand le rapport signal sur bruit du spectre est bon. On peut également critiquer le fait que les pics intenses du signal Raman sont pris en compte dans l'approximation de la courbe du spectre. En effet, cela pourrait introduire des erreurs dans la régression de la courbe d'auto fluorescence. Afin d'être plus précis, il peut donc être nécessaire d'intégrer une étape préliminaire ayant pour but de supprimer les raies intenses du spectre Raman.

Le signal d'auto fluorescence peut toutefois être mis à profit pour obtenir des informations sur l'échantillon dans certains cas [107]. Par exemple, la mélanine semble être auto fluorescente lorsqu'elle est éclairée avec de la lumière du proche infrarouge [108], ce qui permettrait de connaître sa concentration grâce à ce signal qui peut être considéré comme parasite à première vue. Cela pourrait par exemple être mis à profit pour la détection du mélanome [107]. Une méthode intéressante combinant la spectroscopie Raman et l'imagerie d'auto fluorescence a également été proposée dans [109]. Une image d'auto fluorescence d'un échantillon est acquise rapidement puis utilisée pour localiser les zones à analyser en spectroscopie Raman. Bien que cette méthode soit plus rapide que d'acquérir une image Raman complète, elle reste longue (~ 60 min). De plus la résolution est limitée et ne permet de détecter que des tumeurs plus larges que $100 \mu\text{m}$.

Une autre étape également importante est la calibration du dispositif afin de corrélater spatialement les analyses en spectroscopie Raman avec les images de LC-OCT. En LC-OCT, on balaie l'échantillon en profondeur en déplaçant conjointement le plan de cohérence et le plan de mise au point avec une amplitude égale à la profondeur d'imagerie voulue. On positionne subséquemment la lame de verre située sous l'objectif dans le bras objet et servant d'appui à l'échantillon de façon à ce qu'elle soit située en haut de l'image. Toutefois, bien que l'on connaisse l'amplitude de la course des objectifs, on ne connaît pas la position d'origine et, a fortiori, on ne connaît pas la position des moteurs piézoélectriques pour chaque profondeur de l'image. Cela est problématique dans le cas du couplage avec la microscopie Raman car pour choisir le point d'une image LC-OCT à analyser avec la spectroscopie Raman il est nécessaire de connaître la correspondance entre la profondeur d'imagerie et la position du moteur piézoélectrique.

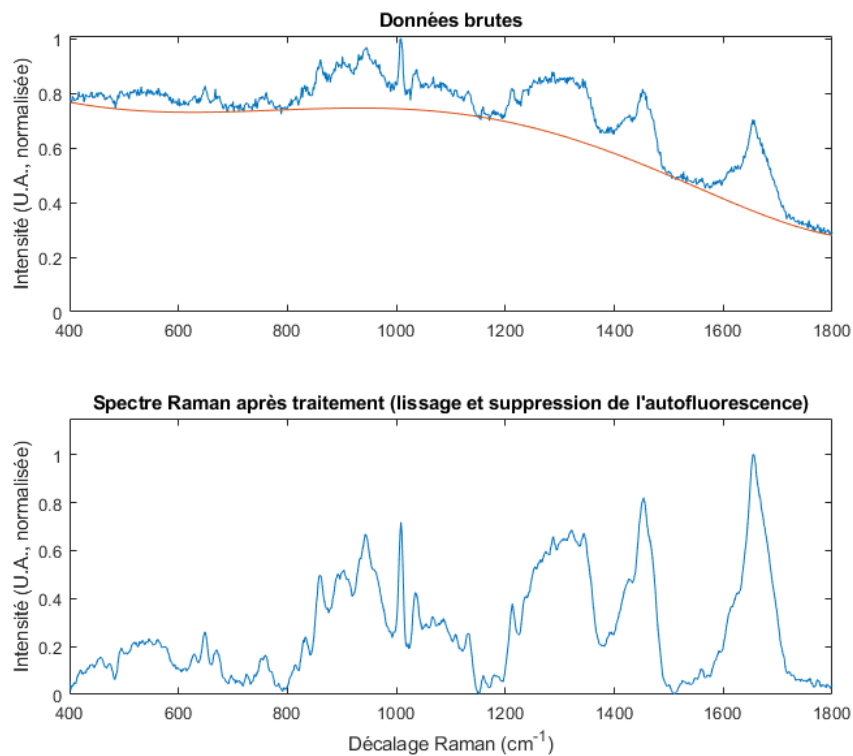


FIGURE 4.12 – Suppression de l’autofluorescence d’un spectre Raman. Dans le graphique du haut on représente le signal brut mesuré en fonction du décalage Raman. La courbe rouge représente le fond d’autofluorescence superposé au signal Raman. On peut alors supprimer cette quantité pour obtenir le graphique du bas. Celui-ci est également lissé par une moyenne glissante pour réduire le bruit de haute fréquence.

Pour l'étape de calibration, on utilise un échantillon de silicium cristallin qui diffuse un signal Raman fort et facilement détectable. En LC-OCT, cet échantillon agit comme un miroir plan qui est donc aisément repérable sur une image. Tout d'abord, on acquiert une image en LC-OCT de l'échantillon de silicium placé approximativement au milieu de l'image en profondeur. On utilise entre l'objet et la lame de verre un liquide de contact dont l'indice de réfraction est égal à celui du liquide d'immersion ($n = 1.40$). Cela permet de simuler un échantillon de peau dont l'indice de réfraction moyen est de 1.40. L'échantillon est ensuite laissé tel quel puis on passe le dispositif en mode microscopie Raman. On balaie alors l'objectif de microscope par pas régulier et on enregistre à chaque fois le spectre diffusé par l'échantillon. Lorsque l'intensité du pic à 521 cm^{-1} du silicium (voir figure 4.4) est à son maximum, la mise au point est optimale. Connaissant maintenant la pente de la course du moteur piézoélectrique et un point de la courbe, on peut trouver la correspondance entre la position du moteur piézoélectrique et la profondeur dans l'image.

Par construction la position latérale du point analysé en spectroscopie Raman se situe au centre de l'image. On peut toutefois le vérifier en déplaçant latéralement l'échantillon à l'aide d'une platine micrométrique jusqu'à trouver le bord de l'échantillon. Cela est fait de la même manière que pour la profondeur : on déplace l'échantillon pas à pas puis on mesure le spectre diffusé. Lorsque le pic à 521 cm^{-1} disparaît, le bord de l'échantillon est atteint. Une image de LC-OCT de l'échantillon dans cette position nous permet de vérifier que le bord de l'échantillon est bien situé au centre de l'image.

Une critique que l'on peut adresser à cette méthode est que les profondeurs d'imagerie en LC-OCT et en microscopie optique ne dépendent pas des mêmes choses. En effet, en LC-OCT on ne mesure pas directement une longueur mais une distance optique, c'est-à-dire la profondeur pondérée par l'indice de réfraction du milieu. On a vu à plusieurs reprises que le plan de mise au point de l'objectif dans le bras objet de l'interféromètre (qui correspond au plan d'imagerie en microscopie confocale) et le plan de cohérence (plan d'imagerie en LC-OCT) se déplacent à des vitesses différentes lorsqu'il y a un écart d'indice de réfraction entre l'objet et l'immersion (voir équations 2.45 et 2.48). On retrouve alors ce même problème entre la position du plan de mise au point en microscopie Raman et le plan de cohérence en LC-OCT. Toutefois, nous verrons dans la section suivante que la profondeur de champ du microscope Raman est approximativement de $50\text{ }\mu\text{m}$, ce qui réduit la précision requise sur la correspondance entre la position de l'objectif de microscope et la profondeur d'imagerie en LC-OCT. En effet, si l'on choisit un cas extrême où la peau aurait l'indice de réfraction de l'eau ($n = 1.33$) alors qu'elle a celui de la silice fondue ($n = 1.45$), alors l'écart entre les plans est de $22\text{ }\mu\text{m}$ à $100\text{ }\mu\text{m}$ de profondeur. Bien que cette valeur soit relativement grande, elle reste inférieure à la résolution axiale du microscope Raman.

4.5 Résultats

4.5.1 Résolution spatiale

La résolution spatiale n'est pas un critère primordial pour notre application. Nous cherchons ici à analyser des zones dont les dimensions sont de l'ordre de quelques cellules³, ce qui relâche les contraintes en termes de résolution spatiale comparé aux microscopes Raman traditionnels. Il est toutefois intéressant de la mesurer afin de caractériser le système.

La résolution d'un microscope confocal Raman est identique à celle de n'importe quel système de microscopie confocale. Pour la mesurer on balaie en profondeur un objet composé d'un dioptre et on mesure l'intensité réfléchie ou rétrodiffusée. La largeur à mi-hauteur en profondeur de la réponse définit la résolution axiale. Ici, on utilise comme échantillon du silicium cristallin dont le spectre de diffusion est hautement reconnaissable grâce à une quasi-unique raie à 521 cm^{-1} . La mesure de l'intensité de ce pic selon la profondeur est représentée sur la figure 4.13, et nous

3. Pour rappel, une cellule entière a des dimensions de l'ordre de 5 à $10\text{ }\mu\text{m}$.

permet de déduire la résolution axiale expérimentale de notre microscope Raman. Celle-ci est de 45 μm .

Cette relativement grande valeur est due au fait que la fibre multimode utilisée pour collecter et transmettre le signal diffusé au spectromètre possède un cœur de 105 μm et que le grandissement du microscope est faible. En effet, l'objectif de microscope possède une focale de 4.5 mm et le miroir parabolique focalisant le signal dans la fibre une focale de 33 mm, créant un grandissement $\gamma = 7.3$. Selon [10], la résolution axiale se met sous la forme suivante :

$$\text{FWHM}_{axiale} = 0.67 \frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{ON}^2}} \sqrt{1 + p^2} \quad (4.14)$$

où λ est la longueur d'onde, n est l'indice de réfraction du milieu, ON est l'ouverture numérique de l'objectif, et p est une grandeur sans dimension définie comme le rapport entre le diamètre de l'image du diaphragme confocal *dans l'espace objet* et le diamètre d'une tache d'Airy. On exprime alors p en unités d'Airy. Le diamètre de la tache d'Airy est elle-même définie par $1.22\lambda/\text{ON}$, ce qui nous donne $p = 12$ unités d'Airy. On trouve donc une résolution axiale théorique de 25 μm . Il est à noter que la théorie donne souvent des résultats optimistes en termes de résolution axiale, ce qui peut expliquer la grande différence avec la valeur expérimentale. En effet, pour peu que l'éclairage de la pupille ne soit pas optimal, l'ouverture numérique est réduite et la résolution axiale s'élargit. Selon l'expression de la résolution axiale ci-dessus, et en considérant le système dépourvu d'aberrations géométriques, une ouverture numérique effective de 0.6 permet d'obtenir une résolution axiale égale à la valeur expérimentale.

Avec un filtrage confocal "parfait", c'est-à-dire avec un diaphragme confocal de taille nulle, la résolution axiale serait de 2 μm . Toutefois, il a été décidé de privilégier l'efficacité de collection du flux à la résolution étant donné que l'effet Raman est par nature faible et que l'ouverture numérique des objectifs utilisés est également faible comparé aux systèmes de microscopies Raman traditionnels⁴.

Concernant la résolution latérale, on mesure la largeur à mi-hauteur d'une tache créée sur une surface comme cela est discuté dans la sous-section 2.5.1. Selon le tableau 2.1, la résolution latérale de ce système est de 1.4 μm . Dans un milieu turbide tel que la peau cette valeur est probablement plus élevée. La taille du cœur de la fibre multimode permet en tous cas de détecter le signal d'une zone de l'échantillon d'un diamètre de $105/\gamma = 14 \mu\text{m}$ maximum.

4.5.2 Spectre Raman de la peau

Après avoir validé l'utilisation du dispositif sur des objets de référence *ex vivo* comme le silicium cristallin ou l'huile de paraffine, nous avons cherché à vérifier que le prototype était bien capable d'acquérir un signal Raman exploitable à partir d'échantillons de peau *in vivo*. Dans un premier temps, nous avons réalisé cette expérience sans chercher à localiser la zone analysée grâce à la LC-OCT.

La figure 4.14 représente le spectre Raman de peau du bout du doigt acquis avec notre dispositif. Le temps d'acquisition pour obtenir ce spectre était de 2×20 s (le signal a été intégré pendant 20 s deux fois). La profondeur de l'analyse n'est pas précisément connue car aucune image de LC-OCT n'a été faite à ce stade, mais nous l'estimons approximativement à 50 μm , ce qui pour le bout du doigt correspond vraisemblablement à la seconde moitié de la couche cornée. L'autofluorescence a préalablement été supprimée et le spectre a été lissé pour éliminer le bruit de haute fréquence. En comparant ce spectre à la littérature [110, 111], il a été possible d'identifier de nombreux pics correspondant à des molécules typiquement présentes dans la peau. Les principales raies identifiées sont explicitées dans le tableau 4.1. Ainsi, nous avons donc pu conclure que le dispositif que nous avons conçu est bien capable de mesurer un signal Raman de

4. Pour rappel, le choix de l'ouverture numérique est le résultat d'un compromis entre efficacité de collection du flux en microscopie Raman et qualité d'imagerie en LC-OCT

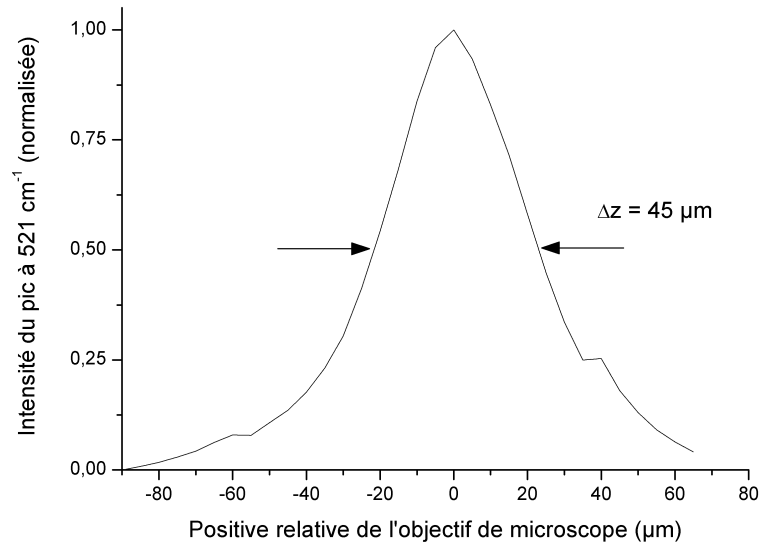


FIGURE 4.13 – Mesure de la résolution axiale du microscope Raman. Un échantillon de silicium cristallin est utilisé comme objet. L'objectif de microscope est déplacé longitudinalement par pas de $5 \mu\text{m}$ et le spectre diffusé par l'objet est mesuré pour chaque position. Le silicium cristallin présente une forte raie à 521 cm^{-1} dont on représente ici l'intensité en fonction de la position relative de l'objectif de microscope. On mesure alors une largeur à mi-hauteur de $45 \mu\text{m}$.

peau exploitable en un temps raisonnable malgré les contraintes imposées par le couplage avec la LC-OCT.

4.5.3 Différentiation entre l'épiderme et le derme

Afin de valider la preuve du concept du couplage, nous avons cherché à différencier des échantillons à l'aide de la microscopie Raman en fonction de leurs profondeurs. Pour confirmer le résultat il est nécessaire qu'il soit vérifiable directement avec l'image de LC-OCT. Nous avons choisi de tenter de différencier l'épiderme du derme dans un échantillon de peau *in vivo* avec la microscopie Raman. Ces deux couches présentent l'avantage d'être aisément discernables en LC-OCT. L'épiderme est concentré en cellules, alors qu'elles sont plus éparées dans le derme. Ce dernier contient également du collagène en plus grande quantité et des vaisseaux sanguins. Une hypothèse raisonnable est que ces couches aient des compositions moléculaires différentes et qu'il soit donc possible de les différencier par microscopie Raman.

Sur la figure 4.15, on représente une image de peau du dos de la main de LC-OCT servant de référence pour l'analyse en spectroscopie Raman. Sur cet échantillon on acquiert cinq spectres à partir de la surface et successivement espacés de $50 \mu\text{m}$ en profondeur. Le temps d'acquisition était de $2 \times 30 \text{ s}$ dans l'épiderme (pour trois premières acquisitions) et $2 \times 60 \text{ s}$ dans le derme (pour les deux dernières acquisitions). Les spectres sont corrigés de l'autofluorescence et normalisés sur la raie $\delta(\text{CH}_2)$ vers 1460 cm^{-1} . Selon [112], les spectres Raman de l'épiderme et du derme diffèrent de plusieurs manières au niveau des bandes Amide I, Amide III et de la proline. Premièrement, la pic de la raie Amide I vers 1650 cm^{-1} semble se décaler vers des nombres d'onde plus élevés lorsque l'on passe de l'épiderme au derme. Dans notre cas, on trouve un décalage d'environ 6 cm^{-1} . Ce pic serait causé dans l'épiderme par la structure en hélice- α de la kératine tandis que le collagène de type I en serait à l'origine dans le derme [112]. On représente également sur la figure 4.15 l'évolution de la localisation de ce pic en fonction de la profondeur. On constate que celle-ci semble évoluer graduellement ce qui permet d'identifier approximativement la position de la jonction dermo-épidermique. On constate également, un inversion du ratio d'intensités dans la bande Amide III (entre $\sim 1250 \text{ cm}^{-1}$ et 1350 cm^{-1}) lorsque l'on passe de l'épiderme au

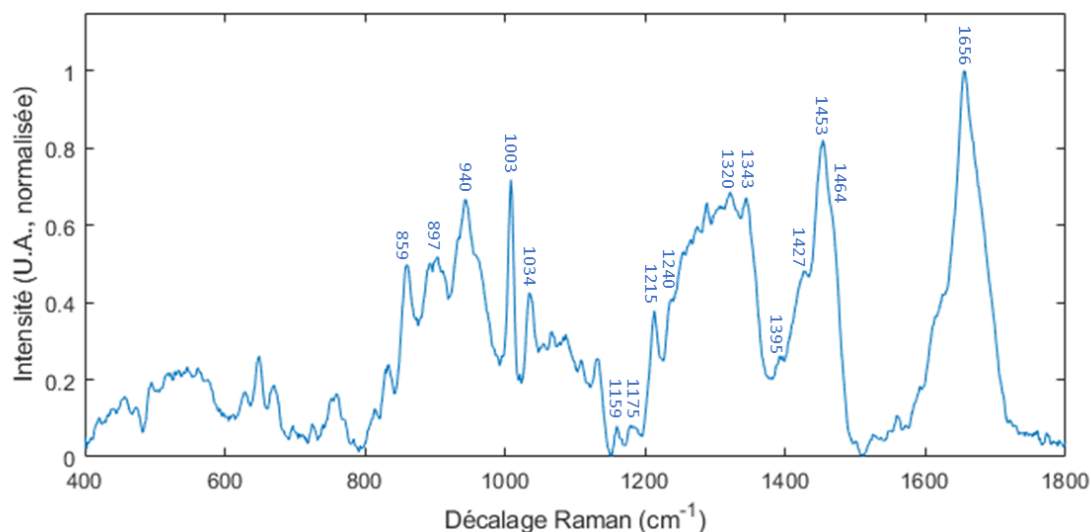


FIGURE 4.14 – Mesure d'un spectre de diffusion Raman de peau du bout du doigt. Les raies identifiées sont explicitées dans le tableau 4.1. Le temps d'acquisition est de 2×20 s.

Nombre d'onde σ (cm^{-1})	Groupe fonctionnel, mode vibrationnel
859	Doublet de Fermi de la tyrosine
897	$\rho(\text{CH}_2)$ (protéines)
940	$\rho(\text{CH}_3)$, $\nu(\text{C-C})$
1003	$\nu(\text{C-C})$ (phénylalanine)
1034	C-H "dans le plan" (phénylalanine)
1159	Sphingomyéline
1175	C-H (tyrosine, phénylalanine)
1215	Amide III, $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$
1240	Amide III, $\nu(\text{C-N})$ et $w(\text{CH}_2)$
1320	Amide III, $\delta(\text{CH}_2)$
1343	Amide III, $\nu(\text{C-N})$ et $\delta(\text{N-H})$
1395	$\delta(\text{CH}_3)$ symétrique
1427	CH_2 scissoring
1453	$\delta(\text{CH})$ (protéines, lipides)
1464	$\delta(\text{CH}_2)$ (protéines, lipides)
1656	Amide I, $\nu(\text{C=O})$

TABLEAU 4.1 – Raies présentes et identifiables dans le spectre Raman de peau de la figure 4.14. ν : étirement ; w : balancement ; δ : déformation ; ρ : hochemment (rocking).

derme (voir (c) et (d) dans la figure 4.15). On remarque finalement une augmentation des pics situés dans la région entre 800 et 980 cm^{-1} qui semble être entre autres due à la proline et au collagène [112]. Toutefois, ce critère semble délicat à utiliser pour segmenter l'épiderme et le derme car il dépend de la normalisation.

Il semblerait donc que l'on arrive à différencier l'épiderme et le derme dans un échantillon de peau *in vivo* et que cela soit cohérent avec les informations données par l'image de LC-OCT. Cette mesure reste toutefois peu précise à cause de la résolution axiale du microscope Raman. On peut toutefois se questionner sur le fait que cela puisse suffire à identifier des structures particulières à l'intérieur d'un échantillon. La durée d'acquisition est ici relativement longue, ce qui est préjudiciable pour la précision de l'analyse car il est difficile de rester fixe pendant plusieurs minutes de suite. Cela peut ne pas être problématique lorsqu'un seul spectre est acquis après une image de LC-OCT, mais cela pourrait le devenir plusieurs spectres sont mesurés notamment s'ils sont situés dans le derme profond duquel on récolte moins de signal.

4.6 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons présenté une preuve de concept de prototype de LC-OCT couplé à la microscopie Raman. L'acquisition des spectres pour des échantillons de peau *in vivo* dureraient entre 1 et 2 minutes selon la profondeur de l'analyse dans l'échantillon. Ce temps peut paraître long comparé au caractère temps réel de la LC-OCT mais reste court par rapport au temps nécessaire pour acquérir une *image* de microscopie Raman.

La spectroscopie Raman présente généralement le désavantage d'être difficile à interpréter pour des échantillons de peau. L'interprétation des spectres est possible pour des scientifiques formés la tâche, mais il est cependant difficilement concevable de présenter un spectre Raman à un dermatologue qui utiliserait le dispositif dans son processus de diagnostic. Il est donc nécessaire de développer un algorithme analysant les spectres et communiquant un résultat compréhensible pour l'utilisateur [113]. Ce résultat peut par exemple prendre la forme d'un pourcentage de certitude quant à la malignité de la lésion. Par ailleurs, nos analyses Raman ont ici été faites avec un spectromètre haut de gamme augmentant considérablement le coût du prototype. La résolution spectrale du spectromètre étant probablement surdimensionnée par rapport à nos besoins, on peut sans doute accepter une baisse en gamme tout en continuant à minimiser les pertes de signal dans le spectromètre.

Nous avons également noté dans ce chapitre une dégradation de la qualité des images de LC-OCT par rapport aux chapitres 2 et 3, ce qui est regrettable et qui fait perdre de l'intérêt à la modalité Raman si on la considère comme un module complémentaire à la LC-OCT. Diminuer l'ouverture numérique à 0.5 permettrait de retrouver la qualité d'imagerie des prototypes de LC-OCT des chapitres 2 et 3, mais augmenterait de manière significative le temps d'acquisition des spectres Raman ce qui rendrait l'analyse *in vivo* difficile voire impossible. Le caractère *in vivo* de la modalité peut également être impacté par l'ergonomie du dispositif. Aujourd'hui, le passage d'une modalité à l'autre se fait essentiellement manuellement. Afin de faciliter le processus il pourrait être judicieux de l'automatiser.

Enfin il serait intéressant de tester différentes variantes pour l'instrumentation du microscope Raman. Cela concerne notamment le filtrage confocal et donc le compromis entre résolution axiale et quantité de flux détecté. Dans notre cas la résolution axiale était en effet relativement faible, probablement à cause d'un choix sous-optimal du diamètre de la fibre de collection et de la longueur focale du système optique focalisant dans cette fibre.

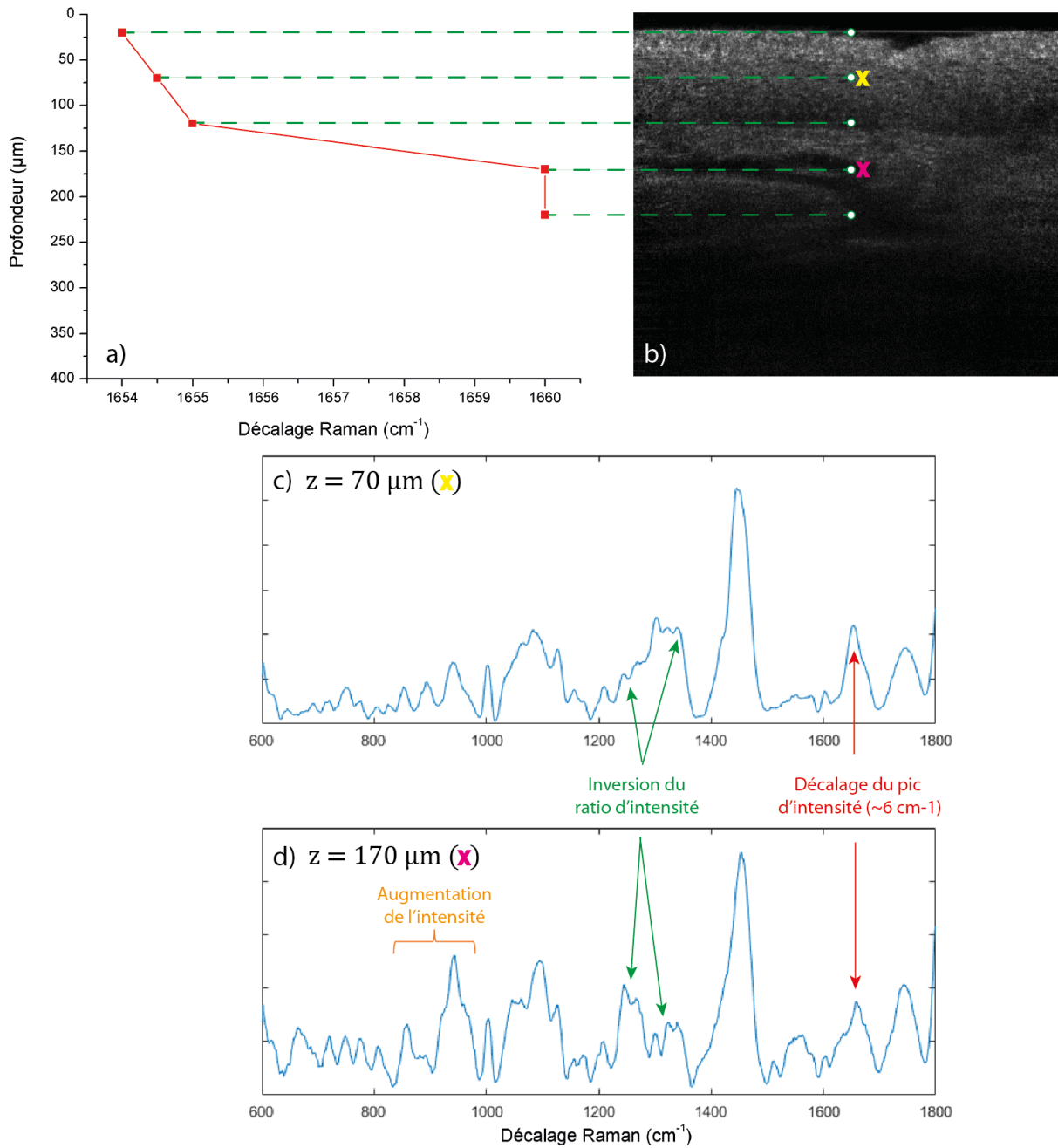


FIGURE 4.15 – Différentiation entre l'épiderme et le derme par microscopie Raman. (a) Évolution de la position de la raie Amide I en fonction de la profondeur dans la peau. (b) Image de LC-OCT de peau du dos de la main. Les positions approximatives des points analysés par microscopie Raman sont indiquées par les points blancs et les lignes discontinues vertes. (c) Spectre Raman acquis dans l'épiderme à une profondeur de 70 μm . La position de l'analyse est indiquée par une croix jaune dans l'image (b). (d) Spectre Raman acquis dans le derme à une profondeur de 170 μm . La position de l'analyse est indiquée par une croix magenta dans l'image (b).

Conclusion générale

Ce manuscrit de thèse s'articule autour du développement d'un système de tomographie par cohérence optique confocal en ligne (LC-OCT) et son application à la détection du cancer de la peau. Nous avons tout d'abord introduit, dans le premier chapitre, le contexte clinique dans lequel s'inscrit cette thèse et présenté l'état de l'art dans le domaine de l'imagerie optique non invasive en dermatologie. Le cancer de la peau est le type de cancer le plus commun et le nombre de cas semble être en constante augmentation, notamment dans les pays occidentaux. Nous avons également présenté les conditions qu'une modalité d'imagerie doit remplir pour efficacement améliorer le processus actuel de diagnostic du cancer de la peau. Ces conditions incluent évidemment des critères de qualité d'imagerie mais également des critères d'ergonomie. Ce chapitre nous permet de dresser un bilan de la situation actuelle et de montrer qu'il existe encore un besoin pour un dispositif d'imagerie non invasive en dermatologie.

* * *

Le deuxième chapitre a été consacré à la description du principe de la LC-OCT. Cette technique d'imagerie permet de réaliser des images en coupe verticale de la peau avec une résolution cellulaire ($\sim 1 \mu\text{m}$), une profondeur d'imagerie permettant de visualiser l'épiderme ainsi que le haut du derme ($\sim 400 \mu\text{m}$), et une fréquence d'acquisition permettant l'imagerie *in vivo* (~ 10 images par seconde). Grâce à l'éclairage et la détection selon une ligne, la LC-OCT permet d'acquérir un B-scan avec un seul balayage axial. La vitesse de balayage est ainsi considérablement réduite comparé aux méthodes nécessitant à la fois un balayage axial et un balayage latéral. Cela rend possible l'ajustement continu de la mise au point de l'objectif à mesure que le plan de cohérence est déplacé dans l'échantillon. Ainsi, des objectifs avec une relativement grande ouverture numérique peuvent être utilisés, ce qui permet l'imagerie à haute résolution. Par ailleurs, l'éclairage et la détection selon une ligne crée un filtrage confocal permettant de rejeter une grande partie de la lumière incohérente et ainsi d'obtenir des images ayant une grande sensibilité avec des temps d'acquisition du signal interférométrique courts (quelques microsecondes).

Appliquée à l'imagerie de la peau, la LC-OCT pourrait fournir un outil performant pour l'amélioration du processus de détection du cancer de la peau. La LC-OCT fait d'ailleurs actuellement l'objet de plusieurs études cliniques dans divers centres hospitaliers en Europe. Ces études cliniques visent à mettre en évidence la capacité de la LC-OCT à détecter *tous* les types de cancers, y compris les mélanomes. En effet, le mélanome se développe généralement à partir de la jonction dermo-épidermique (JDE), ne forme pas de larges tumeurs comme le carcinome et possède un fort potentiel métastatique, ce qui requiert une relativement grande profondeur d'imagerie et une forte résolution afin de le détecter à un stade de développement très précoce. La LC-OCT produit des images avec une résolution cellulaire jusqu'à une profondeur permettant de visualiser la JDE, ce qui la rend adaptée à la détection des mélanomes et de surpasser l'état de l'art.

Bien que la LC-OCT constitue déjà un outil de diagnostic performant en soi, nous avons cherché à en améliorer les performances en développant plusieurs extensions. Par exemple, comme

pour tout système d'imagerie optique, il existe un compromis entre résolution et profondeur de pénétration déterminé par la longueur d'onde. Grâce à un dispositif de LC-OCT à deux bandes, nous avons pu dépasser dans une certaine mesure ce compromis. De plus, la LC-OCT ne produit que des images morphologiques et ne fournit aucune information concernant la composition moléculaire des échantillons. Or, cette information est précieuse car elle permet de différencier des tissus sains de tissus cancéreux. Afin de pallier ce manque, nous avons conçu un dispositif de LC-OCT couplé à la spectroscopie Raman.

* * *

Dans le troisième chapitre, nous avons présenté un prototype de LC-OCT à deux bandes spectrales centrées autour de 770 nm et 1250 nm. Avec un tel système nous avons pu acquérir *in vivo* et simultanément des images avec une bonne résolution spatiale ($1.2\ \mu\text{m} \times 1.3\ \mu\text{m}$, axial \times latéral) et une profondeur d'environ 400 μm , et des images dont la résolution est légèrement dégradée ($2.7\ \mu\text{m} \times 2.3\ \mu\text{m}$, axial \times latéral) mais dont la profondeur de pénétration est étendue (700 μm).

Les images acquises simultanément peuvent être fusionnées pour créer une unique image conservant les propriétés intéressantes de chaque image. La fusion est réalisée en sommant les deux images avec un poids évoluant linéairement en fonction de la profondeur de pénétration. L'image VIS est alors prédominante dans les zones superficielles de l'image fusionnée tandis que l'image IR prédomine en profondeur. Une représentation en couleur utilisant l'espace de couleur RVB, où l'image VIS est assignée au canal vert tandis que l'image IR est assignée au canal rouge, est également utilisée pour améliorer le contraste des images et révéler des informations spectroscopiques à propos des échantillons. Cette représentation a été utilisée en particulier pour mettre en évidence la présence de mélanine dans des peaux sombres et claires.

Le système de LC-OCT à une bande présenté dans le chapitre 2 fonctionne à une longueur d'onde centrale autour de 800 nm car elle a été définie comme étant le meilleur compromis entre résolution et profondeur de pénétration pour l'imagerie de la peau dans un contexte clinique. C'est donc naturellement qu'il a été décidé que la première bande du système à deux bandes fonctionnerait avec un spectre identique. La longueur d'onde centrale de la seconde bande spectrale a été choisie autour de 1300 nm comme pour la majorité des systèmes d'OCT en dermatologie.

Pour couvrir deux bandes spectrales s'étendant au total de 700 nm à 1400 nm, nous avons employé deux capteurs : le premier est un capteur au Silicium, utilisé pour la bande VIS dont le spectre se situe approximativement entre 700 nm et 900 nm ; le second est un capteur InGaAs sensible aux longueurs d'onde de la bande IR qui s'étend de 1100 nm à 1400 nm. Travailler avec un spectre aussi large avec le même objectif de microscope pose des problèmes de chromatisme. En effet, le chromatisme des objectifs de microscope implique qu'ils aient schématiquement deux focales différentes pour les deux bandes spectrales du système. Ainsi, le faisceau d'éclairage illumine deux plans différents dans l'échantillon selon la bande spectrale. Cela est corrigé en rendant le faisceau d'éclairage de la bande IR légèrement convergent avant l'objectif de façon à ce qu'il éclaire le même plan que le faisceau d'éclairage de la bande VIS. Par ailleurs, les caméras, si elles sont toutes deux placées au foyer de leurs lentilles de tube respectives, ne sont pas conjuguées au même plan dans l'échantillon. On déplace alors le capteur InGaAs du foyer image de sa lentille de tube jusqu'à ce que les plans conjugués aux caméras soient superposés.

L'interféromètre de Linnik est quant à lui commun aux deux bandes. Le processus d'acquisition des images est identique à un dispositif de LC-OCT à une seule bande. Les plans de cohérence et de focalisation sont conjointement déplacés longitudinalement par un moteur piézoélectrique pour balayer l'échantillon en profondeur. Des images interférométriques lignes sont acquises de façon à ce que le déphasage entre deux images successives soit de $\pi/2$. Un algorithme de démodulation par interférométrie à décalage de phase est utilisé pour transformer le signal interférométrique en une image en intensité. Les deux bandes spectrales ayant des longueurs

d'onde centrales différentes, le déplacement nécessaire pour obtenir un déphasage de $\pi/2$ est également différent. Le déclenchement de l'acquisition d'images interférométriques se fait donc à des intervalles de temps différents pour les deux bandes, ce qui est permis par le déplacement continu du moteur piézoélectrique.

L'ajout d'une bande spectrale supplémentaire n'est toutefois pas sans inconvénient. D'une part, le coût est significativement augmenté par l'utilisation d'une deuxième caméra, en particulier s'il s'agit d'un capteur InGaAs. L'utilisation de deux caméras augmentent également l'encombrement et le poids du dispositif. Si un dispositif de LC-OCT mono-bande peut être rendu portable, cela semble être compromis pour un dispositif bi-bande. La LC-OCT à deux bandes serait donc limitée aux montages sur banc optique ou, au mieux, sur bras articulé. Toutefois, nous avons cherché dans le cadre de cette thèse à atteindre les meilleures performances possibles en utilisant du matériel de pointe. Il serait alors possible de réduire les coûts et l'encombrement tout en limitant au maximum la perte de qualité d'imagerie en utilisant du matériel adapté.

* * *

Le quatrième chapitre est consacré au couplage de la LC-OCT à la microscopie Raman dont l'intérêt pour le diagnostic du cancer cutané a été démontré. L'effet Raman est un phénomène de diffusion inélastique, c'est-à-dire que l'onde diffusée a une fréquence différente de l'onde incidente. Le spectre diffusé de manière inélastique est caractéristique des liaisons chimiques présentes dans une molécule et peut donc être utilisé pour identifier la composition moléculaire des tissus analysés. On parle de microscopie Raman quand l'éclairage et la collection du signal sont faits par un microscope confocal, ce qui est notre cas dans ce projet.

Une des principales contraintes techniques imposées lors de la conception de ce montage était d'utiliser le même objectif de microscope en LC-OCT et en microscopie Raman. Les objectifs de microscope sont en partie définis par leur ouverture numérique qui agit sur la résolution axiale et latérale ainsi que sur l'angle solide de cône de collection du signal lumineux. L'augmentation de l'ouverture numérique s'accompagne généralement d'une sensibilité accrue aux aberrations induites par les tissus imagés, ce qui peut potentiellement réduire la qualité d'imagerie. Ainsi, nous avons trouvé qu'il n'était pas souhaitable en LC-OCT d'utiliser des objectifs de microscope dont l'ouverture numérique est supérieure à 0.5. Toutefois, il a été décidé d'accepter un compromis en utilisant des objectifs ouverts à 0.8 afin d'optimiser la capacité de collection des objectifs dans le but d'améliorer le rapport signal sur bruit en microscopie Raman.

Le prototype a été calibré de façon à connaître la position de l'analyse Raman sur une image de LC-OCT. Une fois cette calibration faite, nous avons appliqué le prototype à l'analyse de la peau. Dans un premier temps, nous avons confirmé que notre dispositif était capable de mesurer des spectres Raman de la surface de la peau avec un rapport signal sur bruit convenable en un temps acceptable. Les spectres obtenus en une vingtaine de secondes permettaient bien de mettre en évidence des composés typiquement présents dans la peau. Nous avons par la suite montré que l'on pouvait différencier l'épiderme et le derme grâce à la microscopie Raman. Ce résultat a été confirmé par des images de LC-OCT. Le temps d'acquisition des spectres pouvait aller de 60 à 120 secondes selon la profondeur.

Nous avons montré dans ce chapitre qu'un tel couplage est possible, mais ce prototype n'est cependant pas exempt de défauts. Tout d'abord, l'adaptation du montage optique à la microscopie Raman en modifiant l'ouverture numérique des objectifs de microscope impacte négativement la qualité et le champ d'imagerie en LC-OCT. Ensuite, comme pour la LC-OCT à deux bandes, le matériel de pointe utilisé, en particulier le spectromètre, augmente considérablement le coût du dispositif. Il est toutefois imaginable qu'une baisse en gamme de certains composants coûteux puisse se faire sans dégradation substantielle de la qualité de l'analyse. En revanche, contrairement à la LC-OCT à deux bandes, les composants additionnels devant nécessairement se trouver

proches du système optique peuvent tout à fait être compacts et légers. Il serait donc en théorie possible d'intégrer un module Raman dans une sonde portable de LC-OCT.

* * *

Durant ce projet de thèse, nous avons mis en évidence la modularité de la LC-OCT. Tout comme en OCT et en RCM, la liste des modalités pouvant faire l'objet de couplage à la LC-OCT est longue, ce qui ouvre de nombreuses perspectives.

Tout d'abord, en bloquant le bras de référence de l'interféromètre il est possible de faire de l'imagerie de microscopie confocale en ligne, que ce soit en réflectance ou en fluorescence. La qualité d'imagerie n'est pas aussi bonne qu'avec un éclairage et une détection ponctuels, mais les images viendraient s'ajouter aux images de LC-OCT déjà bien résolues. La source de lumière polychromatique utilisée en LC-OCT n'est pas idéale pour ce genre d'applications mais la source monochromatique à 785 nm utilisée pour le couplage avec la microscopie Raman pourrait être utilisée avec des fluorophores exogènes ou des fluorophores endogènes comme la mélanine, ou encore plus simplement en réflectance. Par ailleurs, un montage couplée à la microscopie Raman peut également servir pour la spectroscopie de fluorescence. D'autres méthodes de spectroscopie peuvent également être intéressantes à étudier. La spectroscopie par réflexion diffuse est une méthode de spectroscopie parfois utilisée dans le diagnostic du cancer de la peau. Cette méthode consiste à mesurer le spectre diffusé par un volume éclairé par un faisceau de lumière spectralement large, souvent dans l'infrarouge. Elle pourrait en outre mettre à profit le laser supercontinuum utilisé en LC-OCT.

Toutes les variantes d'OCT et d'OCM à balayage et plein champ peuvent également être implémentées en LC-OCT. Cela inclut par exemple la PS-OCT (*Polarization Sensitive OCT*) permettant d'apporter du contraste aux images et d'acquérir des informations supplémentaires grâce à l'influence de l'échantillon sur la polarisation de la lumière incidente ; la SV-OCT (*Speckle Variance OCT*) tirant profit du speckle présent dans les images pour mettre en évidence les mouvements de l'échantillon ; et l'OCT spectroscopique mesurant, par transformée de Fourier, le spectre de la lumière rétrodiffusée par l'objet de manière résolue spatialement et permettant ainsi de mesurer localement la longueur d'onde centrale dans une image d'OCT. Ces deux dernières méthodes présentent l'avantage de ne nécessiter aucun changement dans le montage optique.

Bibliographie

- [1] Burak Ömür Cakir, Peter Adamson, and Cemal Cingi. Epidemiology and Economic Burden of Nonmelanoma Skin Cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, 20(4) :419–422, nov 2012.
- [2] Zoe Apalla, Aimilios Lallas, Elena Sotiriou, Elizabeth Lazaridou, and Demetrios Ioannides. Epidemiological trends in skin cancer. *Dermatology Practical & Conceptual*, 7(2) :1–6, apr 2017.
- [3] Institut National du Cancer. Epidémiologie des cancers cutanés.
- [4] Paul C. Jou, Ron J. Feldman, and Kenneth J. Tomecki. UV protection and sunscreens : What to tell patients. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 79(6) :427–436, 2012.
- [5] Tom Lister, Philip A. Wright, and Paul H. Chappell. Optical properties of human skin. *Journal of Biomedical Optics*, 17(9) :0909011, sep 2012.
- [6] Craig F. Bohren and Donald R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. Wiley, 1998.
- [7] J. Schäfer, S. C. Lee, and A. Kienle. Calculation of the near fields for the scattering of electromagnetic waves by multiple infinite cylinders at perpendicular incidence. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*, 113(16) :2113–2123, nov 2012.
- [8] Jan-Patrick Schäfer. *Implementierung und Anwendung analytischer und numerischer Verfahren zur Lösung der Maxwellgleichungen für die Untersuchung der Lichtausbreitung in biologischem Gewebe*. PhD thesis, Universität Ulm, apr 2011.
- [9] Marvin Minsky. Microscopy apparatus, nov 1957.
- [10] T. Wilson. Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. *Journal of Microscopy*, 244(2) :113–121, nov 2011.
- [11] Antoine Federici. *Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique plein champ étendus spatialement et spectralement*. PhD thesis, oct 2015.
- [12] Ralph Gräf, Jens Rietdorf, and Timo Zimmermann. *Live Cell Spinning Disk Microscopy*. Springer, Berlin, Heidelberg, may 2005.
- [13] Piergiacomo Calzavara-Pinton, Caterina Longo, Marina Venturini, Raffaella Sala, and Giovanni Pellacani. Reflectance Confocal Microscopy for In Vivo Skin Imaging. *Photochemistry and Photobiology*, 84(6) :1421–1430, nov 2008.
- [14] Warren R. Zipfel, Rebecca M. Williams, and Watt W. Webb. Nonlinear magic : multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11) :1369–1377, nov 2003.
- [15] Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–6, apr 1990.
- [16] Leila Mostaçõ-Guidolin, Nicole L. Rosin, and Tillie-Louise Hackett. Imaging collagen in scar tissue : Developments in second harmonic generation microscopy for biomedical applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), aug 2017.
- [17] Jonas Ogien. *Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau*. PhD thesis, nov 2017.

- [18] David Huang, Eric A. Swanson, Charles P. Lin, Joel S. Schuman, William G. Stinson, Warren Chang, Michael R. Hee, Thomas Flotte, Kenton Gregory, Carmen A. Puliafito, and James G. Fujimoto. Optical coherence tomography. *Science*, 254(5035) :1178–81, nov 1991.
- [19] E. A. Swanson, J. A. Izatt, C. P. Lin, J. G. Fujimoto, J. S. Schuman, M. R. Hee, D. Huang, and C. A. Puliafito. In vivo retinal imaging by optical coherence tomography. *Optics Letters*, 18(21) :1864, nov 1993.
- [20] Hiram G. Bezerra, Marco A. Costa, Giulio Guagliumi, Andrew M. Rollins, and Daniel I. Simon. Intracoronary optical coherence tomography : a comprehensive review clinical and research applications. *JACC. Cardiovascular interventions*, 2(11) :1035–46, nov 2009.
- [21] Arnaud Dubois, Olivier Levecq, Hicham Azimani, Arthur Davis, Jonas Ogien, David Siret, and Anaïs Barut. Line-field confocal time-domain optical coherence tomography with dynamic focusing. *Optics Express*, 26(26) :33534, dec 2018.
- [22] Joel S. Schuman, C. A. Puliafito, James G. Fujimoto, and Jay S. Duker. *Optical coherence tomography of ocular diseases, 3rd Edition*. Slack Inc, 2013.
- [23] Elke Sattler, Raphaela Kästle, and Julia Welzel. Optical coherence tomography in dermatology. *Journal of Biomedical Optics*, 18(6) :061224, jan 2013.
- [24] Desmond C. Adler, Chao Zhou, Tsung-Han Tsai, Joe Schmitt, Qin Huang, Hiroshi Mashimo, and James G. Fujimoto. Three-dimensional endomicroscopy of the human colon using optical coherence tomography. *Optics express*, 17(2) :784–96, jan 2009.
- [25] Maciej Wojtkowski. High-speed optical coherence tomography : basics and applications. *Applied Optics*, 49(16) :D30, jun 2010.
- [26] Michael Choma, Marinko Sarunic, Changhuei Yang, and Joseph Izatt. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography. *Optics Express*, 11(18) :2183, sep 2003.
- [27] Lutz Schmitz, Uwe Reinhold, Erhard Bierhoff, and Thomas Dirschka. Optical coherence tomography : its role in daily dermatological practice. *JDDG : Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 11(6) :499–507, jun 2013.
- [28] Jon Holmes. Theory and applications of multi-beam OCT. In *1st Canterbury Workshop on Optical Coherence Tomography and Adaptive Optics*, volume 7139, page 713908. International Society for Optics and Photonics, sep 2008.
- [29] 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. *Optics Express*, 13(26) :10523, dec 2005.
- [30] Aaron D. Aguirre, Chao Zhou, Hsiang-Chieh Lee, Osman O. Ahsen, and James G. Fujimoto. *Optical Coherence Microscopy*. Springer International Publishing, Cham, 2015.
- [31] Bing Qi, A. Phillip Himmer, L. Maggie Gordon, X. D. Victor Yang, L. David Dickensheets, and I. Alex Vitkin. Dynamic focus control in high-speed optical coherence tomography based on a microelectromechanical mirror. *Optics Communications*, 232(1-6) :123–128, mar 2004.
- [32] Victor X. D. Yang, Nigel Munce, Julius Pekar, Maggie L. Gordon, Stewart Lo, Norman E. Marcon, Brian C. Wilson, and I. Alex Vitkin. Micromachined array tip for multifocus fiber-based optical coherence tomography. *Optics Letters*, 29(15) :1754, aug 2004.
- [33] A. D. Aguirre, P. Hsiung, T. H. Ko, I. Hartl, and J. G. Fujimoto. High-resolution optical coherence microscopy for high-speed, in vivo cellular imaging. *Optics Letters*, 28(21) :2064, nov 2003.
- [34] E. Beaurepaire, A. C. Boccara, M. Lebec, L. Blanchot, and H. Saint-Jalmes. Full-field optical coherence microscopy. *Optics Letters*, 23(4) :244, feb 1998.

- [35] Arnaud Dubois, Kate Grieve, Gael Moneron, Romain Lecaque, Laurent Vabre, and Claude Boccara. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. *Applied Optics*, 43(14) :2874, may 2004.
- [36] Boris Považay, Angelika Unterhuber, Boris Hermann, Harald Sattmann, Holger Arthaber, and Wolfgang Drexler. Full-field time-encoded frequency-domain optical coherence tomography. *Optics Express*, 14(17) :7661, aug 2006.
- [37] Al-Hafeez Dhalla, Justin V. Migacz, and Joseph A. Izatt. Crosstalk rejection in parallel optical coherence tomography using spatially incoherent illumination with partially coherent sources. *Optics Letters*, 35(13) :2305, jul 2010.
- [38] Bettina Heise, Stefan E. Schausberger, Sören Häuser, Bernhard Plank, Dietmar Salaberger, Elisabeth Leiss-Holzinger, and David Stifter. Full-field optical coherence microscopy with a sub-nanosecond supercontinuum light source for material research. *Optical Fiber Technology*, 18(5) :403–410, sep 2012.
- [39] Anton Grebenyuk, Antoine Federici, Vladimir Ryabukho, and Arnaud Dubois. Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination. *Applied Optics*, 53(8) :1697, mar 2014.
- [40] 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. *Optics Letters*, 29(7) :736, apr 2004.
- [41] Blandine Laude, Antonello De Martino, Bernard Drévillon, Laurence Benattar, and Laurent Schwartz. Full-field optical coherence tomography with thermal light. *Applied Optics*, 41(31) :6637, nov 2002.
- [42] Arnaud Dubois, Gael Moneron, and Claude Boccara. Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2 μm wavelength region. *Optics Communications*, 266(2) :738–743, oct 2006.
- [43] Antoine Federici and Arnaud Dubois. Full-field optical coherence microscopy with optimized ultrahigh spatial resolution. *Optics Letters*, 40(22) :5347, nov 2015.
- [44] Jonas Ogien and Arnaud Dubois. High-resolution full-field optical coherence microscopy using a broadband light-emitting diode. *Optics Express*, 24(9) :9922, may 2016.
- [45] Arnaud Dubois, Laurent Vabre, Albert-Claude Boccara, and Emmanuel Beaurepaire. High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope. *Applied Optics*, 41(4) :805, feb 2002.
- [46] Arnaud Dubois. Focus defect and dispersion mismatch in full-field optical coherence microscopy. *Applied Optics*, 56(9) :D142—D150, 2017.
- [47] Yves Coello, Bingwei Xu, Tricia L. Miller, Vadim V. Lozovoy, and Marcos Dantus. Group-velocity dispersion measurements of water, seawater, and ocular components using multiphoton intrapulse interference phase scan. *Applied Optics*, 46(35) :8394, dec 2007.
- [48] Refractiveindex.info. Refractive index of BK7 - SCHOTT.
- [49] Huafeng Ding, Jun Q. Lu, William A. Wooden, Peter J. Kragel, and Xin-Hua 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(6) :1479–1489, mar 2006.
- [50] Joseph A. Izatt, Eric A. Swanson, James G. Fujimoto, Michael R. Hee, and Gabrielle M. Owen. Optical coherence microscopy in scattering media. *Optics Letters*, 19(8) :590, apr 1994.
- [51] E. A. Swanson, D. Huang, M. R. Hee, J. G. Fujimoto, C. P. Lin, and C. A. Puliafito. High-speed optical coherence domain reflectometry. *Optics Letters*, 17(2) :151–153, jan 1992.

- [52] Kieran G. Larkin. Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry. *Journal of the Optical Society of America A*, 13(4) :832, apr 1996.
- [53] Delphine Sacchet, Michal Brzezinski, Julien Moreau, Patrick Georges, and Arnaud Dubois. Motion artifact suppression in full-field optical coherence tomography. *Applied optics*, 49(9) :1480–8, mar 2010.
- [54] S. Labiau, G. David, S. Gigan, and A. C. Boccaro. Defocus test and defocus correction in full-field optical coherence tomography. *Optics letters*, 34(10) :1576–8, may 2009.
- [55] Arnaud Dubois. *Handbook of Full-Field Optical Coherence Microscopy : Technology and Applications*. Pan Stanford Pub, 2016.
- [56] Arnaud Dubois. Phase-map measurements by interferometry with sinusoidal phase modulation and four integrating buckets. *Journal of the Optical Society of America*, 18(8) :1972–1977, aug 2001.
- [57] Boris Považay, Alexander A. Apolonski, Angelika Unterhuber, Boris Hermann, Kostadinka K. Bizheva, Harald Sattmann, Phillip S. J. Russell, Ferenc Krausz, Adolf F. Fercher, and Wolfgang Drexler. Visible light optical coherence tomography. In Valery V. Tuchin, Joseph A. Izatt, and James G. Fujimoto, editors, *Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications VI*, volume 4619, pages 90–94. International Society for Optics and Photonics, jun 2002.
- [58] Ji Yi, Qing Wei, Wenzhong Liu, Vadim Backman, and Hao F. Zhang. Visible-light optical coherence tomography for retinal oximetry. *Optics Letters*, 38(11) :1796, jun 2013.
- [59] J. M. Schmitt, A. Knüttel, M. Yadlowsky, and M. A. Eckhaus. Optical-coherence tomography of a dense tissue : Statistics of attenuation and backscattering. *Physics in Medicine and Biology*, 39(10) :1705–1720, oct 1994.
- [60] Sheng-Hao Tseng, Paulo Bargo, Anthony Durkin, and Nikiforos Kollias. Chromophore concentrations, absorption and scattering properties of human skin in-vivo. *Optics Express*, 17(17) :14599, aug 2009.
- [61] Aneesh Alex, Boris Považay, Bernd Hofer, Sergei Popov, Carl Glittenberg, Susanne Binder, and Wolfgang Drexler. Multispectral in vivo three-dimensional optical coherence tomography of human skin. *Journal of Biomedical Optics*, 15(2) :026025, 2010.
- [62] Felix Spöler, Stefan Kray, Patrik Grychtol, Barbara Hermes, Jörg Bornemann, Michael Först, and Heinrich Kurz. Simultaneous dual-band ultra-high resolution optical coherence tomography. *Optics Express*, 15(17) :10832, 2007.
- [63] Delphine Sacchet, Julien Moreau, Patrick Georges, and Arnaud Dubois. Simultaneous dual-band ultra-high resolution full-field optical coherence tomography. *Optics Express*, 16(24) :19434, nov 2008.
- [64] Peter Cimalla, Julia Walther, Mirko Mehner, Maximiliano Cuevas, and Edmund Koch. Simultaneous dual-band optical coherence tomography in the spectral domain for high resolution in vivo imaging. *Optics Express*, 17(22) :19486, oct 2009.
- [65] Antoine Federici and Arnaud Dubois. Three-band, 1.9- μm axial resolution full-field optical coherence microscopy over a 530–1700 nm wavelength range using a single camera. *Optics letters*, 39(6) :1374–7, mar 2014.
- [66] G. Giano, F. Salzenstein, and P. Montgomery. Comparison of envelope detection techniques in coherence scanning interferometry. *Applied Optics*, 55(24) :6763, aug 2016.
- [67] Yu Chen, Shu-Wei Huang, Aaron D. Aguirre, and James G. Fujimoto. High-resolution line-scanning optical coherence microscopy. *Optics Letters*, 32(14) :1971, jul 2007.
- [68] 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. *Optics Express*, 14(2) :726, jan 2006.

- [69] M. Linh Tran, Ben J. Powell, and Paul Meredith. Chemical and structural disorder in eumelanins : A possible explanation for broadband absorbance. *Biophysical Journal*, 90(3) :743–752, feb 2006.
- [70] I. Alex Vitkin, Joshua Woolsey, Brian C. Wilson, and R. Rox Anderson. Optical and thermal characterization of natural (*Sepia officinalis*) melanin. *Photochemistry and photobiology*, 59(4) :455–62, apr 1994.
- [71] Milind Rajadhyaksha, Melanie Grossman, Dina Esterowitz, Robert H. Webb, and R. Rox Anderson. In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin : Melanin provides strong contrast. *Journal of Investigative Dermatology*, 104(6) :946–952, jun 1995.
- [72] J. M. Schmitt, S. H. Xiang, and K. M. Yung. Speckle in Optical Coherence Tomography. *Journal of Biomedical Optics*, 4(1) :95, 1999.
- [73] Michael Pircher, Erich Götzinger, Rainer Leitgeb, Adolf F. Fercher, and Christoph. K. Hitzenberger. Speckle reduction in optical coherence tomography by frequency compounding. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3) :565, 2003.
- [74] Caroline Magnain, Hui Wang, Sava Sakadžić, Bruce Fischl, and David A. Boas. En face speckle reduction in optical coherence microscopy by frequency compounding. *Optics Letters*, 41(9) :1925, may 2016.
- [75] Bingjie Huang, Peng Bu, Xiangzhao Wang, Nan Nan, and Xin Guo. Speckle reduction in parallel optical coherence tomography by spatial compounding. *Optics and Laser Technology*, 45(1) :69–73, feb 2013.
- [76] N. Iftimia, B. E. Bouma, and G. J. Tearney. Speckle reduction in optical coherence tomography by “path length encoded” angular compounding. *Journal of Biomedical Optics*, 8(2) :260, 2003.
- [77] Hui Wang and Andrew M. Rollins. Speckle reduction in optical coherence tomography using angular compounding by B-scan Doppler-shift encoding. *Journal of Biomedical Optics*, 14(3) :030512, 2009.
- [78] Jeehyun Kim, Donald T. Miller, Eunha Kim, Sanghoon Oh, Junghwan Oh, and Thomas E. Milner. Optical coherence tomography speckle reduction by a partially spatially coherent source. *J. Biomed. Opt.*, 10(6)(6) :64034, 2005.
- [79] Desmond C. Adler, Tony H. Ko, and James G. Fujimoto. Speckle reduction in optical coherence tomography images by use of a spatially adaptive wavelet filter. *Optics Letters*, 29(24) :2878, dec 2004.
- [80] Markus A. Mayer, Anja Borsdorf, Martin Wagner, Joachim Hornegger, Christian Y. Mardin, and Ralf P. Tornow. Wavelet denoising of multiframe optical coherence tomography data. *Biomedical Optics Express*, 3(3) :572, mar 2012.
- [81] Krista Amolins, Yun Zhang, and Peter Dare. Wavelet based image fusion techniques - An introduction, review and comparison. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 62(4) :249–263, sep 2007.
- [82] Michel Misiti, Yves Misiti, Georges Oppenheim, and Jean-Michel Poggi. *Wavelets and their applications*. ISTE, iste ltd. edition, 2007.
- [83] U. Morgner, W. Drexler, F. X. Kärtner, X. D. Li, C. Pitris, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto. Spectroscopic optical coherence tomography. *Optics Letters*, 25(2) :111, jan 2000.
- [84] V. M. Kodach, J. Kalkman, D. J. Faber, and T. G. van Leeuwen. Quantitative comparison of the OCT imaging depth at 1300 nm and 1600 nm. *Biomedical Optics Express*, 1(1) :176, jul 2010.
- [85] George M. Hale and Marvin R. Querry. Optical Constants of Water in the 200-nm to 200- μ m Wavelength Region. *Applied Optics*, 12(3) :555, mar 1973.

- [86] Xiao Shu, Lisa Beckmann, and Hao F. Zhang. Visible-light optical coherence tomography : a review. *Journal of Biomedical Optics*, 22(12) :1, dec 2017.
- [87] Chandrasekhara V. Raman. A change of wave-length in light scattering. *Nature*, 121(3051) :619, apr 1928.
- [88] Chandrasekhara V. Raman and Kariamanickam S. Krishnan. A new type of secondary radiation. *Nature*, 121(3048) :501–502, mar 1928.
- [89] Chad A. Lieber, Shovan K. Majumder, Darrel L. Ellis, D. Dean Billheimer, and Anita Mahadevan-Jansen. In vivo nonmelanoma skin cancer diagnosis using Raman microspectroscopy. *Lasers in Surgery and Medicine*, 40(7) :461–467, 2008.
- [90] E. Brauchle, S. Noor, E. Holtorf, C. Garbe, K. Schenke-Layland, and C. Busch. Raman spectroscopy as an analytical tool for melanoma research. *Clinical and Experimental Dermatology*, 39(5) :636–645, 2014.
- [91] H. Lui, J. Zhao, D. McLean, and H. Zeng. Real-time Raman Spectroscopy for In Vivo Skin Cancer Diagnosis. *Cancer Research*, 72(10) :2491–2500, 2012.
- [92] Chetan A. Patil, Harish Kirshnamoorthi, Darrel L. Ellis, Ton G. van Leeuwen, and Anita Mahadevan-Jansen. A clinical instrument for combined raman spectroscopy-optical coherence tomography of skin cancers. *Lasers in surgery and medicine*, 43(2) :143–51, feb 2011.
- [93] Jan Klemes, Adela Kotzianova, Marek Pokorny, Peter Mojzes, Jindrich Novak, Lada Sukova, Jaroslav Demuth, Jaroslav Vesely, Ladislav Sasek, and Vladimir Velebny. Non-invasive diagnostic system and its opto-mechanical probe for combining confocal Raman spectroscopy and optical coherence tomography. *Journal of Biophotonics*, 10(11) :1442–1449, may 2017.
- [94] Peter J. Caspers, Gerald W. Lucassen, and Gerwin J. Puppels. Combined in vivo confocal Raman spectroscopy and confocal microscopy of human skin. *Biophysical Journal*, 85(1) :572–580, jul 2003.
- [95] Hequn Wang, Anthony M. D. Lee, Harvey Lui, David I. McLean, and Haishan Zeng. A Method for accurate in vivo micro-Raman spectroscopic measurements under guidance of advanced microscopy imaging. *Scientific Reports*, 3(1) :1890, dec 2013.
- [96] C. N. Banwell and Elaine M. McCash. *Fundamentals of molecular spectroscopy*. McGraw-Hill, 1994.
- [97] Theodore H. Maiman. Ruby laser systems, nov 1965.
- [98] W. S. Boyle and G. E. Smith. Charge Coupled Semiconductor Devices. *Bell System Technical Journal*, 49(4) :587–593, apr 1970.
- [99] Thomas Dieing, Olaf Hollricher, and Jan Toporski. *Confocal Raman Microscopy*, volume 158 of *Springer Series in Optical Sciences*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 2011.
- [100] A. C. Croce and G. Bottiroli. Autofluorescence spectroscopy and imaging : a tool for biomedical research and diagnosis. *European Journal of Histochemistry*, 58(4) :2461, dec 2014.
- [101] Chetan Patil, Isaac J. Pence, Chad Lieber, and Anita Mahadevan-Jansen. 1064 nm dispersive Raman spectroscopy of tissues with strong near-infrared autofluorescence. *Optics letters*, 39(2) :303–6, jan 2014.
- [102] Z. Huang, H. Zeng, I. Hamzavi, D. I. McLean, and H. Lui. Rapid near-infrared Raman spectroscopy system for real-time in vivo skin measurements. *Optics letters*, 26(22) :1782–4, nov 2001.

- [103] Chetan A. Patil, Nienke Bosschaart, Matthew D. Keller, Ton G. van Leeuwen, and Anita Mahadevan-Jansen. Combined Raman spectroscopy and optical coherence tomography device for tissue characterization. *Optics Letters*, 33(10) :1135–1137, may 2008.
- [104] Semrock. Flatness of Dichroic Beamsplitters Affects Focus and Image Quality.
- [105] Chad A. Lieber and Anita Mahadevan-Jansen. Automated Method for Subtraction of Fluorescence from Biological Raman Spectra. *Applied Spectroscopy*, Vol. 57, Issue 11, pp. 1363-1367, 57(11) :1363–1367, nov 2003.
- [106] Jianhua Zhao, Harvey Lui, David I. McLean, and Haishan Zeng. Automated Autofluorescence Background Subtraction Algorithm for Biomedical Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, Vol. 61, Issue 11, pp. 1225-1232, 61(11) :1225–1232, nov 2007.
- [107] Haishan Zeng, Harvey Lui, Zhiwei Huang, and David I. McLean. Multimodal Detection of Tissue Abnormalities Based on Raman and Background Fluorescence Spectroscopy, 2008.
- [108] Zhiwei Huang, Haishan Zeng, Iltefat Hamzavi, Abdulmajeed Alajlan, Eileen Tan, David I. McLean, and Harvey Lui. Cutaneous melanin exhibiting fluorescence emission under near-infrared light excitation. *Journal of biomedical optics*, 11(3) :34010, 2006.
- [109] Radu Boitor, Kenny Kong, Dustin Shipp, Sandeep Varma, Alexey Koloydenko, Kusum Kulkarni, Somaia Elsheikh, Tom Bakker Schut, Peter Caspers, Gerwin Puppels, Martin van der Wolf, Elena Sokolova, T. E. C. Nijsten, Brogan Salence, Hywel Williams, and Ioan Notingher. Automated multimodal spectral histopathology for quantitative diagnosis of residual tumour during basal cell carcinoma surgery. *Biomedical Optics Express*, 8(12) :5749, dec 2017.
- [110] Ali Tfayli. *Caractérisation structurale et moléculaire de la peau par microspectroscopies optiques vibrationnelles. Applications au diagnostic précoce des tumeurs cutanées et à l'étude de la diffusion de principes actifs à visée thérapeutique.* PhD thesis, Université de Reims Champagne-Ardenne, 2007.
- [111] Giuseppe Pezzotti, Marco Boffelli, Daisuke Miyamori, Takeshi Uemura, Yoshinori Marunaka, Wenliang Zhu, and Hiroshi Ikegaya. Raman spectroscopy of human skin : looking for a quantitative algorithm to reliably estimate human age. *Journal of Biomedical Optics*, 20(6) :065008, jun 2015.
- [112] T. T. Nguyen, C. Gobinet, J. Feru, S. Brassart-Pasco, M. Manfait, and O. Piot. Characterization of type I and IV collagens by Raman microspectroscopy : Identification of spectral markers of the dermo-epidermal junction. *Advances in Biomedical Spectroscopy*, 7(5-6) :105–110, jul 2013.
- [113] Monika Gniadecka, Peter Alshede Philipsen, Sigurdur Sigurdsson, Sonja Wessel, Ole Faurskov Nielsen, D. H. Christensen, Jana Hercogova, Kristian Rossen, Henrik Klem Thomsen, Robert Gniadecki, Lars Kai Hansen, and Hans Christian Wulf. Melanoma Diagnosis by Raman Spectroscopy and Neural Networks : Structure Alterations in Proteins and Lipids in Intact Cancer Tissue. *Journal of Investigative Dermatology*, 122(2) :443–449, 2004.

Titre : Tomographie par cohérence optique confocale en ligne multimodale pour le diagnostic non invasif des cancers cutanés

Mots clés : Imagerie médicale, imagerie optique, OCT, interférométrie, microscopie.

Résumé : Le cancer de la peau est un enjeu majeur de santé publique. Il représente le type de cancer ayant le plus fort taux de prévalence et le nombre de cas semble être en constante augmentation. Aujourd'hui, la méthode de référence pour le diagnostic du cancer cutané nécessite un échantillon de tissu suspect, appelé biopsie, prélevé après un simple examen visuel de la peau du patient. Par conséquent, près de 60 % des biopsies se révèlent être bénignes et environ 20 % des cancers de la peau ne sont pas détectés.

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit de thèse portent sur le développement d'un dispositif de tomographie par cohérence optique confocale en ligne (LC-OCT) capable de produire des images d'une qualité similaire aux coupes histologiques de manière non invasive et *in vivo*. Le prototype conçu fonctionne à une longueur d'onde centrale autour de 800 nm avec une largeur spectrale d'environ 150 nm. Il a été appliqué à l'imagerie *in vivo* de la peau avec une résolution spatiale quasi-isotrope d'environ 1 μm et une profondeur de pénétration de 400 μm . Ce dispositif pourrait alors être utilisé pour améliorer l'efficacité du processus de diagnostic du cancer de la peau en limitant le nombre de cas non détectés ainsi que le nombre de biopsies inutiles.

Nous présentons ensuite un dispositif de LC-OCT fonctionnant dans deux bandes spectrales centrées autour de 770 nm et 1250 nm. La première bande produit des images à haute résolution (1.3 μm \times 1.2 μm , latéral \times axial) tandis que la seconde offre une profondeur de pénétration accrue (700 μm). En fusionnant les images produites dans les deux bandes il a été possible de produire des images avec une bonne résolution en superficie tout en ayant une profondeur de pénétration étendue. De plus, acquérir des images d'un échantillon dans deux bandes spectrales différentes permet dans une certaine mesure d'obtenir des informations sur les propriétés spectrales de l'échantillon.

Finalement, nous présentons une preuve de concept d'un dispositif de LC-OCT couplé avec un microscope Raman ainsi que quelques exemples d'application. La microscopie Raman est une modalité spectroscopique qui permet d'identifier des molécules et ainsi de mesurer "l'empreinte digitale" d'un échantillon. Cette modalité pourrait alors fournir des informations complémentaires aux images morphologiques acquises par LC-OCT à propos de la composition biomoléculaire de l'échantillon.

Title : Multimodal line-field optical coherence tomography for non-invasive skin cancer diagnosis

Keywords : Medical imaging, optical imaging, OCT, interferometry, microscopy.

Abstract : Skin cancer is a major public health issue. Among all types of cancer, skin cancer has the highest prevalence rate and the number of cases seems to be steadily increasing. Currently, the gold standard of skin cancer diagnosis requires a sample of suspicious tissue, called a biopsy, removed after a simple visual inspection of the patient's skin. Consequently, almost 60 % of biopsies result in benign diagnoses, and approximately 20 % of all skin cancers are missed.

The research presented in this thesis revolves around the development of a line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) device capable of producing non-invasive *in vivo* images similar in quality to histological cuts. The designed prototype operates at a center wavelength around 800 nm with a spectral width of approximately 150 nm. It has been applied to *in vivo* skin imaging with an almost isotropic spatial resolution of about 1 μm and a depth penetration reaching 400 μm . This device could thus be used to improve the efficiency of skin cancer diagnosis by limiting the number of undiagnosed cases and the num-

ber of unnecessary biopsies.

We then present a LC-OCT device system operating in two spectral bands centered around 770 nm and 1250 nm. The first band produces high resolution images (1.3 μm \times 1.2 μm , lateral \times axial) while the second provides enhanced penetration depth (700 μm). By merging the images acquired in the two bands it has been possible to produce images with both high resolution and high penetration. Moreover, acquiring images of a sample in two different spectral bands can give, to a certain extent, information on the spectral properties of the sample.

Lastly, we present a proof-of-concept LC-OCT prototype coupled together with a Raman microscope, as well as some application examples. Raman microscopy is a spectroscopic method capable of identifying molecules present in a sample and thus measuring the "fingerprint" of a sample. This modality could then provide complementary information to the morphological images provided by LC-OCT about the biomolecular composition of the sample.



