Imagerie Optique Multimodale des tissus par Tomographie Optique Cohérente Plein Champ

Clément Apelian

▶ **To cite this version:**

Clément Apelian. Imagerie Optique Multimodale des tissus par Tomographie Optique Cohérente Plein Champ. Physique Médicale [physics.med-ph]. Université Paris sciences et lettres, 2017. Français. NNT : 2017PSLET009 . tel-02286212

HAL Id: tel-02286212

https://pastel.hal.science/tel-02286212

Submitted on 13 Sep 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.

THÈSE DE DOCTORAT

de l'Université de recherche Paris Sciences et Lettres
PSL Research University

Préparée à l'Institut Langevin - ESPCI

Multimodal imaging of tissues using full field optical coherence tomography

Imagerie optique multimodale des tissus par tomographie optique cohérente plein champ

Ecole doctorale n°564

Ecole Doctorale de Physique en Ile-de-France

Spécialité Optique

COMPOSITION DU JURY :

M. GIOUX Sylvain
Université de Strasbourg, Rapporteur

M. TAVITIAN Bertrand
Université Paris Descartes, Rapporteur

Mme. VINCENT-SALOMON Anne
Institut Curie, Examinatrice

Mme. LAPLACE Corinne
Institut Gustave Roussy, Examinatrice

Mme. MEAS-YEDID Vannary
Institut Pasteur, Examinatrice

M. BOCCARA Albert-Claude
Institut Langevin - ESPCI, Directeur de thèse

M. RAMAZ François
Institut Langevin - ESPCI, Co-directeur de thèse

Soutenue par Clément APELIAN
le 3 Novembre 2017

Dirigée par **Claude BOCCARA**
et **François RAMAZ**

PSL RESEARCH UNIVERSITY PARIS | ESPCI PARIS EDUCATION SCIENCE INNOVATION

Table des matières

Introduction générale.....1

Chapitre I : Contexte et enjeux

I.1- Introduction.....3
I.2- Un regard historique.....4
I.3- Problématiques et opportunités cliniques.....5
I.3.a- Un exemple clinique actuel en guise d'introduction.....5
I.3.b- Des problématiques multiples.....5
I.4- Pertinence de l'OCT plein champ et limites.....6
I.5- Enjeux pour le secteur médical.....9
I.5.a- Tendances du secteur.....9
I.5.b- Enjeux économiques.....11
I.5.c- Enjeux humains et sociaux.....12
I.6- Perspectives de recherche.....12
I.6.a- Diversité de contraste dans l'imagerie biomédicale.....12
I.6.b- OCT plein champ et microscopie de fluorescence.....14
I.6.c- OCT plein champ et élastographie.....15
I.6.d- OCT plein champ et métabolisme.....16
I.6.e- Traitement de données et imagerie : vers une assistance par ordinateur ?.....16
I.7- Conclusion.....17

Chapitre II : Imagerie des tissus biologiques par OCT plein champ

II.1- Introduction.....21
II.2- Physique de l'imagerie optique en milieu diffusant.....21
II.2.a- Optique des milieux diffusants.....21
II.2.b- Imagerie en milieu diffusant.....26
II.3- l'OCT plein champ.....33
II.3.a- Physique de l'OCT plein champ.....33
II.3.b- Dispositif expérimental d'OCT plein champ.....39
II.4- Conclusion.....46

Chapitre III : Tomographie optique plein champ dynamique, modèles et mesures

III.1- Introduction.....49
III.2- Origine de la technologie.....50
III.3- Mesure dynamique par OCT plein champ.....51
III.3.a- Problèmes de reconstruction et processus dynamiques.....51
III.3.b- Fluctuation du signal induite par un diffuseur unique en déplacement.....53
III.3.c- De la cellule à la caméra : lien entre biologie et signal mesuré.....58
III.4- Métriques associées à la mesure dynamique.....63
III.5- Conclusion et perspectives.....71

Chapitre IV : Application de la tomographie optique plein champ dynamique

IV.1- Introduction……75
IV.2- Mise en œuvre instrumentale……76
IV.2.a- L'imagerie dynamique en pratique……76
IV.2.b- Analyse des bruits et signaux parasites……80
IV.2.c- Vers une mesure *in vivo*……83
IV.3- Corrélats biologiques ……86
IV.4- Album commenté……89
IV.4.a- Foie……89
IV.4.b- Système immunitaire……91
IV.4.c- Intestin……92
IV.4.d- Pancréas……93
IV.4.e- Cerveau……95
IV.4.f- Sein……98
IV.5- Discussion……99
IV.6- Conclusion et perspectives……100

Chapitre V : Outils issus du traitement de données appliqués à la tomographie optique plein champ dynamique

V.1- Introduction……103
V.2- Problématique liée à la classification……104
V.2.a- Linear Discriminant Analysis……105
V.2.b- Quadratic Discriminant Analysis……106
V.2.c- Dépasser la non-séparabilité……106
V.3- Chaine de traitement pour l'aide au diagnostic……107
V.3.a- Présentation générale de la chaine de traitement……107
V.3.b- Constitution de structures……109
V.3.c- Analyse et classification……113
V.4- Résultats……115
V.5- Conclusion……121

Conclusion générale……125

Remerciements……127

Introduction générale

Si l'on remonte au-delà du V^{ème} siècle avant notre ère, on peut déjà trouver dans nombre de pratiques un composant essentiel qui sera, plus tard, au cœur de la science et de la médecine : l'observation des phénomènes naturels dans un but diagnostic et pronostic. La maladie était alors pensée comme une affliction surnaturelle et son diagnostic était l'affaire de la divination. En occident, nous situons la naissance de la médecine au tournant du V^{ème} siècle avec Hippocrate. Le malade n'est plus vu comme victime d'une divinité courroucée, mais de causes naturelles dont les effets sont répertoriés et permettent les premiers diagnostics. Cette observation des anomalies pathologiques évoluera, mais restera pour de nombreux siècles limitée par les outils d'observations accessibles au médecin que sont ses organes sensoriels. Aujourd'hui nous pouvons voir l'héritage de cette évolution lors d'observations macroscopiques effectuées par un médecin anatomopathologiste lors, par exemple, d'un examen extemporané. L'invention du microscope au début du XVII^{ème} siècle rend l'accès possible aux échelles cellulaires jusqu'alors hors de portée. Cet outil est une révolution qui engendre dès ses débuts de grandes avancées comme la découverte de la cellule et la notion de tissu. Sur ces bases s'appuie l'histologie, terme forgé en 1819, qui est aujourd'hui la technique à visée diagnostique de référence pour les pièces opératoires. D'autres innovations technologiques sont depuis venues enrichir les moyens d'observation utilisés dans le secteur biomédical avec notamment l'échographie, la radiographie, l'imagerie à résonance magnétique (IRM) pour ne citer que les plus connus.

Toute nouvelle technologie d'imagerie médicale a vocation à éclairer les zones d'ombre qui restent inaccessibles aux procédés déjà établis, que ce soit en termes d'échelles accessibles, de contraintes sur l'objet à imager, de contraintes de temps et bien d'autres. C'est dans cette optique que la technologie OCT (tomographie optique cohérente) a été développée dans les années 90. Permettant l'imagerie de tissus *in situ* sans agent de contraste avec une résolution de l'ordre de la dizaine de microns, cette technique s'est imposée comme succès commercial pour l'imagerie structurelle des tissus dans les applications ophtalmologiques. On la retrouve principalement pour l'examen de la rétine, en équipant les premiers hôpitaux dès 1995 en France ; aujourd'hui elle s'est démocratisée et l'on trouve couramment un système de ce type dans les cabinets d'ophtalmologie. Plus récemment, de nouveaux développements ont permis de repousser certaines limites propres à l'OCT et de nouvelles applications voient le jour. C'est notamment le cas de l'OCT plein champ (Full Field OCT ou FFOCT), développé en 1998, qui permet d'atteindre des résolutions de l'ordre du micron dans les trois dimensions et s'affranchit de la nécessité de scanner l'échantillon propre à l'OCT. Sous l'impulsion de l'Institut Langevin (laboratoire de l'ESPCI – PSL research university) et de l'entreprise LLTech, de nombreuses études ont vu le jour sur l'application de cette technologie au diagnostic peropératoire en cancérologie. Cette initiative a montré un intérêt net pour effectuer un primo-diagnostic au cours de l'opération, mais n'arrive néanmoins pas au niveau de performances de l'histologie. Cette dernière est plus longue – pouvant aller de quelques jours à la semaine – mais elle est considérée comme la référence à ce jour.

L'objet de ce manuscrit est de présenter les recherches et développements menés de 2014 à 2017 dans le cadre d'une thèse CIFRE – impliquant l'Institut Langevin et LLTech – pour ajouter à l'OCT plein champ de nouveaux modes d'imagerie visant à se rapprocher des performances de la procédure d'histologie. Le premier chapitre présentera le contexte et les enjeux de cette recherche, avec une approche centrée sur les applications cliniques tout en restant au contact du contexte académique. Le second chapitre traitera de la technique de l'OCT plein champ. Les chapitres trois et quatre présentent la modalité d'imagerie dynamique qui constitue le cœur du travail de thèse. Le chapitre trois se propose d'explorer le fonctionnement de celle-ci, tandis que le chapitre quatre présente le versant expérimental de cette modalité. Le cinquième et dernier chapitre permettra de considérer les développements effectués pour l'analyse d'images multimodales et l'utilisation croisée de l'information disponible dans chaque mode d'imagerie pour le diagnostic peropératoire en cancérologie chez l'humain.

Chapitre I : Contexte et enjeux

I.1- Introduction……3
I.2- Un regard historique……4
I.3- Problématiques et opportunités cliniques……5
I.3.a- Un exemple clinique actuel en guise d'introduction……5
I.3.b- Des problématiques multiples……5
I.4- Pertinence de l'OCT plein champ et limites……6
I.5- Enjeux pour le secteur médical……9
I.5.a- Tendances du secteur……9
I.5.b- Enjeux économiques……11
I.5.c- Enjeux humains et sociaux……12
I.6- Perspectives de recherche……12
I.6.a- Diversité de contraste dans l'imagerie biomédicale……12
I.6.b- OCT plein champ et microscopie de fluorescence……14
I.6.c- OCT plein champ et élastographie……15
I.6.d- OCT plein champ et métabolisme……16
I.6.e- Traitement de données et imagerie : vers une assistance par ordinateur ?……16
I.7- Conclusion……17

I.1- Introduction

Si tout projet a vocation à former une unité distincte de son environnement, il ne faut toutefois pas oublier qu'il y prend origine et se positionne en relation avec ce dernier. Sans une approche prenant en compte le contexte, les acteurs, les enjeux et les perspectives des travaux effectués, les choix stratégiques qui orientent les recherches ne peuvent paraitre qu'arbitraires : il convient donc de les éclairer. Ce projet CIFRE s'inscrit dans la continuité des collaborations entre l'Institut Langevin – laboratoire de l'Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle de la ville de Paris (ESPCI) – d'une part, et l'entreprise LLTech d'autre part. Cette collaboration s'appuie sur un besoin médical que nous prendrons soin de définir en relation avec les enjeux cliniques qui le motivent. Avant cela nous retracerons rapidement l'histoire de la technique de l'OCT plein champ et de ses racines avant de nous appuyer sur un exemple clinique pour introduire les enjeux cliniques tels qu'ils se présentent aujourd'hui. Une fois le besoin industriel cerné et la problématique centrale à cette thèse formulée, nous évaluerons l'impact à court terme de cette technologie et les tendances qui semblent se dégager du secteur de l'imagerie biomédicale ; puis nous nous tournerons vers les pistes de recherche qu'une telle problématique appelle. Cela nous mènera à brosser un portrait d'ensemble de ce domaine avant de détailler trois pistes envisagées. Nous conclurons par une réflexion sur l'apport du traitement de données pour ce domaine et à la justification des orientations stratégiques prises au cours de cette thèse.

I.2- Un regard historique

Si depuis l'invention du microscope au XVII^{ème} siècle de nombreuses technologies appartenant au domaine de l'imagerie biomédicale ont vu le jour, la logique présente n'est pas pour autant un progrès linéaire où chaque génération vient détrôner la précédente et la rendre obsolète. Il semblerait plutôt que le développement technologique vienne combler les faiblesses des technologies précédentes ou donner accès à de nouveaux contrastes. Historiquement nous observons un schéma similaire pour ces différentes technologies avec un premier temps de découvertes académiques qui viennent fonder la méthode d'imagerie ; suivi par un second temps de transfert technologique vers l'industrie qui rend la méthode accessible pour des besoins spécifiques du domaine biomédical ; et enfin une troisième phase de développement plus exploratoire où la méthode permet de poser de nouvelles questions et de faire évoluer le domaine. On peut citer l'exemple de l'Imagerie par Résonance Magnétique nucléaire (IRM) qui après une phase de développements académiques entre 1946 – avec la description du phénomène de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) – et 1977 – avec la première image IRM d'un corps humain – va venir équiper les hôpitaux et centres de recherche pour aujourd'hui constituer un outil fondamental de diagnostic et d'exploration en neurosciences[1,2].

La technologie OCT (Tomographie de Cohérence Optique), proposée au début des années 90, hérite des méthodes interférométriques. Ces techniques prennent leur origine théorique à la fin du XVII^{ème} siècle avec Huygens et Fresnel et la théorie ondulatoire de la lumière avant d'être mis en évidence expérimentalement par Young en 1801, plus d'un siècle plus tard. Ces développements passeront par Maxwell et la théorie de l'électromagnétisme, puis plus tard par l'extension du modèle avec l'apport particulier des théories quantiques en optique. Les grands noms de l'interférométrie restent présents à travers les instruments qu'ils nous ont légués : Michelson, Fabry, Perot, Sagnac, Fizeau pour les principaux. L'OCT constitue une continuité dans cet historique de développements, qui trouve très vite un intérêt pour l'imagerie des tissus biologiques avec la rétine comme objet d'étude privilégié dès ses débuts. Cette méthode va par la suite se ramifier avec des innovations ultérieures comme l'OCT spectral et swept-source ainsi que l'OCT plein champ. Le développement de l'OCT plein champ au début des années 2000[3–5] se base sur la configuration de l'interféromètre de Linnik et bouleverse les repères établis par les autres technologies OCT. Tout d'abord par la plus grande résolution transverse qui est proposée, mais aussi par l'acquisition simultanée de tous les pixels d'un même plan (orthogonal à l'axe optique) qui donnera le nom à la technique de plein champ avec une acquisition d'images dite « en face ». Cette technologie se diffuse dès lors dans la sphère académique pour être utilisée aujourd'hui par différents groupes, avec de façon non exhaustive, en France : l'Institut Langevin, l'institut de la vision et le laboratoire Charles Fabry ; l'université de Leiden aux Pays-Bas ; l'université de Genève et Lausanne en Suisse ; aux Etats Unis l'université de Miami, de Washington à St Louis ; l'université de Nanjing en Chine ; l'université de Tokyo et de Yamagata au Japon, et l'institut Gwangju en Corée. Parallèlement aux recherches académiques, l'industrie s'est également saisie de cette technologie avec la création en 2009 de la société LLTech qui met sur le marché un premier système OCT plein champ destiné à la recherche clinique en 2011. Depuis LLTech multiplie les essais cliniques avec de nombreux partenaires à l'international et prévoit une sortie prochaine du système clinique pour l'analyse extemporanée de tissus tumoraux.

I.3- Problématiques et opportunités cliniques

I.3.a- Un exemple clinique actuel en guise d'introduction

Suivons un instant le parcours de soin d'une patiente atteinte d'un cancer du sein, comme environ 54 000 nouvelles personnes chaque année en France[6]. Le dépistage précoce a permis de démarrer le parcours de soin en amont, conduisant après examen à une opération visant à retirer le tissu tumoral. La prise en charge étant précoce, la mastectomie totale n'est pas nécessaire, et une opération minimale (visant à préserver le tissu sain) sera pratiquée. Pendant l'opération, une fois l'exérèse réalisée, l'équipe chirurgicale va demander un *primo* diagnostic peropératoire : l'examen extemporané. Un anatomopathologiste, spécialiste de ce type de pathologie, va examiner la pièce opératoire et en particulier les marges d'exérèses pour déceler la présence résiduelle de tissu tumoral. Ce spécialiste réalise un examen macroscopique où son expérience personnelle va lui permettre dans une certaine mesure de qualifier les marges par leur apparence visuelle et par le toucher (rigidité, texture, etc.). Il peut parfois réaliser un examen microscopique en congelant la pièce, découpant une tranche fine (de quelques microns d'épaisseur), colorant celle-ci à l'aide d'agents spécifiques puis en l'observant au microscope classique par transmission. Cette manipulation est appelée « coupe au cryostat » (frozen section). Cette étape est longue (souvent proche de 30 minutes), destructive, peut introduire des artefacts par la procédure de congélation et de découpe, et n'est pas garante d'un diagnostic fiable. Après cet examen extemporané, l'équipe chirurgicale est informée du résultat et peut adapter la procédure en fonction de cela, par exemple en retirant plus de tissu là où une marge suspecte a été repérée. A la fin de l'opération, la patiente est informée que le diagnostic final sera disponible d'ici une à deux semaines, ce qui orientera le futur de la prise en charge. Pendant ce temps les prélèvements vont suivre tout un parcours où ils seront enregistrés, mesurés, fixés et mis en paraffine pour finalement être découpés en lames minces colorées qui pourront enfin être analysées par un pathologiste qui en déduira le diagnostic final. Cette opération est l'examen histologique et constitue, malgré sa simplicité technologique, le meilleur outil disponible à ce jour pour le diagnostic de pathologies à l'échelle tissulaire. Pour en revenir à notre exemple, si le diagnostic indique qu'une marge est cancéreuse, impliquant une réopération, les conséquences sont lourdes pour tous les acteurs : la patiente subi un stress psychologique plus important, prend de nouveaux risques liés à l'anesthésie et à l'environnement médical de façon générale, l'hôpital subit une surcharge d'opérations et tout cela se répercute naturellement sur le personnel médical et le budget de la santé.

I.3.b- Des problématiques multiples

L'exemple précédent pourrait sembler anecdotique, malheureusement il permet d'illustrer un grand nombre de problématiques clefs présentes dans le contexte clinique. En premier lieu, la durée de l'opération et le coût des coupes au cryostat représentent une charge qui pourrait être réduite dans bien des cas. A titre indicatif, pour les opérations des cancers de type ORL une moyenne de 12 coupes au cryostat sont effectuées, pour un coût avoisinant les 660 €. L'attente des résultats en peropératoire génère un coût supplémentaire de plus de 2,2 k€ (correspondant au coût de mobilisation de l'équipe médicale sur ce temps d'attente). La surcharge liée à une seconde opération, bien que variable d'un cancer à l'autre, est bien réelle et constitue suivant le système de santé de chaque pays un coût supplémentaire pour le patient (et/ou son assurance) et l'hôpital. Nous relevons également une problématique quant à la

qualité de traitement avec une génération de contexte stressant (l'attente du résultat) qui plus qu'une gêne psychologique semble constituer un environnement peu propice à la récupération postopératoire et à la guérison[7,8]. D'autre part la charge de travail et le contexte propre à la spécialité des pathologistes en fait un goulot d'étranglement dans le dispositif de soin avec tous les risques que cela comporte, notamment dans la rareté de la compétence, mais aussi dans le compromis paradoxal entre un examen fin et un impératif de rendement au détriment, possible, de la qualité.

Ces multiples problématiques néanmoins peuvent se réduire à deux besoins sous-jacents :

- Il existe un besoin de retour rapide d'information fiable pendant l'opération
- Il existe un besoin de réduire le nombre nécessaire de lames d'histologie par cas

Le premier se caractérise par les variables de rapidité et de fiabilité qui sont à rapporter à ce qui se fait de mieux aujourd'hui : un temps inférieur à la gamme de 20 à 40 minutes et une fiabilité proche de celle possible avec une coupe d'histologie.

Le second besoin consiste en une qualification préalable des pièces nécessaires pour le diagnostic en éliminant les cas évidents pour diminuer le volume d'examens de lames.

Il est à noter que ce même type de problématiques est également présent lors du prélèvement de biopsies, où de façon générale il y a une prise excessive d'échantillons pour compenser le fait qu'il y ait des biopsies inexploitables (ne contenant pas de tissu tumoral) et il y a également un grand nombre de lames à traiter et examiner. De même, le patient peut être rappelé pour prendre de nouveaux échantillons avec les conséquences présentées précédemment. Dans le cas du cancer de la prostate par exemple, une biopsie peut sectionner des connections nerveuses entrainant des complications fortement handicapantes pour le patient, il est donc primordial de limiter le nombre de prélèvements et une qualification en temps réel permettrait cela.

I.4- Pertinence de l'OCT plein champ et limites

L'OCT plein champ, bien que concurrencé par d'autres techniques comme la microscopie confocale ou multiphotonique, trouve tout son intérêt à la lumière de ces problématiques cliniques. En effet, la limite de temps intrinsèque au problème exposé précédemment contraint à imager directement le tissu à qualifier sans perdre de temps en préparation préalable (comme c'est le cas pour les coupes au cryostat). L'OCT plein champ rempli cette condition, permettant l'examen de la pièce opératoire sur une profondeur allant de 150 µm à plus de 500 µm suivant les propriétés de diffusion du tissu. De plus, les images fournies sont des coupes orthogonales à l'axe optique, comme en microscopie classique, ce qui correspond aux habitudes des pathologistes. Cela permet bien souvent de ne réaliser qu'une coupe plutôt que de scanner le tissu sur toute la profondeur pour reconstruire l'image en trois dimensions, permettant un gain de temps de plusieurs ordres de grandeur. Signalons également qu'un grand nombre de critères de diagnostic sont liés à l'architecture du tissu, ce que l'OCT plein champ révèle de façon intrinsèque, par contraste purement endogène – issu des propriétés de diffusion locale du tissu. La résolution transverse est équivalente à celle habituelle en histologie, à savoir le micron ; néanmoins dans de nombreux cas les cellules sont difficilement visibles, ce qui prive le pathologiste d'une partie de ses

critères de qualification de la pièce. En ce qui concerne le sectionnement axial, l'OCT plein champ propose des résolutions variant selon la source d'illumination entre 6 µm et 0,5 µm, ce qui est de l'ordre de grandeur ou inférieur à ce qui est couramment utilisé en histologie, à savoir des coupes de 5 µm.

Cette technologie, bien que pertinente pour le diagnostic peropératoire en cancérologie, fait face à un certain nombre de limites. Nous venons de voir que l'examen détaillé des cellules, avec des critères comme la forme du noyau ou le nombre de couches cellulaires par exemple, n'est pas toujours possible en OCT plein champ ; si l'on combine cela avec le manque de spécificité par rapport à ce dont l'histologie dispose au travers de ses colorants, il est alors normal d'observer parfois un décalage entre la qualification par OCT plein champ et le diagnostic final par histologie qui sert de référence. Pour évaluer lors des tests précliniques l'efficacité de cette méthode, nous pouvons réaliser un diagnostic comparatif en double aveugle où une personne effectuera le diagnostic à l'aide uniquement des images issues de l'OCT plein champ alors qu'un pathologiste effectuera ce même diagnostique de façon standard à l'aide des coupes histologiques. Nous avons alors quatre cas :

- Les diagnostics concordent, la pièce contient du matériel tumoral : il s'agit de vrais positifs
- Les diagnostics concordent, la pièce est saine : il s'agit de vrais négatifs
- Le diagnostic par l'OCT plein champ indique un tissu cancéreux alors que l'histologie révèle un tissu sain : il s'agit de faux positifs
- Le diagnostic par l'OCT plein champ indique un tissu sain alors que l'histologie révèle du matériel tumoral : il s'agit de faux négatifs

Ces statistiques permettent de calculer la sensibilité (ou sélectivité), c'est-à-dire la capacité de donner une réponse positive lorsque l'histologie est positive, et la spécificité qui, elle, est la capacité à donner une réponse négative lorsque l'histologie est négative. Ces deux valeurs doivent se situer au plus proche de 100% si la méthode est équivalente à l'histologie et elles convergeront vers 50% si le test est complètement décorrélé de l'histologie (en donnant des résultats au hasard par exemple). Nous pouvons également définir la précision du diagnostic en ne comptant que les réussites (positives ou négatives) sur le nombre total d'essais. Le tableau 1.1 donne un aperçu des études précliniques réalisées par LLTech.

Tissu	Résultats	Echantillon	Partenaire clinique
Peau[9]	En cours	200	Drexel University, Philadelphia, USA
Sein[10]	94% sensibilité 75% spécificité	75	Hôpital Tenon et institut Curie, Paris, France
Prostate[11–13]	100% sensibilité 96% spécificité	1800	Hôpital Cochin, Paris, France UCLA, CA, USA Beijing Hospital, Beijing, Chine
Vessie	Précision de 96%	24	Hôpital Cochin, Paris, France
Rein	Précision de 100%	25	Weill Cornell Medical College, NY, USA
ORL[14,15]	89% sensibilité 84% spécificité	57	Institut Gustave Roussy, Villejuif, France
Polypes colorectales	Na	20	Hôpital Cochin, Paris, France
Greffe ovarienne[16]	Na	Na	LUMC, Leiden, Pays-Bas
Ganglions[17]	100% sensibilité 97% spécificité	60	Hôpital Tenon, Paris, France
Cerveau[18]	Na	18	Hôpital St Anne, Paris, France
Cornée[19]	Na	13	Institut de la vision, Paris, France

Tableau 1.1 : Résultats précliniques menés par LLTech. Les résultats sur tissus non référencés correspondent à des résultats internes non publiés, en cours de publication ou à des études en cours. Na signifie que l'étude ne contient pas de diagnostic comparatif qui puisse produire des scores de précision, sensibilité ou spécificité ou que ces résultats ne sont pas annoncés.

De l'observation des résultats précliniques ci-dessus, nous pouvons tirer une confiance éclairée concernant la pertinence de l'OCT plein champ pour répondre au problème clinique soulevé (I.3). Les résultats sont encourageants, mais peuvent se révéler insuffisant dans le contexte médical, notamment pour le cas de faux positifs qui vont engendrer un retrait excessif de matériel délétère pour le patient.

Nous sommes donc confrontés au problème industriel et clinique motivant les recherches de la présente thèse : **comment augmenter les performances de l'OCT plein champ pour atteindre le « gold standard » fixé par le diagnostic histologique ?** A cette problématique exploratoire se rajoutent un ensemble de contraintes liées au contexte médical et industriel :

- Contrainte de coût : Tout ajout matériel au système déjà présent alourdi les coûts liés à la production de la machine. Dans l'optique d'apporter un outil performant au meilleur coût, nous nous proposons de prendre cet aspect en compte dans le développement.
- Contrainte de robustesse : qu'il s'agisse de simplicité de production ou de facilité de maintenance sur site, une contrainte importante repose sur la simplicité de la conception et sa capacité à fournir le service attendue pendant toute la durée de vie de la machine.
- Contrainte de temps : L'OCT plein champ vient répondre à un besoin explicitement dépendant du temps. En allant plus loin encore, chaque minute que les nouveaux développements ajoutent à la procédure sont des pertes – soit financière soit de qualité de soin – pour un acteur (Hôpital / Patient / Entreprise). Il est donc primordial de garder cette contrainte en permanence à l'esprit.
- Encombrement : Le système Light-CT produit par LLTech doit pouvoir tenir en laboratoire d'analyse extemporané où la place est restreinte et il doit être transportable sur un chariot d'hôpital standard. Les futurs développements doivent respecter ces impératifs pratiques.

- Sensibilité à l'environnement : L'appareil ayant pour but une utilisation dans un contexte médical, la sensibilité aux vibrations (ventilations, systèmes de refroidissement, microtomes, etc.), à la lumière parasite (éclairage visible standard), aux perturbations électromagnétiques et à la température sont bien évidement à prendre en compte. A un autre niveau, la prise en compte de l'utilisateur final, de son niveau de compétence et surtout de ses usages va nécessairement constituer un ensemble de contraintes qui orientent le développement : une technologie ne prend sens qu'à travers l'utilisation qui en est faite.
- Compatibilité avec l'OCT plein champ : il va de soi que tout développement fait dans le but de se rapprocher de l'histologie ne doit se faire au détriment des avantages intrinsèques de l'OCT plein champ. Cela inclus notamment d'éviter l'utilisation d'agents de contraste exogènes. Il est également nécessaire de ne pas détruire l'échantillon, ou ne pas l'endommager au cours de l'analyse, afin de pouvoir effectuer une vérification par histologie *a posteriori*.

Les problématiques cliniques vues précédemment, combinées avec ces contraintes, nous conduisent à évaluer les impacts d'une telle technologie pour ce secteur.

I.5- Enjeux pour le secteur médical

Nous avons déjà vu à travers l'exemple clinique exposé précédemment quelques enjeux cliniques du secteur de l'imagerie biomédicale appliquée à l'oncologie. Nous commencerons par faire l'inventaire de quelques tendances que laisse présager les développements de la pratique clinique, ceux-ci mettront en lumière des enjeux clairement liés au développement de l'OCT plein champ et pointeront du doigt des directions à privilégier dans les perspectives de recherche que nous détaillerons plus loin. Dans un second temps nous chercherons à situer cette technologie dans une perspective économique avant d'en cerner les enjeux humains qui en découleront.

I.5.a- Tendances du secteur

Sans prétendre saisir la totalité des mutations du secteur et bien conscient que la prédiction est un exercice périlleux, nous pouvons néanmoins dégager certaines directions qui semblent se dessiner pour le futur de ce secteur.

La première tendance est déjà fortement amorcée et semble se pérenniser : il s'agit de la réduction de l'invasivité des procédures, à savoir la réduction des exérèses au strict minimum et la conservation tant que possible des tissus sains environnant. Nous avons évoqué dans l'exemple précédent le cas du cancer du sein qui, pour des raisons esthétiques et d'identité s'oriente de plus en plus vers des mastectomies partielles, mais cela se généralise également aux cancers de la peau touchant le visage pour les mêmes raisons. Dans ce cas un type spécial de chirurgie existe, la chirurgie dite de Mohs qui vise spécifiquement à retirer un minimum de tissu et qui montre bien que les gestes opératoires évoluent conformément à cette tendance. Nous voyons également cette volonté de préservation sur des organes où le tissu a une forte valeur fonctionnelle comme l'illustre le cas du cerveau de façon exemplaire. Cette tendance trouve son prolongement dans l'utilisation de la microscopie *in situ* plutôt que d'effectuer des biopsies quand cela est possible.

Nous relevons une seconde tendance qui procède de la révolution numérique d'une part, de la spécialisation des experts de santé d'autre part et de façon non négligeable de la mondialisation. Il s'agit du domaine émergeant de la « digital pathology » ou pathologie digitale qui constate que le format numérique prend une part toujours plus importante dans le diagnostic et qu'il est impossible pour de petites structures d'héberger un panel d'experts couvrant l'étendue des cas qui se présentent. Cette constatation est d'autant plus frappante lorsque l'on prend également en considération les besoins de santé des pays émergents ou en voie de développement. Ainsi, ces formats d'images non contrains géographiquement peuvent être analysés à distance par des centres possédant les compétences nécessaires. De façon plus marginale et en touchant à l'anticipation, les progrès récents du traitement d'image et de l'apprentissage par ordinateur (machine learning) donnent espoir quant à la possibilité d'une aide au diagnostic partiellement automatisée, bien que cela soit confiné, pour le moment, à la sphère académique.

De plus en plus d'experts semblent abandonner une vision unilatérale du progrès dans leurs disciplines pour embrasser une vue plurielle qui considère qu'une combinaison des aspects les plus pertinents de différentes technologies permettra de nous approcher au plus près d'une efficacité optimale. Chaque technologie ayant ses limites, leur combinaison permet de couvrir les angles morts. En croisant ces approches, le diagnostic peut atteindre une précision qui serait impensable pour une modalité unique d'imagerie. L'approche multimodale, qu'elle soit intégrée en amont ou que la synthèse soit faite en aval par le corps médical, est un phénomène déjà présent et tout indique que cette tendance se confirme jour après jour.

Deux derniers développements semblent émerger : ce que l'on regroupe sous le terme de « médecine personnalisée » d'une part, et les approches de type « diagnostic et bilan en un jour » d'autre part. La médecine personnalisée tend à adapter la prise en charge d'un patient à son profil : cela correspond à du « sur mesure » médical comparativement au « prêt à porter » que l'on peut identifier dans les protocoles de traitement plus anciens. Pour que cette personnalisation ait lieu, c'est bien évidement une évolution de la pratique médicale qui est en jeu, mais c'est aussi une occasion de développement technologique visant à qualifier le profil du patient. Et ce n'est pas sans raison qu'est regroupée ici cette tendance certes propre aux pays fortement développés avec les tendances de diagnostic et bilan en un jour telle que l'on peut trouver dans des centres comme l'Institut Gustave Roussy ; en effet ces deux tendances reposent sur un besoin similaire de développement technologique qui recoupent cette tendance à la *multimodalité* et à la pathologie digitale tout en reposant sur les mutations de la pratique médicale elle-même. Le diagnostic en un jour consiste en une batterie de tests conditionnant le parcours du patient avec chaque test orientant vers l'évaluation suivante qui poursuivra l'investigation pour plus de détails ; l'objectif étant de cerner en un parcours diagnostic d'une journée la pathologie et de dégager une stratégie de soins adaptée.

I.5.b- Enjeux économiques

Le mot « opportunité » s'est présenté à plusieurs reprises dans ce chapitre, et cela découle tout naturellement des possibilités offertes par les développements technologiques autours de l'OCT plein champ rapportées aux besoins exprimés par le marché que constitue le secteur biomédical. Il faut tout d'abord considérer que l'organisation des systèmes de santé suivant les différents pays joue un rôle déterminant dans l'apport de valeur que constitue l'OCT plein champ, et cela même s'il répond aux mêmes problématiques techniques. Pour cela nous nous concentrerons sur ce qui semble être le marché le plus propice à la génération de valeur à travers l'offre technologique proposée par LLTech : le système de santé américain (USA). En effet, de par son organisation libérale, le gain de temps d'opération ou de temps d'analyse par un pathologiste est directement convertible en profits réalisés par l'institution de santé et/ou impacte le coût des soins pour le patient. Nous montrerons deux applications directes de l'OCT plein champ et les enjeux économiques associés : la chirurgie de Mohs pour le cancer de la peau et le cas de la cancérologie ORL (Oto-Rhino-Laryngologie).

- Chirurgie de Mohs :
  Cette procédure a déjà été introduite précédemment, il s'agit pour rappel d'une opération d'exérèse minimale de tissus de peau cancéreux, généralement sur des zones avec un fort impact esthétique comme le visage. Le gain ici se situe sur deux tableaux : tout d'abord la technologie OCT plein champ permettrait de faire chuter de moitié le coût du personnel médical nécessaire aux opérations de préparation de l'histologie, permettant une réduction des coûts de l'ordre de 75 à 90 k$ par an. Plus important encore, cela permet de supprimer le goulot d'étranglement que représente l'histologie aujourd'hui en éliminant les échantillons non utiles au diagnostic final, ce qui permet d'augmenter le nombre de patients traités de 30% (passant de 6 à 8 par jours) ce qui représente un profit de l'ordre de 750 k$ par an.
- Cancer ORL :
  Aujourd'hui le coût de ce type d'opération est de 3100 $ par patient et comporte en moyenne 12 coupes au cryostat, ce qui représente autour de 700 $. L'attente due à l'examen extemporané se chiffre quant à elle autour de 2400 $. L'introduction d'un système clinique par LLTech permettrait de réduire ce coût quasiment par deux, que ce soit au niveau du coût de revient d'un échantillon ou en termes de temps d'attente.

Si l'on ajoute à ces cas détaillés les prises de biopsies et les autres opérations majeures en cancérologie (poumon, prostate, système digestif, sein, etc.) nous avons un volume annuel supérieur au milliard de dollars pour les Etats Unis seulement (concernant 5200 sites sur les 21000 estimés au total sur les zones US-Europe-Asie). Pour le système de santé américain, cela représente plus de 400 millions de dollars de réduction de coût par an, ne serait-ce que pour les quatre principales opérations que sont le cancer du sein, le cancer ORL, le cancer de la vessie et de la prostate. Si cette estimation permet de s'assurer d'une certaine confiance vis-à-vis de l'utilité réelle de la technologie OCT plein champ, nous pouvons aussi nous intéresser à une partie moins immédiatement quantifiable mais tout aussi importante de la création de valeur : les bénéfices humains et sociaux générés.

I.5.c- Enjeux humains et sociaux

Certains bénéfices ont déjà été mentionnés, comme le fait qu'en réduisant le taux de réopérations nous permettons simultanément une chute du stress associé chez les patients, ce qui a pour bénéfice secondaire d'en éviter les effets nocifs[7,8]. Mais la détection précoce, en peropératoire, joue également un rôle majeur dans la prise en charge de cancer présentant une évolution rapide. En effet, dans certains cas, le délai d'une semaine associé au diagnostic histologique peut entrainer un retard dramatique sur la progression de la maladie. Evidement la prise en charge lors de réopérations entraine une surcharge de lits d'hôpitaux et de temps de travail, ce qui se traduit par divers effets comme un stress plus élevé du personnel soignant, une déshumanisation des rapports entre personnel soignant et patients par manque de temps, des retards de prise en charge et bien d'autres. En réduisant les réopérations ou les rappels de patients pour extraire de nouvelles biopsies, ce sont tous ces effets qui sont indirectement régulés. En rapport avec la prise de biopsie, nous avons déjà mentionné les risques d'un prélèvement excessif en termes de trauma du tissu et de sections nerveuses. La qualification en temps réel permettrait une réduction du nombre de prises ainsi qu'une diminution des rappels et un désengorgement du service de pathologie en retirant les biopsies non qualifiées. Ces avantages s'accompagnent également d'une baisse des tarifs, d'après les réductions de coût évoquées précédemment, ce qui permet un accès à des soins de meilleure qualité pour un plus grand nombre.

I.6- Perspectives de recherche

Nous présenterons tout d'abord brièvement la famille des techniques d'imagerie utilisées dans le domaine biomédical sous la perspective des sources de contraste propre à chacune d'elles. Nous prendrons alors le temps de montrer différentes pistes de développements comme l'ajout d'une modalité de fluorescence, la mesure des propriétés mécaniques du tissu et l'évaluation de la dynamique cellulaire. Nous finirons sur l'apport du traitement de données vis-à-vis des technologies d'imagerie et en particulier de son apport aux approches multimodales.

I.6.a- Diversité de contraste dans l'imagerie biomédicale

Le principe sous-jacent commun à toute technique d'imagerie repose sur le triptyque : Source de contraste – Propriétés de l'objet – Détection. Avec ce schéma de base, chaque technique vient construire ses spécificités. Les sources de contraste créent une première séparation entre les différentes techniques :

- Techniques optiques[20] :
  Ces techniques reposent sur une source lumineuse, l'acceptation générale comprend le spectre visible (380nm à 780nm) ainsi que, par extension, les bandes spectrales proches comme l'infrarouge et l'ultraviolet. Au sens strict du terme, il s'agit, comme pour les rayons X et la radioactivité gamma de rayonnements électromagnétiques qui ne diffèrent pas en nature mais par leur niveau d'énergie (ou fréquence). On trouve dans cette famille le microscope classique[21] et ses extensions technologiques comme l'imagerie de phase, la microscopie de fluorescence, confocale, non-linéaire, de polarisation et bien d'autres. On peut également noter les techniques de super-localisation qui permettent l'imagerie de super-résolution ; ces techniques ont connues un développement particulièrement intense en microscopie optique avec des techniques comme

l'illumination structurée[22,23] (SIM), la déplétion par émission stimulée[23] (STED) ou les techniques par localisation photo-activée[23] (PALM, STORM). L'OCT et ses développements sont également présents, comme l'OCT en domaine spectral[24], « swept source »[24] (source à balayage de fréquence) et l'OCT plein champ[3]. Il convient également de noter la présence de techniques d'imagerie macroscopiques comme la tomographie optique diffuse et de modalités utilisées par différents systèmes comme l'imagerie multi-spectrale ou hyper-spectrale[25].

- Rayons X[26] :
  Ce rayonnement électromagnétique est caractérisé par des longueurs d'ondes comprises entre 1 picomètre (10^{-3} nm) et 10 nm, c'est un rayonnement ionisant dont les doses et les conditions d'utilisations sont réglementées dans la plupart des pays (en Europe par les normes Euratom). Les techniques de cette famille sont souvent bien connues du grand public avec la radiographie et le scanner X, mais qui se trouvent déclinées sous différentes variations comme l'ostéodensitométrie ou scanner spectral X qui est un équivalent de l'imagerie multi-spectrale, mentionnée ci-dessus, aux rayonnements X.
- Techniques employant la radioactivité :
  Les techniques employant des matériaux radioactifs comme source de contraste sont généralement rassemblées sous le nom de médecine nucléaire (pour le diagnostic comme pour le traitement). Le rayonnement gamma issue de la désintégration des noyaux atomiques de ces matériaux se situe à des longueurs d'ondes inférieures au picomètre (10^{-3} nm), comme pour les rayons X, ce sont des rayonnements ionisant encadrés. On retrouve dans cette catégorie la scintigraphie, la tomographie par émission mono-photonique (SPECT) ou la tomographie par émission de positron (TEP ou PET scan)[27].
- Perturbations du champ magnétique/électrique :
  Nous trouvons ici toutes les techniques qui enregistrent directement le champ électrique comme l'électroencéphalographie (EEG) ou l'électrocardiographie (ECG), les techniques qui mesurent directement le champ magnétique induit comme la magnétoencéphalographie (MEG) ou la magnétocardiographie (MCG) ou les techniques qui viennent induire une perturbation du champ électromagnétique comme l'imagerie par résonnance magnétique (IRM)[2].
- Acoustique :
  En parallèle des techniques basées sur le rayonnement électromagnétique, les techniques acoustiques fonctionnent par propagation d'ondes mécaniques dans la matière. L'échographie est la principale technique utilisée dans cette catégorie, mais présente de nombreux développements spécialisés comme l'imagerie Doppler ou l'élastographie.

Cette première distinction en différentes sources de contraste nous permet de situer l'OCT plein champ par rapport aux autres techniques. Par rapport à la catégorisation « source de contraste – propriétés de l'objet – détecteur » nous avons non seulement une segmentation sur les sources de contraste, mais en règle générale sur la détection également. Bien que cela soit faux pour certaines techniques comme les approches multi-ondes telles que l'imagerie photoacoustique, la majorité des techniques utilisent une détection correspondant à la source de contraste. Si nous nous référons à la problématique centrale et aux contraintes qui y sont attachées, nous voyons qu'il est nécessaire de rester dans le domaine optique autant que possible, de façon à capitaliser sur des fonctionnalités déjà présentes dans l'OCT plein champ comme la source lumineuse ou la caméra pour la détection. Cela nous oriente vers une approche visant

à différencier les propriétés du tissu tout en restant dans le domaine optique. L'OCT plein champ interrogeant les propriétés de rétrodiffusion du tissu, nous pouvons étendre cela aux propriétés biochimiques du tissu, aux propriétés mécaniques ou encore aux propriétés métaboliques de ce dernier.

I.6.b- OCT plein champ et microscopie de fluorescence

L'OCT plein champ est souvent comparé aux techniques concurrentes de fluorescence qui sont à l'origine d'entreprises telles que Caliber ID pour l'examen de la peau ou Mauna Kea pour l'examen endoscopique. Mais loin de s'exclure, ces technologies peuvent se complémenter de façon pertinente. Nous verrons ici les bases de la microscopie de fluorescence dans les tissus, les tentatives de telles combinaisons conduites en laboratoire ainsi que les développements possibles de ces technologies tout en soulignant les sacrifices que cela suppose pour l'OCT plein champ.

Les techniques de fluorescence se basent soit sur une fluorescence exogène – portée par des marqueurs spécifiques, qui fournissent un contraste basé sur les propriétés biochimiques d'un vecteur, auquel ces fluorophores sont liés – soit sur une fluorescence endogène (autofluorescence) de la cible. Cette dernière est souvent non-spécifique, sauf dans le cas de techniques telles que le CARS[28] (Coherent anti-Stokes Raman spectroscopy) ou la MUSE[29] (Microscopy with UV Surface Excitation) pour ne citer qu'eux. Dans les deux cas, le principe reste le même : illuminer le fluorophore à sa longueur d'onde d'excitation et imager la réponse à la longueur d'onde d'émission. La microscopie de fluorescence est possible dans le volume des tissus, mais nécessite l'utilisation de technologies spécifiques. La plus connue est sans doute la technologie confocale, qui par l'utilisation d'un sténopé (diaphragme confocal) permet le rejet du rayonnement fluorescent d'émission se situant hors du plan de travail du microscope[30]. La microscopie multiphotonique permet quant à elle, grâce aux effets non-linéaires dont elle dépend, de n'exciter que les fluorophores du plan de mise au point du microscope, ce qui est un avantage en termes de phototoxicité et de photoblanchiment des fluorophores[30]. Cette technique permet également de pénétrer plus profondément dans les tissus d'un ordre de grandeur, soit plusieurs centaines de microns comparés à plusieurs dizaines de microns pour la microscopie confocale. D'autres techniques sont disponibles pour réaliser le sectionnement dans les tissus comme l'illumination structurée qui consiste à moduler spatialement la source lumineuse utilisée. Ainsi le motif sera net dans le plan de travail du microscope et flou en dehors de la profondeur de champ. Cette modulation du motif permet alors par démodulation à la réception de retrouver uniquement le signal d'intérêt[22].

La combinaison de l'OCT plein champ avec les techniques de fluorescence a montré son intérêt sous divers aspects et modalités d'implémentation. Dès 2012 nous voyons une proposition de combinaison de fluorescence par illumination structurée avec l'OCT plein champ[31–33]. L'illumination structurée semble en effet un choix judicieux puisqu'elle permet de réaliser le sectionnement optique en plein champ, contrairement au confocal et à la microscopie multiphotonique qui nécessite de scanner l'échantillon. Nous voyons différentes implémentations permettant l'imagerie simultanée ou non par fluorescence et OCT plein champ, mais une application de cette simultanéité ne sera démontrée qu'à partir de 2012 par Makhlouf et al.[32] puis exploitée en 2015 avec les travaux de Thouvenin et al.[34–38] .

Si l'on peut voir quelques opportunités qu'apporte la fluorescence pour notre problématique, il faut également souligner les contraintes qu'elle exige et les incompatibilités qui peuvent exister. Tout d'abord la microscopie confocale ne permet pas une aussi bonne pénétration dans les tissus que l'OCT

plein champ et la microscopie multiphotonique se positionne sur des échelles de temps bien plus longues et des coûts sensiblement plus élevés que nos contraintes peropératoires ne l'autorisent. D'un point de vue plus fondamental, l'ajout d'un agent de contraste à une méthode initialement endogène implique un temps de préparation supplémentaire et peut poser problème dans le contexte d'une analyse ultérieure. De plus, cet ajout de modalité de fluorescence à l'OCT plein champ suppose un développement technique important ajoutant une nouvelle source, un nouveau détecteur et complexifiant le système, ce qui pose le problème du coût ainsi que celui de la robustesse en rapport du résultat escompté.

De ces observations il nous semble que, bien que cette combinaison OCT plein champ et microscopie de fluorescence ait un réel intérêt pour la recherche biomédicale, elle présente de sérieuses difficultés vis-à-vis de l'objectif qu'est le diagnostic peropératoire en cancérologie.

I.6.c- OCT plein champ et élastographie

Commençons par mentionner l'apport de la modalité d'imagerie des propriétés mécaniques des tissus à une technique conceptuellement proche de l'OCT : l'échographie. En effet le développement de l'échographie ultra-rapide[39,40] a permis le suivi des ondes de cisaillement dans les tissus et ainsi d'en déduire une valeur du module d'Young local[41,42], ce qui permet de complémenter le diagnostic offert par la seule échographie et montre des applications cliniques similaires à ce que nous recherchons[42]. Aux vues des résultats de cette méthode, la tentation pourrait être grande de vouloir les répliquer à une échelle plus fine qui est celle de l'OCT (à titre indicatif, il y a entre 2 et 3 ordres de grandeurs entre la résolution de l'OCT plein champ et celle de l'échographie). Plusieurs pistes ont déjà étés explorées dans cette perspective et trois techniques semblent se dégager :

- Evaluation de la vitesse de propagation d'ondes de cisaillement :
  Il s'agit ici de répliquer les techniques utilisées en échographie mentionnées précédemment, en enregistrant le passage d'ondes de cisaillement dans le tissu. Deux techniques peuvent être utilisées, la première est active et nécessite la génération d'ondes de cisaillement à l'aide d'une source externe[43] (souffle d'air, actuateur, ultrasons, laser UV, etc.), la seconde consiste à mesurer les corrélation de bruits mécaniques naturellement présents dans le tissu[44,45].
- Corrélation d'images 3D :
  Cette technique consiste à enregistrer une image en trois dimensions du tissu avant et après compression, puis de réaliser une carte de corrélation 3D dont les paramètres mécaniques peuvent être extraits[46].
- Elastographie statique par capteur déformable (« compliant sensor ») :
  Inspiré des développements de l'OCT standard en élastographie[47,48], cette technique vise à mesurer les déformations d'un senseur : une couche polymère transparente située au-dessus de l'échantillon, le polymère et échantillon sont contenus dans un volume contraint qui est la chambre d'imagerie. Ces déformations du polymère suite à une compression permettent de déduire le module d'Young moyen local de l'échantillon (intégré sur toute la hauteur de l'échantillon) dans le cas où le module d'Young du senseur est connu et où la contrainte appliquée l'est également.

Ces trois techniques peuvent être envisagées dans le cas qui nous intéresse, notamment grâce aux récents développements des techniques de corrélation 3D[49,50] qui rend l'élastographie par corrélation d'images

3D accessible aux échelles de temps du peropératoire. Des développements sont néanmoins encore nécessaires pour que ces technologies soit transférables à un contexte industriel et clinique.

I.6.d- OCT plein champ et métabolisme

Nous pouvons constater que bon nombre de techniques initialement conçues pour l'imagerie statique de la morphologie des tissus entrainent par leurs développements ultérieurs une prise en compte du facteur temps ; tout d'abord sous forme d'une observation des changements structurels au cours du temps puis en convergent vers une imagerie fonctionnelle. C'est le cas de l'IRM qui, avec le développement de l'IRM fonctionnelle (IRMf), a constitué une véritable révolution pour l'étude du fonctionnement cérébral[1]. Nous pouvons également prendre comme exemple l'échographie Doppler qui permet la mesure de flux sanguins, très utilisée en cardiologie[51] et pour l'étude fonctionnelle du cerveau chez le petit animal[52] et l'enfant[53]. Plus proche de l'OCT plein champ, nous pouvons constater les développements de l'OCT standard et spectral avec ce qui est regroupé sous le nom d'OCA[54] (optical coherence angiography pour angiographie par cohérence optique) et qui comprend les techniques d'OCT Doppler[55] (ou variance de phase) et de variance du speckle[56] ainsi que pour les techniques de contraste de motilité[57,58]. Ces développements n'impliquent pas de modifications majeures du système d'imagerie, permettent une imagerie rapide et fournissent un contraste différent fortement du contraste morphologique. Mais des doutes peuvent être émis vis-à-vis de notre application car les pièces opératoires à examiner sont bien entendu *ex-vivo*, ce qui signifie qu'il n'y a plus de flux sanguin et la mesure de motilité n'a été montrée que dans le cas d'agrégats cellulaires (sphéroïdes) ou de tissus en culture.

I.6.e- Traitement de données et imagerie : vers une assistance par ordinateur ?

Les développements envisagés précédemment (I.5.b - I.5.d) se contentent de proposer un développement portant sur l'acquisition de nouvelles métriques, c'est-à-dire à multiplier les modes d'imagerie de façon à cerner des propriétés spécifiques que l'on souhaite isoler : dans notre cas cette propriété est le caractère cancéreux des cellules composant le tissu. Cette approche multimodale est au cœur de la stratégie de cette thèse, néanmoins la multiplication de modes d'imagerie pose le problème de la représentation de l'information. Celle-ci qui est cruciale de façon générale, puisqu'une mesure ou une image ne prend sens qu'à travers l'utilisation qu'en fait l'utilisateur final ; mais elle est particulièrement critique dans le cas qui nous occupe puisqu'il s'agit d'un contexte médical. Cette constatation nous éloigne d'une conception où le système d'imagerie n'est qu'un intermédiaire qui rend visible à l'humain une réalité physique invisible. Cette constatation nous rapproche d'une réalité de plus en plus présente où la mesure physique brute passe par tout un ensemble de traitements ayant pour but de faciliter l'interprétation *juste* qu'en fera l'utilisateur. Cet éloignement de la mesure physique brute pour se diriger toujours plus vers l'abstraction n'est pas sans lien avec le domaine du traitement de l'image et de la vision par ordinateur. En effet, à un niveau basique la simple suppression des artefacts de mesure propre à l'appareil ou l'augmentation du signal par rapport au fond (*ie* : le contraste) constitue une facilité offerte à l'utilisateur dont il semble difficile de se passer ; mais alors que l'on s'éloigne toujours plus de la « réalité physique » du signal, en lissant le speckle par exemple pour des images d'échographie ou d'OCT, la machine prend de plus en plus en charge ce que le cerveau de l'utilisateur était, dans le temps, entrainé – ou contraint – à faire. Il est aujourd'hui évident qu'il faut être un « expert » pour interpréter les images fournies par

l'imagerie médicale, la question naturelle qui s'impose est alors : cette expertise doit-elle concerner la physique de l'imagerie en question et son lien avec la biologie sous-jacente ou, bien plus, doit-elle s'occuper de l'interprétation des paramètres biologiques révélées par cette imagerie en lien avec le parcours médical du patient ? Les développements récents du traitement d'image, de l'apprentissage et de l'intelligence artificielle donnent aujourd'hui l'espoir de séparer ces deux pôles d'expertise. Délocaliser une part de l'interprétation de bas niveau (ex : interprétation d'un ensemble de pixels comme étant une cellule) dans la machine permet au clinicien de se concentrer sur les taches d'interprétations de haut niveau (ex : effectuer un diagnostic global compte tenu de l'ensemble des éléments diagnostics présents), permet de décharger ce dernier des apprentissages d'interprétation qui peuvent conduire à des erreurs et finalement permet de baser le diagnostic sur des critères plus objectifs (un niveau de signal, une densité d'objets, etc.) et donc plus facilement transmissible et moins sensibles aux différences interindividuelles (d'un clinicien à l'autre) et liées au contexte (stress, fatigue, etc.).

I.7- Conclusion

Nous avons essayé de montrer dans la section précédente (I.5) un panorama à la fois épuré mais large des opportunités de recherche qui se sont présentées à nous au commencement de cette thèse en relation avec les problématiques cliniques et industrielles (I.3 et I.4). L'ensemble de ces pistes avec leurs opportunités et leurs risques inhérents nous ont mené à établir des priorités qui ont évolué au fil des résultats expérimentaux obtenus. La combinaison de l'OCT plein champ avec la fluorescence a déjà fait l'objet de recherches et conduit à sacrifier des avantages spécifiques à l'OCT plein champ qui sont essentiels pour le but recherché, cette piste a donc été écartée tôt dans le processus. L'élastographie a été développée en détail par les travaux de Nahas et al. pour l'OCT plein champ et les développements subséquents ont rapidement cédé la place à d'autres intérêts de recherche. Finalement, les premiers résultats fortement encourageant donnés par l'imagerie métabolique des tissus par OCT plein champ nous ont conduits à focaliser nos efforts dans le développement de cette modalité. Ces recherches nous ont amené dans un second temps à tirer parti des différentes métriques extraites des dynamiques cellulaires et de l'OCT plein champ pour approcher une imagerie fonctionnelle endogène des tissus à l'échelle du micron. Le chapitre suivant présentera les bases théoriques du fonctionnement de l'OCT plein champ sur lesquelles se base l'imagerie dynamique.

Bibliographie du chapitre I :

1. K. Li et al., “Review of methods for functional brain connectivity detection using fMRI” Comput. Med. Imaging Graph. **33**(2), 131–139 (2009)
2. H. Johansen-Berg and T. E. J. Behrens, *Diffusion MRI: From Quantitative Measurement to In vivo Neuroanatomy*, Academic Press (2013)
3. E. Beaurepaire et al., “Full-field optical coherence microscopy” Opt. Lett. **23**(4), 244–246 (1998)
4. E. Beaurepaire et al., “Optical coherence microscopy for the in-depth study of biological structures: system based on a parallel detection scheme” (1998)
5. A. Dubois et al., “High-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography with a Linnik Microscope” Appl. Opt. **41**(4), 805 (2002)
6. “Cancer du sein,” Ligue contre le cancer
7. L. M. Christian et al., “Stress and Wound Healing” Neuroimmunomodulation **13**(5–6), 337–346 (2006)
8. C. M. Conti, G. Maccauro, and M. Fulcheri, “Psychological Stress and Cancer” Int. J. Immunopathol. Pharmacol. **24**(1), 1–5 (2011)
9. J. R. Durkin et al., “Imaging of Mohs Micrographic Surgery Sections Using Full-Field Optical Coherence Tomography: A Pilot Study” Dermatol. Surg. **40**(3), 266–274 (2014)
10. O. Assayag et al., “Large field, high resolution full-field optical coherence tomography: a pre-clinical study of human breast tissue and cancer assessment” Technol. Cancer Res. Treat. **13**(5), 455–468 (2014)
11. B. F et al., “Full field optical coherence tomography of prostate biopsies: a step towards pre-histological diagnosis?” Progres En Urol. J. Assoc. Francaise Urol. Soc. Francaise Urol. **24**(1), 22–30 (2014)
12. J. Lopater et al., “Real-time cancer diagnosis during prostate biopsy: ex vivo evaluation of full-field optical coherence tomography (FFOCT) imaging on biopsy cores” World J. Urol. **34**(2), 237–243 (2016)
13. C. Yang et al., “High efficiency for prostate biopsy qualification with full-field OCT after training” (2016)
14. F. De Leeuw et al., “Optical biopsy on head and neck tissue using full-field OCT: a pilot study” (2014)
15. F. De Leeuw et al., “Full-field OCT for fast diagnostic of head and neck cancer” (2015)
16. I. T. A. Peters et al., “Non-invasive detection of metastases and follicle density in ovarian tissue using full-field optical coherence tomography” Clin. Cancer Res., clincanres.0288.2016 (2016)
17. K. Grieve et al., “Assessment of Sentinel Node Biopsies With Full-Field Optical Coherence Tomography” Technol. Cancer Res. Treat. **15**(2), 266–274 (2016)
18. O. Assayag et al., “Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissues with full-field optical coherence tomography” NeuroImage Clin. **2**, 549–557 (2013)
19. W. Ghouali et al., “Full-field optical coherence tomography of human donor and pathological corneas” Curr. Eye Res. **40**(5), 526–534 (2015)
20. J. G. Fujimoto and D. Farkas, *Biomedical Optical Imaging*, Oxford University Press (2009)
21. B. Herman and J. J. Lemasters, *Optical Microscopy: Emerging Methods and Applications*, Elsevier (2012)
22. M. Saxena, G. Eluru, and S. S. Gorthi, “Structured illumination microscopy,” Adv. Opt. Photonics **7**(2), 241–275 (2015)
23. B. O. Leung and K. C. Chou, “Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology,” Appl. Spectrosc. **65**(9), 967–980 (2011)
24. W. Drexler and J. G. Fujimoto, *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*, Springer Science & Business Media (2008)
25. C.-I. Chang, *Hyperspectral Imaging: Techniques for Spectral Detection and Classification*, Springer Science & Business Media (2003)
26. J. Beutel, H. L. Kundel, and R. L. V. Metter, *Handbook of Medical Imaging: Physics and psychophysics*, SPIE Press (2000)
27. G. L. Brownell et al., “New Developments in Positron Scintigraphy and the Application of Cyclotron-Produced Positron Emitters” (1969)
28. W. M. Tolles et al., “A Review of the Theory and Application of Coherent Anti-Stokes Raman Spectroscopy (CARS),” Appl. Spectrosc. **31**(4), 253–271 (1977)
29. F. Fereidouni et al., “Microscopy with UV Surface Excitation (MUSE) for slide-free histology and pathology imaging,” (2015)
30. A. Diaspro, *Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications and Advances* (2001)
31. F. Harms et al., “Multimodal full-field optical coherence tomography on biological tissue: toward all optical digital pathology” (2012)
32. H. Makhlouf et al., “Simultaneous optically sectioned fluorescence and optical coherence microscopy with full-field illumination” Opt. Lett. **37**(10), 1613–1615 (2012)
33. E. Auksorius et al., “Dual-modality fluorescence and full-field optical coherence microscopy for biomedical imaging applications” Biomed. Opt. Express **3**(3), 661–666 (2012)
34. K. Grieve et al., “Three-dimensional structure of the mammalian limbal stem cell niche” Exp. Eye Res. **140**, 75–84 (2015)
35. O. Thouvenin, M. Fink, and C. Boccara, “Dynamic multimodal full-field optical coherence tomography and fluorescence structured illumination microscopy” J. Biomed. Opt. **22**(2), 026004–026004 (2017)
36. K. Grieve et al., “Appearance of the Retina With Full-Field Optical Coherence TomographyFFOCT and the Retina” Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. **57**(9), OCT96-OCT104 (2016)
37. O. Thouvenin, M. Fink, and C. Boccara, “Synchronous multimodal combination of full-field OCT and structured illumination fluorescence microscopy (Conference Presentation)” (2016)
38. O. Thouvenin et al., “En face coherence microscopy” [Invited] Biomed. Opt. Express **8**(2), 622–639 (2017)

39. J. Provost et al., “3D ultrafast ultrasound imaging in vivo” Phys. Med. Biol. **59**(19), L1 (2014)
40. M. Tanter and M. Fink, “Ultrafast imaging in biomedical ultrasound” IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control **61**(1), 102–119 (2014)
41. L. Sandrin et al., “Shear modulus imaging with 2-D transient elastography” IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control **49**(4), 426–435 (2002)
42. F. Sebag et al., “Shear Wave Elastography: A New Ultrasound Imaging Mode for the Differential Diagnosis of Benign and Malignant Thyroid Nodules” J. Clin. Endocrinol. Metab. **95**(12), 5281–5288 (2010)
43. A. Nahas et al., “From supersonic shear wave imaging to full-field optical coherence shear wave elastography” J. Biomed. Opt. **18**(12), 121514–121514 (2013)
44. T.-M. Nguyen et al., “Diffuse shear wave imaging: toward passive elastography using low-frame rate spectral-domain optical coherence tomography” J. Biomed. Opt. **21**(12), 126013–126013 (2016)
45. S.Catheline et al. “Tomography from diffuse waves: Passive shear wave imaging using low frame rate scanners” Appl. Phys. Lett. **103**(1), 014101 (2013)
46. A. Nahas et al., “3D static elastography at the micrometer scale using Full Field OCT” Biomed. Opt. Express **4**(10), 2138–2149 (2013)
47. B. F. Kennedy, K. M. Kennedy, and D. D. Sampson, “A Review of Optical Coherence Elastography: Fundamentals, Techniques and Prospects” IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron. **20**(2), 272–288 (2014)
48. B. F. Kennedy et al., “In vivo three-dimensional optical coherence elastography” Opt. Express **19**(7), 6623–6634 (2011)
49. F. Hild and S. Roux, “Comparison of Local and Global Approaches to Digital Image Correlation” Exp. Mech. **52**(9), 1503–1519 (2012)
50. “Digital Image Correlation: from Displacement Measurement to Identification of Elastic Properties – a Review - Hild - (2006) - Strain - Wiley Online Library”
51. A. P. Yoganathan et al., “Review of hydrodynamic principles for the cardiologist: Applications to the study of blood flow and jets by imaging techniques” J. Am. Coll. Cardiol. **12**(5), 1344–1353 (1988)
52. E. Macé et al., “Functional ultrasound imaging of the brain,” Nat. Methods **8**(8), 662–664 (2011)
53. P. A. Ahmann et al., “Brain death in children: Characteristics common carotid arterial velocity patterns measured with pulsed Doppler ultrasound” J. Pediatr. **110**(5), 723–728 (1987)
54. S. Makita et al., “Optical coherence angiography” Opt. Express **14**(17), 7821–7840 (2006)
55. A. V. Zvyagin et al., “Real-time detection technique for Doppler optical coherence tomography” Opt. Lett. **25**(22), 1645–1647 (2000)
56. MS Mahmud et al. “Review of speckle and phase variance optical coherence tomography to visualize microvascular networks" | Journal of Biomedical Optics | SPIE (2013)
57. A. L. Oldenburg et al., “Motility-, autocorrelation-, and polarization-sensitive optical coherence tomography discriminates cells and gold nanorods within 3D tissue cultures” Opt. Lett. **38**(15), 2923–2926 (2013)
58. A. L. Oldenburg et al., “Inverse-power-law behavior of cellular motility reveals stromal–epithelial cell interactions in 3D co-culture by OCT fluctuation spectroscopy” Optica **2**(10), 877–885 (2015)

Chapitre II : Imagerie des tissus biologiques par OCT plein champ

II.1- Introduction.....21
II.2- Physique de l'imagerie optique en milieu diffusant.....21
II.2.a- Optique des milieux diffusants.....21
II.2.b- Imagerie en milieu diffusant.....26
II.3- l'OCT plein champ.....33
II.3.a- Physique de l'OCT plein champ.....33
II.3.b- Dispositif expérimental d'OCT plein champ.....39
II.4- Conclusion.....46

II.1- Introduction

Avant de rentrer dans le détail des développements réalisés au cours de cette thèse, il convient tout d'abord de comprendre sur quelle base technologique ils s'appuient : l'OCT plein champ. Nous avons brièvement souligné au chapitre précédent les origines de cette technologie (I.2) et quelques-unes de ses caractéristiques (I.4), ici nous entrerons dans la physique des processus impliqués dans l'imagerie des milieux diffusants que sont les tissus biologiques ainsi que dans l'implémentation technique de ces principes pour le cas particulier de l'OCT plein champ sur lequel nos recherches se basent.

II.2- Physique de l'imagerie optique en milieu diffusant

La grande majorité des tissus biologiques sont des milieux diffusants pour les rayonnements électromagnétiques visibles et proches (infrarouge et ultraviolet), ce qui pose un grand nombre de défis pour l'imagerie en profondeur. Nous nous intéresserons tout d'abord à la description physique des milieux diffusants pour aboutir à quelques concepts clefs décrivant ces milieux. Une fois ces concepts mis en lumière, nous poursuivrons à travers les différentes stratégies utilisées pour imager en profondeur de tels milieux.

II.2.a- Optique des milieux diffusants

Nous n'avons pas pour ambition ici de réaliser un exposé détaillé d'un modèle physique de la diffusion de la lumière en milieu complexe[1], mais plutôt de cerner les résultats clefs qui permettent de saisir les articulations de ce dernier et de pouvoir l'utiliser. En première approximation un milieu diffusant peut être considéré comme une collection de particules réparties dans un milieu. Si l'on s'intéresse au comportement en champ lointain ($k_0.r >> 1$) d'une particule soumise à une onde plane monochromatique décrite par le champ suivant :

$$Champ\ incident : E_{inc}(\vec{r},t) = Re\left[E_0 e^{i\vec{k}_{inc}.\vec{r}-i\omega t}\right] avec\ \frac{\omega}{c} = k_0 \qquad \text{(Eq2.1)}$$

Avec *Re* la partie réelle, E_0 l'amplitude du champ, $\vec{k}$ le vecteur d'onde, et ω la pulsation. Si l'on omet la dépendance temporelle en $e^{-i\omega t}$ pour ne considérer que l'amplitude complexe, on a le champ correspondant à la diffusion par une particule petite en comparaison de la longueur d'onde ou en champ lointain :

$$Champ\ rayonné : E_{diff}(\vec{r}) = S(\vec{u}_{inc}).\frac{e^{ik_0 r}}{r}.E_{inc} \qquad \text{(Eq2.2)}$$

Avec le vecteur unitaire $\vec{u}_{inc}$ pointant dans la direction d'incidence et S l'amplitude de diffusion qui est homogène à une longueur ; il s'agit en général d'une grandeur complexe. En pratique nous avons seulement accès avec les capteurs optiques qu'à des valeurs de puissance. On définit donc la section efficace de diffusion d'une particule diffusante par le rapport entre la puissance diffusée totale (en Watt) et l'intensité avec laquelle cette particule a été éclairée (l'intensité est homogène à une puissance par unité de surface, $W.m^{-2}$). On a donc :

$$Section\ efficace\ de\ diffusion : \sigma_{diff} = \iint_{4\pi} |S(\vec{u}_{inc})|^2 d\Omega \quad \text{(Eq2.3)}$$

La section efficace de diffusion est donc homogène à une surface et dépend directement et exclusivement de l'amplitude de diffusion définie précédemment. De la même manière on définit la section efficace d'absorption comme le rapport de la puissance absorbée en rapport de l'intensité reçue par la particule et la section efficace d'extinction comme la puissance prélevée au faisceau incident en rapport de l'intensité incidente. Naturellement, la section efficace d'extinction est la somme de la section efficace de diffusion et d'absorption. Nous ne rentrerons pas dans sa démonstration, mais il existe une expression de la section efficace d'extinction :

$$Théorème\ optique : \sigma_{ext} = \frac{4\pi}{k_0} Im[S(\vec{u}_{inc})] \quad \text{(Eq2.4)}$$

Nous avons donc vu qu'une particule soumise à un rayonnement allait prélever une partie de celui-ci en absorption et en diffusion. Soumise à un champ, cette particule va subir en son sein des mouvements de charges (charges de polarisation) ; le calcul du champ diffusé passe donc par le calcul du rayonnement provoqué par les courants induits. Nous avons le champ total en un point de l'espace qui est la somme du champ incident et du champ rayonné (Eq2.6) par les sources induites dans la particule diffusante. En ce qui concerne ce second terme, il est le résultat de chaque élément de volume de la particule qui se comporte comme un dipôle de moment $\vec{p} = \vec{P}\ d^3r'$ ($\vec{P}$ le moment dipolaire volumique). Soit G la fonction de Green qui décrit la relation linéaire qu'il existe entre le champ au point r et le dipôle placé en r' :

$$\vec{E}(\vec{r}) = \mu_0 \omega^2 \overleftrightarrow{G}\left(\vec{r}, \overrightarrow{r'}, \omega\right).\vec{p} \qquad \text{(Eq2.5)}$$

Avec μ_0 la perméabilité magnétique du vide. On a la formulation générale pour une particule diffusante :

$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}_{inc}(\vec{r}) + \vec{E}_{diff}(\vec{r}) \qquad \text{(Eq2.6)}$$

$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}_{inc}(\vec{r}) + \mu_0 \omega^2 \iiint_{V_{diffuseur}} \overleftrightarrow{G}(\vec{r}, \overrightarrow{r'}, \omega).\vec{P}(\overrightarrow{r'})\, d^3\overrightarrow{r'} \qquad \text{(Eq2.7)}$$

Si l'on décrit macroscopiquement le diffuseur par son indice optique n(r,ω), on a $\vec{P}(\overrightarrow{r'}) = \varepsilon_0.[n^2 - 1]\vec{E}(\overrightarrow{r'})$ (ε_0 la permittivité diélectrique du vide) avec d'autre part $\mu_0.\omega^2 = k_0^2$ et donc :

$$\vec{E}(\vec{r}) = \vec{E}_{inc}(\vec{r}) + {k_0}^2 \iiint_{V_{diffuseur}} \overleftrightarrow{G}(\vec{r}, \overrightarrow{r'}, \omega).\varepsilon_0[n^2(\overrightarrow{r'}, \omega) - 1].\vec{E}(\overrightarrow{r'})d^3\overrightarrow{r'} \qquad \text{(Eq2.8)}$$

Cette dernière équation est l'expression analytique générale pour le problème de la diffusion d'une particule ; sa résolution peut s'avérer très complexe et plusieurs cas s'offrent à nous :

- Une résolution approchée en utilisant des approximations comme l'approximation dipolaire qui suppose une particule très petite devant la longueur d'onde du rayonnement incident ; ce qui conduit à obtenir un champ rayonné suivant la loi de diffusion de Rayleigh. Ou encore l'approximation de Born qui suppose que $|n^2-n_0^2|<<1$ (la différence d'indice entre le diffuseur et le milieu), c'est-à-dire que le diffuseur perturbe peu le champ incident.
- Une résolution exacte pour le cas particulier d'une géométrie de diffuseur sphérique de constitution homogène, ce qui conduit à la loi de diffusion de Mie ou alors dans le cas général une résolution par calcul numérique.

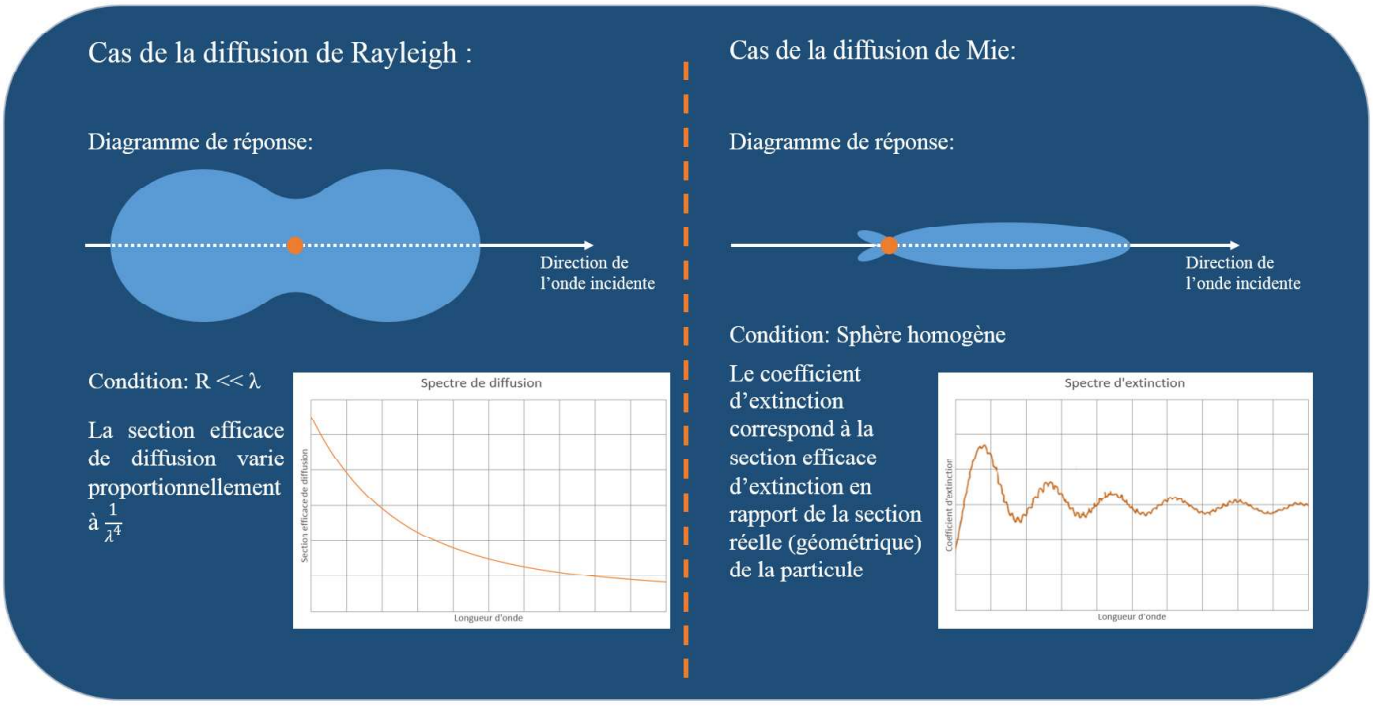

Figure 2.1 : Illustration de deux régimes de diffusions en lumière non polarisée.

Nous avons ainsi une vision générale du comportement d'un diffuseur soumis à un rayonnement électromagnétique, nous allons maintenant voir quel comportement de groupe se dégage lorsque l'on dispose d'une distribution de diffuseurs dans un milieu. Rappelons tout d'abord que la propagation de l'onde incidente dans le milieu diffusant hétérogène de constante diélectrique $\varepsilon(r) = n^2(r)$ obéit à l'équation de Helmholtz :

$$\nabla^2 E(\vec{r}) + \varepsilon(\vec{r}) k_0^2 E(\vec{r}) = 0 \qquad \text{(Eq2.9)}$$

Le champ diffusé $E_{diff} = E - E_{inc}$ obéit donc à l'équation :

$$\nabla^2 E_{diff}(\vec{r}) + k_0^2 E_{diff}(\vec{r}) = -[\varepsilon(\vec{r}) - 1] k_0^2 E(\vec{r}) \qquad \text{(Eq2.10)}$$

La solution générale de cette équation peut être exprimée en fonction de G_0 la fonction de Green de l'espace libre :

$$\vec{E}(\vec{r}) = \overrightarrow{E_{inc}}(\vec{r}) + \overrightarrow{E_{diff}}(\vec{r}) \qquad \text{(Eq2.11)}$$

$$\vec{E}_{diff}(\vec{r}) = \iiint_{Milieu\ diffusant} \overrightarrow{G_0}(\vec{r}, \overrightarrow{r'}, \omega).[\varepsilon(\overrightarrow{r'}) - 1]k_0^2 \vec{E}(\overrightarrow{r'})\, d^3\overrightarrow{r'} \qquad \text{(Eq2.12)}$$

Deux régimes peuvent être observés conduisant à des comportements très différents :

- Comme souligné précédemment avec l'approximation de Born portant sur le cas d'un milieu dilué : le champ est peu perturbé par les diffuseurs et on peut remplacer E(r') dans l'équation précédente par E_{inc}(r'), ce régime est appelé diffusion simple
- Pour un milieu dense, on peut écrire le champ total sous la forme condensée

$$E = E_{inc} + G_0.[\varepsilon - 1]k_0^2.E \qquad \text{(Eq2.13)}$$

Puis par itération :

$$E = E_{inc} + G_0.[\varepsilon - 1]k_0^2.E_{inc} + G_0.[\varepsilon - 1]k_0^2.G_0.[\varepsilon - 1]k_0^2.E_{inc} + \cdots \qquad \text{(Eq2.14)}$$

Chaque terme représente un ordre de diffusion avec en premier le champ incident non perturbé suivi de la diffusion simple puis de la diffusion sur deux diffuseurs et des ordres de diffusion plus élevés.

En pratique, cette description que nous venons d'introduire ne présente qu'un intérêt limité. En effet, dans un milieu diffusant réel nous ne connaissons pas précisément la distribution des diffuseurs ainsi que leurs propriétés. Il est par contre utile de décrire le comportement de tels milieux de façon statistique pour en tirer des propriétés macroscopiques. Le champ est alors décomposé en un champ moyen et une fluctuation :

$$E(\vec{r}) = E_{inc}(\vec{r}) + < E_{diff}(\vec{r}) > + \delta E_{diff}(\vec{r}) \qquad \text{(Eq2.15)}$$

Avec < > la moyenne d'ensemble et $<\delta E_{diff}> = 0$

On a ainsi une expression de l'intensité :

$$I = < I > + \delta I \qquad \text{(Eq2.16)}$$

$$< I >= |< E >|^2 + < |\delta E|^2 > \qquad \text{(Eq2.17)}$$

La première partie de l'expression est une intensité qui peut être qualifiée de balistique tandis que la seconde partie est souvent appelée intensité diffuse et ensemble constituent le transport d'énergie. Les fluctuations d'intensité δI constituent le speckle (figure de tavelure en français).

Après un parcours à travers un milieu diffusant d'épaisseur L, on peut écrire l'expression de l'intensité balistique décrite par la loi de Beer-Lambert :

$$\text{Loi de Beer Lambert : } I_{bal}(L) = I_{inc} e^{-\rho \sigma_{ext} L} \qquad \text{(Eq2.18)}$$

Avec ρ la densité de diffuseurs et σ_{ext} la section efficace d'extinction. On peut faire apparaitre $1/\rho.\sigma_{ext}$ comme une longueur : le libre parcours moyen d'extinction. Si le milieu est purement diffusant (aucune absorption) cette valeur est égale au libre parcours moyen de diffusion l_s qui peut être interprété comme la distance moyenne entre deux évènements de diffusion. On définit donc trois régimes :

- $L << l_s$: correspond à une onde se propageant dans le milieu sans subir significativement la diffusion, il s'agit du régime balistique.
- $L \sim l_s$: diffusion simple correspondant au cas de l'approximation de Born vu précédemment.
- $L >> l_s$: régime de diffusion multiple, le faisceau incident est complètement éteint et l'énergie est transportée en totalité par la composante diffuse.

Nous avons donc vu le comportement de <I> en fonction du régime de diffusion, il ne reste qu'à analyser la contribution de δI. Cette composante de speckle ne transporte pas d'énergie, elle est caractéristique des milieux désordonnés. On peut observer cette composante en éclairant de façon uniforme un milieu diffusant fin avec une source cohérente et polarisée et en observant la distribution d'intensité en champ lointain. La distribution de speckle est directement liée à la distribution spatiale des diffuseurs dans le milieu et dispose de statistiques remarquables. En effet pour un speckle pleinement développé on a :

- Pour deux séquences de diffusion différentes les amplitudes et les phases sont indépendantes
- Pour une séquence donnée l'amplitude et la phase sont décorrélées
- Pour une séquence donnée la phase est uniformément distribuée sur l'intervalle [0 ; 2π]

Ce qui permet de montrer que les fluctuations d'intensité sont de l'ordre de la valeur moyenne :

$$\frac{\Delta I}{< I >} \sim 1$$

On peut également montrer pour une couche d'épaisseur $L >> l_s$ et isotrope éclairée par un faisceau incident de largeur $D >> L$ et imagée par une lentille de focale f que la taille du grain de speckle sera alors :

$$\phi_{grain} \sim \frac{\lambda f}{D}$$

Dans le cas où le faisceau est focalisé, c'est-à-dire que $D << L$:

$$\phi_{grain} \sim \frac{\lambda f}{L}$$

Ces deux cas constituent les cas limites pour l'évaluation de la taille du grain de speckle.

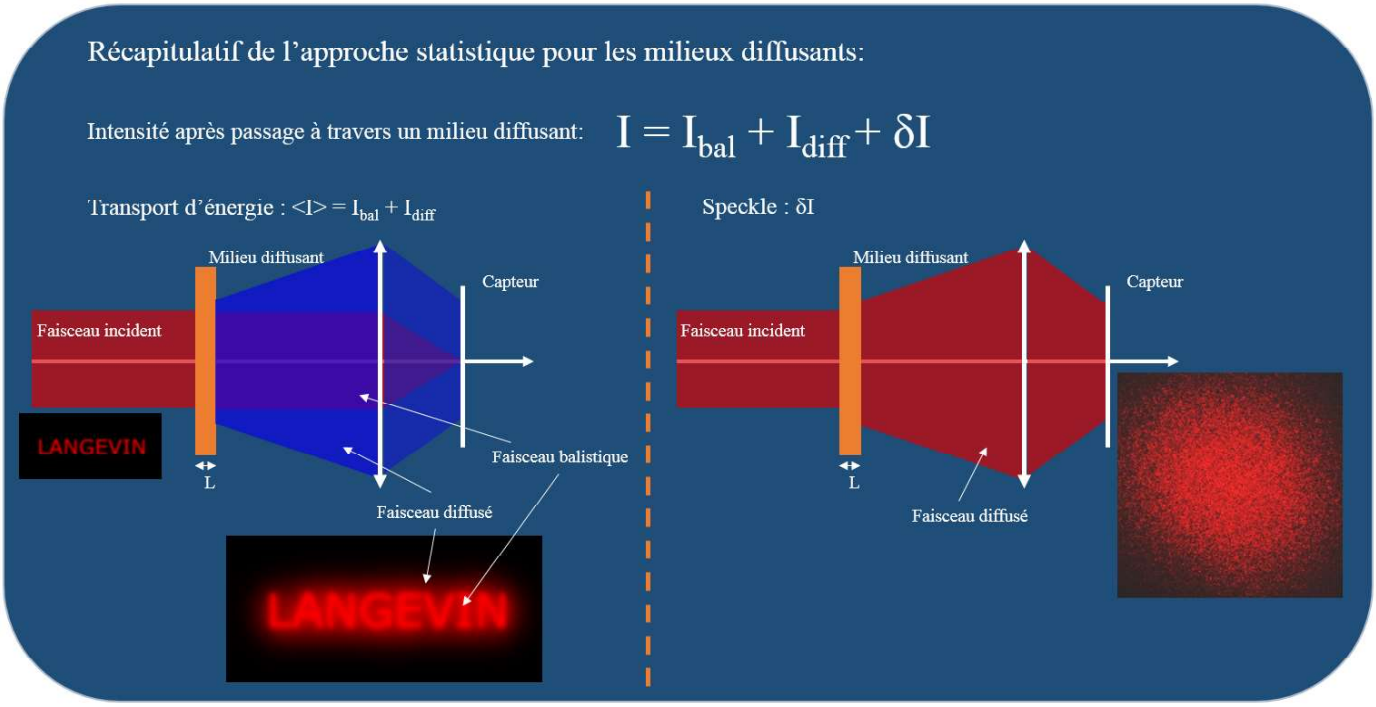

Figure 2.2 : Récapitulatif de l'approche statistique pour les milieux diffusants.

Maintenant que nous avons passé en revue les principaux concepts de la théorie de la diffusion dans les milieux complexes, nous allons pouvoir nous intéresser aux stratégies que l'on peut mettre en place pour imager de tels milieux en profondeur ainsi que les défis que cela représente.

II.2.b- Imagerie en milieu diffusant

De nombreuses techniques existent pour l'imagerie des milieux diffusants et peuvent être classées en deux catégories :

- Imagerie des photons multi-diffusés :
  Les techniques d'imagerie des photons multi-diffusés font face au problème de la diffusion multiple dans les milieux biologiques en tentant de reconstruire les chemins de diffusions qu'a suivi la lumière. Cela s'avère comme nous l'avons vu analytiquement périlleux d'autant plus que les milieux biologiques sont rarement homogènes et statiques. Nous pouvons citer des techniques comme la tomographie optique diffuse[2,3], l'imagerie photo-acoustique[4] ou l'imagerie acousto-optique[5,6] comme méthodes qui ont fait leur preuve pour l'imagerie en profondeur des photons multi-diffusés. Ces méthodes ont l'avantage de pénétrer sur plusieurs millimètres à plusieurs centimètres dans les tissus. Cependant la résolution est loin des standards de la microscopie optique avec des résolutions de plusieurs dizaines de microns à plusieurs millimètres suivant les techniques. Nous ne détaillerons pas ces méthodes qui ne font pas l'objet de cette thèse.

- Imagerie des photons balistiques :
  Comme nous l'avons vu à la partie précédente (II.2.a), l'intensité lumineuse en sortie d'un milieu diffusant peut être décomposée en une partie balistique et une partie diffuse. Les

méthodes balistiques se concentrent sur l'utilisation de stratégies diverses pour isoler la partie balistique du signal et rejeter la composante diffuse. Ces méthodes permettent de travailler avec une résolution limitée par la diffraction, ce qui est indispensable si l'on souhaite accéder aux éléments qui permettent de fonder un diagnostic similaire à l'histologie. Les différentes stratégies possibles pour réaliser cette sélection des photons balistiques seront détaillées dans cette partie.

Avant de rentrer dans l'inventaire des stratégies d'imagerie en profondeur dans les tissus, prenons le temps de tirer quelques conclusions pratiques des considérations précédentes.

En ce qui concerne la profondeur de pénétration, nous avons un libre parcours moyen de diffusion dans les tissus biologiques qui varie de 20 µm à 100 µm, ce qui exclut l'imagerie par transmission dès que l'on s'intéresse à des échantillons de plus de quelques millimètres d'épaisseur. Si l'on considère un plan d'intérêt à une profondeur z dans un tissu à imager d'épaisseur L ; il devient rapidement évident que pour maximiser la quantité de lumière balistique issue de ce plan d'intérêt il faut se placer dans une configuration en réflexion. En effet, le faisceau balistique subit une atténuation en transmission suivant la loi de Beer-Lambert sur toute l'épaisseur L. En réflexion en revanche, nous avons une première phase d'atténuation du faisceau balistique sur la profondeur z ; puis une diffusion balistique vers l'arrière dans un angle solide correspondant à l'ouverture numérique du système d'imagerie ; et enfin une seconde phase d'atténuation sur la même profondeur z pour le retour du faisceau balistique (figure 2.3). Ce qui donne :

$$I_{reflexion}(z) = I_{inc} P_{arrière} e^{-2z/L_{ext}} \quad \text{(Eq2.19)}$$

Avec I_{inc} l'intensité incidente, $P_{arrière}$ la portion de lumière diffusée vers l'arrière dans l'ouverture numérique du système et nous reconnaissons la fonction exponentielle la décroissance décrite par Beer-Lambert avec le facteur 2 tenant compte de l'aller et du retour de la lumière dans l'échantillon. Si l'on prend un cas même très défavorable suivant un régime de diffusion correspondant au modèle de Mie (donc avec une faible portion $P_{arrière}$) avec des paramètres semblables à ce qui peut être trouvé dans les milieux biologiques [L_{ext} =60 µm ; σ_{avant} =0,6859 µm² $\sigma_{arrière}$ = 3,2.10^{-3} µm² ; ρ= 0.6 μm^{-3}; avec une couche d'intérêt de 1 µm d'épaisseur] ; on trouve l'épaisseur à partir de laquelle il est intéressant de se placer dans une configuration en réflexion :

$$\frac{I_{reflexion}(z)}{I_{trans}(z)} = \frac{I_{inc} P_{arrière} e^{-2z/L_{ext}}}{I_{inc} P_{avant} e^{-L/L_{ext}}} \quad \text{(Eq2.20)}$$

Soit pour un ratio unitaire atteint pour $L = L_{lim}$

$$L_{lim} = \left[L_{ext} . \ln\left(\frac{P_{avant}}{P_{arrière}}\right) \right] + 2z \quad \text{(Eq2.21)}$$

Avec les paramètres cités précédemment, on a $L_{lim} \sim 320 + 2z$ (en µm). On peut donc dire que dans un cas défavorable (diffusion de Mie principalement vers l'avant) en prenant le pire cas ($z = L_{lim}/2$ soit une image au milieu de l'échantillon) nous avons intérêt à utiliser une configuration en réflexion pour les milieux biologiques dès que l'épaisseur de l'échantillon est supérieure à plusieurs centaines de microns (aux alentours de 400 µm pour notre exemple).

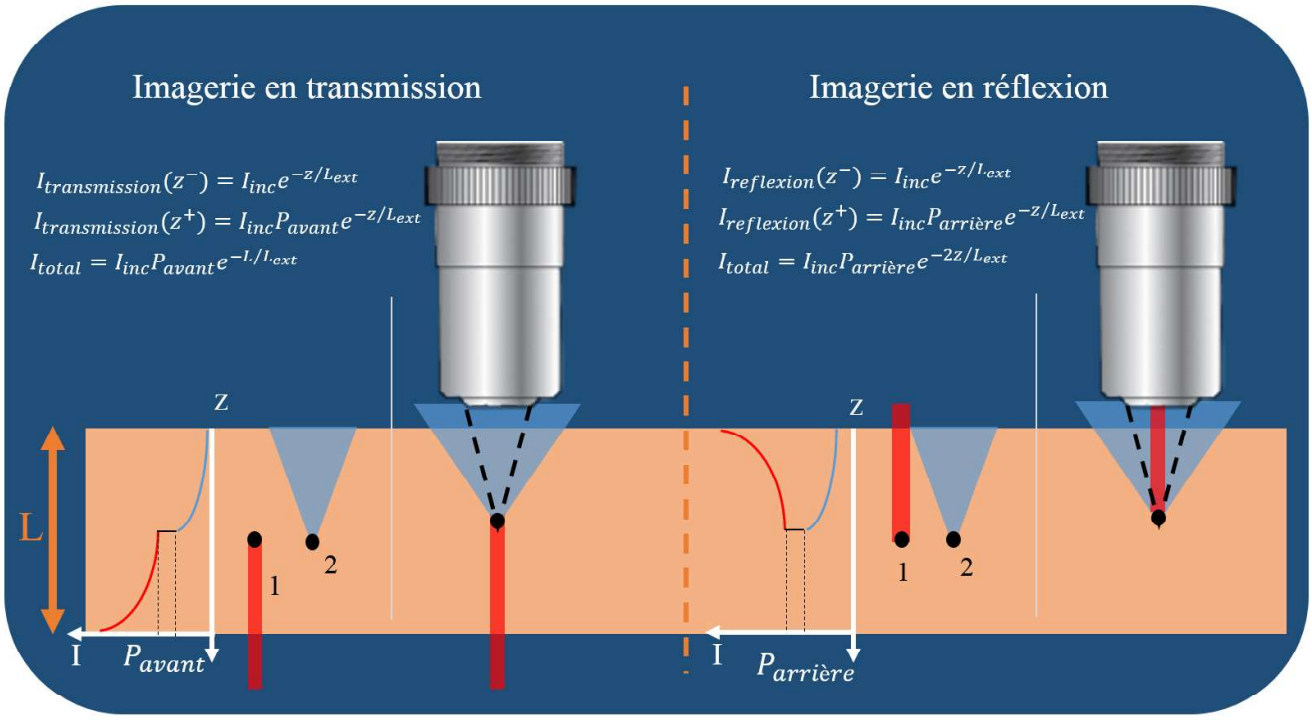

Figure 2.3 : Illustration de la différence entre imagerie en transmission et en réflexion. On notera le décrochage présent à la profondeur z lorsqu'il y a diffusion. Celle-ci est causée par le coefficient de diffusion vers l'avant ou l'arrière. L'ouverture du système joue de façon similaire dans les deux cas, la portion du signal diffusé prélevé étant seulement fonction de la profondeur du diffuseur z.

Nous avons également souligné dans la partie précédente l'influence de la longueur d'onde sur la diffusion ; elle se retrouve bien entendu avec l'absorption. Cette influence nous suggère de porter attention aux éléments constitutifs du milieu à imager de façon à minimiser de façon conjointe l'absorption et la diffusion, ce qui permettra d'augmenter le ratio entre les photons balistiques utiles et ceux qui sont multiplement diffusés. Cette analyse révèle l'existence d'une gamme de longueurs d'ondes où la lumière pourra pénétrer le plus profondément en raison de la faible extinction des tissus biologiques qui est relié à leur composition. Cette gamme de longueurs d'onde a été baptisée « fenêtre thérapeutique » et se situe approximativement entre 620nm et 1300nm.

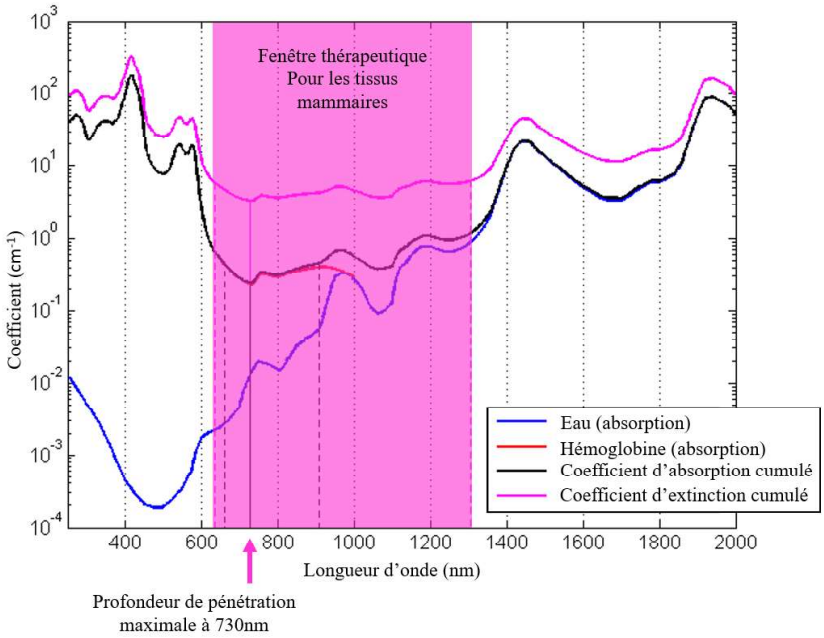

Figure 2.4 : Fenêtre thérapeutique pour les tissus mammaires, courbes adaptées de Wikimedia Commons[7]

Nous allons maintenant évoquer les différentes stratégies qui sont envisageables pour la sélection des photons balistiques. Ces stratégies peuvent se diviser en deux catégories : celles qui reposent sur un principe de sélection spatiale et celles qui reposent sur une sélection temporelle. Dans la première nous retrouvons les principes sous-jacents à des technologies déjà citées comme la microscopie confocale, la microscopie multi-photonique et l'illumination structurée, dans la seconde catégorie nous avons les différentes déclinaisons de la technologie OCT. Nous pouvons répertorier les stratégies correspondantes :

- Stratégie de rejet par sténopé :
  C'est cette stratégie qui est au cœur de la microscopie confocale[8]. En effet, l'utilisation d'un diaphragme de faible diamètre conjugué avec le plan focal de l'objectif permet de sélectionner majoritairement la lumière venant du point conjugué au sténopé. La lumière provenant d'un plan hors du focus du système sera flou (PSF étalée) dans le plan du diaphragme et donc majoritairement à l'extérieur de ce dernier. Pour un point dans le même plan, la lumière sera coupée par le diaphragme, ce qui pose l'obligation de scanner l'échantillon. Certain systèmes utilisent une fente plutôt qu'un diaphragme pour accélérer l'acquisition[9] en imageant une ligne. Cette stratégie contraint à utiliser des objectifs à haute ouverture numérique car le sectionnement optique (résolution axiale) est inversement proportionnel au carré de l'ouverture numérique. Cela rend le système plus sensible aux aberrations induites par l'échantillon. Néanmoins, cette méthode de sélection ne contraint pas la technique d'imagerie, elle peut être utilisée pour de l'imagerie de fluorescence ou de rétrodiffusion, ce qui en fait une solution polyvalente.

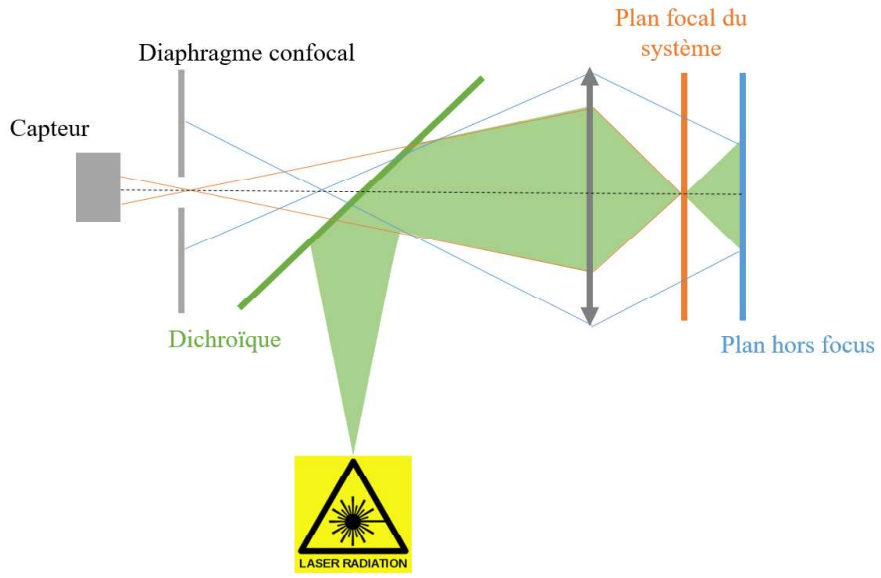

Figure 2.5 : Principe de la microscopie confocale. Une source laser vient exciter des fluorophores dans tout l'échantillon (plan orange et bleu). Les fluorophores excités émettent à la longueur d'onde d'émission qui leur est propre. Cette lumière est capturée par l'optique du système (ici simplifiée par une lentille simple) et imagée sur un capteur. Le miroir dichroïque est transparent à la longueur d'onde d'émission des fluorophores. Le sténopé confocal bloque une grande majorité des photons en provenance des plans hors focus et bloque la totalité des photons émis dans le plan focal à l'exception d'une zone : celle correspondant à l'image conjuguée du diaphragme par le système optique. Le système de balayage pour imager la totalité de l'échantillon n'est pas représenté.

- Stratégie de rejet par illumination structurée :
  Dans le point précédent, l'illumination se faisait point par point et le filtrage (sectionnement) se faisait à la réception. Ici, l'illumination et la réception se font en plein champ alors qu'une modulation spatiale et temporelle de la source lumineuse est induite[10,11]. La modulation spatiale est réalisée à l'aide d'une grille de fréquence spatiale connue et conjuguée avec le plan focal du système, de telle sorte qu'elle ne soit nette que dans ce plan. Par la suite, une modulation de la position de la grille va permettre de reconstruire la totalité de l'image en complétant l'information manquante et en excluant l'information hors du sectionnement non modulée.

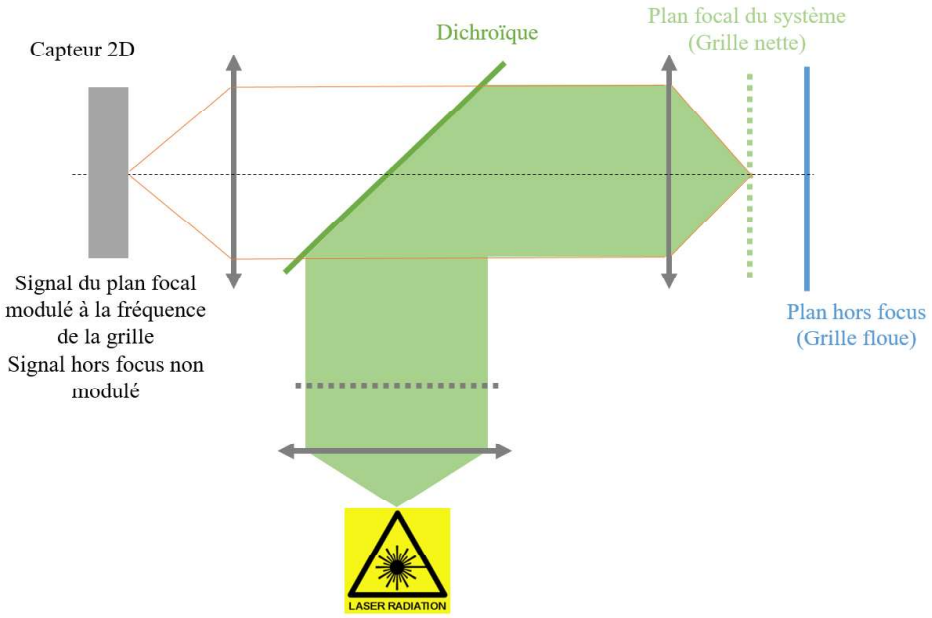

Figure 2.6 : Principe de l'illumination structurée. L'illumination est modulée (grille grise sur l'image) et conjuguée avec le plan focal (grille verte). La fluorescence est excitée dans tout l'échantillon, mais n'est spatialement modulée que dans le plan de sectionnement. La modulation temporelle de la position de la grille permet de reconstruire toute l'image et de rejeter la lumière hors du plan focal (plan en bleu par exemple).

- Effets non-linéaires :

  Les méthodes précédentes excitent de façon globale l'échantillon (en profondeur) puis effectuent une sélection : il y a ainsi une grande partie de lumière inutilement perdue dans l'échantillon dans le cas d'une imagerie de fluorescence, cela peut mener à un photoblanchiment des fluorophores non imagés. Il est cependant possible d'utiliser les propriétés non linéaires de l'excitation à plusieurs photons. Cela consiste à illuminer l'échantillon avec une source laser à une longueur d'onde double (ou plus) de la longueur d'onde d'excitation du fluorophore. Il n'y aura excitation de la fluorescence que s'il y a absorption conjointe de deux (ou plus) photons par le composé sur une période extrêmement courte (de l'ordre du dixième de femtoseconde). Pour que cela soit possible, une grande densité de puissance est donc nécessaire, ce qui contraint la zone excitée. La dépendance de ce phénomène au carré (ou plus) de la densité de puissance restreint fortement l'étendue de cette zone. La microscopie multiphotonique[12,13] a montré une réduction du photoblanchiment en dehors de la zone imagée, une meilleure profondeur de pénétration (jusqu'à 500µm) et permet d'accéder à un certain nombre de contrastes endogènes ; par contre la forte densité de puissance atteinte autour du point focal peut entrainer des problèmes de phototoxicité à prendre en compte[14].

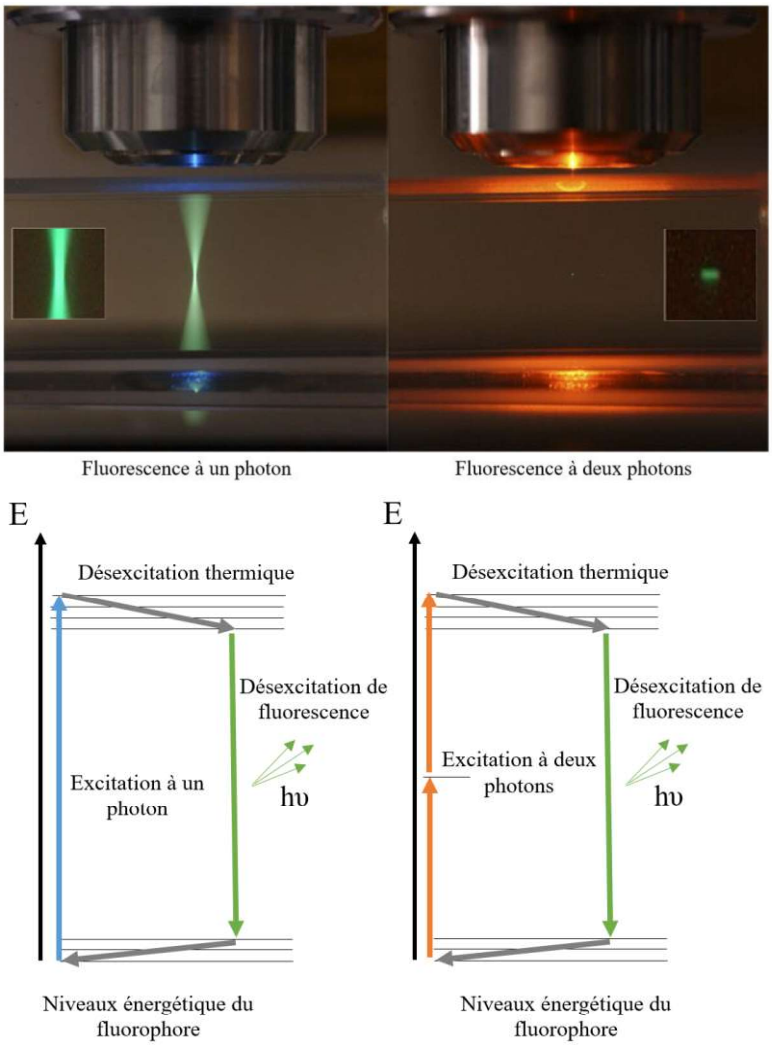

Figure 2.7 : Comparaison de la microscopie à un photon et à deux photons. Les photographies présentent à gauche la colonne lumineuse excitée en fluorescence à un photon alors qu'à droite la zone excitée est restreinte aux fortes densités de puissances. Les graphes montrent le passage d'un fluorophore à un état excité puis sa désexcitation par émission lumineuse respectivement pour une excitation à un photon à gauche et à deux photons à droite. Cette dernière requiert une forte densité de puissance car le temps de vie de l'état intermédiaire est très court. Photographies adaptées de Steve Ruzin[15].

- Stratégies interférométriques :
  La stratégie qui va le plus nous concerner, puisque centrale à l'OCT plein champ, est l'utilisation d'un dispositif interférométrique pour la sélection des photons balistiques. Contrairement aux stratégies précédentes qui se basaient sur un filtrage spatial pour que seuls les photons balistiques atteignent le capteur, ici il s'agira de sélectionner les photons en fonction de leur « temps de vol ». Bien entendu, compte tenu de la célérité de la lumière et des faibles distances en jeu, le temps de réponse du capteur ne peut être à la hauteur. C'est pourquoi nous utilisons les propriétés ondulatoires de la lumière pour obtenir des « temps de vol » relatif entre un signal de référence et un signal venant de l'objet à imager. Nous détaillerons cette stratégie commune aux technologies rattachées à l'OCT dans la partie suivante, en s'appuyant sur le cas particulier de l'OCT plein champ.

Nous avons donc mis en lumière quelques concepts majeurs de l'optique des milieux diffusants qui nous ont permis de dégager certaines conclusions en ce qui concerne l'imagerie des milieux biologiques. Cela nous a conduits également à mettre en lumière deux catégories d'imagerie : l'imagerie des photons multi-diffusés et celle des photons balistiques. A partir de là, nous avons montré différentes stratégies de sélection de ces photons balistiques. Nous allons à présent porter attention plus en détail aux principes de l'OCT plein champ, avec ses concepts physiques sous-jacents et son implémentation expérimentale dans le cadre de cette thèse.

II.3- l'OCT plein champ

L'OCT a souvent été décrit comme étant l'équivalent optique de l'échographie. Dans une certaine mesure cette analogie tient ; il s'agit effectivement de mesurer l'amplitude complexe de l'onde qui a été rétrodiffusée par des structures en profondeur dans un tissu au même titre que l'échographie enregistre l'amplitude du signal acoustique rétrodiffusé. A ce titre, l'OCT plein champ pourrait, de par son acquisition en plein champ, être rapprochée de l'imagerie ultrasonore ultra-rapide[16,17]. Mais si l'on rentre plus en détail dans cette analogie, on peut se rendre compte, comme nous l'évoquions plus haut, que la mesure du « temps de vol » des photons devient complexe. En effet dans les tissus biologiques la lumière parcours 1 µm en 5 femtosecondes et aucun détecteur n'est en mesure d'enregistrer des décalages temporels de cet ordre de grandeur. C'est pourquoi l'OCT[18,19] et – par extension l'OCT plein champ[20,21] – pour sélectionner différents temps de vol, utilisent le principe d'interférométrie en lumière blanche. Nous décrirons ici les principes physiques de l'OCT plein champ puis nous détaillerons les dispositifs utilisées dans le cadre de cette thèse.

II.3.a- Physique de l'OCT plein champ

L'OCT plein champ est basée sur un interféromètre en configuration de Linnik (figure 2.8), il s'agit d'un interféromètre de Michelson dans lequel sont introduits deux objectifs de microscope identiques dans le bras de référence et dans le bras objet. Le miroir du bras de référence est monté sur une céramique piézoélectrique de façon à pouvoir introduire une différence de marche contrôlée de faible amplitude. Nous allons tout d'abord nous intéresser à la façon dont cette configuration permet de réaliser un sectionnement optique dans les tissus.

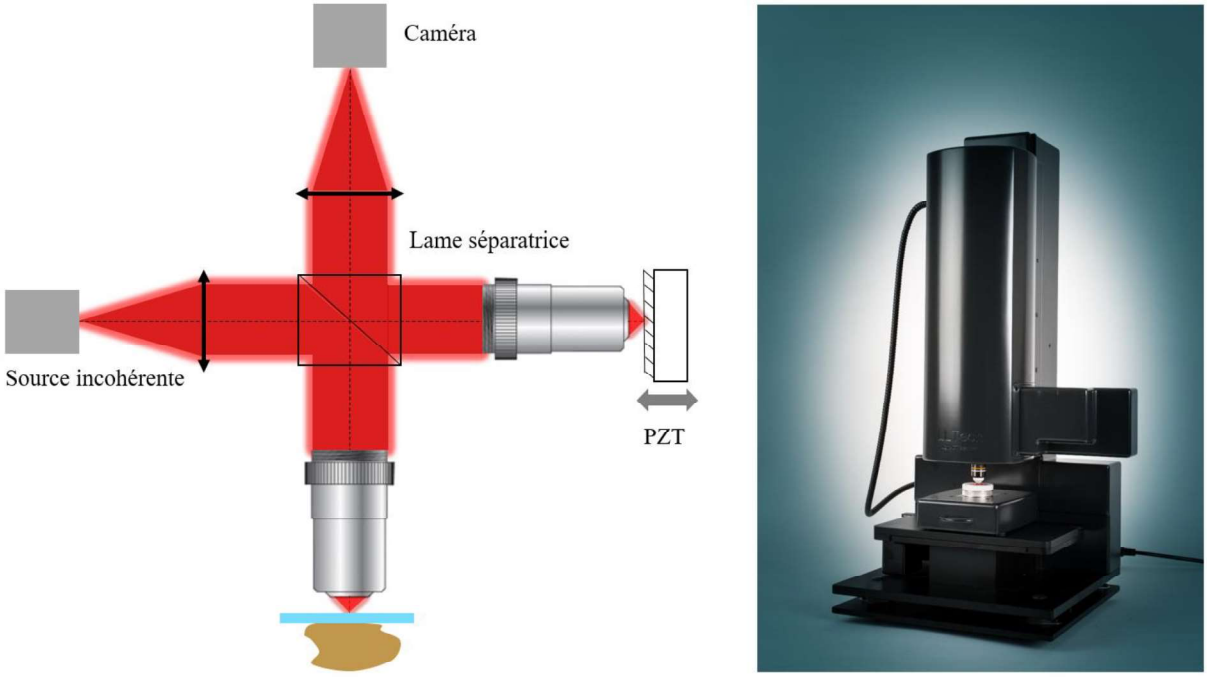

Figure 2.8 : Schéma de l'OCT plein champ et photographie du système d'OCT plein champ Light-CT commercialisé par LLTech.

Les temps d'intégration des détecteurs utilisés sont très grands devant les périodes optiques (de l'ordre de 10^{-3} s contre 10^{-14} s), on se place donc dans un régime d'illumination stationnaire :

$$I(\tau) = < |E_O(t+\tau) + E_R(t)|^2 > \qquad \text{(Eq2.22)}$$

Où E_O est le champ issu du bras objet et E_R issu du bras de référence, τ le décalage temporel entre le bras de référence et le bras objet et $< >$ la moyenne temporelle sur le temps d'intégration du capteur. Soit en développant :

$$I(\tau) = < |E_O(t+\tau)|^2 > + < |E_R(t)|^2 > + 2Re[< E_O(t+\tau).E_R^*(t) >] \qquad \text{(Eq2.23)}$$

Avec *Re* la partie réelle et * le complexe conjugué. Si l'on considère la forme générale du champ dans l'un des bras comme :

$$E = A.e^{i\phi} = A.e^{\frac{2i\pi}{\lambda}\tau.n.c}$$

En considérant A l'amplitude du signal et ϕ la phase on peut écrire l'intensité reçue par le détecteur en prenant soin de sommer les contributions de chaque longueur d'onde :

$$I(\tau) = I_0 + 2a_O a_R \int S(\lambda)\cos(4\pi\frac{\tau.n.c}{\lambda})\, d\lambda \qquad \text{(Eq2.24)}$$

Où I_0 les deux premiers termes de l'équation précédente, a_O et a_R les amplitudes des bras objet et référence supposés indépendants de λ et $S(\lambda)$ la densité spectrale de la source. Nous pouvons reconnaitre l'expression d'une transformée de Fourier :

$$I(\tau) = I_0 + 2a_O a_R.TF[S](\tau)\cos(4\pi\frac{\tau.n.c}{\lambda_0}) \qquad \text{(Eq2.25)}$$

Avec λ_0 la longueur d'onde centrale. En exprimant τ.n.c en différence de marche entre les deux bras δz on a :

$$I(\delta z) = I_0 + 2a_O a_R . TF[S] . \cos(4\pi \frac{\delta z}{\lambda_0}) \qquad \text{(Eq2.26)}$$

Cela nous permet de donner une expression de la longueur de cohérence qui est définie comme la différence de marche correspondant à une amplitude réduite de moitié. Pour une densité spectrale gaussienne :

$$L_c = \frac{2ln2\lambda_0^2}{\pi\Delta\lambda} \qquad \text{(Eq2.27)}$$

Avec $\Delta\lambda$ la largeur à mi-hauteur du spectre. C'est ce paramètre, la longueur de cohérence, qui donne la résolution axiale du système d'OCT plein champ. En effet, au-delà d'une différence de marche supérieure à la longueur de cohérence, les franges correspondant aux différentes longueurs d'ondes du spectre vont se brouiller et le contraste (entre une frange claire et une frange sombre) va fortement chuter.

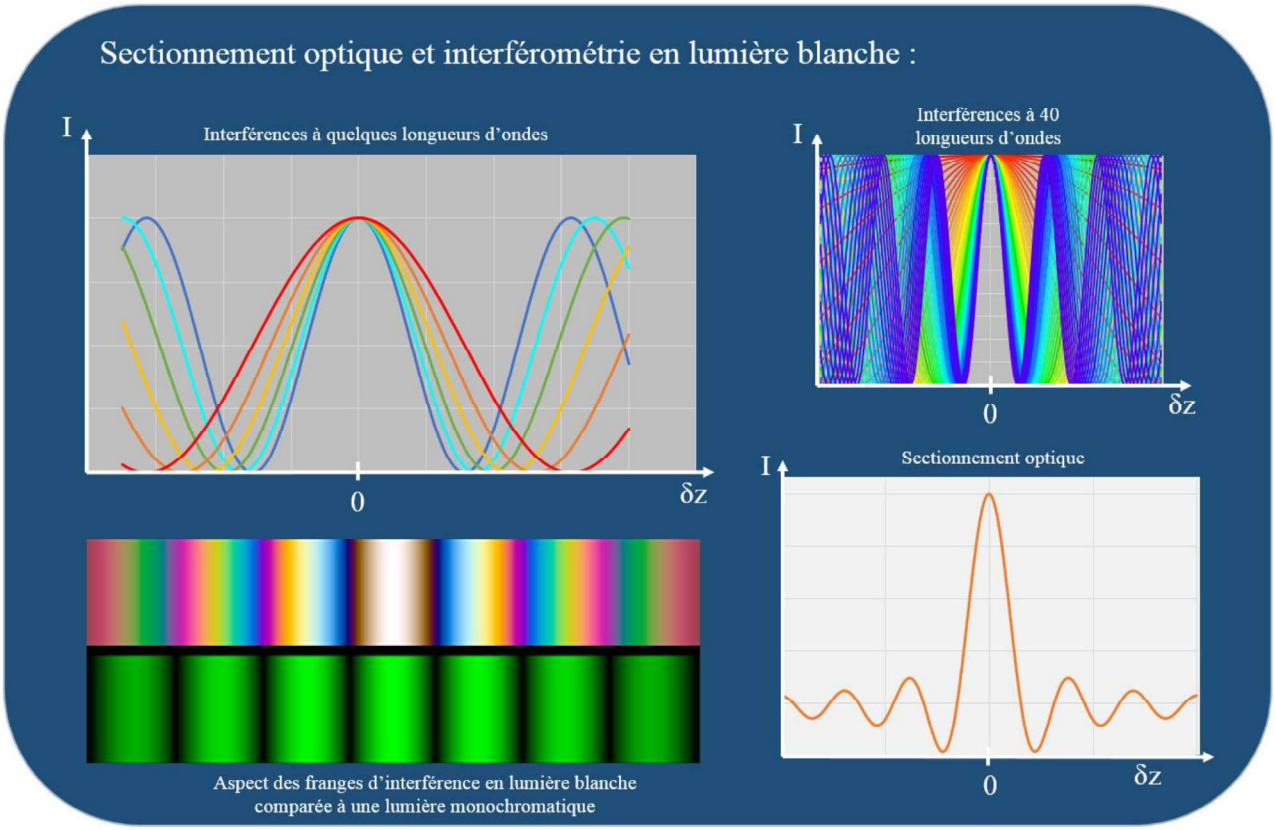

Figure 2.9 : Illustration du sectionnement optique comme somme d'interférogrammes monochromatiques en phase.

Nous avons donc une expression rendant compte de la capacité de sectionnement optique de l'OCT plein champ qui est reliée au spectre de la source. Cependant, l'expression (Eq2.26) nous montre deux paramètres qui se retrouvent impliqués dans le signal mesuré : l'amplitude et la phase du champ. Il convient donc de séparer ces composantes. Pour cela, deux possibilités peuvent être envisagées : la première consiste à enregistrer simultanément de façon directe l'amplitude et la phase du champ, c'est

ce que réalise les techniques holographiques ; la seconde méthode, celle utilisée par l'OCT plein champ, consiste à moduler le paramètre de phase indépendamment du paramètre d'amplitude et de reconstruire le champ d'après une série d'images d'intensité. Plusieurs méthodes de modulation existent, nous n'en détaillerons qu'une ici pour sa simplicité, les autres fonctionnant sur une logique similaire. Voyons maintenant cette méthode de séparation des paramètres d'amplitude et de phase du champ à partir des figures d'intensité (interférogrammes) modulées en phase : la méthode des quatre phases.

Un déplacement axial faible du miroir de référence (faible devant la profondeur de champ de l'objectif) ne crée pas de variation de l'amplitude du signal pour un champ objet statique. Dans le même temps, ce déplacement va induire un changement de phase qui varie linéairement avec ce dernier. Le principe de cette méthode réside dans la prise de quatre images déphasées de π/2 les unes des autres, soit :

$$\begin{cases} I_1 = I_0 + 2a_O a_R . TF[S] . \cos(\Phi_0) & \text{(Eq2.28.1)} \\ I_2 = I_0 + 2a_O a_R . TF[S] . \cos(\Phi_0 + \frac{\pi}{2}) & \text{(Eq2.28.2)} \\ I_3 = I_0 + 2a_O a_R . TF[S] . \cos(\Phi_0 + \pi) & \text{(Eq2.28.3)} \\ I_4 = I_0 + 2a_O a_R . TF[S] . \cos(\Phi_0 + \frac{3\pi}{2}) & \text{(Eq2.28.4)} \end{cases}$$

A partir de ces quatre interférogrammes, nous pouvons découpler amplitude et phase de la manière suivante :

$$I_{amp} = \frac{1}{2}\sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_4 - I_2)^2} \qquad \text{(Eq2.29)}$$

$$I_{phase} = Atan(\frac{I_4 - I_2}{I_1 - I_3}) \qquad \text{(Eq2.30)}$$

Notons que cette méthode n'est valide que pour un champ objet statique, c'est-à-dire avec une variation de phase au cours de l'acquisition très faible devant π/2, c'est-à-dire pour des différences de marche très faibles devant $\lambda_0/8$ (cf. Eq2.26).

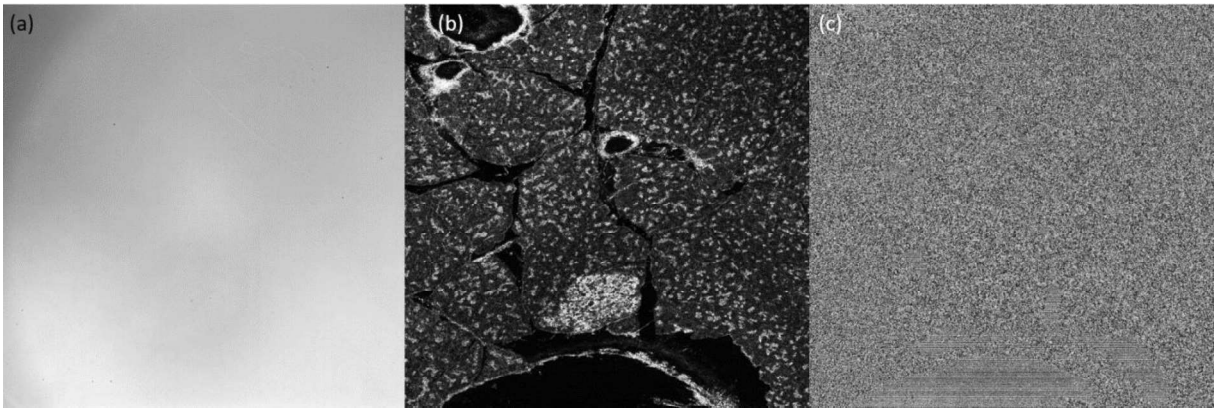

Figure 2.10 : (a) est l'image directe enregistrée sur la caméra contenant l'interférogramme et quasi-saturée (I_0 très important). (b) et (c) sont les images d'amplitude et de phase reconstruites à partir de la méthode des quatre phases. Echantillon de pancréas de rat fixé.

Avant d'entrer dans des considérations instrumentales concernant l'OCT plein champ, voyons d'abord une particularité qui lui est propre. Du fait de l'utilisation d'une source incohérente, l'OCT plein

champ se trouve être quasiment insensible aux aberrations ; nous allons voir quelle est l'origine de cette particularité qui le distingue des technologies sœurs que sont l'OCT en domaine temporel et l'OCT spectral.

Nous pouvons commencer par évoquer une première différence qu'introduit l'usage de sources incohérentes pour l'OCT plein champ, il s'agit de la suppression du phénomène de « crosstalk » qui est un couplage entre pixels adjacents prenant son origine dans les phénomènes de diffusion multiple[22]. Mais au-delà de l'élimination de ce problème, les travaux de Xiao et al.[23,24] ont permis de montrer que ce type de source rend la résolution transverse de l'OCT plein champ quasiment immunisée aux aberrations causées par l'échantillon. En effet, comme le bras de référence est limité par la diffraction, la PSF (fonction de transfert optique ou fonction d'étalement de point) de référence est une tâche d'Airy. Cette PSF de référence va interférer avec la PSF distordue par les aberrations introduites par l'échantillon donnant une PSF effective correspondant au produit scalaire des deux. L'incohérence spatiale de la source permet de n'avoir d'interférence qu'entre deux PSF bien colocalisées, ce qui évite l'interférence entre les bords distordus de la PSF objet et une région voisine du front d'onde de référence (cf : figure 2.11). Ainsi la PSF effective aura un diamètre proche de la tache de diffraction (la PSF la plus fine) et le système ne souffrira pas d'une perte de résolution transverse causé par les aberrations. L'impact des aberrations se fera néanmoins sentir sur l'intensité du signal puisque naturellement, toute l'énergie hors de la zone de recouvrement des PSF sera perdue. Cet effet, pouvant sembler peu intuitif, a été confirmé expérimentalement dans des situations comportant des aberrations extrêmes comme par exemple une aberration piston (ou défocus) de plus de dix fois la profondeur de champ du système.

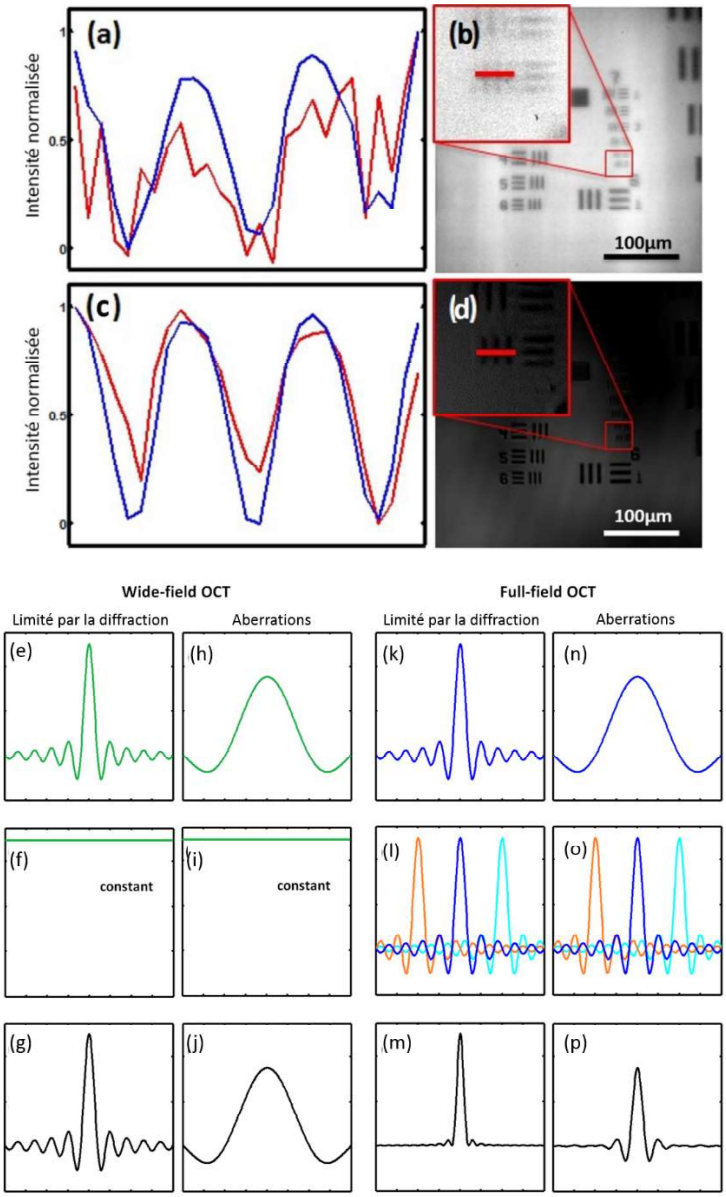

Figure 2.11 : (a) montre le niveau de signal normalisé sur la ligne montrée en (b). (b) est une image de microscopie directe (en réflexion) d'une mire ; elle a été obtenue en bloquant le bras de référence de l'OCT plein champ pour s'en servir en configuration de microscopie classique. Nous voyons dans (b) et (a) l'effet d'un défocus sur l'image. De la même façon (c) montre le signal normalisé sur la même ligne que (a), mais lorsque le bras de référence est utilisé (en configuration d'OCT plein champ donc). (d) montre une suppression de l'aberration piston avec une forte chute du signal. Pour (a), (b), (c) et (d), le rapport de Strehl est de 0,06. Ceci montre expérimentalement l'insensibilité de l'OCT plein champ aux aberrations. Pour une illustration théorique, (e) et (k) montrent une PSF limitée par la diffraction en provenance du bras objet dans le cas d'une source cohérente spatialement (Wide-field OCT) et incohérente (Full-field OCT). En dessous nous avons le signal en provenance du bras de référence qui est constant (miroir plan) dans le cas de (f) et de (l). Néanmoins, le signal constant dans le graphe (l) est la somme des PSF incohérentes entre elles, contrairement à (f) où les PSF sommées sont cohérentes. Cela entraine dans le cas incohérent (g) qui correspond à (e)*(f) où l'on retrouve une PSF limitée par la diffraction ; et (m) qui est l'interférence entre (k) et seulement la partie centrale (bleu) de (l). En effet, (k) ne peut interférer avec la partie orange et cyan de (l) car ils ne sont pas cohérent. On a donc pour (m) une PSF qui est $(k)^2$. Dans le cas où le front d'onde en provenance de l'objet est aberré, comme dans (h) et (n), le même processus se produit. Cela donne (j) dans le cas d'une source cohérente spatialement avec (h)*(i). Dans le cas où la source est incohérente, cela donne (p) qui est l'interférence de (n) avec la partie centrale (bleu) de (o). Il s'en suit naturellement que la surface de recouvrement est d'autant plus faible que l'aberration est importante, résultant en un signal plus faible, mais une largeur caractéristique très proche de celle limitée par la diffraction. Figure adaptée de P. Xiao et al.[23]

Nous avons donc exposé les principes physiques sous-jacents à trois aspects de l'OCT plein champ : La capacité de sectionnement optique dans les tissus diffusants, la méthode d'extraction d'image par la méthode des quatre phases et la quasi-insensibilité aux aberrations de la technique. Nous allons maintenant aborder le versant instrumental et expérimental de l'OCT plein champ.

II.3.b- Dispositif expérimental d'OCT plein champ

Différents systèmes d'OCT plein champ ont été utilisés au cours de cette thèse, ils ont évolués au fil des projets et des exigences expérimentales. Nous détaillerons tout d'abord les composants essentiels des systèmes d'OCT plein champ utilisés avant de voir comment ces composants forment ces systèmes, puis nous présenterons les performances de ces systèmes suivant un mode transversal, permettant une meilleure saisie de l'ensemble des possibilités expérimentales ouvertes durant cette thèse.

Nous avons déjà présenté superficiellement la conception instrumentale de l'OCT plein champ dans la sous-section précédente (II.3.a), il ne sera donc pas nécessaire de rappeler que le cœur d'un tel système repose sur un interféromètre en configuration de Linnik (cf : figure 2.8). Cet interféromètre s'articule autour de peu d'éléments :

- La source lumineuse :
  La source, comme nous l'avons vu, doit être incohérente et fixera par son étendue spectrale la résolution axiale du système. Notons tout de même qu'une coupe plus fine signifie également un nombre plus restreint de diffuseurs dans le volume de cohérence, ce qui entraine une diminution du signal utile sur la caméra en rapport du fond. Plusieurs sources ont été utilisées ; la plus étendue spectralement étant une source halogène fibrée Schott KL 1500 compact suivie par deux filtres colorés fixant les bornes du spectre entre 610-1000 nm. Nous avons également utilisé plusieurs LEDs (Diode ElectroLuminescente) de la gamme Thorlabs dont la longueur d'onde centrale va de 420 nm à 850 nm avec des largeurs spectrales variant de 100 nm pour la plus grande (largeur à mi-hauteur de la LED lime M565L3) à 15 nm pour la plus fine (largeur à mi-hauteur de la LED violet M420L3). Ces sources présentent de nombreux avantages :
  - Disponibilité : ces sources sont aujourd'hui des composants courants en optique de par leur utilisation extrêmes large, autant dans les applications industrielles, militaires ou grand public.
  - Prix : pour des raisons très similaires ces sources représentent un faible coût comparées aux sources utilisées dans les autres systèmes de la famille OCT comme les diodes superluminescentes, les lasers femtoseconde et sources laser à balayage spectral.
  - Largeur spectrale : Comme énoncé plus haut, les largeurs spectrales de telles sources permettent d'atteindre des coupes allant de 0,7 µm à 6 µm, ce qui correspond à l'ordre de grandeur des coupes histologiques (4 µm).
  - Fiabilité : De manière générale les sources LED ou thermiques sont très fiables. Les sources LED bénéficient d'une durée de vie très étendues et d'une faible consommation. Les sources thermiques quant à elles peuvent être assez limitées dans leur temps de vie, mais sont facilement remplaçables à faible coût.

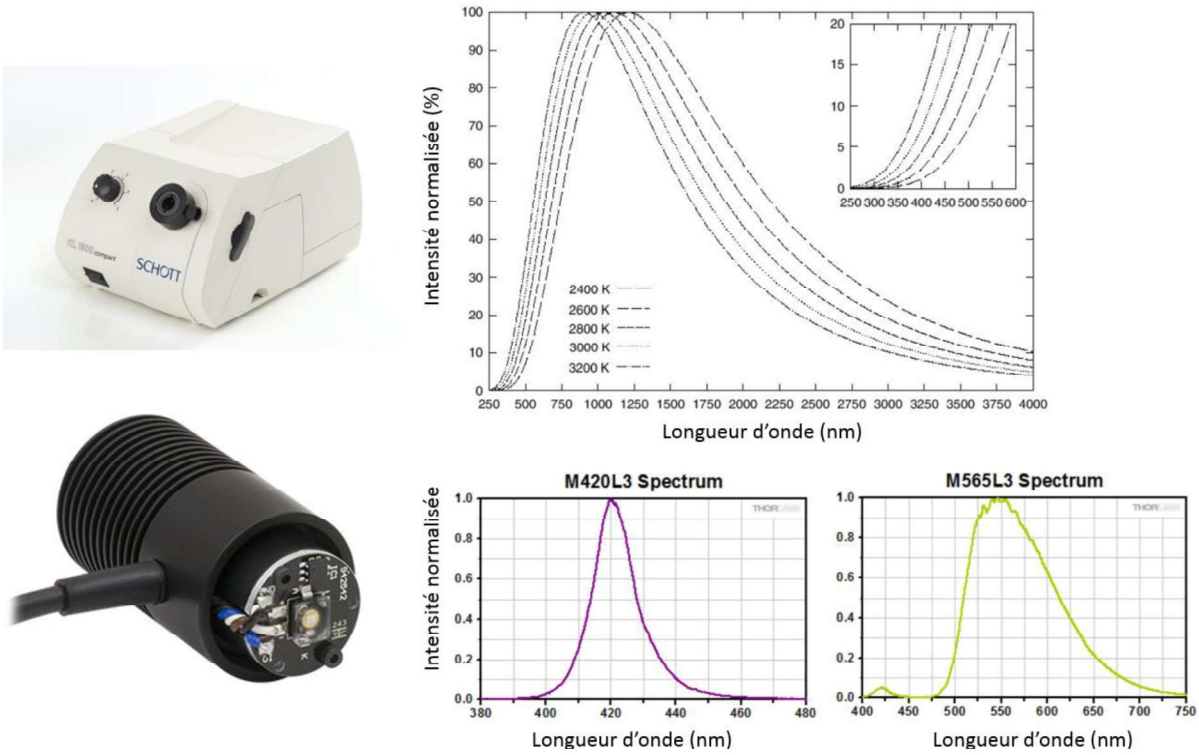

Figure 2.12 : Quelques sources lumineuses utilisées et leurs spectres normalisés associés. En haut la source halogène Schott KL1500, en bas LED Thorlabs avec deux spectres (le plus fin et le plus large utilisés). Figure adaptée du site des constructeurs.

- La séparatrice :

  Cet élément permet une séparation du front d'onde en provenance de la source en deux fronts d'ondes à destination de l'échantillon et du miroir de référence. Dans un second temps il permet une recombinaison des fronts d'onde en provenance de l'échantillon d'une part et de la référence d'autre part et à destination de la caméra. Un simple bilan photométrique nous indique que pour une lame séparatrice de réflectivité R (R ∈ [0 ; 0,5]) l'intensité maximale que l'on peut espérer (en ignorant les pertes) pour une réflexion totale dans les deux bras est:

$$I_{sortie} = 2I_{entrée}.R.(1-R) \quad \text{(Eq2.31)}$$

  Ce qui dirige notre choix vers une séparatrice de réflectivité 0,5 pour optimiser le flux et donc le signal. Nous avons également choisi un modèle sous forme de cube pour une plus grande robustesse, notamment aux vibrations qui introduiraient des perturbations importantes sur l'interférogramme, mais aussi en termes de maintenance car une lame est plus susceptible de rompre lors d'un déplacement du système par des services externes pouvant faire preuve de peu de précautions.

- Les objectifs :

  Dans le bras d'imagerie, ou bras objet, le rôle de l'objectif est strictement le même qu'un objectif de microscope classique. Dans le bras de référence en revanche, son rôle est d'introduire les mêmes perturbations du front d'onde qu'introduit l'objectif du bras objet ; ainsi il y a compensation du chemin optique et de la dispersion. La sélection des objectifs repose sur l'ouverture numérique principalement, qui déterminera la résolution transverse du système mais aussi sur le couplage optique (air ou immersion). La résolution du système peut être évaluée à l'aide du critère de séparation de Rayleigh fixant une valeur de résolution du système :

  $$\text{Critère de Rayleigh : } \phi = \frac{1{,}22\lambda_0}{2Na} \qquad \text{(Eq2.32)}$$

  Avec λ_0 la longueur d'onde centrale et Na l'ouverture numérique. Nous avons principalement travaillé avec des objectifs Olympus 10x à immersion dans l'eau d'ouverture numérique 0,3 qui nous permettent une résolution transverse de 1,2 µm (pour une longueur d'onde centrale de 600 nm) ; mais nous avons également eu l'opportunité d'utiliser des objectifs 40x à immersion dans l'eau ouvert à 0,8 ce qui permet d'atteindre une résolution transverse de 0,5 µm et 30x à immersion dans l'huile silicone ouvert à 1,05 permettant une résolution proche de 0,3 µm (pour une longueur d'onde centrale de 600 nm). Le couplage optique est effectué par une huile silicone (indice 1,4) dans le premier cas (objectif 10x) ce qui permet de réduire la rupture d'indice entre l'air et la fenêtre de silice couvrant l'échantillon (voir ci-dessous) et ainsi diminuer la réflexion spéculaire sur celle-ci sans introduire de distorsion du front d'onde. Dans le deuxième cas, la faible distance de travail de l'objectif ne permet pas d'utiliser de lames couvre-objet et nous conduit à utiliser un milieu d'immersion aqueux.

- Le porte échantillon :

  Le porte échantillon répond à un certain nombre de contraintes liées à la nature des échantillons et au système. Il permet avant tout de conserver l'échantillon dans une chambre isolée du milieu extérieur, pouvant contenir au besoin un milieu liquide permettant une bonne conservation du tissu (pour éviter la déshydratation, le gonflement suite à un choc osmotique ou autre). Cette isolation se fait à l'aide d'une chambre d'imagerie cylindrique en acier inoxydable à hauteur réglable par un piston ; le haut de cette chambre est scellé par une fenêtre en silice de 1 mm d'épaisseur fixé au corps du porte échantillon par une bague plastique. Cette chambre d'imagerie permet de satisfaire plusieurs critères :

  - Le volume utile de 28mm de diamètre par 10mm de hauteur maximale permet de contenir une grande variété d'échantillon.
  - Comme nous l'avons déjà signalé, la chambre d'imagerie permet une isolation du milieu extérieur et une rétention des substances liquides.
  - Le modèle est compatible avec les procédures de décontamination standards.
  - La hauteur réglable permet une adaptation à l'épaisseur de l'échantillon ; en pressant légèrement ce dernier contre la fenêtre en silice la contrainte mécanique vient aplanir les irrégularités de surface et ainsi faciliter l'examen de l'échantillon (réduit les ruptures d'indice et l'introduction d'aberrations).

- La fenêtre en silice permet une bonne tenue à la contrainte mécanique évoquée précédemment par son épaisseur de 1 mm, et par sa faible différence d'indice (n=1,45) permet de minimiser la rupture d'indice entre l'huile d'immersion et l'échantillon. Il est à noter que la silice présente une absorption marginale sur l'ensemble du spectre utilisé.

Figure 2.13 : De gauche à droite : schéma en coupe du porte-échantillon où l'on peut voir le piston, l'échantillon en rouge et la fenêtre en blanc. Puis : photo du porte échantillon hors du système avec la bague de maintien de la fenêtre en plastique blanc. Vient ensuite une photo du porte-échantillon dans le système Light-CT (OCT plein champ LLTech) et finalement à l'extrême droite l'huile silicone faisant le contact optique et une fenêtre en silice isolant l'échantillon du reste du milieu. Figure adaptée de F.Harms[25].

- Le bras de référence :
  Comme nous l'avons énoncé précédemment, le bras de référence se compose d'un objectif de microscope identique à celui utilisé pour le bras d'imagerie, avec pour les mêmes raisons l'huile silicone d'immersion ainsi qu'une fenêtre en silice de 1 mm pour compenser celle présente dans le bras objet et enfin un miroir monté sur une céramique piézoélectrique. Le miroir est une surface de silicium permettant une réflectivité de 17,5%. Ce choix ne correspond pas à l'optimum menant à un équilibre en termes d'amplitude entre le bras d'imagerie et le bras de référence (nous comptons suivant l'échantillon une réflectivité de quelques %), mais a été choisi pour des considérations industrielles que nous ne détaillerons pas ici.

- Lentille tube :
  Cette optique permet de focaliser le faisceau parallèle en sortie du cube séparateur (en provenance des objectifs de chaque bras) sur le détecteur. La lentille tube permet en outre, combinée avec le modèle d'objectif choisi, de fixer le grandissement du système. Dans les systèmes utilisés c'est un doublet achromatique de focale 250mm qui fait office de lentille tube. Cette focale a été choisie en lien avec les pixels du détecteur et les objectifs de façon à respecter le critère de Shannon.

- Détecteur :
  Deux détecteurs ont été utilisés pour ces travaux de thèse, le premier étant une caméra commerciale Photon focus MV-D1024-160 dont les caractéristiques se rapprochaient le plus des besoins de l'OCT plein champ bien que non optimale. Le second capteur a été conçu spécialement pour notre application dans le cadre du projet Européen FP7 CAReIOCA. Le

détecteur est un élément critique du système ; il va, par ses caractéristiques, fixer des valeurs de performances clefs pour la totalité du dispositif (ces performances seront détaillées plus loin dans cette partie). Tout d'abord la taille du capteur, définie par le nombre de pixels et leur taille, va délimiter le champ imagé par le système dans les limites de l'objectif (au-delà d'un certain écart par rapport à l'axe optique, les objectifs ne sont plus corrigés). Ce nombre de pixels va donc permettre de profiter pleinement de l'acquisition plein champ du système et ainsi minimisera le nombre de champs à capturer pour scanner un échantillon. La seconde caractéristique essentielle du détecteur est sa fréquence d'acquisition maximale, celle-ci sera aussi déterminante pour deux raisons : pour accélérer la capture d'un échantillon (ce que permet aussi l'augmentation de la taille du capteur), mais aussi pour suivre des déplacements ou des dynamiques rapides (ce point sera développé au chapitre III). Pour finir, la profondeur de puit du capteur (Full Well Capacity) va impacter la sensibilité (cf. performances) et par conséquence la qualité de l'image au même titre que le bruit du capteur (détaillé au chapitre IV). Les caractéristiques des capteurs utilisés peuvent être comparées dans le tableau ci-dessous :

	Photon Focus MV-D1024-160	Adimec - CARelOCA
Technologie	CMOS	CMOS
Fréquence d'acquisition	138Hz	750Hz
Taille (diagonale)	15.42 mm	24.44 mm
Taille de capteur	1024x1024	1440x1440
Taille de pixel (diagonale)	15µm	16µm
Profondeur de puit (FWC)	200 ke^-	2Me^-
Rendement quantique	>45%	>45%
Mode de lecture	Global shutter	Global shutter

Soit un gain de vitesse pour une qualité d'image équivalente d'un facteur 42 entre la première caméra et la seconde.

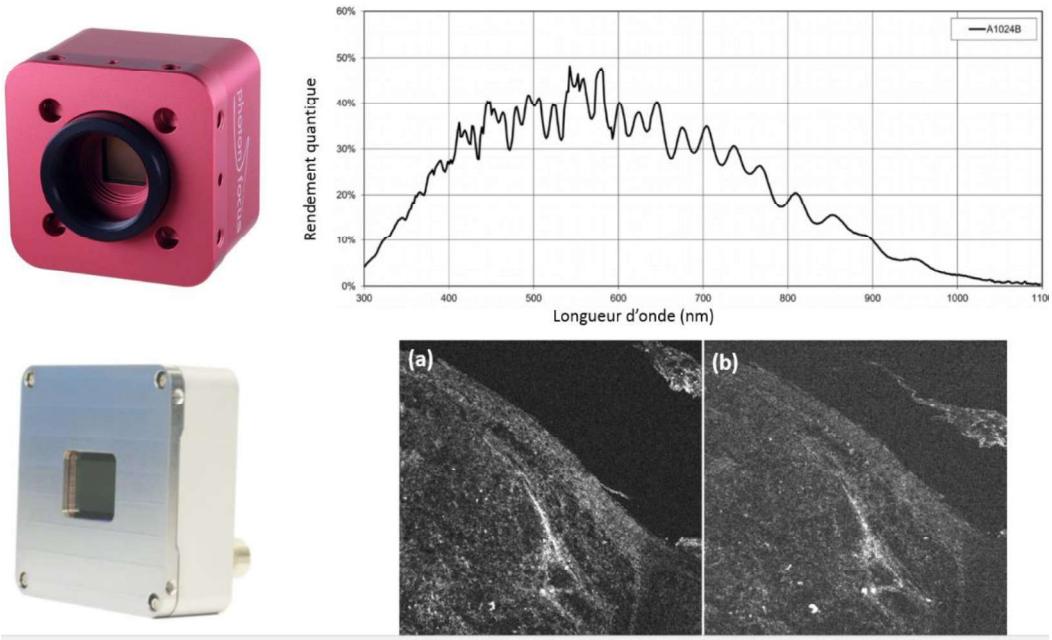

Figure 2.14 : Capteurs utilisés dans ces travaux de thèse. En haut : caméra Photonfocus A1024B et spectre de réponse du capteur correspondant. En bas : caméra issue du projet CAReIOCA et comparaison d'un même champ avec le même nombre d'accumulations pour la caméra optimisée (a) et pour la caméra photonfocus (b). Figure adaptée du site des constructeurs et de F.Harms[25].

Maintenant que nous avons détaillé les éléments constitutifs d'un système d'OCT plein champ, intéressons-nous aux performances d'un tel système.

- Résolution :
  Comme nous l'avons vu, la résolution du système s'évalue sur deux composantes indépendantes que sont la résolution axiale (ou sectionnement optique) et la résolution transverse. Pour la première nous renvoyons à l'équation (Eq2.27). Pour les sources utilisées cette résolution axiale se situe entre 6 µm et 0,5 µm (cf : La source lumineuse). Pour la résolution transverse, comme nous l'avons présenté (cf : Les objectifs), l'ouverture numérique des objectifs de microscope fixe la limite de diffraction pour une source donnée (Eq2.32). Cela nous conduit à des résolutions transverses allant de 0,3 µm à 1,2 µm.

- Sensibilité :
  La sensibilité peut être définie comme la plus faible amplitude rétrodiffusée mesurable par le système. Cela peut se traduire par la limite où le signal est au niveau du bruit, c'est-à-dire la limite où le rapport signal à bruit (SNR) est unitaire. De (Eq2.29) et de (Eq2.28.1 à Eq2.28.4) on a un signal qui peut s'écrire :

$$Signal = 4|a_O a_R . TF[S]| \qquad \text{(Eq2.33)}$$

  Si l'on exprime l'amplitude rétrodiffusée en fonction du nombre de photons générés par la source par unité de temps E^-_0, de la réflectivité du miroir de référence R_r et de la « réflectivité » équivalente de l'objet dans le volume de cohérence R_{obj} on a :

$$\frac{E^-_0}{2} R_{obj} = 2{a_O}^2 TF[S]^2 \text{ (Eq2.34.1)}$$

$$\frac{E_0^-}{2} R_r = 2{a_R}^2 \quad \text{(Eq2.34.2)}$$

$$Signal = E_0^- \sqrt{R_{obj} R_r} \quad \text{(Eq2.35)}$$

Prenons le temps d'expliquer (Eq2.34.1) et (Eq2.34.2). L'intensité incidente sur l'échantillon est $I_{inc} = E^-_0/2$ photons par unité de temps (par image) car le faisceau en provenance de la source a été séparé par le cube séparateur (50/50). Une fraction de cette intensité est alors rétrodiffusée par la section d'intérêt de l'échantillon de façon balistique et constitue un signal qui, une fois divisé par deux une fois de plus par la séparatrice, sera égal au signal exprimé par (Eq2.33). Il en est de même pour (Eq2.34.2).

Exprimons maintenant le bruit :

$$Bruit = \sqrt{\sigma_{ph}^2 + \sigma_{th}^2 + \sigma_e^2} \qquad \text{(Eq2.36)}$$

Avec :

$$Bruit\ de\ photon\ \sigma_{ph}^2 = \frac{E_0^-}{4}(R_{obj} + R_r) \qquad \text{(Eq2.37.1)}$$

$$Bruit\ thermique\ \sigma_{th}^2 = \frac{2k_B T}{\tau . R_c} \qquad \text{(Eq2.37.2)}$$

Et σ_e^2 le bruit électronique du détecteur qui est donné par le constructeur du capteur sous le terme « bruit de lecture ». On notera pour le bruit thermique : k_B la constante de Boltzmann, T la température en K, τ le temps d'acquisition et R_c la résistance de charge équivalente du détecteur.

En considérant deux conditions :

$$C1 :\ R_r \gg R_{obj}$$

$$C2 :\ \sigma_{ph}^2 \gg \sigma_{th}^2 + \sigma_e^2$$

Qui sont en pratique vérifiées pour un miroir en silicium, des échantillons biologiques standards et un détecteur comme ceux décrits précédemment fonctionnant proche de la saturation. On peut exprimer le SNR avec C1 et C2 :

$$\frac{Signal}{Bruit} = \frac{E_0^- \sqrt{R_{obj} R_r}}{\sqrt{\frac{E_0^-}{4}(R_{obj} + R_r)}} \sim 2\frac{E_0^- \sqrt{R_{obj} R_r}}{\sqrt{E_0^- R_r}} = 2\sqrt{E_0^- R_{obj}}$$

Or avec C1 on a :

$$E_{sat}^- \sim \frac{E_0^- R_r}{4} \qquad \text{(Eq2.38)}$$

Ce qui, pour un SNR unitaire, sous réserve de C1 et C2 donne :

$$2\sqrt{E_0^- R_{obj}} = 1$$

$$avec\ (Eq2.38) :\ 4\sqrt{E_{sat}^{-}\frac{R_{obj}}{R_r}} = 1$$

$$R_{obj}(\min) = \frac{R_r}{16E_{sat}^{-}} \quad \text{(Eq2.39)}$$

Ce qui donne pour les valeurs typiques de saturation, de FWC et de réflectivité du miroir de référence : $R_{obj}(\min) = 6.10^{-9}$

- Profondeur d'imagerie :
  La profondeur d'imagerie maximale est définie comme la profondeur limite pour laquelle le SNR est unitaire. La profondeur d'imagerie est donc directement liée à la sensibilité du système et au libre parcours moyen d'extinction de l'échantillon concerné. On ne peut que donner une gamme typique de profondeur maximale d'imagerie, sachant que l'on peut augmenter la sensibilité artificiellement en moyennant plusieurs acquisitions du même plan de l'échantillon. Nous pouvons situer cette gamme autour de 200 µm à 500 µm, mais pour des tissus transparents comme la cornée, ces valeurs peuvent atteindre plusieurs millimètres.

- Vitesse d'acquisition :
  La vitesse d'acquisition repose sur deux contraintes : la première est la vitesse d'acquisition d'un champ unitaire, la seconde repose sur le temps de transition d'un champ à un autre. La vitesse d'acquisition d'un champ unitaire est lié à la fréquence d'acquisition f_{acq} et au nombre d'accumulations d'images N_{acc} auxquels il faut ajouter un temps de traitement T_{proc} :

$$Pour\ la\ méthode\ des\ 4\ phases :\ T_{acq} = \frac{4N_{acc}}{f_{acq}} + T_{proc} \qquad \text{(Eq2.40)}$$

  La fréquence d'acquisition sera limitée par la fréquence la plus faible entre celle de la caméra et celle de la céramique piézoélectrique. Pour le temps de transition d'un champ à l'autre il faut compter la vitesse de déplacement de la platine, le temps d'attente une fois l'objectif atteint pour la stabilisation mécanique et enfin le recouvrement avec les zones déjà imagées. Le premier paramètre qu'est la vitesse de déplacement est évident, pour le second nous rappelons ce que nous avions énoncé lors de l'explication de la méthode des 4 phases (II.3.a) : la phase doit rester stable (différence de marche faible devant $\lambda_0/8$) entre chaque acquisition pour que l'on puisse reconstruire correctement l'amplitude et/ou la phase. Ainsi les vibrations engendrées par le déplacement de la platine doivent passer sous ce seuil avant de pouvoir recommencer une nouvelle acquisition. Pour le troisième paramètre, il faut bien avoir à l'esprit que le fait de capturer une grande surface à travers une collection de petits champs implique nécessairement de devoir les recombiner *a posteriori* à l'aide d'une procédure de mozaïquage (Stitching en anglais). Pour ce type de procédure il est préférable, compte tenu de l'imprécision du déplacement, d'avoir un recouvrement non nul entre chaque champ, ce qui impose un temps supplémentaire proportionnel à cette redondance. Pour le cas de nos systèmes la vitesse d'acquisition se situe autour de 1cm/min avec un recouvrement de 10% sur chaque axe, un temps d'attente de 50 ms entre chaque acquisition, 10 accumulations d'images et à une fréquence d'acquisition limitée par la céramique piézoélectrique à 300Hz (pour une oscillation en créneaux suivant le schéma des 4 phases).

Les différentes parties du système d'OCT plein champ ont été décrites, permettant ainsi une évaluation de l'importance de chaque élément pour la capture des images, et nous avons montré les performances et limites d'un tel système. Nous allons maintenant condenser la somme d'informations présentes dans ce chapitre sous une forme plus épurée avant de passer au développement d'un mode d'imagerie alternatif basé sur cette même technologie : la tomographie optique plein champ dynamique.

II.4- Conclusion

Ce chapitre s'est ouvert sur une description de la propagation des ondes lumineuses en milieu complexe. Nous y avons vu quelques concepts généraux permettant cette description avant d'aboutir à une expression analytique générale. Cette expression s'est révélée utile pour dégager des comportements de diffusion dans des cas particuliers (diffusion de Rayleigh ou de Mie), mais elle n'était pas soluble analytiquement en dehors de ces cas. Nous avons pu par la suite montrer une décomposition de l'intensité diffuse en trois composantes : une composante balistique, une composante multi-diffusée et une dernière correspondant à une figure de tavelure (speckle). Cette décomposition a permis de mettre en évidence deux types d'imagerie des milieux diffusants : celles reposant sur l'imagerie des photons balistiques et celle reposant sur l'imagerie des photons multiplement diffusés. Se concentrant sur la première catégorie, nous avons montré quelques applications pour l'imagerie des propriétés remarquables des milieux diffusants comme l'avantage d'un système en réflexion ou encore l'existence d'une gamme de longueur d'onde permettant une meilleure pénétration (fenêtre thérapeutique). Après avoir présenté plusieurs stratégies de sélection des photons balistiques, nous nous sommes concentrés sur la méthode de sélection par interférométrie, méthode centrale à l'OCT plein champ. Nous avons alors décrit les principes physiques permettant le sectionnement optique dans les tissus biologiques, une méthode de reconstruction du champ à partir de mesures d'intensité et une propriété remarquable de l'éclairage incohérent sur l'OCT plein champ : la quasi-insensibilité de la résolution aux aberrations présentes dans le bras d'imagerie. Nous avons alors pris le temps de décomposer le système d'OCT plein champ pour analyser l'impact et le rôle de chaque élément avant de s'intéresser aux performances globales du système. Nous avons maintenant, à travers la description physique des milieux diffusants et du système d'imagerie, une bonne compréhension du processus d'imagerie menant aux résultats énoncés au chapitre I. Rappelons que l'objectif est de proposer un mode d'imagerie alternatif à l'OCT plein champ pour augmenter les scores de détections de pathologies dans un contexte peropératoire. De ce chapitre nous pouvons voir que le type de contraste extrait de l'échantillon est de type structurel et statique, reposant sur les propriétés locales de rétrodiffusion de la lumière. Nous avions terminé le chapitre I sur une argumentation plaidant pour une orientation vers un contraste dynamique complémentaire à l'OCT plein champ. Le chapitre III présentera cette nouvelle modalité.

Bibliographie du chapitre II :

1. Waves and Imaging through Complex Media | P. Sebbah | Springer.
2. D. A. Boas et al., "Imaging the body with diffuse optical tomography" IEEE Signal Process. Mag. **18**(6), 57–75 (2001)
3. R.J. Cooper, "Bioimaging: Watching the brain at work : Nature Photonics : Nature Research" (2014)
4. L. V. Wang and S. Hu, "Photoacoustic Tomography: In Vivo Imaging from Organelles to Organs" Science **335**(6075), 1458–1462 (2012)
5. M. Lesaffre et al., "Acousto-optical coherence tomography using random phase jumps on ultrasound and light" Opt. Express **17**(20), 18211–18218 (2009)
6. E. B. a la Guillaume et al., "Acousto-optical coherence tomography with a digital holographic detection scheme" Opt. Lett. **37**(15), 3216–3218 (2012)
7. Zhun310, English: Spectra for breast tissue (StO2 ≈ 70%) (2009).
8. M. Minsky, "Microscopy apparatus," US3013467 A (1961).
9. P. J. Dwyer, C. A. DiMarzio, and M. Rajadhyaksha, "Confocal theta line-scanning microscope for imaging human tissues," Appl. Opt. **46**(10), 1843–1851 (2007)
10. M. a. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope" Opt. Lett. **22**(24), 1905–1907 (1997)
11. M. Saxena, G. Eluru, and S. S. Gorthi, "Structured illumination microscopy," Adv. Opt. Photonics **7**(2), 241–275 (2015)
12. A. Diaspro, Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications and Advances (2001).
13. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy," Science **248**(4951), 73–76 (1990).
14. K. König, "Multiphoton microscopy in life sciences" J. Microsc. **200**(2), 83–104 (2000)
15. "Two-Photon fluorescence microscopy," (http://microscopy.berkeley.edu/courses/TLM/2P/index.html)
16. J. Provost et al., "3D ultrafast ultrasound imaging in vivo," Phys. Med. Biol. **59**(19), L1 (2014)
17. M. Tanter and M. Fink, "Ultrafast imaging in biomedical ultrasound," IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control **61**(1), 102–119 (2014)
18. W. Drexler and J. G. Fujimoto, Optical Coherence Tomography: Technology and Applications, Springer Science & Business Media (2008).
19. D. Huang et al., "Optical Coherence Tomography," Science **254**(5035), 1178–1181 (1991).
20. A. Dubois et al., "High-Resolution Full-Field Optical Coherence Tomography with a Linnik Microscope," Appl. Opt. **41**(4), 805 (2002)
21. O. Thouvenin et al., "En face coherence microscopy [Invited]," Biomed. Opt. Express **8**(2), 622–639 (2017)
22. B. Karamata et al., "Spatially incoherent illumination as a mechanism for cross-talk suppression in wide-field optical coherence tomography," Opt. Lett. **29**(7), 736–738 (2004)
23. P. Xiao, M. Fink, and A. C. Boccara, "Full-field spatially incoherent illumination interferometry: a spatial resolution almost insensitive to aberrations," Opt. Lett. **41**(17), 3920–3923 (2016)
24. P. Xiao, M. Fink, and A. C. Boccara, "Adaptive optics full-field optical coherence tomography," J. Biomed. Opt. **21**(12), 121505–121505 (2016)
25. F. Harms, Imagerie des tissus à haute résolution en profondeur par tomographie de cohérence optique plein champ : approches instrumentales et multimodales pour l'application au diagnostic per-opératoire du cancer, Paris 6 (2015).

Chapitre III : Tomographie optique plein champ dynamique - modèles et mesures -

"Il moto è causa d'ogni vita"

"Le mouvement est principe de toute vie"

Leonardo Da Vinci, in Codice Trivulziano, 36

III.1- Introduction……49
III.2- Origine de la technologie……50
III.3- Mesure dynamique par OCT plein champ……51
III.3.a- Problèmes de reconstruction et processus dynamiques……..51
III.3.b- Fluctuation du signal induite par un diffuseur unique en déplacement……..53
III.3.c- De la cellule à la caméra : lien entre biologie et signal mesuré……..58
III.4- Métriques associées à la mesure dynamique……63
III.5- Conclusion et perspectives……..…71

III.1- Introduction

Cette citation introductive résume à elle seule le cœur de l'approche dynamique appliquée à l'OCT plein champ. L'*Anima* – le principe de vie en latin, est à la racine du mot « animer », utilisé aujourd'hui au sens de mettre en mouvement – signifiait à l'origine souffle avec un sens de processus dynamique de respiration tel qu'on le retrouve dans le concept grec de pneuma ou dans le terme sanskrit Prāṇa**.** Nous aurons l'occasion de nous attarder sur les heureuses coïncidences entre ces considérations étymologiques et les corrélats biologiques de l'OCT plein champ dynamique (IV.3). Mais au-delà des correspondances qu'une telle approche permet, la métaphore de « la vie comme mouvement » donne une vision simple de l'objectif de l'imagerie dynamique :

Si les processus vitaux ont pour conséquence directe une mise en mouvement d'éléments observables (quelle qu'en soit l'échelle), alors l'observation de tels éléments et de leur mouvement en particulier nous renseigne directement sur les processus vitaux à l'œuvre.

L'idée d'introduire le facteur temps dans la mesure pour suivre l'évolution d'un phénomène est bien sûr chose courante, néanmoins, l'analyse de séries temporelles de mesures pour la déduction de propriétés métaboliques locales (III.4 et III.3.c) est, à notre connaissance, peu répandue (III.2).

Dans ce chapitre nous proposons une description de la méthode de tomographie optique plein champ dynamique développée au cours de ces travaux de thèse (que nous serons amenés à appeler de façon indifférenciée : OCT plein champ dynamique, DFFOCT, imagerie métabolique ou simplement imagerie dynamique). En commençant par un rapide tour d'horizon des techniques qui ont inspiré cette approche, nous continuerons avec une exposition des phénomènes en jeu lors de la mesure dynamique puis nous en montrerons quels procédés d'analyse mènent à la mesure DFFOCT.

III.2- Origine de la technologie

Le développement de l'OCT plein champ dynamique a été inspiré par différentes sources. Tout d'abord, nous ne pouvons que remarquer naïvement l'extraordinaire enchevêtrement de structures et de dynamiques présentes du plus simple organisme aux plus complexes, ne serait-ce qu'au niveau d'une cellule[1]. Comme nous l'évoquions plus haut, ces mouvements de structures sont fortement liées à la vie de l'organisme, et sont un important marqueur de santé[2]. Pour explorer ces dynamiques, plusieurs méthodes ont été proposées, comme la spectroscopie à corrélation de fluorescence (FCS)[3,4]. Cette méthode enregistre les fluctuations d'intensité en provenance de structures mobiles fluorescentes. Des modèles basés sur le calcul d'autocorrélations sont ensuite utilisés pour extraire des informations quantitatives sur les dynamiques de diffusion dans l'échantillon. Nous pouvons citer également la microscopie à contraste de phase (PCM) qui permet de mesurer des variations de chemin optique d'un point à l'autre de l'échantillon. Plusieurs structures cellulaires ont pu ainsi être suivies en PCM pour étudier leurs dynamiques[5,6]. Plus proche encore de nous, une approche utilisant la technologie OCT (en domaine temporel ou spectral) a été mise en œuvre pour la mesure de flux ou de diffusion de particules endogènes. Cette approche, le DLS-OCT pour dynamic light scattering OCT, utilise des méthodes proches de celles citées pour la FCS, à savoir l'utilisation de modèles mathématiques basés sur une fonction d'autocorrélation de la mesure. L'utilisation de ces modèles permet de dériver notamment une valeur de vitesse axiale et de coefficient de diffusion local[7]. De façon plus générale, l'OCT a été largement utilisé pour l'étude de phénomènes dynamiques comme l'angiographie ou les techniques utilisant l'effet Doppler[8–10].

Un problème fondamental de bon nombre de techniques est la difficulté qu'elles peuvent avoir à passer de l'imagerie de cultures à l'imagerie de tissus. En effet, pour les tests pharmacologiques ou toxicologiques, le suivi des dynamiques cellulaires pourraient constituer une information cruciale concernant l'effet de telles substances, néanmoins les propriétés et comportements cellulaires changent souvent lors du passage de cultures plan à leur réel environnement 3D dans les tissus. Du point de vue du biologiste, de nouveaux modèles ont vu le jour pour s'approcher des conditions réelles du tissu, comme les scaffolds (modèles multicouches) qui ont été imagés en OCT[11] ou les sphéroïdes (agrégats multicellulaires) imagés en holographie[12]. Mais cette transition de modèles plans et transparents à des modèles de plus en plus complexes, jusqu'à atteindre des tissus réels, apportent des difficultés techniques pour lesquelles un certain nombre de technologies n'ont pas été conçues.

Pour revenir au cas de l'OCT qui nous intéresse tout particulièrement, puisqu'il constitue notre source d'inspiration principale, nous voyons qu'il existe des résultats concernant l'extraction d'information des signaux temporels[13–16]. Ces résultats encourageants sont néanmoins limités par la faible résolution de l'OCT (généralement de 5 à 15µm) qui ne permet bien souvent qu'une mesure globale sans pouvoir réellement résoudre individuellement les cellules et leurs composants. Nous sommes donc mus par la motivation de voir au-delà des limites imposées par l'OCT ; cela non seulement en termes de résolution, mais aussi en termes d'échelle de temps. En effet, les dynamiques étudiées à l'aide de l'OCT se basent sur une échelle de temps longue comme l'apoptose, la prolifération ou la migration cellulaire[11,13,17], alors que les fréquences d'acquisition de plusieurs centaines d'images par seconde que nous utilisons permettent d'explorer des dynamiques aux échelles de temps courtes. A titre de comparaison, un OCT spectral à ultra-haute résolution (entre 6 µm et 3.5 µm) et à ultra-grande vitesse[18] (29.10^6 voxels par

seconde), bien que très supérieur aux standards du marché (73 fois plus rapide et jusqu'à 3 fois mieux résolu), est encore loin des performances de l'OCT plein champ. En effet, avec des résolutions pouvant atteindre 0,3µm et des fréquences supérieures à 750Hz ($1{,}5.10^9$ voxels par seconde soit plus de 50 fois plus rapide qu'un OCT ultra-rapide et près de 3800 fois plus rapide qu'un OCT standard), l'OCT plein champ promet de nouveaux horizons d'exploration. A ces échelles de temps, les cellules restent statiques et seule leur activité interne est mesurée, ce qui change la nature des dynamiques observées par l'accès à des résolutions temporelles et spatiales supérieures. Notons tout de même que cela n'implique pas de devoir se couper des échelles de temps plus grandes car il suffirait simplement d'étendre le temps de mesure ou de réaliser une séquence d'images « time lapse »[19].

L'ensemble du panorama que nous venons de voir nous invite à explorer cette région où seul semble pouvoir s'aventurer l'OCT plein champ. Avant de découvrir les « paysages » qui nous y attendent, il convient d'abord d'introduire quelques considérations physiques sur la nature des phénomènes observés, leur impact sur la mesure et la façon dont nous construisons les images à partir de ces mesures.

III.3- Mesure dynamique par OCT plein champ

Lorsque l'on s'intéresse au comportement dynamique d'un milieu diffusant, c'est-à-dire à une suite de réalisations de la position des diffuseurs, il est possible de repartir des concepts introduits précédemment (II.2.a et II.3.a) et d'interroger le lien entre ces différentes réalisations au cours du temps.

Nous verrons en premier lieu les limites qu'imposent les processus dynamiques en termes de reconstruction de l'amplitude et de la phase, avant de s'intéresser à l'impact sur le signal du mouvement d'un diffuseur unique selon différentes directions. Nous ferons enfin un lien entre les données biologiques que l'on possède sur le comportement des diffuseurs et le modèle théorique proposé pour montrer une simulation du type de signal attendu.

III.3.a- Problèmes de reconstruction et processus dynamiques

Nous avons vu (II.2.a) qu'un milieu diffusant peut être considéré comme une collection de particules dans un milieu en première approximation. Considérons le cas d'une particule ponctuelle (de taille très inférieure à la résolution du système) et voyons l'influence du mouvement de cette particule sur le signal enregistré au cours du temps par le système d'OCT plein champ.

Rappelons l'équation exprimant l'intensité mesurée par un pixel de la caméra (II.3.a Eq2.26) :

$$I(\mathrm{x},\mathrm{y},\mathrm{z},\mathrm{t}) = I_0 + 2a_O(x,y,z,t)a_R(x,y,z,t).TF[S](z).\cos(4\pi\frac{\delta z(t)}{\lambda_0}) \quad \text{(Eq3.1)}$$

Avec I_0 rassemblant tous les termes de lumière incohérente, a_O et a_R respectivement l'amplitude du signal en provenance de l'objet et du bras de référence, S le spectre de la source, λ_0 la longueur d'onde centrale de la source et δz la différence de marche entre les deux bras.

Comme nous l'avons énoncé, la méthode des quatre phases, permettant de reconstruire indépendamment l'amplitude et la phase du signal, n'est valide que pour un signal dont la phase varie peu ($\delta z << \lambda_0/8$) au

cours de l'acquisition des quatre images. Dans le cas d'une particule en déplacement axial, cela suppose donc une vitesse très inférieure à :

$$condition\ de\ séparation\ amplitude - phase\ :\ v_{particule} \ll \frac{f_{acq}.\lambda_0}{32} \qquad \text{(Eq3.2)}$$

Avec f_{acq} la fréquence d'acquisition. Une application numérique avec des valeurs typiques pour $f_{acq}.\lambda_0$ utilisées au cours de cette thèse nous donne : $v_{particule} << 3\ \mu m.s^{-1}$. La littérature[20,21] nous indique une vitesse de transport de cargos intracellulaires de l'ordre de 0,33 à 1,25 $\mu m.s^{-1}$, ce qui est non négligeable. Pour avoir une idée plus claire de l'impact du mouvement sur la reconstruction, nous avons simulé l'impact d'un mouvement axial d'une particule unique à une vitesse donnée sur la reconstruction de l'amplitude et de la phase par la méthode des quatre phases. Il semblerait qu'aux vitesses données par la litérature[20,21], l'erreur sur l'amplitude du signal soit relativement marginale, entre 2 et 7% mais l'impact sur la phase est bien plus problématique. Nous n'avons en effet pas inclus ici les différents bruits qui interviennent au cours de la mesure et qui seront détaillés au chapitre suivant (IV.2.b), mais nous pouvons signaler que ces bruits impactent de façon négligeable la reconstruction.

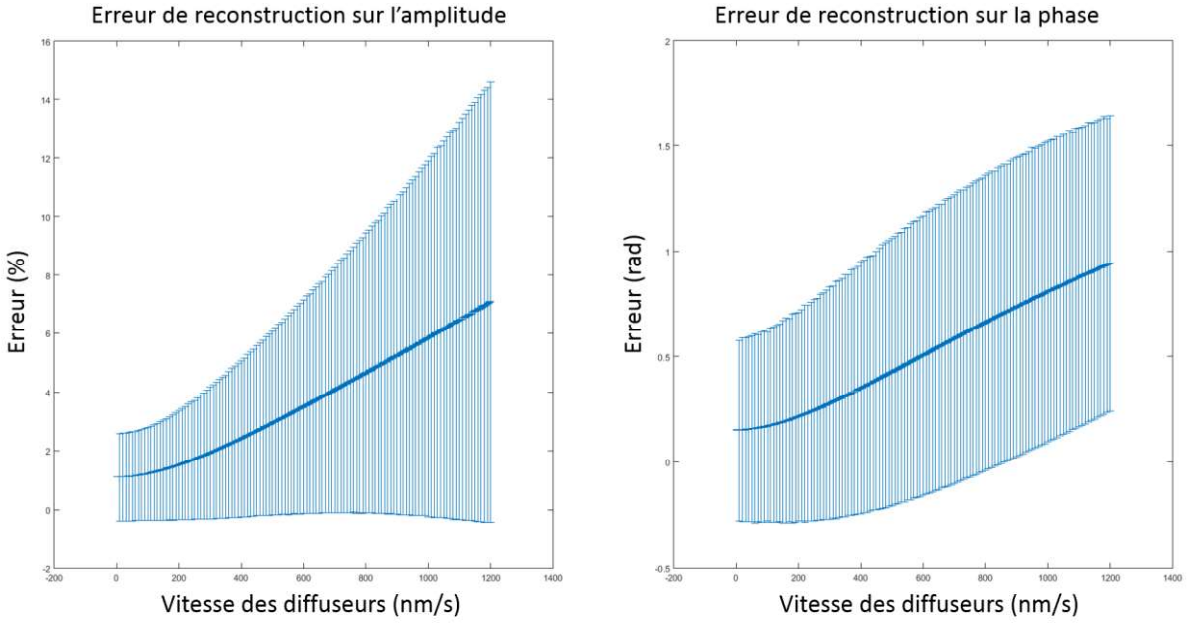

Figure 3.1 : Influence d'une particule unique en mouvement axial sur la méthode de reconstruction des quatre phases. Courbes obtenues par simulation, chaque point est l'erreur moyenne sur 2.10^5 réalisations aléatoires de l'amplitude et de la phase. Barres d'erreur représentant deux écarts types. La longueur d'onde centrale pour cette simulation a été fixée à 500 nm.

D'après ces résultats, nous voyons qu'il sera possible pour des tissus biologiques vivants de reconstruire une image d'amplitude FFOCT correcte à une erreur près que nous pouvons évaluer en fonction des vitesses locales. Par contre, la reconstruction de la phase échoue pour des vitesses typiques des milieux biologiques, elle ne sera par conséquent pas possible avec cette méthode.

III.3.b- Fluctuation du signal induite par un diffuseur unique en déplacement

Nous pouvons reprendre (Eq3.1) pour un déplacement δz axial comme précédemment avec une particule unique initialement hors du volume de cohérence, traversant celui-ci pendant l'acquisition et finissant à l'extérieur. Ce mouvement va générer un signal sur le pixel correspondant de nature sinusoïdal modulé par la distribution TF[S] caractéristique du sectionnement optique (volume de cohérence temporelle) comme montré sur la figure 3.2. La période d'un tel signal est bien sûr uniquement liée à la longueur d'onde centrale de la source qui est déjà connue et ne nous donne donc pas d'information particulière pour un déplacement uniforme. Par contre, pour un déplacement avec rebroussement (comme c'est le cas pour le transport intracellulaire[20]) nous verrons une rupture symétrique dans la sinusoïde (cf : figure 3.2 (B)). Nous ne pouvons en pratique observer ce niveau de détail dans les fluctuations à cause des remarques faites précédemment (III.3.a) et d'éléments que l'on prendra le temps de développer ultérieurement (IV.2.b). La largeur de l'enveloppe du signal correspond naturellement au temps de résidence de la particule dans le volume de cohérence ; avec en chaque instant, la hauteur de l'enveloppe qui nous renseigne sur l'éloignement de la particule au centre de la section optique.

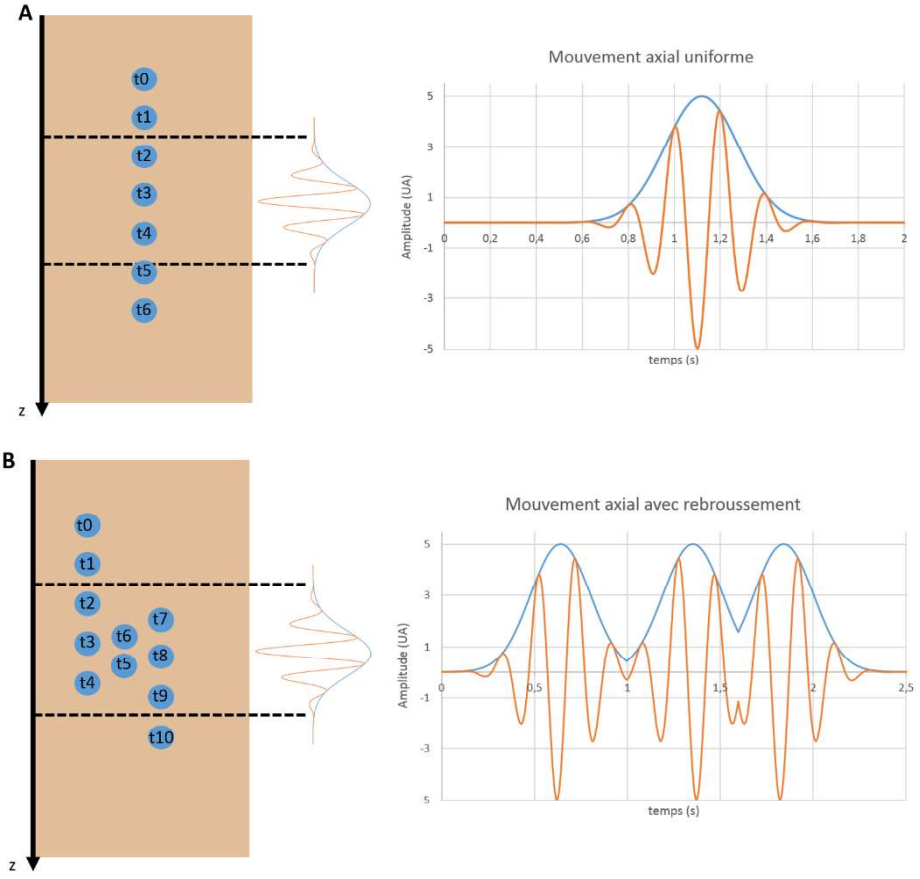

Figure 3.2 : (A) présente le trajet d'une particule en mouvement axial uniforme (1.25 µm.s^{-1}) à gauche et le signal enregistré sur la caméra au cours du temps à droite. De même pour (B) où la particule subit un rebroussement comme décrit précédemment[20] entre t4 = 1 s et t7 = 1,6 s. On observe alors une rupture symétrique du signal. Les courbes bleues correspondent à une simulation de l'amplitude et celles en orange correspondent au signal total A.cos(ϕ).

Ce que nous avons montré ici pour une particule unique en mouvement axial peut être étendu au comportement d'un groupe de particule ayant un mouvement « en bloc », c'est-à-dire pour un groupe de particule dont les positions relatives restent identiques.

Intéressons-nous maintenant au même processus pour une particule en mouvement transverse dans le plan de cohérence. Dans ce cas, pour une profondeur constante ($z = z_0 \; \forall t$), la valeur du terme en cosinus sera constante. Ainsi la valeur d'un pixel sur la caméra correspondra à l'amplitude de rétrodiffusion de la particule, pondérée par le terme en cosinus et par la distribution correspondant au pixel dans l'espace objet (image du pixel par le système optique). Pour une particule en mouvement uniforme entre deux pixels, il y aura au cours du temps une diminution du signal suivant la distribution relative au pixel dans l'espace objet divisée par la vitesse de déplacement de la particule. Pour le second pixel, l'augmentation du signal suivra la même loi que le premier pixel mais retourné temporellement. Une illustration est donnée dans la figure 3.3.

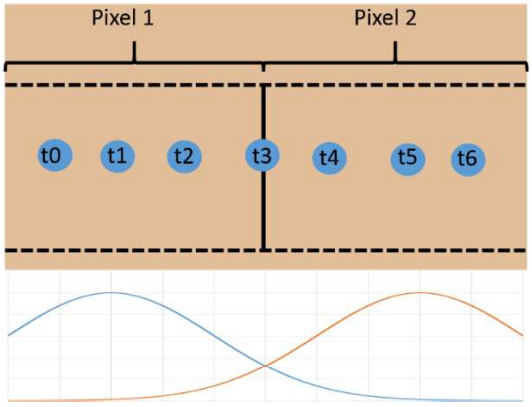

Figure 3.3 : particule en mouvement uniforme à une profondeur fixée entre deux pixels. Le graphe représente le niveau de signal pour chaque pixel dans le cas d'une PSF gaussienne et d'une taille de pixel inférieure au diamètre de la PSF. Les courbes bleu et orange indiquent la variation du signal respectivement sur les pixels 1 et 2 en fonction de la position de la particule.

De cette étude du mouvement d'une particule unique selon deux configurations orthogonales, nous pouvons déduire une première remarque concernant la sensibilité du système au mouvement. En effet, la sensibilité au mouvement du système sera donné par : la sensibilité instrumentale aux variations d'intensité, c'est-à-dire à la plus faible variation d'intensité mesurable d'une part, mais aussi à l'amplitude physique du mouvement, c'est-à-dire la plus petite distance correspondant à cette variation d'intensité. Or nous avons vu que pour une particule se déplaçant dans le plan, la variation correspondante enregistrée sur la caméra était une fonction de la PSF du système. Bien que cette PSF n'ait pas une variation linéaire avec l'amplitude du mouvement, nous pouvons en donner une taille caractéristique comme la demi-largeur à mi-hauteur (HWHM pour Half Width at Half Maximum) qui pour notre système comme nous l'avons vu au chapitre précédent (II.3.b) est de l'ordre de 600 nm. De même pour un mouvement axial, la relation entre le déplacement et la variation d'intensité est non-linéaire (cf : figure 3.2) mais nous pouvons également donner une grandeur caractéristique. Pour un tel déplacement nous avons une HWHM de l'ordre de $\delta z = \frac{\lambda_0}{4}$ soit un déplacement réel de la particule de $\frac{\lambda_0}{8n}$ avec n l'indice optique du milieu (notons pour le facteur 2 qu'un déplacement axial va augmenter ou diminuer le chemin optique non-seulement à l'allée – avant l'évènement de rétrodiffusion – mais aussi au retour – après l'évènement de rétrodiffusion). Cela nous donne une application numérique dans un cas typique avec n = 1,4 et λ_0 = 500 nm où nous avons une HWHM de l'ordre de 45 nm. De ces

considérations nous pouvons affirmer que le système d'OCT plein champ est plus sensible à un déplacement axial que latéral d'un facteur proche de dix dans les cas typiques.

Maintenant que nous avons un modèle pour une particule unique en mouvement, intéressons-nous au comportement de plusieurs particules. Remarquons en premier lieu qu'un mouvement « en bloc » comme nous l'avons défini précédemment revient strictement au modèle à une particule. Ce comportement de groupe étant envisagé, il reste deux comportements à analyser : la dynamique de la quantité locale de diffuseurs et la dynamique de reconfiguration relative des diffuseurs.

Voyons en premier lieu l'influence sur la dynamique temporelle du signal pour de multiples diffuseurs. La première remarque que l'on peut émettre concerne le cas de particules multiples dont la taille est de l'ordre de grandeur de la PSF du système. Dans ce cas, les diffuseurs sont quasiment résolus et ne peuvent occuper simultanément un même voxel. L'intensité est donc une fonction de la position de cette particule unique dans l'espace comme décrit précédemment. Pour toute taille de diffuseur – et notamment pour des diffuseurs petits devant la PSF – on peut définir en tout instant une réflectivité effective d'un voxel donné comme :

$$réflectivité\ effective\ \forall t : R(x,y,z,t) = \sum_{i=1}^{N_S} PSF(x_i,y_i,z_i,x,y,z).R_i \qquad \text{(Eq3.3)}$$

Avec N_S le nombre de diffuseurs dans le milieu et x_i,y_i,z_i la position du diffuseur i de réflectivité R_i. $PSF(x_i,y_i,z_i,x,y,z)$ est la valeur aux coordonnées x_i,y_i,z_i de la PSF du système centrée en x,y,z. Nous pouvons à partir de cette expression comprendre l'effet d'un transfert de diffuseurs sur l'intensité du signal au cours du temps. En chaque instant, le bilan pour chaque pixel $\Delta R = R(x,y,z,t+dt) - R(x,y,z,t)$ nous donne un facteur de la variation d'intensité enregistrée sur la caméra. Sous réserve que l'on soit capable de reconstruire l'amplitude du signal rétrodiffusé :

$$\Delta R(x,y,z) = \sum_{i=1}^{N_S} \Delta PSF.R_i \quad \text{(Eq3.4)}$$

Avec :

$$\Delta PSF = PSF\left(x_i + v_{x,i}.dt, y_i + v_{y,i}.dt, z_i + v_{z,i}.dt, x, y, z\right) - PSF(x_i,y_i,z_i,x,y,z) \quad \text{(Eq3.5)}$$

Dans le cas limite où $N_S = 1$ le temps caractéristique de variation de l'amplitude est de l'ordre de $\tau = \frac{\phi_{PSF}}{||\vec{v}||}$ (avec ϕ_{PSF} le diamètre de la PSF) soit autour de 0,5 secondes pour des valeurs typiques (ϕ_{PSF} ~ 600 nm et $||v||$ ~1.25 µm.s^{-1}). Dans le cas général, si l'on considère que $\vec{v_i}$, la vitesse de chaque diffuseur est une variable aléatoire dont la direction est équiprobable et dont le module est identique d'un diffuseur à l'autre, alors : le temps caractéristique de variation de l'amplitude va chuter avec le nombre de diffuseurs N_S.

Avec cela nous avons une description de la dynamique locale de la quantité de diffuseurs et son impact sur les variations temporelles du signal. Cela suppose la capacité de reconstruire l'amplitude et nous pouvons garder en tête les difficultés qui y sont liées (cf : précédemment III.3.a). Mais la présence de multiples diffuseurs dans un voxel implique également un effet sur la phase lors de leur mouvement. Considérons que le déplacement des diffuseurs dans le voxel et/ou les éventuels flux entrant et sortant soient tels qu'en chaque instant il y ait un équilibre de la réflectivité effective locale : $\Delta R = 0$. Pour autant, la reconfiguration des positions relatives des diffuseurs va induire une variation de phase

produisant un clignement (blinking) du speckle. Il n'est pas évident de se faire une idée des temps caractéristiques de ce clignement, en effet il va être soumis non seulement à la projection axiale des phénomènes de transports évoqués précédemment mais aussi aux fluctuations induites par l'agitation thermique (mouvement Brownien). En se référant à des relevés expérimentaux[20], pour des particules (des vesicules) à l'arrêt, le temps caractéristique correspondant à la sensibilité typique du système est de l'ordre de 2,5 millisecondes pour une extension spatiale de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Cette valeur est bien entendue fournie pour situer des grandeurs, mais rappelons néanmoins qu'il peut y avoir une grande variabilité selon la nature des particules et leur environnement comme en attestent les coefficients de diffusion s'étalant sur plusieurs ordres de grandeurs[22].

Des considérations précédentes concernant les dynamiques locales à la fois sur la densité de diffuseurs et sur leur réorganisation au cours du temps nous permettent de décrire de manière générale l'impact des mouvements de particule sur le signal :

$$\Delta I(\mathrm{x,y}) = \alpha . I_0 \left[\sqrt{R(x,y,t+dt)}.\cos\left(\phi(t) + 4\pi\frac{\Delta(dt)+\delta(dt)}{\lambda_0}\right) - \sqrt{R(x,y,t)}.\cos\big(\phi(t)\big)\right] \quad \text{(Eq3.6)}$$

Avec α un facteur multiplicatif prenant en compte la réflectivité du miroir de référence (constant selon x,y,z,t), I_0 l'intensité de la source, R la réflectivité effective, ϕ la phase, Δ la différence de marche induite par le transport sur dt et δ la différence de marche induite par la réorganisation des diffuseurs sans transport sur ce même intervalle dt. De cette expression, nous voyons différents comportements potentiellement séparables dans le temps. En effet, pour des temps caractéristiques de transports lents devant les temps caractéristiques de réorganisation* : $\tau_{transport} \ll \tau_{réorganisation}$ on a :

$$pour\ dt < \tau_{réorganisation} : R(t) \sim R(t+dt) et\ \Delta(dt) \ll \delta(dt)$$

$$Soit: \Delta I(\mathrm{x,y}) \sim \alpha . I_0 \sqrt{R(x,y,t)} \left[\cos\left(\phi(t) + 4\pi\frac{\delta(dt)}{\lambda_0}\right) - \cos\big(\phi(t)\big)\right] \quad \text{(Eq3.7)}$$

Les fluctuations de l'intensité décrites ici correspondent à une fluctuation rapide du speckle. En effet lorsque le transport est négligeable, la phase est modulée par l'agitation thermique et conduit à des fluctuations de phases rapides qui se compensent sur des temps courts. On peut également réécrire (Eq3.6) :

$$\Delta I(\mathrm{x,y}) = \alpha . I_0 . \left[\sqrt{R(x,y,t+dt)}.\left(\cos\left(\phi(t) + 4\pi\frac{\Delta(dt)}{\lambda_0}\right).\cos\left(4\pi\frac{\delta(dt)}{\lambda_0}\right) - \sin\left(\phi(t) + 4\pi\frac{\Delta(dt)}{\lambda_0}\right)\sin\left(4\pi\frac{\delta(dt)}{\lambda_0}\right)\right) - \sqrt{R(x,y,t)}.\cos\big(\phi(t)\big)\right]$$

* Nous entendons par réorganisation les mouvements relatifs entre diffuseurs, potentiellement induits par le transport non colinéaire de ceux-ci, aux différences de vitesses ou simplement au mouvement Brownien contraint.

Qui est simplement le développement du premier cosinus. En considérant $dt > \tau_{transport}$, et un temps d'intégration grand devant $\tau_{réorganisation}$, on peut obtenir l'approximation que les mouvements causés par la réorganisation sont équiprobables et donc à somme globalement nulle :

$$\int_{t}^{t+\tau_{transport}} \delta.dt \sim 0 \ \ soit : \cos\left(4\pi\frac{\delta(dt)}{\lambda_0}\right) \sim 1 \ et \ \sin\left(4\pi\frac{\delta(dt)}{\lambda_0}\right) \sim 0$$

$$D'où: \Delta I(x,y) \sim \alpha.I_0.\left[\sqrt{R(x,y,t+dt)}.\cos\left(\phi(t)+4\pi\frac{\Delta(dt)}{\lambda_0}\right) - \sqrt{R(x,y,t)}.\cos\left(\phi(t)\right)\right] \text{ (Eq3.8)}$$

On a donc une variation sur les temps longs ($dt > \tau_{transport}$) qui dépend de la variation relative de réflectivité $\left(\frac{\Delta R}{R}\right)$ et de la variation de phase. Si la variation relative de réflectivité est faible comparée à la période du cosinus (dépendant uniquement de $\frac{\Delta(dt)}{\lambda_0}$), alors on a une séparabilité temporelle entre un clignement du speckle rapide généré par le transport et une variation lente générée par la variation de réflectivité.

Ces considérations nous permettent d'avoir une idée du type de signal que l'on peut attendre, connaissant les structures que l'on observe et leurs dynamiques. Nous avons déjà donné quelques ordres de grandeur inspirés de grandeurs typiques en biologie, et nous allons maintenant voir quelques types de diffuseurs intracellulaires pouvant être à l'origine d'une modulation de l'interférogramme enregistré sur la caméra.

III.3.c- De la cellule à la caméra : lien entre biologie et signal mesuré

Les cellules sont constituées d'un grand nombre de structures pouvant diffuser la lumière. Chaque type cellulaire possède ses particularités propres, mais nous pouvons identifier un ensemble d'éléments génériques présents dans une cellule[1] (cf : figure 3.4).

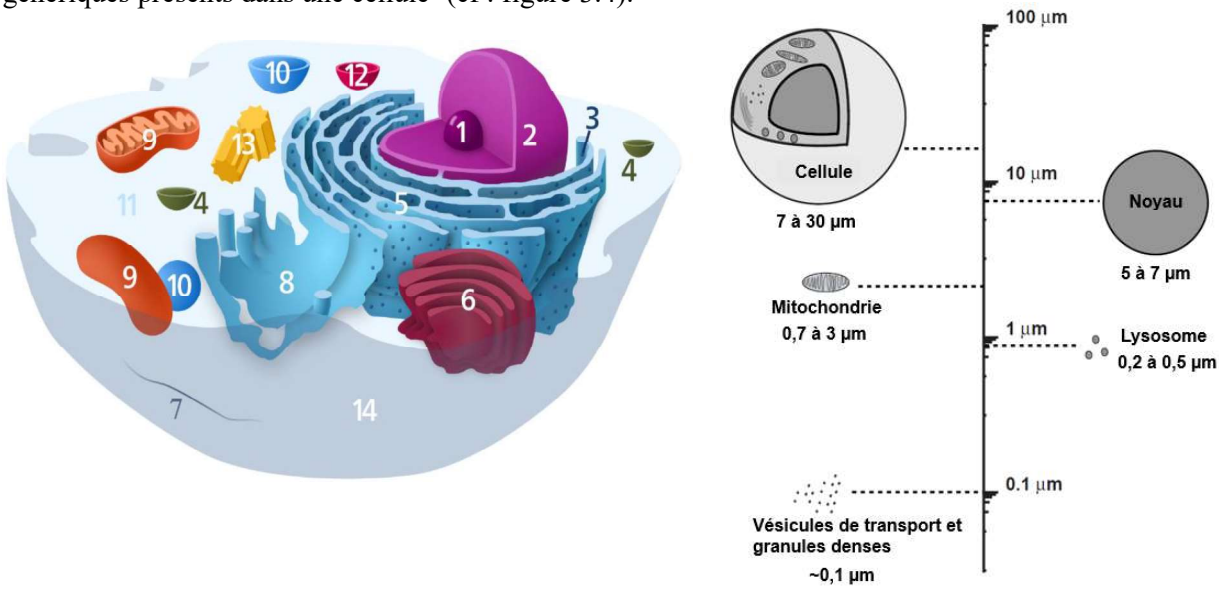

Figure 3.4 : Schéma typique d'une cellule eucaryote avec une échelle donnant quelques ordres de grandeurs. (1) Nucléole, lieu de la transcription des ARN ribosomiques ; (2) Noyau, contenant la chromatine (ADN) ; (3) Ribosome, à l'origine de la synthèse protéique ; (4, 10, 12) Vésicules (vésicules de transport, granules denses ou lysosomes), bicouche lipidique stockant, transportant ou digérant des produits ou déchets cellulaires ; (5) Réticulum endoplasmique rugueux, structure hôte des ribosomes ; (6) Appareil de Golgi, joue un rôle régulateur dans le transport vésiculaire et dans la modification de protéines ; (7) Cytosquelette, réseau de bio-polymères conférant à la cellule ses propriétés architecturales et mécaniques, permet le transport de structures à l'intérieur de la cellule ; (8) Réticulum endoplasmique lisse, joue des rôles divers dans la régulation, la transformation et la synthèse de produits cellulaires ; (9) Mitochondries, structure génératrice de l'ATP, cette génération se produit au cours du cycle respiratoire ; (11) Cytosol, phase liquide constituant le milieu interne de la cellule ; (13) Centrosome, impliqué dans la division cellulaire ; (14) Membrane plasmique, délimite le cytoplasme du milieu extracellulaire. Schéma de cellule adaptée de Wikimedia Commons[23]; grandeurs de quelques éléments subcellulaires adapté de Jeremy D. Wilson[24].

Compte tenu d'un tel enchevêtrement de structures et de dynamiques propres, il est clair que le signal rétrodiffusé au cours du temps va dépendre de l'ensemble de ces structures. Cela rend la compréhension des comportements locaux très complexe. Néanmoins, des travaux ont permis de mettre en évidence quelles structures contribuent de manière significative à la diffusion de la lumière dans les cellules et de quelle manière[24–28]. Ces travaux pointent deux structures aux comportements très différents impliqués dans la diffusion de la lumière : les mitochondries et les vésicules. Compte tenu des particularités de notre méthode, ces résultats nécessitent examen. En effet, un autre paramètre entre en jeu outre la quantité de lumière rétrodiffusée, il s'agit du mouvement de ces éléments.

Intéressons-nous tout d'abord au comportement des mitochondries. D'autres méthodes ont permis d'imager les mitochondries[29,30], donnant accès à leurs dimensions et géométrie ou de dériver un ensemble d'informations concernant leur motilité[21,31,32]. On peut mentionner également l'influence de l'activité sur la réflectivité[33]. Tous ces paramètres (Tableau 3.1) nous permettent d'évaluer l'impact du mouvement des mitochondries sur le signal dynamique enregistré sur la caméra.

Paramètre	Valeur typique	commentaire
Taille	0,7 – 3 µm	Occupe approximativement un voxel
Géométrie	-	Constitué d'une membrane externe et d'une membrane interne repliée avec en son sein un grand nombre de structures de petites tailles (granules, ribosomes, ADN…)
Déplacement	~300 nm/s	Dépend de la situation de la mitochondrie[21] (cf : Figure 3.5)
Indice optique	1,41	Indice élevé comparé au cytosol (1,35)
Fraction volumique	22,6 ± 5,7%	Valeur à titre indicatif pour un hépatocyte[25]
Densité (nombre par cellule)	1740 ± 462	Valeur à titre indicatif pour un hépatocyte[25]
Section efficace de rétrodiffusion	~6.10^{-3} µm²	Valeur dérivée de la référence[25]

Tableau 3.1 : Récapitulatif des paramètres caractéristiques des mitochondries.

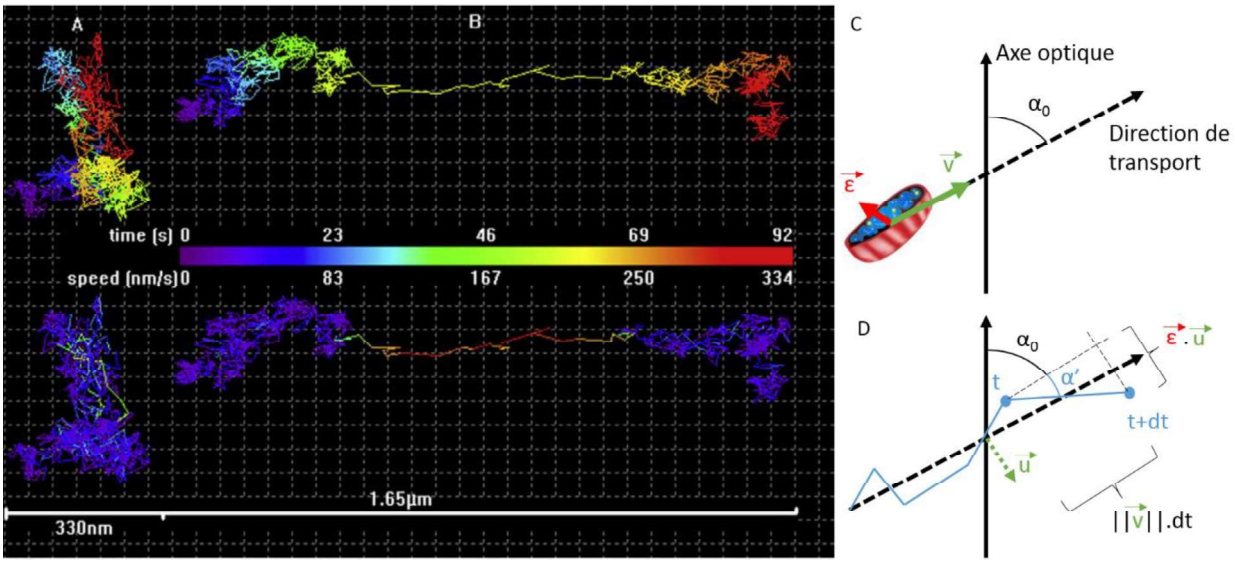

Figure 3.5 : (A) représente la marche aléatoire Brownienne d'une mitochondrie (PTK2), en haut avec la couleur indiquant la coordonnée temporelle, en bas avec la couleur indiquant la vitesse instantanée. (B) montre un déplacement le long d'un microtubule avec un mouvement brownien contraint. (C) et (D) illustrent la situation et les notations utilisées pour la simulation d'un transport de mitochondrie. (A) et (B) adaptés de Chrstopher D. Saunter et al.[21].

Nous avons ainsi élaboré une simulation calculant la variation de l'intensité enregistrée par un pixel au cours du temps lorsqu'une mitochondrie est en mouvement dirigé (mouvement le long d'un microtubule) et traverse le voxel imagé. Avant d'interpréter les résultats fournis par ce modèle, nous allons tout d'abord en faire une rapide description. Le cœur du modèle est basé sur l'équation (Eq3.1). On suppose un sectionnement optique gaussien (en conséquence d'une source au spectre gaussien) de largeur totale 1,2 µm (pour se placer dans le cas le plus standard d'un voxel cubique de coté 1,2 µm). Cela fixe la composante TF[S] de (Eq3.1). Nous prenons une longueur d'onde centrale de 500 nm, une distribution de vitesse entre 0 et 300 nm/s qui correspond aux vitesses d'une mitochondrie en mouvement ou statique[21] et une réflexion unitaire. La position initiale de la mitochondrie est choisie aléatoirement dans la coupe optique. Le modèle calculera l'intensité toutes les 2 ms ce qui correspond à une fréquence d'acquisition de 500 Hz. Le mouvement brownien contraint de la mitochondrie n'est pas évident à évaluer. En effet, il va dépendre de facteurs multiples (et pas seulement de l'agitation

thermique). Pour avoir une simulation au plus proche du comportement réel, nous avons réalisé un grand nombre de réalisations de mouvements aléatoires de différentes amplitudes jusqu'à trouver celle correspondant aux données de la littérature[21]. Nous avons également pris en compte la direction de déplacement de la mitochondrie par rapport à l'axe optique (direction faisant un angle α avec l'axe optique), cela se traduit par une correction du terme de phase :

$$I(\mathrm{t}+\mathrm{dt}) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{\left(\left\|\overrightarrow{r(t+dt)}-\overrightarrow{r_0}\right\|\right)^2}{2\sigma^2}} . \cos\left(\phi(t) + 4\pi \frac{2.\left\|\overrightarrow{r(t+dt)}-\overrightarrow{r(t)}\right\|.n.cos(\alpha)}{\lambda_0}\right) \qquad \text{(Eq3.9)}$$

Avec dt le pas temporel, n l'indice optique, σ l'écart type de la fonction gaussienne définissant le sectionnement optique, ϕ(t) la phase au temps t avec ϕ(0) = 0. Si l'on intègre dans (Eq3.9) une fonction aléatoire $\overrightarrow{\varepsilon(t)}$ telle que $\left\|\overrightarrow{\varepsilon(t)}\right\|$ soit conforme aux données expérimentales de la litérature[21] et de direction équiprobable ; et que l'on tire à chaque dt une nouvelle valeur de $\overrightarrow{\varepsilon(t)}$ (à savoir une amplitude et une direction aléatoire répondant aux critères précédents) ; alors on peut écrire :

$$\begin{cases} \overrightarrow{r(t+dt)} = \overrightarrow{r(t)} + \vec{v}.dt + \overrightarrow{\varepsilon(t)} \\ \alpha = \alpha_0 + \tan\left(\frac{\overrightarrow{\varepsilon(t)}.\vec{u}}{||\vec{v}||.dt}\right) \end{cases} \qquad \text{(Eq3.10)}$$

Avec $\vec{v}$ le vecteur vitesse instantanée, α_0 l'angle que fait la trajectoire du mouvement dirigé de la mitochondrie avec l'axe optique et $\vec{u}$ la direction orthogonale à ce mouvement tel que $\vec{u}.\vec{v} = 0$. Une représentation visuelle de (Eq3.10) est donnée dans la figure 3.5. Avec ce modèle, nous pouvons donc simuler le passage d'une mitochondrie par un voxel et à l'aide de plusieurs réalisations et de plusieurs directions de mouvement constater le type de variations que cela implique sur la fluctuation de l'intensité (figure 3.6).

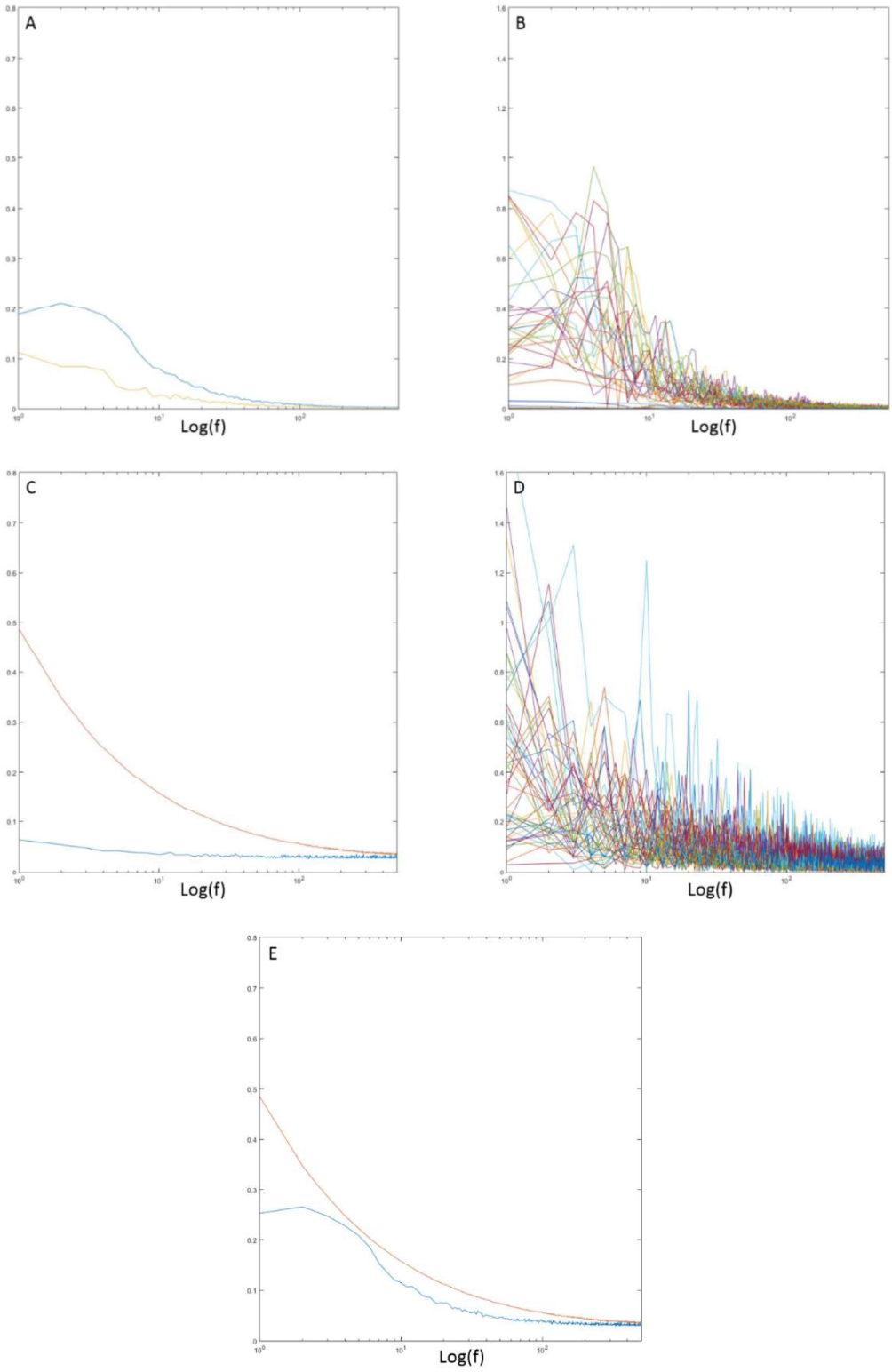

Figure 3.6 : (A) et (B) montrent l'analyse spectrale des signaux simulés avec (A) la moyenne des réalisations aléatoires sur 10^5 réalisations avec en bleu les mitochondries en déplacement et en jaune les mitochondries statiques (mouvement Brownien contraint) et (B) quelques exemples de réalisations. (C) et (D) présentent l'analyse spectrale de séries réelle, provenant d'acquisitions faites dans du foie de rat avec (C) la moyenne sur les pixels d'indice métabolique les plus faible (appartenant au bruit) en bleu et la moyenne sur les pixels restant en orange et (D) quelques exemples de séries fréquentielles. (E) montre la superposition de (A_bleu) le spectrogramme simulé auquel on rajoute le niveau de bruit (C_bleu) avec (C_orange) le spectrogramme des séries réelles. Les ordonnées sont en échelle logarithmique, f est la fréquence d'unité $\frac{1}{\Delta T}$ où ΔT est la durée totale de l'acquisition.

Il est intéressant de noter plusieurs remarques à la suite de la figure 3.6. La première est la contribution non négligeable des mitochondries au signal réel, quantifiable par le rapport des aires des deux spectrogrammes (57% de recouvrement). La seconde remarque bien sûr concerne les 43 autres pourcents, correspondant aux très basses fréquences (inférieures à 0,4 Hz) et aux fréquences élevées (au-dessus de 2 Hz). Pour ceux-ci, nous ne pouvons que supposer d'autres diffuseurs plus rapide – ce que nous allons examiner dans la suite avec le cas des vésicules – ou plus lent, ce qui correspondrait à des dérives du tissu qui ne procède pas du signal métabolique à proprement parler, mais plutôt d'un artefact (Nous verrons cela au prochain chapitre IV.2.b).

Maintenant que le comportement des mitochondries a été simulé et comparé aux données expérimentales, intéressons-nous au rôle des vésicules que nous avions temporairement laissé de côté. Comme nous l'avons évoqué, les vésicules sont plus petites d'environ un ordre de grandeur par rapport aux mitochondries ; certaines sont composées simplement d'une bicouche lipidique encapsulant un élément particulier. Ces vésicules ont été étudiées en détail par différentes techniques, que ce soit dans leur diversité[34,35], leur structure[35], leur distribution au sein d'une cellule[36] ou leurs comportements[20]. De par leur diversité, certaines valeurs typiques peuvent varier fortement (cf : Tableau 3.2).

Paramètre	Valeur typique	commentaire
Taille	50 – 600 nm	D'après des mesures par microscopie électronique et par FSC et SSC[35]
Géométrie	-	Bicouche lipidique sphérique
Déplacement	~1,2 µm/s	Moyenne sur un trajet aller-retour d'un cargo intracellulaire, pouvant atteindre des pics de vitesse instantanée à 4µm/s[20]
Indice optique	1,5	Principalement lipide[20]
Densité	~2 μm^{-3} (<10 μm^{-3})	En croisant plusieurs informations de la littérature[20,37–39] on peut avoir une idée du nombre maximal de vésicules se déplaçant le long du cytosquelette et une valeur typique
Section efficace de rétrodiffusion	1.10^{-6} – 3.10^{-4} µm²	Par simulation pour des diffuseurs sphériques à λ=500 nm avec vérification des ordres de grandeur pour un exemple de la literature[25]

Tableau 3.2 : Récapitulatif des paramètres caractéristiques des vésicules.

L'évaluation de l'impact du trafic intracellulaire des vésicules est difficile à évaluer. En effet, contrairement aux mitochondries qui pouvaient être simulées comme des particules uniques dans un voxel, ici, plusieurs vésicules peuvent simultanément se retrouver dans un même voxel. Il en résulte un comportement que nous avons décrit précédemment où les mouvements individuels des diffuseurs vont créer une modulation de l'amplitude par leur transport et de la phase par la réorganisation de leur configuration spatiale. Voyons si, dans le cas particulier des vésicules, nous pouvons réaliser certaines approximations permettant de juger de leur impact sur le signal. Tout d'abord nous voyons que la section efficace de diffusion de ces particules est plus faible d'au moins un ordre de grandeur comparé à celle d'une mitochondrie. En composant cela avec le faible nombre de vésicules pouvant statistiquement se trouver au même instant dans un voxel, nous pouvons en conclure que le signal est dominé par la rétrodiffusion provenant des mitochondries. Pour le signal résiduel, nous constatons une vitesse moyenne de transport pour les vésicules quatre fois plus importante que celle des mitochondries. Cela

nous permet d'anticiper un impact potentiel de ces éléments sur les hautes fréquences temporelles du signal interférométrique, en comparaison des fréquences plus faibles (constantes de temps plus longues) pour les mitochondries. Il est à noter que cette composante fréquentielle sera notablement élargie suivant la distribution des orientations de microtubules (support du mouvement) comme nous l'avons montré précédemment avec le paramètre α de (Eq3.9).

En résumé, nous avons montré dans cette partie :

- Une évaluation de l'impact du mouvement des diffuseurs sur la reconstruction du signal d'amplitude et de phase à l'aide de la méthode des quatre phases. Nous pouvons aux valeurs typiques des tissus biologiques espérer reconstruire l'amplitude avec une erreur de l'ordre de 5% alors que la phase ne peut être évaluée correctement aux fréquences des capteurs utilisés.
- Deux modèles montrant l'impact du mouvement des diffuseurs sur le film d'interférogrammes capturé ; un premier concernant le mouvement d'une particule unique et un second concernant un nombre arbitraire de diffuseurs.
- Une description des structures intracellulaires potentiellement impliquées dans la modulation du signal au cours du temps avec une piste favorisant la mitochondrie comme agent principal de la modulation.

Prenons le temps de recontextualiser : nous avons vu au chapitre I qu'un besoin clinique avait motivé l'utilisation de l'OCT plein champ pour le diagnostic peropératoire en oncologie. Pour augmenter les performances de cette approche, l'ajout de modalités d'imagerie complémentaires a été envisagé avec une focalisation sur le développement de méthodes d'observation du métabolisme cellulaire. Au chapitre II nous avons décrit le dispositif expérimental d'OCT plein champ et les principes physiques en jeux dans cette méthode. Nous venons dans cette première partie de montrer quel impact peut avoir le mouvement des diffuseurs sur l'image enregistrée. Nous voilà donc en possession d'un film d'interférogrammes modulés par le mouvement intrinsèque des diffuseurs endogènes au tissu. Ce film constitue la donnée de base de l'imagerie dynamique. Cependant, seul, ce film contenant pourtant toute l'information que le système peut procurer ne permet pas de déduire une connaissance sur le tissu. Pour cela, il est nécessaire de dériver de ces données brutes – de ces séries temporelles – un certain nombre de mesures qui permettront une interprétation de ces informations.

III.4- Métriques associées à la mesure dynamique

En partant du principe physique sous-jacent à la modulation temporelle de l'interférogramme enregistré sur la caméra, nous allons voir ici comment nous dérivons de cet enregistrement temporel (un film d'interférogrammes) des mesures signifiantes, porteuses d'informations pertinentes pour le diagnostic.

Comme nous l'avons vu précédemment (III.3.c), deux informations physiques/biologiques peuvent présenter un intérêt :

- Une information de variation locale de réflectivité effective qui traduit un bilan de transport de diffuseurs.
- Une information concernant les temps caractéristiques de variation du signal interférométrique, c'est-à-dire une information de contenu fréquentiel des séries temporelles enregistrées. Cette

information permet d'obtenir un indice sur le type de comportement local s'étant produit lors de l'acquisition.

Pour évaluer ces aspects, trois métriques ont été proposées :

- Indice métabolique :

$$MI(x,y,z,f_{min},f_{max}) = \int_{f_{min}}^{f_{max}} FFT[I](x,y,z,f).df \quad \text{(Eq3.11)}$$

Avec I le signal interférométrique enregistré sur la caméra aux coordonnées (x,y,z) et f la fréquence. On a avec cette définition une évaluation de l'énergie présente dans le signal pour la bande spectrale considérée. Cette énergie est fonction de deux paramètres : la réflectivité effective du voxel et le transport local.

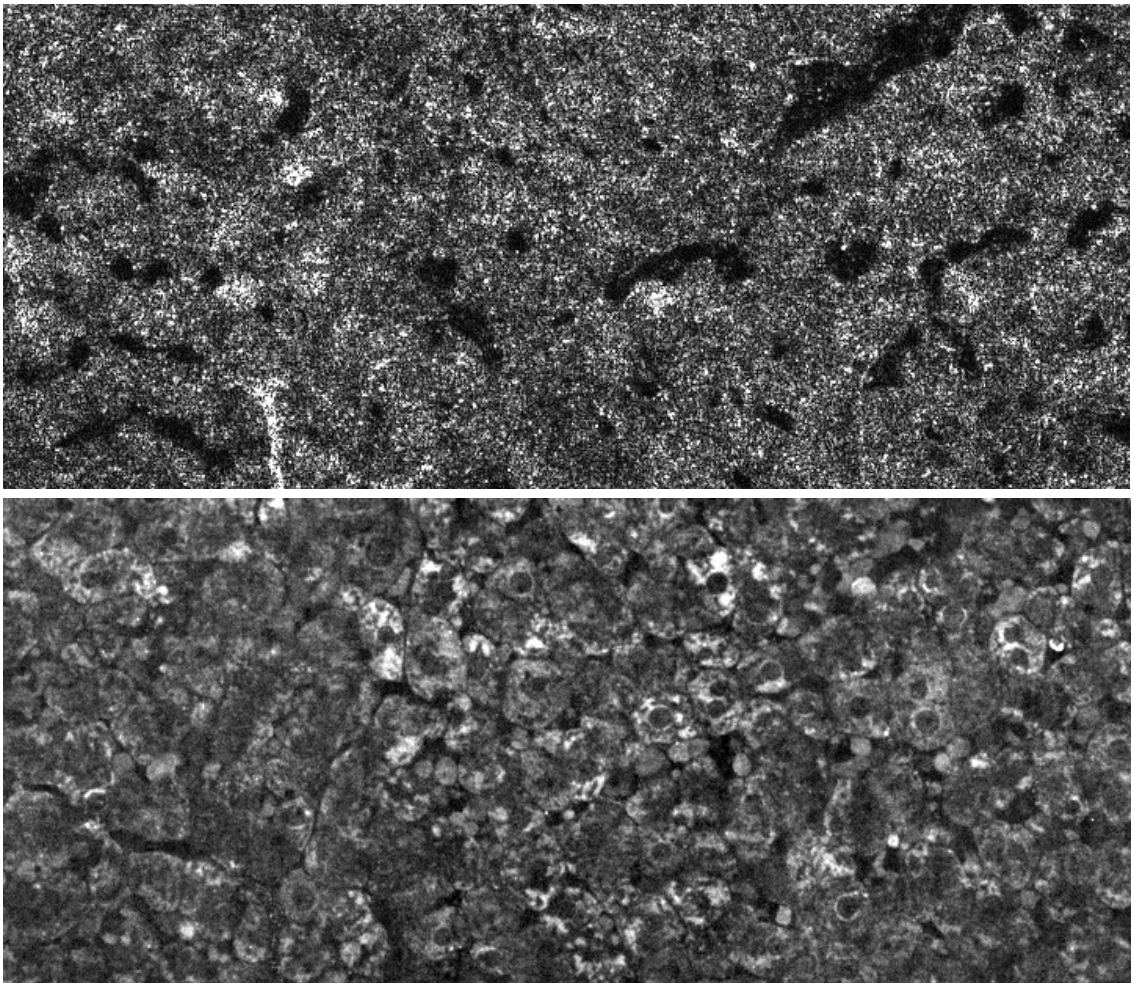

Figure 7 : Un exemple de carte d'indice métabolique (en bas) pour un échantillon de foie comparé au même champ imagé en OCT plein champ (haut) dans un échantillon de foie de rat. Champs de 560x240µm.

Une autre définition de l'indice métabolique a été donnée dans un premier article présentant cette méthode[40], il s'agit de prendre l'écart type de chaque série temporelle, ce qui donne :

$$MI(x,y,z) = <\frac{1}{T}\sqrt{\sum_{t=0}^{T}(I(x,y,z,t) - < I(x,y,z,t) >)^2} > \quad \text{(Eq3.12)}$$

Avec T la durée totale de l'acquisition (nombre d'échantillons temporels), t l'indice de l'interférogramme capturé au temps $\frac{t}{f_{acq}}$.

Cette définition mène à un résultat tout à fait similaire puisque l'écart type mesure l'amplitude de l'écart à la moyenne du signal et l'énergie contenue dans la bande de fréquence $[f_{min}, f_{max}]$ est fonction de l'amplitude des sinusoïdes contribuant au signal : ce qui est une mesure de l'écart du signal à la moyenne pour peu que $f_{min} > 0$. Cette remarque a pour fondement le théorème de Parseval qui montre l'équivalence de l'énergie entre le signal et sa transformée de Fourier.
Nous préférons désormais la définition donnée en (Eq3.11) et ce même si le calcul de l'indice métabolique par la définition donnée en (Eq3.12) est plus rapide. En effet, comme nous allons le voir, le calcul de FFT[S] est nécessaire pour l'évaluation des métriques suivantes, ce qui rend ce gain de temps obsolète. Cette métrique (MI) est le cœur de l'imagerie métabolique comme nous le montrerons au IV.3, mais intéressons-nous maintenant aux deux autres métriques restantes.

- Fréquence centrale :
  Le spectre calculé pour chaque série temporelle présente des variations qui nous informent sur le type de dynamique se produisant localement. Une donnée physique intéressante à extraire du spectre est la fréquence centrale, correspondant au barycentre du spectre. En pratique, un ensemble de corrections sont nécessaires si l'on veut extraire une donnée pertinente du calcul de la fréquence centrale, nous détaillons cela au prochain chapitre. Considérons ici un spectre idéal ou préalablement corrigé. La fréquence centrale est donc calculée comme suit :

$$CF = f_0 \; tel \; que:$$

$$\frac{1}{f_{min}-f_0}\int_{f_{min}}^{f_0} FFT[I](x,y,z,f).df = \frac{1}{f_0-f_{max}}\int_{f_0}^{f_{max}} FFT[I](x,y,z,f).df \qquad \text{(Eq3.13)}$$

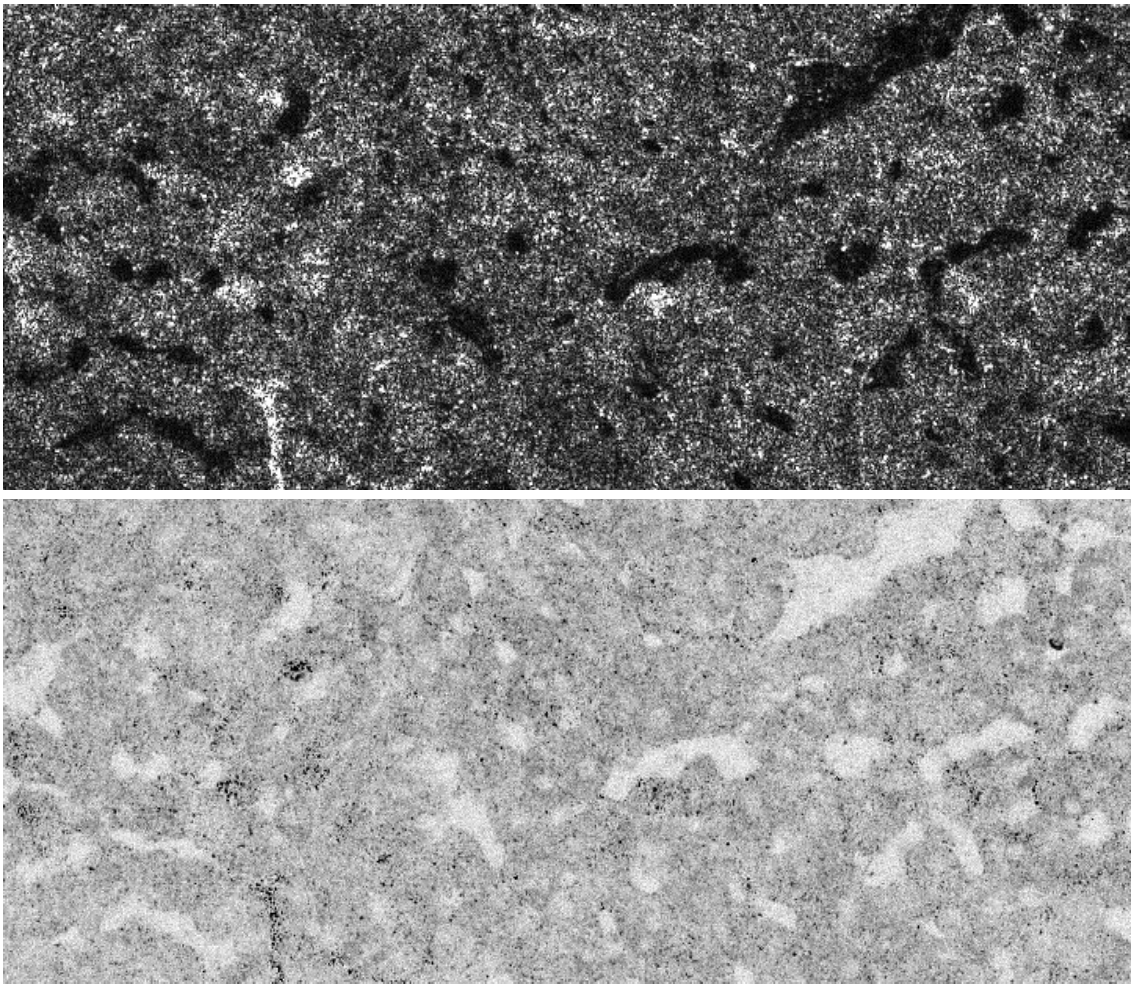

Figure 3.8 : Un exemple de carte de temps caractéristiques (en bas) pour un échantillon de foie comparé au même champ imagé en OCT plein champ (haut) dans un échantillon de foie de rat. L'échelle de gris est exprimée en fréquence de sorte que les faibles valeurs de gris correspondent à des basses fréquences et donc à des temps caractéristiques longs. Champs de 560x240µm.

Il peut être intéressant d'exprimer non pas la fréquence centrale, mais son inverse, ce qui nous donne un temps : le temps caractéristique. Nous nous réfèrerons désormais à cette métrique indifféremment sous le nom de fréquence centrale ou de temps caractéristique.

- Largeur spectrale :

  De même que nous avons défini la fréquence centrale du spectre, nous pouvons calculer l'étendue spectrale caractéristique. Celle-ci donnera une mesure de la pureté spectrale du signal, valeur qui – comme la fréquence centrale – permet d'avoir un indice supplémentaire concernant les comportements dynamiques à l'œuvre dans le tissu. Il se défini de manière triviale :

$$Si\ CF = f_0\ , alors\ BW = \Delta f\ tel\ que:$$

$$\int_{f_0-\frac{\Delta f}{2}}^{f_0+\frac{\Delta f}{2}} FFT[I](x,y,z,f).df = \frac{1}{2}\int_{f_{min}}^{f_{max}} FFT[I](x,y,z,f).df \qquad \text{(Eq3.14)}$$

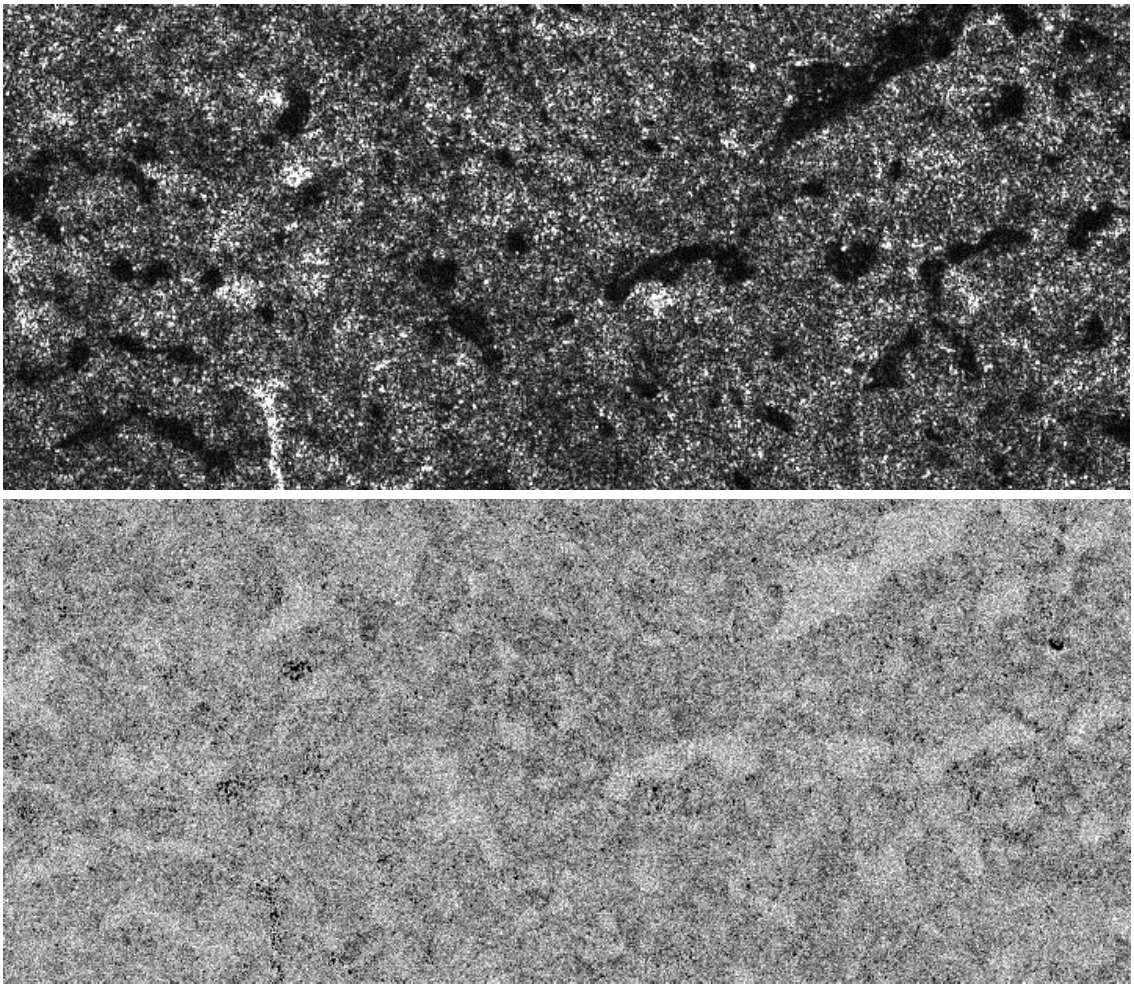

Figure 3.9 : Un exemple de carte des largeurs spectrales (en bas) pour un échantillon de foie comparé au même champ imagé en OCT plein champ (haut) dans un échantillon de foie de rat. L'échelle de gris est exprimée en fréquence. Champs de 560x240µm.

On a alors la largeur spectrale définie comme l'étendue de la bande de fréquence centrée sur la fréquence centrale qui contient la moitié de l'énergie du signal.

Nous avons donc trois métriques dérivées du film d'interférogrammes bruts, la figure 3.11 montre comment elles caractérisent le spectre des signaux temporels. Se pose alors naturellement la question de savoir s'il est possible de composer une représentation de ces trois métriques permettant à l'utilisateur d'avoir un accès rapide aux informations cruciales de l'état du tissu. Nous avons mis en place une représentation colorée basée sur l'espace de couleur HSV (pour Hue Saturation Value) dont une représentation est proposée dans la figure 10. La fréquence centrale est représentée par la teinte (H), la largeur spectrale par la saturation (S) et l'indice métabolique par la valeur (V). Cet espace a un intérêt multiple :

- La composante d'intensité (V) permet de coder une première information de *saillance* visuelle, c'est-à-dire d'attirer l'attention de façon prioritaire sur des ensembles de pixels ou des régions de l'image. Cette première valeur permet également de séparer des *formes sur un fond* par l'écart du niveau d'intensité.
- La composante de teinte (H) est celle à laquelle nous sommes le plus sensible en termes de variations, c'est-à-dire qu'une même variation relative de teinte sera mieux perçue en échelle de couleur qu'en variation d'intensité. Ainsi, il est préférable de réserver ce canal pour le paramètre demandant le plus de *finesse de discrimination*. Mais ce paramètre permet également comme l'intensité de séparer des *formes sur un fond*.
- La saturation (S) complète la valeur de teinte en modérant son expression. En effet, une teinte fortement saturée est facilement séparable d'une teinte voisine, mais à mesure que l'on désature la teinte il devient de plus en plus complexe de séparer des teintes proches. A l'extrême pour une saturation nulle, la teinte n'a aucune signification puisque, quelle que soit la teinte, le pixel apparaitra gris. La saturation joue donc un rôle de *modération* de la teinte.

Il s'en suit que cet espace de couleur est particulièrement approprié à la représentation des métriques présentées en comparaison – par exemple – de l'espace de couleur RGB (cf : figure 3.11). En effet, l'indice métabolique génère une carte d'amplitude de motilité locale (cf : IV.3) et il est approprié que l'utilisateur soit orienté vers les éléments les plus dynamiques de l'image (au sens décrit précédemment). Il est également à noter que les cellules composant le tissu constituent un ensemble d'indice métabolique plus fort que le milieu extérieur. Ainsi les cellules, caractérisées par un fort indice métabolique constituent une figure se détachant d'un fond, ce qui correspond à l'usage de la valeur d'intensité. Parallèlement à cela, la fréquence centrale peut être codée par la valeur de teinte, ce qui permet une distinction plus précise de faibles variations de celle-ci. De plus la représentation de temps caractéristiques ou de fréquences par des échelles de teintes est d'usage courant et intuitif. La largeur spectrale joue vis-à-vis de la fréquence centrale le même rôle que joue la saturation vis-à-vis de la teinte. En effet, pour un spectre très fin (ie : avec une largeur spectrale faible), la fréquence centrale contribue de façon majoritaire au signal, alors qu'à l'opposé, pour un spectre « plat » (ie : avec une largeur de bande infinie) la contribution de la fréquence centrale est exactement la même que n'importe quelle autre fréquence (dans le cas limite la fréquence centrale n'est même plus définie). Pour la teinte il en est de même, lorsque la saturation est maximale, la couleur correspond exactement à la teinte, et à l'inverse pour une couleur désaturée la teinte n'a plus aucun rôle puisque la couleur n'est plus qu'une valeur de gris. La saturation – en prenant l'inverse – est donc un paramètre approprié pour représenter la largeur spectrale.

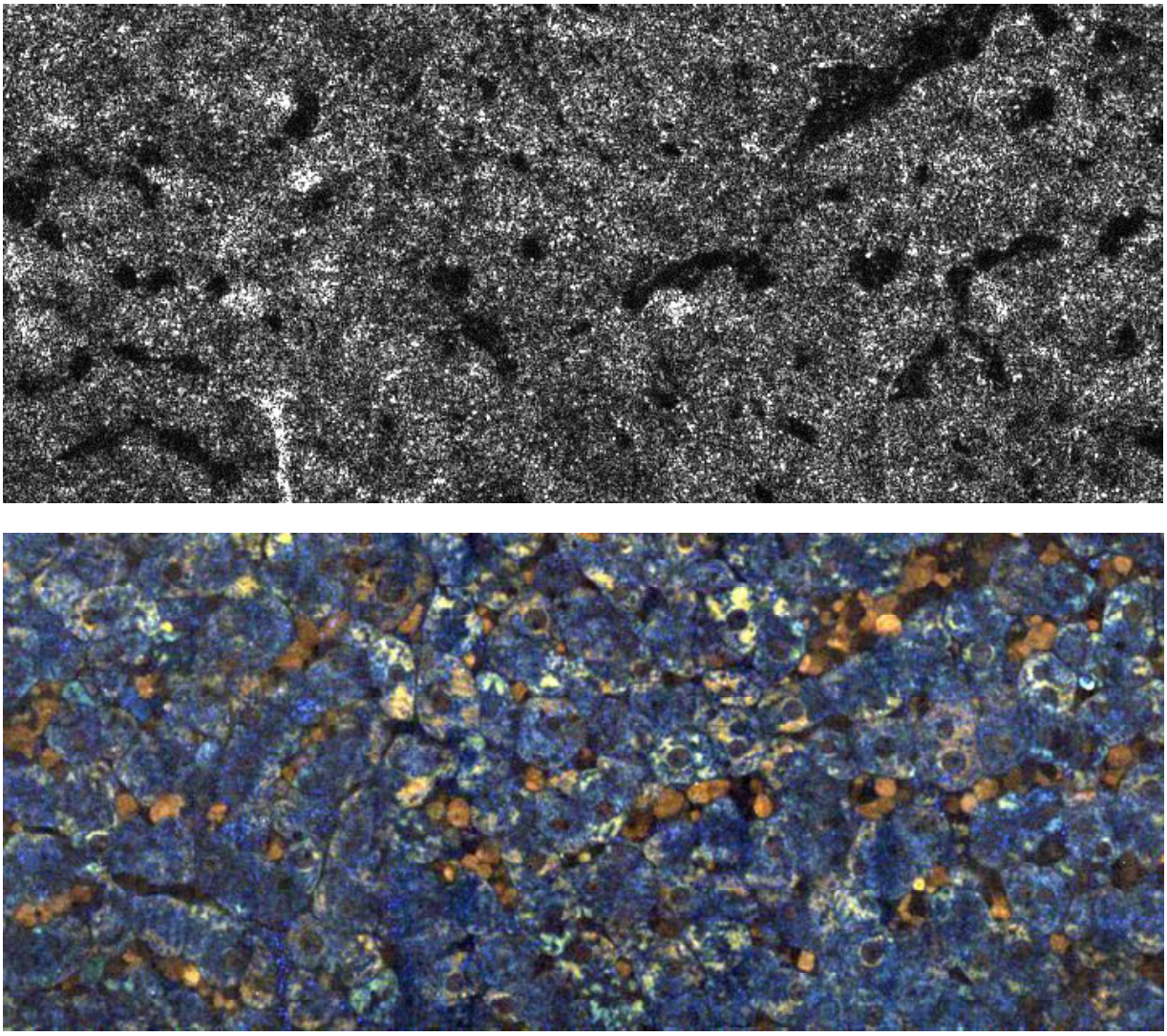

Figure 10 : Un exemple de combinaison en espace HSV des métriques dynamiques (en bas) pour un échantillon de foie comparé au même champ imagé en OCT plein champ (haut) dans un échantillon de foie de rat. L'échelle de couleur est exprimée en fréquence (bleu : basses fréquences [10Hz] ; rouge : hautes fréquences [120Hz]). Champs de 560x240µm.

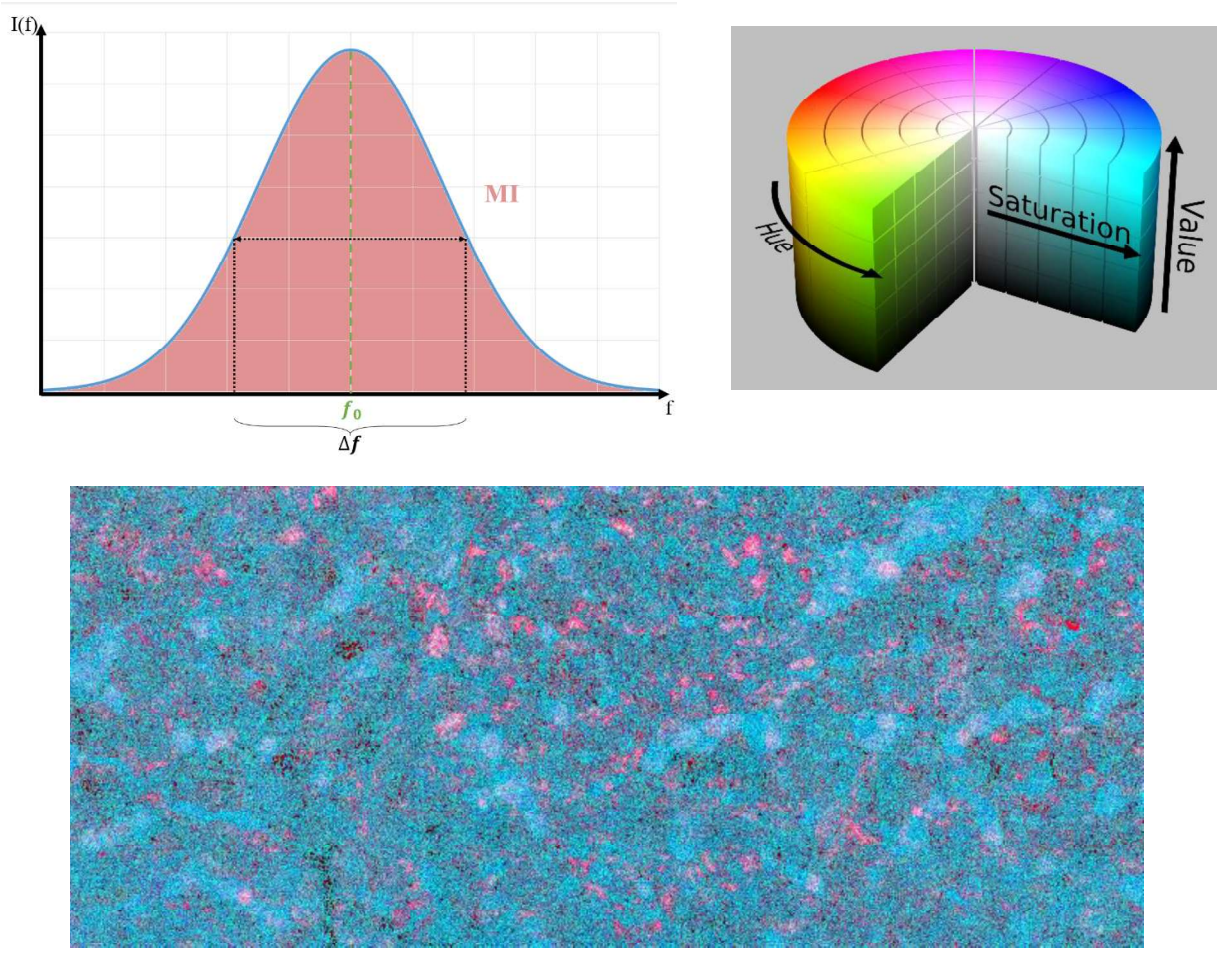

Figure 11 : A gauche – illustration des trois métriques sur un spectre gaussien (courbe bleu). L'indice métabolique est visualisé en rouge comme l'aire sous le spectre (rouge). La fréquence centrale est notée f_0 visualisée en vert avec la largeur spectrale en noir notée Δf. A droite – illustration de l'espace de couleur HSV, nous voyons une représentation en coordonnées cylindriques avec en axe l'intensité (V), en angle la teinte (H) et en rayon la saturation (S). L'image du bas est la combinaison des trois métriques décrites précédemment dans l'espace de couleur RGB pour le même champ que la figure 10, l'interprétation est bien plus complexe et non intuitive. Image de droite adaptée de Wikimedia Commons[41].

Nous avons donc désormais une méthode de traitement des séries temporelles pour en dégager trois valeurs quantitatives caractérisant le comportement local des diffuseurs et une représentation visuelle permettant de synthétiser une image lisible pour un utilisateur. Il n'aura pas échappé à l'œil attentif que les images ainsi constituées – ou pour simplifier les cartes d'indice métabolique – sont exemptes de speckle. En effet, le speckle ne transportant pas d'énergie, ce qui en fait un signal ergodique de moyenne nulle. Rappelons qu'un signal est ergodique si les statistiques d'un ensemble de réalisations peuvent être approchées par les statistiques temporelles d'une seule réalisation quand sa durée tend vers l'infini. Ce qui en pratique pour le speckle se traduit par l'énoncé suivant : les statistiques de la distribution spatiale du speckle sur une image unique peuvent être approchées par les statistiques temporelles des fluctuations du speckle sur un pixel unique pour peu que l'on ait une acquisition suffisamment longue. Cela signifie, dans notre cas, que lorsque l'on calcule chacune de nos trois métriques nous intégrons au cours de la mesure les fluctuations de speckle qui se moyennent à zéro. Cela est à rapprocher de ce que l'on a pu énoncer dès le commencement de ce chapitre (III.3.a) ; en effet pour une phase fluctuant fortement, le terme en cosinus décriera au moins une période, ce qui permet d'avoir la propriété d'ergodicité proposée ci-dessus.

III.5- Conclusion et perspectives

Nous avons débuté ce chapitre sur l'idée centrale de l'imagerie dynamique : le mouvement nous renseigne sur les processus vitaux à l'œuvre dans un tissu. Nous avons montré sur quelles technologies nous nous sommes appuyés pour proposer cette approche (III.2), soulignant au passage l'espoir au début de ce projet que les atouts de l'OCT plein champ permettraient d'accéder à cette mesure indirecte du métabolisme. Cet espoir a été mis à l'épreuve par le constat que la phase nous échappe dès lors que l'on travaille dans un tissu frais (III.3.a). Mais il a été finalement récompensé par les résultats obtenus à l'aide de nos différentes métriques (III.4). Nous avons exposé ici les bases théoriques de l'OCT dynamique avec son versant physique (III.3.b) mais aussi avec une approche orientée vers la biologie (III.3c) et ce qu'elle permet de dire de nos signaux ainsi que de leur origine. A l'heure de conclure ce chapitre, de nombreuses interrogations restent en suspens. Nous avons utilisé différentes appellations pour cette technologie, mais nous n'avons pu nous empêcher de laisser filtrer le terme d'imagerie métabolique, nous apporterons au prochain chapitre les éléments permettant de juger de la légitimité de ce qualificatif. Nous avons également effectué des simulations n'incluant pas le bruit et autres signaux parasites, nous analyserons donc cet impact en détail (IV.2.b). Après les considérations théoriques de ce chapitre, nous allons entrer dans la mise en œuvre de la technique d'OCT plein champ dynamique.

Bibliographie du chapitre III :

1. B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell, Sixth Edition*, Garland Science (2014).
2. M. Guo et al., "Probing the stochastic, motor-driven properties of the cytoplasm using force spectrum microscopy" Cell **158**(4), 822–832 (2014).
3. E. L. Elson and D. Magde, "Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory" Biopolymers **13**(1), 1–27 (1974)
4. H. Chen, E. R. Farkas, and W. W. Webb, "In vivo applications of fluorescence correlation spectroscopy" Methods Cell Biol. **89**, 3–35 (2008).
5. N. T. Shaked, M. T. Rinehart, and A. Wax, "Quantitative phase microscopy of biological cell dynamics by wide-field digital interferometry" in Coherent Light Microscopy, pp. 169–198, Springer (2011).
6. G. Popescu et al., "Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy" Blood Cells. Mol. Dis. **41**(1), 10–16 (2008).
7. J. Lee et al., "Dynamic light scattering optical coherence tomography" Opt. Express **20**(20), 22262–22277 (2012).
8. W. Drexler and J. G. Fujimoto, *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*, Springer Science & Business Media (2008).
9. J. A. Izatt and M. Kulkarni, "Doppler Flow Imaging using Optical Coherence Tomography" in Conference on Lasers and Electro-Optics (1996), paper CPD3, p. CPD3, Optical Society of America (1996).
10. J. A. Izatt et al., "In vivo bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography" Opt. Lett. **22**(18), 1439 (1997)
11. W. Tan et al., "Optical coherence tomography of cell dynamics in three-dimensional tissue models" Opt. Express **14**(16), 7159–7171 (2006).
12. K. Jeong, J. J. Turek, and D. D. Nolte, "Volumetric motility-contrast imaging of tissue response to cytoskeletal anti-cancer drugs" Opt. Express **15**(21), 14057–14064 (2007).
13. G. Farhat et al., "Detecting apoptosis using dynamic light scattering with optical coherence tomography" J. Biomed. Opt. **16**(7), 070505–070505 (2011).
14. A. Oldenburg et al., "Dynamic imaging of in vitro human airway epithelium using optical coherence tomography" in Biomedical Optics and 3-D Imaging (2012), paper BTu4B.6, p. BTu4B.6, Optical Society of America (2012)
15. A. L. Oldenburg et al., "Motility-, autocorrelation-, and polarization-sensitive optical coherence tomography discriminates cells and gold nanorods within 3D tissue cultures" Opt. Lett. **38**(15), 2923–2926 (2013).
16. A. L. Oldenburg et al., "Inverse-power-law behavior of cellular motility reveals stromal–epithelial cell interactions in 3D co-culture by OCT fluctuation spectroscopy" Optica **2**(10), 877–885 (2015).
17. R. M. Pasternack, J.-Y. Zheng, and N. N. Boustany, "Detection of mitochondrial fission with orientation-dependent optical Fourier filters" Cytometry A **79A**(2), 137–148 (2011)
18. T. C. Chen et al., "Spectral Domain Optical Coherence Tomography: Ultra-high Speed, Ultra-high Resolution Ophthalmic Imaging" Arch. Ophthalmol. **123**(12), 1715–1720 (2005)
19. C.-E. Leroux et al., "Elastography of multicellular aggregates submitted to osmo-mechanical stress" New J. Phys. **17**(7), 073035 (2015).
20. Y.-F. Huang et al., "Label-free, ultrahigh-speed, 3D observation of bidirectional and correlated intracellular cargo transport by coherent brightfield microscopy" Nanoscale **9**(19), 6567–6574 (2017)
21. C. D. Saunter et al., "Stochastically determined directed movement explains the dominant small-scale mitochondrial movements within non-neuronal tissue culture cells" FEBS Lett. **583**(8), 1267–1273 (2009).
22. R. B. Bird, W. E. Stewart, and E. N. Lightfoot, *Transport Phenomena*, John Wiley & Sons (2007).
23. "Cellule (biologie)" in Wikipédia (2017).
24. J. Wilson, "Measurements and interpretations of light scattering from intact biological cells" (2007).
25. B. Beauvoit and B. Chance, "Time-Resolved Spectroscopy of mitochondria, cells and tissues under normal and pathological conditions" Mol. Cell. Biochem. **184**(1–2), 445–455 (1998)
26. W. J. Cottrell, J. D. Wilson, and T. H. Foster, "Microscope enabling multimodality imaging, angle-resolved scattering, and scattering spectroscopy" Opt. Lett. **32**(16), 2348–2350 (2007)
27. J. D. Wilson and T. H. Foster, "Characterization of lysosomal contribution to whole-cell light scattering by organelle ablation" J. Biomed. Opt. **12**(3), 030503-030503-3 (2007)
28. J. D. Wilson, W. J. Cottrell, and T. H. Foster, "Index-of-refraction-dependent subcellular light scattering observed with organelle-specific dyes," J. Biomed. Opt. **12**(1), 014010-014010-10 (2007)
29. G. Perkins et al., "Electron Tomography of Neuronal Mitochondria: Three-Dimensional Structure and Organization of Cristae and Membrane Contacts" J. Struct. Biol. **119**(3), 260–272 (1997)
30. T. G. Frey and C. A. Mannella, "The internal structure of mitochondria" Trends Biochem. Sci. **25**(7), 319–324 (2000)
31. M. Yi, D. Weaver, and G. Hajnóczky, "Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal" J Cell Biol **167**(4), 661–672 (2004)
32. H. M. Heath-Engel and G. C. Shore, "Mitochondrial membrane dynamics, cristae remodelling and apoptosis" Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res. **1763**(5), 549–560 (2006)
33. K. Haseda et al., "Significant correlation between refractive index and activity of mitochondria: single mitochondrion study," Biomed. Opt. Express **6**(3), 859–869 (2015)
34. E. C. Dell'angelica et al., "Lysosome-related organelles," FASEB J. **14**(10), 1265–1278 (2000)
35. R. A. Dragovic et al., "Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis" Nanomedicine Nanotechnol. Biol. Med. **7**(6), 780–788 (2011)
36. D. D. Sabatini, K. Bensch, and R. J. Barrnett, "Cytochemistry and Electron Microscopy" J. Cell Biol. **17**(1), 19–58 (1963)

37. R. A. Longoria and G. T. Shubeita, “Cargo Transport by Cytoplasmic Dynein Can Center Embryonic Centrosomes” PLOS ONE **8**(7), e67710 (2013)
38. C. Brunner, C. Wahnes, and V. Vogel, “Cargo pick-up from engineered loading stations by kinesin driven molecular shuttles” Lab. Chip **7**(10), 1263–1271 (2007)
39. D. M. Suter, A. W. Schaefer, and P. Forscher, “Microtubule Dynamics Are Necessary for Src Family Kinase-Dependent Growth Cone Steering” Curr. Biol. **14**(13), 1194–1199 (2004)
40. C. Apelian et al., “Dynamic full field optical coherence tomography: subcellular metabolic contrast revealed in tissues by interferometric signals temporal analysis” Biomed. Opt. Express **7**(4), 1511 (2016)
41. “HSL and HSV” in Wikipedia (2017).

Chapitre IV : Application de la tomographie optique plein champ dynamique

"'Si ton œil était plus aigu tu verrais tout en mouvement"

Friedrich Nietzsche in Fragments posthumes

IV.1- Introduction……75
IV.2- Mise en œuvre instrumentale……76
IV.2.a- L'imagerie dynamique en pratique……76
IV.2.b- Analyse des bruits et signaux parasites……80
IV.2.c- Vers une mesure *in vivo*……83
IV.3- Corrélats biologiques ……86
IV.4- Album commenté……89
IV.4.a- Foie……89
IV.4.b- Système immunitaire……91
IV.4.c- Intestin……92
IV.4.d- Pancréas……93
IV.4.e- Cerveau……95
IV.4.f- Sein……98
IV.5- Discussion……99
IV.6- Conclusion et perspectives……100

IV.1- Introduction

Fort des concepts exposés au chapitre précédent, nous poursuivons ici l'exposé de la modalité dynamique de la tomographie optique plein champ. Nous explorerons dans ce chapitre les aspects instrumentaux et expérimentaux liés à cette technologie. De l'analyse des sources de signaux parasites à l'exposé des corrélats biologiques de l'imagerie métabolique, nous verrons le pendant expérimental du chapitre précédent.

La citation de Nietzsche ci-dessus se prête tout particulièrement à ce que nous allons voir, en effet, par-delà le signal relié au métabolisme (comme nous le verrons au IV.3), le mouvement se trouve partout. Il se trouve dans le mouvement chaotique des débris cellulaires lors de mauvais conditionnements des pièces opératoires (IV.2.a), dans les bruits parasites (IV.2.b) ainsi que dans les rythmes propres au corps lorsque la mesure est effectuée dans un contexte *in vivo* (IV.2.c). Nous nous écartons ainsi ici de la simplification du modèle (III) pour aller vers la complexité de l'expérience.

Dans ce chapitre nous mettrons en lumière les aspects expérimentaux liés à cette approche et montrerons sur quels corrélats biologiques nous nous appuyons pour affirmer qu'il s'agit d'une mesure métabolique locale. Cela fait, nous commenterons une sélection de résultats choisis pour illustrer les avantages et limites de la méthode, notamment dans le cas de cancer chez le petit animal et chez l'humain.

IV.2- Mise en œuvre instrumentale

L'application des méthodes d'imagerie dynamique exposées au chapitre précédent nécessitent un ensemble de précautions et de bonnes pratiques pour donner des résultats optimaux que nous prendrons le temps de décrire. Nous donnerons quelques points de repères en termes de grandeurs typiques et nous ferons le lien avec les modèles précédemment exposés pour en évaluer les performances. C'est dans cette partie également que nous détaillerons selon quels guides éthiques les expériences impliquant des tissus biologiques ont été conduites. Dans une deuxième sous-section nous détaillerons l'ensemble des sources des signaux parasites et des bruits et nous proposerons des méthodes permettant une réduction de ceux-ci. Puis nous clôturerons cette partie avec une ouverture vers une application *in vivo* de l'imagerie dynamique et les développements instrumentaux mis au service de cet objectif.

IV.2.a- L'imagerie dynamique en pratique

Nous avons détaillé au chapitre II (II.3.b) le dispositif expérimental d'OCT plein champ avec lequel nous avons réalisé les expériences d'imagerie dynamique dont nous parlerons plus loin (IV.3 et III.4). La mise en œuvre expérimentale de ce système d'imagerie demande à être explicitée. Commençons par l'élément central à la procédure d'imagerie : l'échantillon. Suite au chapitre précédent, il n'est pas nécessaire de rappeler que les tissus imagés avec l'OCT plein champ dynamique doivent être *frais*. Cette fraicheur du tissu est capitale, en effet, nul ne pourrait attendre une image d'activité cellulaire là où il n'y a que du tissu mort. Cette mort tissulaire est exposée plus en profondeur plus loin (IV.3), mais nous pouvons dès à présent donner une idée claire de ce que cela présuppose en termes de précautions à prendre en pratique :

- Extraction de la pièce :
  Différentes procédures chirurgicales peuvent être employées pour obtenir l'échantillon qui subira l'examen par OCT plein champ ; de l'extraction d'une pièce opératoire au scalpel à des procédures utilisant un trocart pour extraire une biopsie. Nous avons remarqué que la blessure infligée au tissu par cette procédure peut être à l'origine d'une perte d'indice métabolique se propageant sur plusieurs couches cellulaires. Nous avons remarqué une dépendance de ce phénomène avec le type de tissu, que nous attribuons de façon hypothétique aux propriétés mécaniques de ceux-ci ; et une dépendance également avec la violence de la procédure. En effet une coupe au scalpel semble, de par sa précision, moins endommager le tissu qu'une coupe par cisaillement brutale comme réalisée par une paire de ciseaux ou par un trocart. La manipulation de la pièce à l'aide de pinces peut également dégrader la zone de contact. Nous n'avons pas exploré les causes et mécanismes de ces phénomènes, mais nous pouvons proposer deux observations basées sur notre expérience empirique. Tout d'abord, plus un tissu est mou, et plus il semble résistant aux effets de coupe. Ensuite, une coupe nette semble moins traumatisante pour le tissu qu'une coupe impliquant de forts cisaillements (impliquant des compressions du tissu avoisinant).

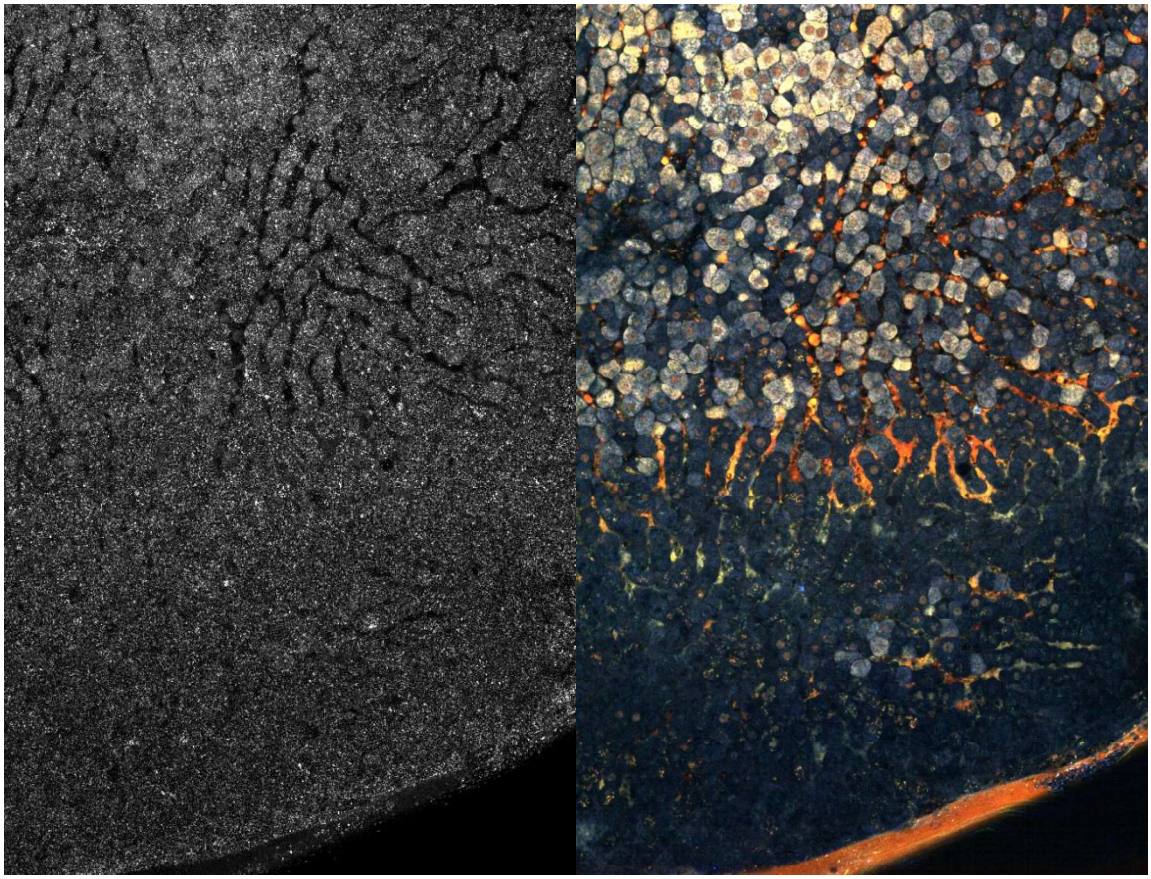

Figure 4.1 : Tissu de foie blessé par une coupe aux ciseaux, OCT plein champ standard à gauche image métabolique à droite. La coupe est située en bas de l'image, nous voyons une activité normale dans la partie haute de l'image (à l'opposé de la coupe) puis une perte de la majorité du signal dynamique à environs 250 µm de la blessure. Nous pouvons noter que les capillaires ne sont plus visibles dans la zone traumatisée sur l'image d'OCT plein champ (capillaires visibles dans la partie supérieure sous la forme de ramifications sombres) et qu'ils apparaissent en couleurs chaudes dans l'image dynamique. Cet effet est causé par l'apoptose des hépatocytes qui génère un gonflement (swelling en anglais) contractant les capillaires. Le signal à l'intérieur des capillaires en imagerie dynamique provient du flux de matériel intracellulaire relâché lors de l'éclatement des cellules. Champs de 555 µm par 845 µm.

- Conservation et transport de l'échantillon :
  Après l'extraction, le tissu doit être acheminé jusqu'à l'emplacement du système d'imagerie. Ce trajet nécessite une attention particulière portée à la conservation de l'échantillon pour éviter une mort tissulaire précoce. Il faut pour cela éviter deux phénomènes : la déshydratation du tissu et le choc osmotique. La déshydratation semble être une évidence, un tissu desséché va évidemment présenter des signes d'une mort précoce. Nous pouvons donner ici quelques échelles de temps permettant de fixer quelques idées concernant la contrainte que cela représente. En effet, le temps de déshydratation – bien que dépendant légèrement du tissu – est de l'ordre de quelques minutes. Cela permet de questionner les pratiques classiques de conservation et de transport des pièces opératoires qui se font à l'air libre, ce qui est incompatible avec un examen en imagerie dynamique sauf recoupe éventuelle de la pièce. Le transport et la conservation doit donc nécessairement se faire dans un milieu aqueux. C'est ici que peut intervenir le second phénomène à éviter : le choc osmotique. En effet, le milieu interne des cellules est régulé pour maintenir une certaine concentration ionique. Si le milieu de conservation est déséquilibré par rapport aux concentrations intracellulaires typiques, les

cellules vont naturellement gonfler (par introduction d'eau dans le cytoplasme) pour rétablir l'équilibre, ce qui va entrainer rapidement une mort cellulaire généralisée (cf : figure 4.2). Pour éviter ces phénomènes nous avons utilisé systématiquement une solution de PBS (solution tampon phosphate salin) pour transporter et conserver les échantillons. Précisons tout de même que nous parlons de conservation brève, puisque dans ces conditions, les tissus *ex vivo* ne peuvent survivre sur des durées prolongées. Les durées de conservations typiques sont variables selon le type de tissu, mais nous observons pour les cas que nous avons expérimentés (foie, cerveau, rate, pancréas, thymus, intestin, rétine, rein, poumons, muscle, ganglion, vessie, prostate, peau) une bonne tenue de l'échantillon plusieurs heures après extraction. Nous recommandons bien sûr un délai minimal (inférieur à trois heures dans l'idéal), bien que nous n'ayons pas réalisé une étude exhaustive de viabilité sur l'ensemble des tissus ni dans quelle mesure certains phénomènes biologiques sont plus sensibles que d'autres à ce délai d'attente.

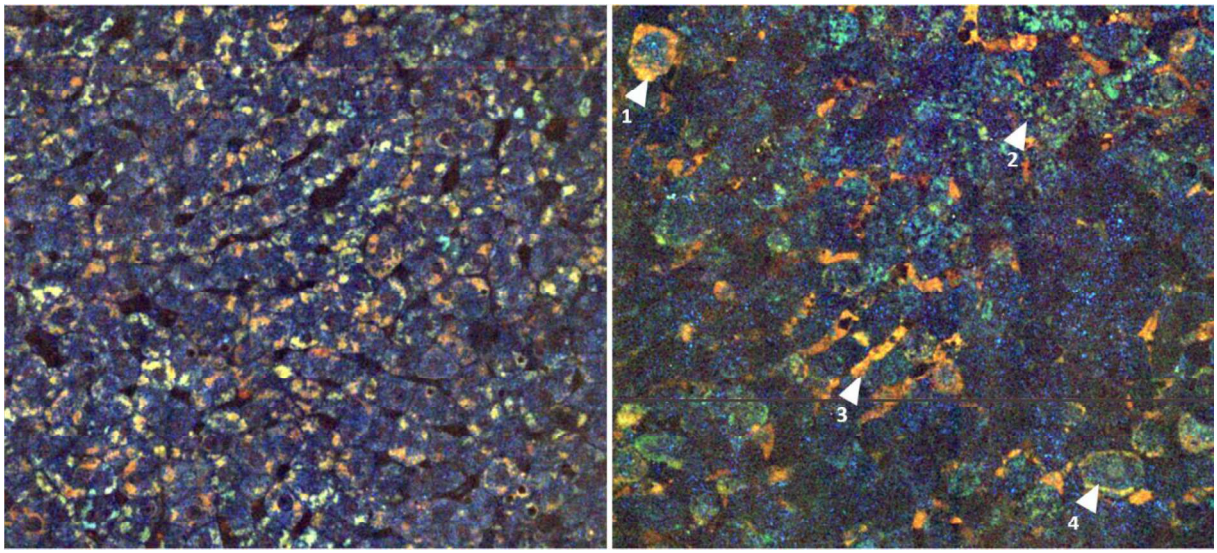

Figure 4.2 : A gauche – image métabolique d'un foie de rat sain conservé dans une solution de PBS. L'architecture est typique avec une forte densité d'hépatocytes et une irrigation du tissu par des capillaires sanguins en arborescence (en noir). A droite – image métabolique d'un échantillon de foie de rat sain conservé dans de l'eau déminéralisée. Nous observons une absence de signal dans une grande partie de l'image, signe de mort cellulaire, en particulier nous voyons (1) une cellule en cours d'éclatement ; (2) des régions du tissu composés de débris cellulaires ; (3) les capillaires sont chargés de matériel cellulaire en suspension (comme vu à la figure 4.1) ; (4) une cellule en gonflement, la membrane cellulaire a cette aspect puisqu'elle est en expansion au cours de l'acquisition.

- Conditionnement de l'échantillon :

  Nous avons déjà présenté le système de porte-échantillon précédemment (II.3.b). La mise en place de l'échantillon dans ce dispositif nécessite parfois une recoupe s'il est plus grand que le volume utile de la chambre (pour rappel : cylindre de 14 mm de rayon pour 10 mm de hauteur maximale). L'ajustement de la hauteur de la chambre se fait via un piston actionné par rotation de la base du porte-échantillon. L'échantillon est donc comprimé légèrement par cet ajustement, ce qui permet un aplanissement de la surface à imager. Il est néanmoins recommandé d'exercer une contrainte minimale pour éviter la dégradation de l'échantillon ou la rupture de la fenêtre d'imagerie. Il est à signaler que nous imageons à température ambiante. Nous avons effectué des tests d'imagerie à 37°C pour être au plus proche des conditions normales du tissu.

Néanmoins les fluctuations d'indice optique (notamment dans l'huile de contact) généraient des perturbations trop importantes pour mesurer un quelconque écart d'activité significatif vis-à-vis d'une condition d'imagerie normale (à température ambiante). Ces résultats non significatifs ne sont pas présentés ici. Nous nous sommes donc limités aux expériences menées à température ambiante.

- Procédure d'imagerie :
  La suite de la procédure d'imagerie est entièrement supervisée par le logiciel développé par LLTech qui permet : une initialisation du système ; une acquisition macroscopique de l'échantillon ; une exploration de l'échantillon en trois dimensions en OCT plein champ ; et gère l'acquisition des images d'OCT plein champ et des images brutes dynamiques avec possibilité de scanner l'échantillon pour reconstruire des surfaces bien plus grande qu'un champ de vue unique. Les dernières versions permettent également une prévisualisation des cartes d'indice métabolique lors de l'exploration et une acquisition de celles-ci sur de grands champs.

Maintenant que nous avons mis en lumières quelques points clefs de la procédure d'imagerie dynamique, nous pouvons énoncer quelques grandeurs typiques.

Paramètre	Valeur typique	commentaire
Temps d'acquisition	20 mm²/min	En considérant une fréquence d'acquisition standard à 300Hz et un temps d'acquisition pour un champ unitaire de 3 secondes (permet de capturer les variations lentes ; valeur standard)
Indice métabolique	1,3 < RSB < 8	L'indice métabolique étant exprimé en unités arbitraires, le rapport signal à bruit (RSB) permet d'évaluer l'intensité typique du signal.
Fréquence centrale	1 – 130 Hz	Variable selon le tissu
Largeur spectrale	30 – 90 Hz	-

Tableau 4.1 : Grandeurs typique en imagerie dynamique.

Evoquons enfin quelques considérations éthiques concernant les échantillons utilisés au cours de ces travaux de thèse. En ce qui concerne les études sur les rats et souris, les animaux ont été hébergés individuellement pour les rats et par groupes de six pour les souris avec un accès libre à l'eau et à la nourriture dans un environnement contrôlé en température avec un cycle diurne artificiel de 12h/12h. Les expérimentations animales ont été réalisées conformément aux recommandations institutionnelles pour l'usage expérimental des animaux et conformément aux lois et directives nationales et internationales (directives 87-848, 19 octobre 1987, ministère de l'agriculture et de la forêt, service de la santé et de la protection animale). Pour les tests précliniques chez l'humain, nous avons obtenu le consentement écrit des patients et nous nous sommes conformés aux procédures standards imposées par chaque partenaire hospitalier avec les autorisations correspondantes.

Nous avons donc vu quelques considérations pratiques concernant la mise en œuvre expérimentale de cette méthode d'OCT plein champ dynamique. Cependant, en l'état, il est peu probable qu'une image de qualité soit au rendez-vous. En effet, notre signal est dérivé de faibles déplacements de structures

faiblement diffusantes et nous sommes donc particulièrement sensibles à tout un ensemble de signaux parasites et de bruits qu'il convient d'analyser et de neutraliser dans la mesure du possible.

IV.2.b- Analyse des bruits et signaux parasites

L'ensemble constitué par le système et l'échantillon comporte de nombreuses sources de signaux ; certains sont utiles alors que d'autres viennent parasiter la mesure. Nous détaillerons ici l'ensemble des bruits principaux venant perturber la mesure du signal utile. Parmi ceux-ci nous avons :

- Le bruit de photons :
  Nous avons déjà évoqué le bruit de photons précédemment (II.3.b), en ce qui concerne l'imagerie dynamique, ce bruit a une statistique Poissonnienne et constitue un bruit intrinsèque à la mesure. Nous pouvons augmenter le rapport signal à bruit comme proposé précédemment en se plaçant proche de la saturation du capteur (le RSB croit en $\sqrt{N_{ph}}$). Nous pouvons également réduire l'impact de ce bruit en effectuant une moyenne de plusieurs images si la dépendance temporelle des signaux le permet (sacrifice des hautes fréquences).
- Bruit causé par l'instabilité temporelle aléatoire globale de la réponse du capteur :
  En suivant l'évolution de l'intensité moyenne des images interférométriques au cours du temps, nous pouvons remarquer une importante fluctuation. Cette fluctuation n'est pas d'origine biologique, mais provient de l'instabilité temporelle globale du capteur. Cette instabilité provoque une diminution du RSB en ajoutant un fond constant aux images dynamiques et provoque une surestimation des basses fréquences, ce qui conduit à un décalage de la fréquence centrale mesurée vers les basses fréquences. Comme ces fluctuations ne sont pas répétables d'une mesure à l'autre, le fond constant change d'une image dynamique à l'autre, ce qui rend toute comparaison quantitative impossible. Pour supprimer cet impact aux conséquences lourdes, nous avons besoin de faire appel à une hypothèse :

  $$C1 : \forall t, \iint \alpha(x,y,t).\cos\big(\varphi(x,y,t)\big).dx.dy = 0$$

  Cette hypothèse est supportée par les remarques que nous avons exposées au chapitre précédent (III.3.b) qui valident le fait que l'énergie globale de la figure d'interférence est nulle. Sous cette condition C1 nous pouvons alors normaliser chaque image temporelle par le niveau moyen sans biaiser la mesure dynamique.
- Bruit dynamique fixe de la caméra :
  Le capteur CMOS de la caméra possède une architecture d'adressage des pixels qui comporte un ensemble d'amplificateurs. Ces amplificateurs peuvent, à cause de leur valeur de gain qui varie de l'un à l'autre, générer une inhomogénéité de la réponse. En effet, nous pouvons voir cela particulièrement lorsque l'on réalise une image dynamique en l'absence d'échantillon avec des lignes ou des colonnes plus brillantes que d'autres, ce qui donne un aspect tramé à l'image (cf : figure 4.3). Une partie de ce signal parasite possède une dynamique propre qui se conserve dans le temps, nous parlons de bruit dynamique fixe pour indiquer que par-delà les fluctuations, le comportement reste identique d'une image dynamique à l'autre. Ainsi, il suffit de capturer la réponse de la caméra en l'absence d'échantillon dans les mêmes conditions d'acquisition que celles qui seront utilisées dans l'expérience pour ensuite retrancher sa densité spectrale de puissance à celle du film interférométrique acquis. Un filtrage dans l'espace de Fourier peut

aussi être envisagé (suppression des lignes / colonnes constantes), mais risque d'introduire des erreurs de reconstructions.

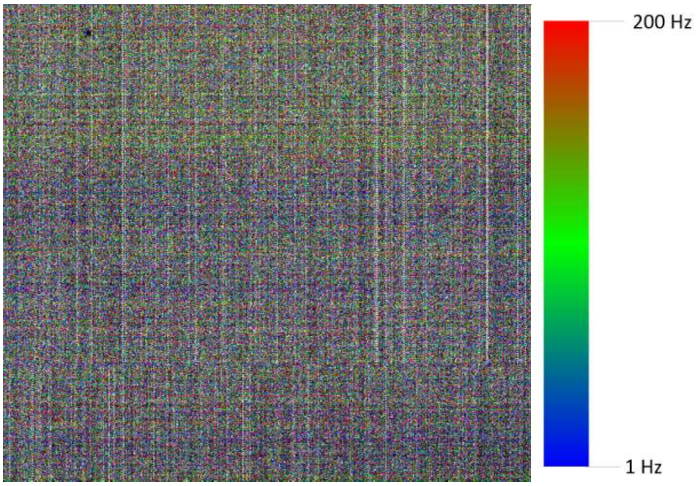

Figure 4.3 : Image dynamique du bras de référence seul en l'absence d'échantillon. On peut observer le signal parasite introduit par la caméra avec un aspect tramé de l'image. Cette image contient une partie qui se conserve d'une acquisition à l'autre (bruit dynamique fixe) et une autre variable (bruit dynamique aléatoire).

- Bruit aléatoire de la caméra :
  Le phénomène décrit pour le bruit dynamique fixe possède aussi une composante aléatoire, qui ne se conserve pas d'une image à l'autre. Cette fluctuation aléatoire peut être amoindrie en moyennant plusieurs images dynamiques.

Avant de s'aventurer vers les sources de bruits dépendantes de l'échantillon, évaluons le niveau de bruit induit par la caméra et comparons ce niveau aux signaux typiques observés en imagerie dynamique. Lorsque l'on utilise le système sans échantillon, seul le bras de référence renvoie de la lumière de façon homogène, cela permet de caractériser le détecteur dans les conditions standard d'utilisation sans signal utile. Pour une illumination proche de la saturation du détecteur (condition expérimentale classique) nous avons un niveau de bruit sur la caméra (total) de 2,3 pour un niveau moyen de 1600 avec un bruit de photons comptant pour 1,2 (inclus dans le bruit total de la caméra). En comparaison, les signaux enregistrés en imagerie métabolique sont de l'ordre de 8 pour les mêmes conditions, ce qui permet d'évaluer le rapport signal à bruit autour de 3,33. Voyons maintenant les signaux parasites introduits par l'échantillon :

- Bruit mécanique :
  Les bruits et signaux parasites précédents entraient en jeu au niveau de la caméra ; ici, l'origine de cette perturbation se trouve au niveau de l'échantillon. Les signaux parasites mécaniques sont multiples et constituent une menace sérieuse pour cette méthode. En effet, la sensibilité est telle qu'il suffit de très faibles perturbations mécaniques pour fortement altérer l'image dynamique. Voyons tout d'abord l'impact d'une modulation mécanique locale sur l'indice métabolique :
  Supposons une modulation mécanique axiale d'amplitude – très grande devant le déplacement des diffuseurs – qui varie dans le temps selon $A_{méca}(t)$. Le signal sera donc :

$$I(\mathrm{x},\mathrm{y},z_0,\mathrm{t}) = I_0 + 2a_O(x,y,z_0 + A_{méca}(t),t)a_R(x,y,t).\cos(4\pi\frac{\delta\mathrm{z}(\mathrm{t})+A_{méca}(t)}{\lambda_0}) \qquad \text{(Eq15)}$$

Si l'on suppose que le tissu est suffisamment homogène pour que l'amplitude de rétrodiffusion reste identique au cours de la modulation mécanique, on a uniquement un impact du bruit mécanique sur le terme en cosinus. En prenant la transformé de Fourier temporelle de (Eq15) on obtient un spectre qui va être la somme du spectre du signal utile et du spectre du bruit. L'indice métabolique peut donc s'écrire :

$$MI(x,y) = \int [E_{dyn}.S_{dyn}(f) + E_{méca}.S_{méca}(f)]\,df \quad \text{(Eq16)}$$

Avec E l'énergie du signal dynamique ou de la perturbation mécanique et S le spectre respectif. Or, comme nous l'avons évoqué, pour des perturbations grandes devant le mouvement des diffuseurs, $E_{méca} \gg E_{dyn}$ donc nous retrouvons l'image d'amplitude (l'image OCT plein champ) mélangée avec l'image dynamique non bruitée avec une prédominance de la première sur la seconde. Sur cette base se déploie un ensemble de stratégies propres à chaque type de perturbations mécaniques :

- Perturbations mécaniques localisées en temps :
  Ce type de perturbation brève peut être repéré en mesurant la fluctuation d'intensité globale de l'interférogramme d'une image à l'autre. La perturbation sera ainsi localisée dans le temps et il suffit de retirer les quelques images concernées et de combler ce manque par interpolation.
- Perturbations mécaniques localisées en fréquence :
  Pour une oscillation mécanique continue au cours de l'acquisition (comme une vibration induite par une ventilation par exemple), le spectre de la perturbation sera très fin. En analysant la distribution spatiale d'énergie pour chaque fréquence nous pouvons identifier celles qui correspondent à la fréquence d'oscillation. En effet : elles contiendront une énergie globale très supérieure au reste du spectre et une distribution fortement corrélée à l'image d'OCT plein champ, ce qui signifie une présence de speckle que nous pouvons détecter simplement en mesurant l'énergie portée par les hautes fréquences spatiales de cette distribution.

Pour qualifier ce bruit mécanique, nous pouvons placer l'interface entre la fenêtre de silice et l'air, pour un porte échantillon vide, au plan focal de l'objectif. Nous observerons alors des franges d'interférences car les réflecteurs du bras objet et du bras de référence forment un angle. La différence de marche associée à l'interfrange étant donnée par la longueur d'onde centrale de la source, nous pouvons déduire des fluctuations de la position des franges la stabilité du système. Plus l'angle entre les réflecteurs est faible, plus l'interfrange sera grand, ce qui rendra la mesure des perturbations mécaniques plus précises.

- Flux de particules dans l'échantillon :
  L'échantillon peut contenir des canaux, des capillaires ou des crevasses dues aux irrégularités de la pièce. Du fait de sa conservation en phase liquide, l'échantillon est entouré de milieu aqueux et potentiellement imprégné de ce dernier. Lorsque l'on observe l'échantillon, les espaces libres que nous avons évoqués – chargés de particules flottant librement – vont produire de fortes modulations du signal. Le flux de particules va en effet, de par son amplitude de

rétrodiffusion et son amplitude de mouvement importante, créer un indice métabolique fort qui n'a strictement aucun lien avec l'activité locale. Pour s'affranchir de ce signal, nous pouvons nous tourner vers l'image d'OCT plein champ puisque ces espaces libres sont bien moins diffusants que le tissu, ils apparaitront avec une très faible intensité. Par un simple seuillage que l'on reporte à l'image d'indice métabolique nous pouvons supprimer ce type de perturbations. Autrement, si le signal correspondant au flux est supérieur au signal issu des cellules les plus actives, nous pouvons effectuer un simple seuillage pour enlever les pixels intenses appartenant au flux.

- Cas de la dérive ou de la relaxation de l'échantillon :
  L'échantillon peut, à cause de ses propriétés mécaniques, glisser au cours de l'acquisition, créant du même coup une modulation lente sur l'ensemble de l'échantillon. Si cette modulation est trop importante, comme signalé plus haut pour le bruit mécanique, l'image OCT se présentera superposée à l'image dynamique. De la même façon, à la suite de l'application de l'échantillon contre la fenêtre de silice, ce dernier peut subir une relaxation lente ayant les mêmes conséquences. Dans le premier cas nous pouvons d'un point de vue expérimental proposer un matériau pour le porte échantillon qui permet une meilleur adhérence du tissu. Pour le second processus – la relaxation – nous ne pouvons que recommander de réaliser une compression minimale de l'échantillon. Il existe aussi des méthodes de traitement *a posteriori* pour s'affranchir de l'impact de telles problématiques. Nous pouvons réduire le temps d'acquisition (et donc limiter notre exploration des basses fréquences) de sorte que les processus décrits précédemment soient négligeables en comparaison des processus dynamiques à l'œuvre. Gardons néanmoins à l'esprit que tout processus dynamique plus lent que cette limite sera ainsi perdu.

Nous avons donc mis en lumière plusieurs sources de bruits et de signaux parasites ainsi que des méthodes tantôt instrumentales, tantôt effectuée en post-traitement pour limiter leur impact et accéder à une image dynamique de bonne qualité. Les bruits originaires de l'échantillon (bruits mécaniques, flux de particules, mouvement intrinsèque…) ont une place particulièrement importante dans cette liste, et ils constituent une limite évidente à l'application de l'imagerie dynamique à un contexte *in vivo*. C'est pourtant un défi que nous avons tenté de relever.

IV.2.c- Vers une mesure *in vivo*

Compte tenu de notre problématique, on ne peut s'empêcher de rêver à de futures applications d'endoscopie utilisant l'OCT plein champ et l'imagerie dynamique. Des travaux ont été menés dans cette direction, avec pour l'instant une visée exploratoire. Différentes approches ont été proposées avec des conceptions basées sur un endoscope rigide[1,2], ou sur l'utilisation de fibres optiques[2–5]. Un premier pas dans cette direction peut être effectué en évaluant l'impact du contexte *in situ* sur cette modalité d'imagerie métabolique. La crainte principale concernant le passage de l'imagerie *ex vivo* à l'imagerie *in vivo* reposait sur la présence de mouvements induits par la respiration du sujet et par la propagation d'ondes mécaniques d'origine cardio-vasculaires. Nous avons pu montrer qu'il est possible de réaliser une image dynamique dans un tel contexte à l'aide de quelques modifications expérimentales. Nous allons détailler ces résultats dans cette section.

Nous allons tout d'abord montrer les résultats obtenus sur des larves de poisson-zèbre (Danio rerio) à l'aide du dispositif expérimental classique présenté au chapitre II (II.3.b) puis nous exposerons les développements en vue d'une utilisation dans un contexte plus large.

La larve de poisson-zèbre, est un modèle animal couramment utilisé en laboratoire pour les facilités d'utilisations qu'il permet. Nous avons pu effectuer des tests sur quelques larves ayant reçues de l'α-bungarotoxine et maintenus dans un gel d'agar. L'α-bungarotoxine est une neurotoxine permettant d'inhiber le couplage neuromusculaire, engendrant ainsi une paralysie totale. Il est à noter que le système cardiovasculaire reste actif car il dispose d'un fonctionnement autonome. Ce dispositif permet donc de maintenir en vie les larves tout en supprimant les déplacements. Cette condition a permis de tester l'impact des flux sanguins sur l'imagerie métabolique. Ce que nous observons est bien sûr un signal très important au sein des vaisseaux, avec un impact double :

- Les pulsations cardiaques induisent du bruit mécanique. Cependant nous remarquons que cette composante est suffisamment localisée autour des vaisseaux.
- Le flux sanguin présent dans une couche supérieure à la tranche d'observation (selon l'axe optique) vient perturber le signal mesuré à sa verticale. Cet effet provient d'une perturbation importante du signal d'interférence (provenant de la tranche d'observation) par les objets des couches supérieures. Dans le cas de tissus *ex vivo*, les couches supérieures restent statiques aux échelles de temps d'observation et sensiblement homogènes. Ce dernier point mérite un commentaire ; en effet, pour un voxel donné et une ouverture numérique donnée, la surface occupée par le front d'onde (provenant du voxel) va croitre avec la propagation dans le tissu vers l'objectif du système. Ayant cela à l'esprit, nous pouvons aisément constater que plus un plan est éloigné du voxel, plus sa contribution à la perturbation du front d'onde sera homogénéisée sur une surface importante. Dans le cas d'un tissu *in vivo*, malgré cet effet, les flux sanguins contribuent notablement à perturber le signal, ce qui est visible lors de l'acquisition d'une image dynamique 3D (une coupe est présentée à la figure 4.4).

Mais malgré l'impact du flux sanguin, les cellules restent visibles dans le même champ. Ce résultat encourageant nous permet de nourrir l'espoir d'une application future de l'OCT plein champ dans un contexte *in vivo*.

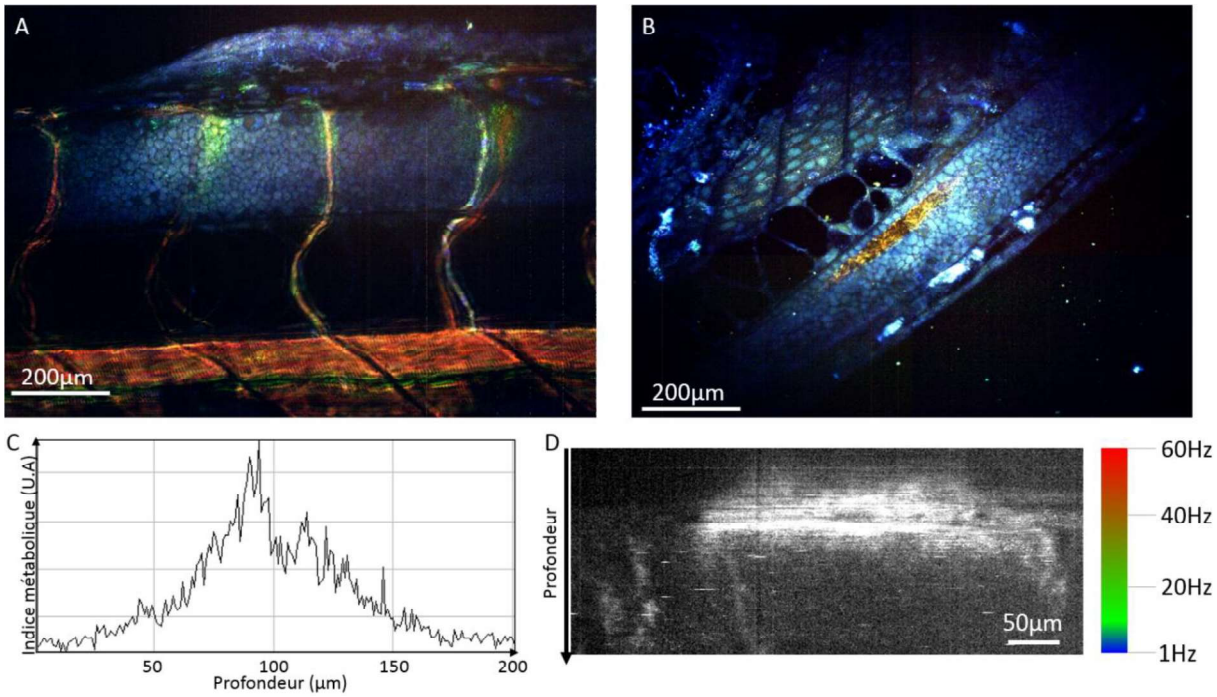

Figure 4.4 : Larve de poisson-zèbre imagé en OCT plein champ dynamique. (A) tissu irrigué par plusieurs capillaires sanguins avec un vaisseau principal présent en bas de l'image. On remarque du bruit mécanique (en vert proche des vaisseaux) induit par les pulsations cardiaques, mais qui ne masque pas le signal issu des cellules. (B) montre une partie de la larve où l'on peut observer du transport vésiculaire dans le liquide cérébrospinal (en jaune sur l'image), ce mouvement ne perturbe quasiment pas le signal issu des cellules à proximité. Nous voyons également sur (B) l'impact des vaisseaux sanguins hors plan (taches brillantes). (C) présente cet impact avec une coupe verticale d'un vaisseau sanguin. (D) illustre cet impact avec un tronçon de vaisseau sanguin visible.

Il n'aura pas échappé au lecteur que le contexte clinique standard, qu'il s'agisse d'un bloc opératoire ou d'un laboratoire de pathologie, est bien éloigné de l'expérience présentée précédemment. Pour se rapprocher de ce type de contexte, un premier développement instrumental a été réalisé, consistant en l'ajout d'une pièce spécifique au niveau de l'objectif du système. Il est important de remarquer que ces développements ne constituent que les premiers pas d'une approche qui a vocation à devenir de plus en plus intégrée et ergonomique. Nous présentons un visuel du module *in vivo* à la figure 4.5, cette pièce fixée au châssis de l'appareil permet de:

- Fixer la distance entre l'objectif du bras objet et la fenêtre de silice, fixant du même coup la profondeur d'imagerie.
- Maintenir l'huile de contact entre l'objectif et la fenêtre.
- Réaliser une aspiration permettant de solidariser la pièce à imager et le système.

Ce dernier point est de loin le plus important, puisque c'est par cette aspiration que les perturbations mécaniques telles que la respiration ou les mouvements naturels de la cible pourront être fortement réduits (d'autant plus que nous restons proche de la surface). Comme nous avons vu précédemment que les flux sanguins n'empêchent pas l'imagerie dynamique, nous espérons prochainement passer le cap de l'imagerie *in vivo* sur une cible non paralysée. Des premiers tests ont étés réalisés sur l'épiderme humain, mais le signal des cellules (kératinocytes) est très faible (même *ex vivo*) rendant la discrimination du bruit mécanique compliqué.

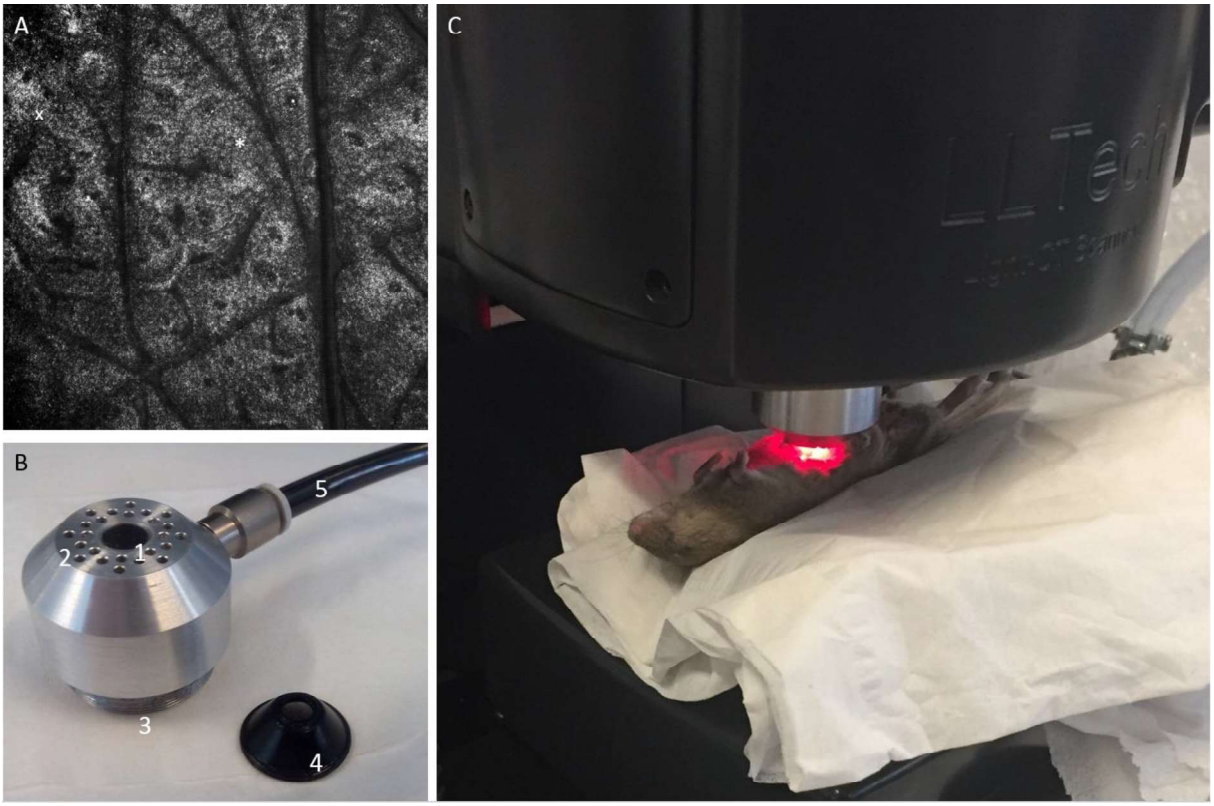

Figure 4.5 : Dispositif d'imagerie *in vivo*. (A) image obtenue sur un épiderme humain (avant-bras) avec (*) des kératinocytes et (x) des perturbations mécaniques provoquées par les capillaires sanguins sous-jacents. (B) le barillet d'imagerie *in vivo* avec : (1) la fenêtre d'imagerie en silice ; (2) la surface d'aspiration (permettant de solidariser le montage avec le tissu) ; (3) le pas de vis pour fixer le barillet sur un module de translation (permettant le positionnement axial de la coupe optique) ; (4) le joint souple faisant contact entre (1) le bord de la fenêtre et l'objectif du bras objet, il permet de contenir l'huile d'immersion ; (5) le conduit d'aspiration menant à la pompe. (C) expérience avec le dispositif (B) sur une souris récemment décédée.

IV.3- Corrélats biologiques

Si nous avons avec l'imagerie dynamique une méthode permettant de révéler des structures qu'un œil entrainé sait reconnaitre comme étant des cellules ; et si d'autre part nous pouvons décrire simplement en quoi cette mesure est reliée à des grandeurs physiques propres au tissu ; il n'en reste pas moins qu'une certaine part d'ombre couvre les mécanismes biologiques à l'origine du signal. Nous avons à plusieurs reprises parlé d'imagerie métabolique ; nous prendrons le temps ici de montrer sur quelles expériences nous nous appuyons pour proposer l'OCT plein champ dynamique comme une méthode de mesure de l'activité métabolique locale.

Dès l'introduction du chapitre III, nous avons évoqué le lien étroit entre les mouvements de diffuseurs dans le tissu et les processus liés à la vie cellulaire. La première expérience visant à alimenter cette hypothèse consiste à imager un tissu possédant un fort indice métabolique (MI) avant et après une procédure de fixation (fixation dans du formaldéhyde). Cette expérience nous montre une disparition totale du signal dynamique, suggérant que les processus de mouvement à l'œuvre ne sont pas simplement liés à l'agitation thermique.

Nous avons suivi dans un second temps une logique similaire en observant sur le long terme (au cours de plusieurs dizaines d'heures) la mort naturelle d'un tissu (figure 4.6).

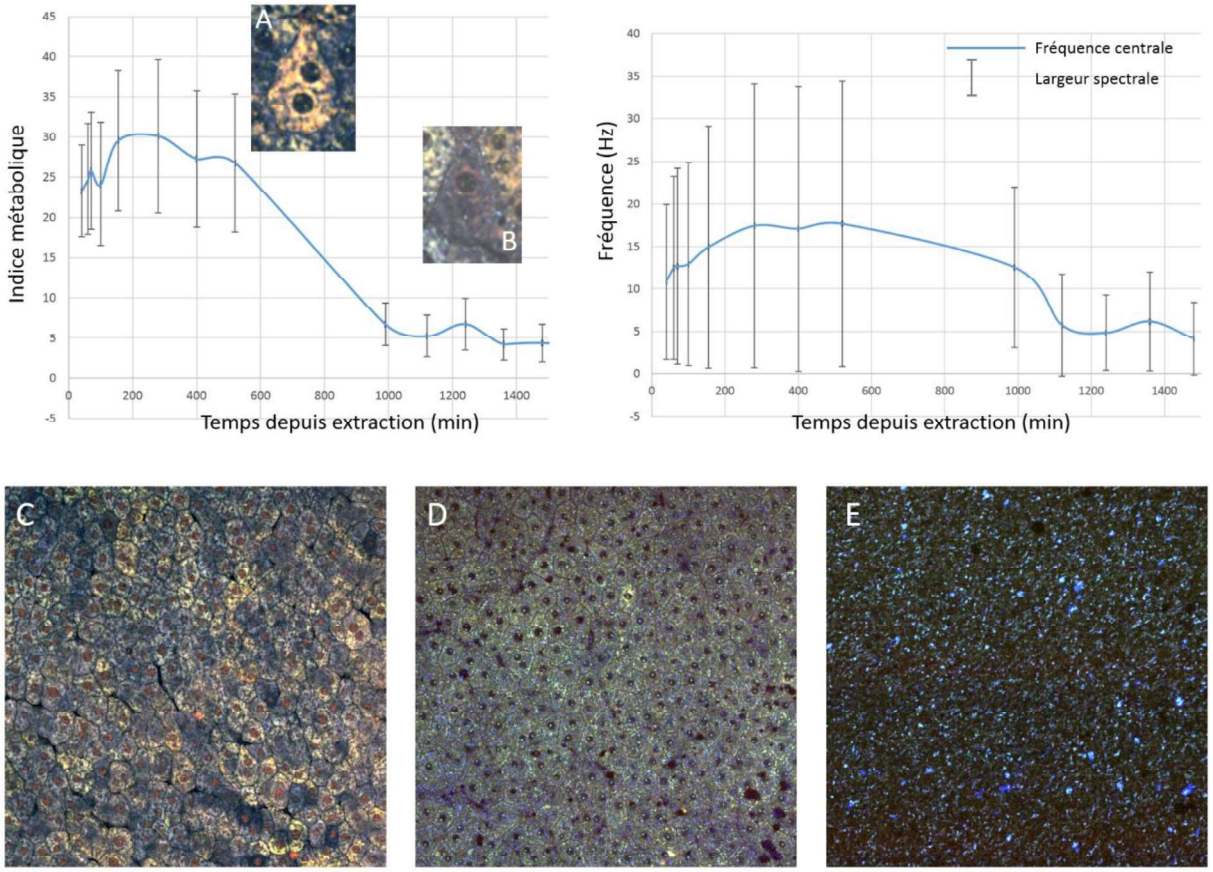

Figure 4.6 : Le graphe de gauche montre la chute de l'indice métabolique dans le cytoplasme au cours de la mort naturelle d'un foie de rat. (A) est l'image d'une cellule 8 heures après extraction et (B) montre la même cellule 8 heures plus tard. Le graphe de droite présente l'évolution du contenu fréquentiel des signaux dynamiques issus du cytoplasme au cours du temps. La courbe bleue indique l'évolution de la fréquence centrale et les barres symétriques indiquent la plage fréquentielle contenant 50% de l'énergie des signaux. (C) est le champ complet lors de la première acquisition 40 minutes après extraction, (D) 24 heures après extraction et (E) 72 heures après extraction. (C), (D) et (E) ont été ajustés en intensité individuellement. (C), (D) et (E) sont des champs de 400x400 µm². Valeurs quantitatives de (E) non montrées sur les graphes : MI = 0.139 ; CF = 47.8 Hz ; BW = 110 Hz.

Cette expérience vient conforter notre première remarque, nous avons bien une chute de l'indice métabolique au cours de la mort tissulaire. Mais ce que montrent ces mesures, c'est que cette mort n'implique pas une chute monotone de nos métriques, mais passe par une phase d'activité supérieure avant de chuter vers le niveau du bruit. Cette hyperactivité du tissu peut être rapprochée du phénomène d'apoptose de façon probable, la vérification de cette hypothèse constitue une perspective de ce travail.

Après ces deux premières expériences, un lien semble se préciser entre nos mesures et les processus vitaux à l'œuvre dans les tissus, néanmoins ce lien empirique ne justifie en rien l'appellation « imagerie métabolique » dont nous avons largement usé jusqu'à présent. Dans l'optique de comprendre l'origine du signal et de mettre à l'épreuve l'hypothèse de la mesure indirecte du métabolisme, nous avons mis en place une troisième expérience. L'idée de ce protocole est de tester le lien logique suivant : le signal dynamique repose sur des processus nécessitant une consommation d'énergie. Cette proposition est l'explicitation de ce que l'on entend par métabolisme, c'est-à-dire un ensemble de processus dépendant

de la consommation d'ATP. Le protocole est donc simple : imager un tissu avant et après injection d'un inhibiteur de la glycolyse. En effet, la glycolyse est le processus utilisé par les cellules pour la production d'une faible partie de l'ATP, mais c'est aussi un mécanisme nécessaire au fonctionnement du cycle de Krebs (mécanisme ayant lieu dans les mitochondries) qui est responsable de l'essentiel de la production d'ATP. En utilisant du 2-Deoxy-D-glucose, un inhibiteur de la glycolyse, nous pouvons ainsi bloquer toute la chaine de production de l'énergie dans les cellules. Cette substance agit rapidement (de l'ordre de la minute sur des cultures), nous n'avons donc qu'à prévoir un temps suffisamment long pour qu'elle diffuse dans le tissu ; puisque nous imageons un plan proche de la surface, un contact de 30 minutes a été choisi. La figure 4.7 présente les résultats de cette expérience avec une quantification de la chute relative d'indice métabolique pour le tissu ayant reçu l'inhibiteur et un tissu contrôle.

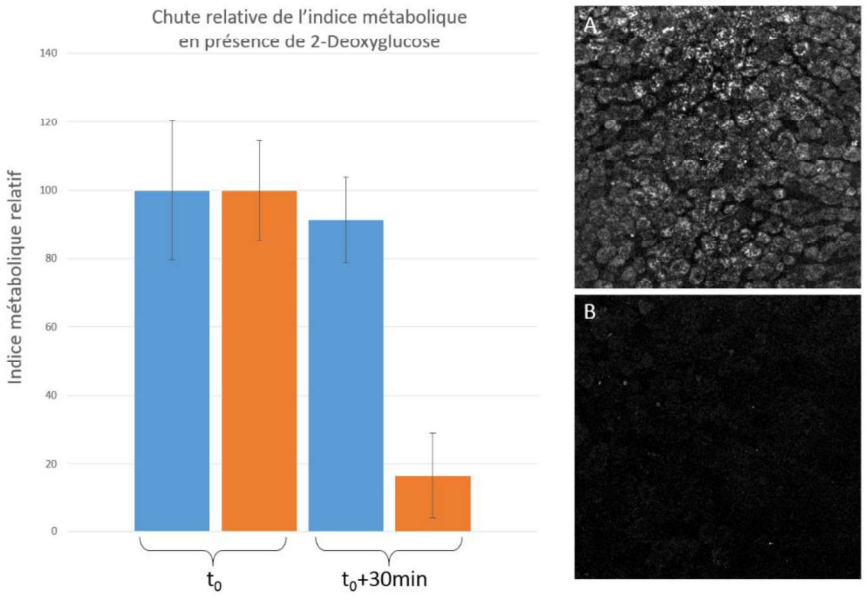

Figure 4.7 : Le graphe montre la chute de l'indice métabolique moyen mesuré sur du foie de rat pour des champs de 400x400µm². Les barres bleues correspondent au groupe contrôle (laissé 30min dans du liquide physiologique) et celles oranges correspondent au groupe ayant subi un contact avec le 2-Deoxy-D-glucose durant 30 minutes. (A) carte d'indice métabolique du groupe traité avant contact avec l'inhibiteur et (B) après contact avec l'inhibiteur. Les deux cartes (A) et (B) partagent la même échelle de gris.

Le résultat est sans appel, nous voyons une nette suppression du signal par l'inhibiteur de la glycolyse, faisant tomber l'indice métabolique au niveau du bruit. Le groupe contrôle quant à lui reste à un niveau équivalent ; la faible différence étant imputable au fait que l'on n'ait pas retrouvé après 30 minutes la zone exacte imagée à t_0. Cette expérience a été réalisée sur un échantillon de foie car cet organe est fortement isotrope, ce qui rend la mesure équivalente quel que soit la position de l'échantillon, pourvue que l'on garde la même profondeur d'imagerie. Cela a évité de devoir retrouver le même champ imagé à t_0 après le bain dans les solutions de liquide physiologique et de 2-Deoxy-D-glucose respectivement.

De ces résultats nous sommes donc en mesure d'affirmer que l'indice métabolique repose sur l'évaluation de mécanismes nécessitant une consommation d'énergie. Pour faire un lien avec les remarques du chapitre précédent concernant l'origine du signal (III.3.c), il est intéressant de noter que les mitochondries demeurent immobiles après traitement par un inhibiteur de la respiration[6].

Des efforts sont encore nécessaires pour élucider les détails du lien entre la mesure d'imagerie dynamique et le métabolisme, notamment en modulant finement différents paramètres influençant séparément le métabolisme et le transport des organelles le long du cytosquelette. Orientons-nous maintenant vers un aspect applicatif de l'imagerie métabolique.

IV.4- Album commenté

Au cours des chapitres de cette thèse, quelques images de tomographie optique plein champ dynamique ont pu être aperçues pour illustrer tel ou tel concept ou résultat. Ici, nous ouvrons un espace de discussion des résultats d'imagerie obtenus sur différents organes, dans différentes conditions. Le but est de s'appuyer sur un certain nombre de comparaisons avec l'histologie (quand cela est possible) pour montrer les particularités de l'imagerie métabolique mais aussi d'exposer les structures remarquables présentes lors de nos observations. Pour les considérations éthiques concernant les échantillons, se référer à la section (IV.2.a).

IV.4.a- Foie

Le foie est un tissu intéressant à plus d'un titre. En effet, il est constitué d'un type cellulaire principal (70%) pour l'ensemble du tissu – l'hépatocyte – en forte densité et de grande taille (20 à 30 µm de diamètre). De plus l'architecture du tissu en mosaïque compacte d'hépatocytes irrigués par une arborescence de capillaires sanguins rend l'observation équivalente d'un champ d'observation à l'autre (comme nous l'avons expliqué au IV.3). Nous pouvons également noter l'intérêt de l'imagerie dynamique en comparaison de l'OCT plein champ seul. En effet, le contraste obtenu avec ce dernier ne permet pas de distinguer d'autre structure que les capillaires sanguins. En comparaison, l'imagerie dynamique permet de révéler des hépatocytes individuels ainsi que des structures subcellulaires comme le noyau, mais elle permet aussi de révéler les cellules sanguines dans les capillaires (érythrocytes et cellules immunitaires).

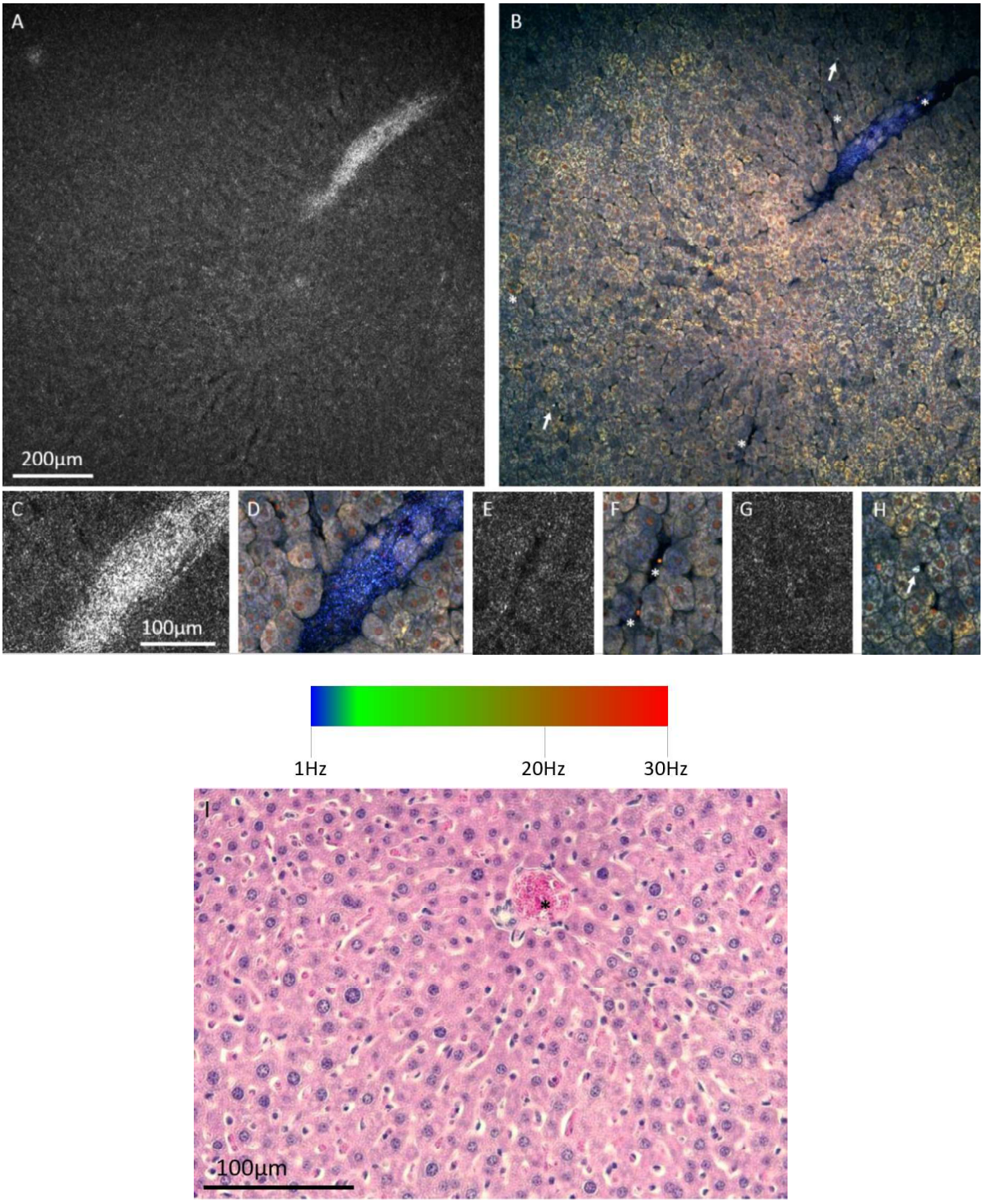

Figure 4.8 : Foie de rat sain imagé en OCT plein champ (A), (C), (E) et (G) et en imagerie métabolique (B), (D), (F) et (H). Les champs (A) à (H) sont des sections de 6µm prises à une profondeur de 12µm sous la surface. (C) à (H) sont des zooms sélectifs sur des parties de (A) et (B). (C) montre la paroi d'un vaisseau constitué de collagène, fortement statique comme nous le voyons sur (D) avec des temps caractéristiques de l'ordre de la seconde. (D) nous permet de révéler des cellules non seulement autour du vaisseau, mais aussi le sommet de quelques hépatocytes se trouvant juste au-delà de la paroi. (*) indiquent sur (B), (F) et (I) quelques érythrocytes piégés dans les capillaires, ils sont reconnaissables par leur temps caractéristiques courts (correspondant vraisemblablement aux fluctuations de leur membrane[7,8]). (→) indiquent la présence sur (B) et (H) de cellules immunitaires (plus de détails au IV.3.b). (I) présente une comparaison avec une image d'histologie colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) prise sur un foie de souris pour comparaison. L'image d'histologie (I) est adaptée de IHC world image Gallery – H&E stains[9]. Echantillons de foie mis à disposition par le laboratoire Dynamique et Structure Neuronale de l'ESPCI.

Le foie peut être l'objet de pathologies handicapantes, notamment la stéatose hépatique pouvant dégénérer vers une cirrhose. Nous n'avons pu obtenir d'échantillons présentant ce type de pathologie, mais tout indique qu'une quantification de la sévérité et de la progression de cette pathologie serait possible par notre méthode. En effet, la stéatose se caractérise par la présence de triglycérides (sphères lipidiques) dans les hépatocytes, ce qui devrait être repérable grâce à notre résolution subcellulaire. L'évolution vers la cirrhose se caractérise par un développement de fibrose péri-cellulaire et éventuellement de travées fibreuses. Ces fibres, par leur rupture d'indice avec le milieu, sont fortement contrastées en OCT plein champ, ce qui devrait les rendre facile à détecter (comme pour les échantillons cancéreux, voir figure 4.10). La stéatose peut être macrovésiculaire (bénigne) ou microvésiculaire, cette dernière étant liée à un dysfonctionnement des mitochondries (pathologie sévère). L'étude de la différentiation de ces deux types de pathologies semble être un axe de recherche prometteur étant donné le lien entre imagerie dynamique et fonctionnement mitochondrial. D'un point de vue applicatif, néanmoins, de nombreuses méthodes de diagnostic éprouvées occupent déjà aujourd'hui le terrain. Ces dernières présentent en outre l'avantage d'être non-invasives.

IV.4.b- Système immunitaire

Le système immunitaire est constitué d'un réseau complexe d'acteurs impliqués dans la production de différents agents immunitaires, leur maturation, leur transport et leur activation. Ce système est aujourd'hui au centre de la recherche de pointe pour le développement de thérapies en oncologie. Depuis les années 2000[10] ce champ est en expansion rapide et plein de promesses[11]. Dans ce contexte l'évaluation des capacités de l'OCT plein champ dynamique pour explorer la réponse immunitaire est un enjeu non négligeable. Nous n'avons malheureusement pu bénéficier de collaborations permettant d'explorer ces thématiques comme elles l'auraient mérité, et ce type de projet reste donc une perspective de recherche actuelle. Néanmoins, les opportunités d'imagerie de différents types de cancers que nous présentons (IV.3.c à IV.3.f) ainsi que les échanges que nous avons pu avoir avec différents pathologistes nous ont orientés vers une première évaluation des capacités d'imagerie des cellules immunitaires par imagerie métabolique. Nous nous sommes donc tournés vers des organes impliqués dans la production et la maturation des leucocytes (et notamment des lymphocytes), comme la rate, les ganglions et le thymus. La figure 4.9 présente une image de rate de rat où l'on peut clairement identifier deux types de cellules. Les cellules fortement actives présentent un type d'activité (MI, CF, BW) et une morphologie que l'on retrouve dans le thymus, les ganglions et dans une majorité d'échantillons cancéreux (figures 4.10, 4.12 et 4.15). En l'absence de tests permettant d'identifier formellement ces cellules, nous préférons nous y référer sous le terme de « cellules immunitaires ». Nous pouvons d'ores et déjà noter que – compte tenu de la densité de ces cellules imagées dans la rate – nous ne sommes probablement pas sensibles à toutes les cellules composant le système immunitaire.

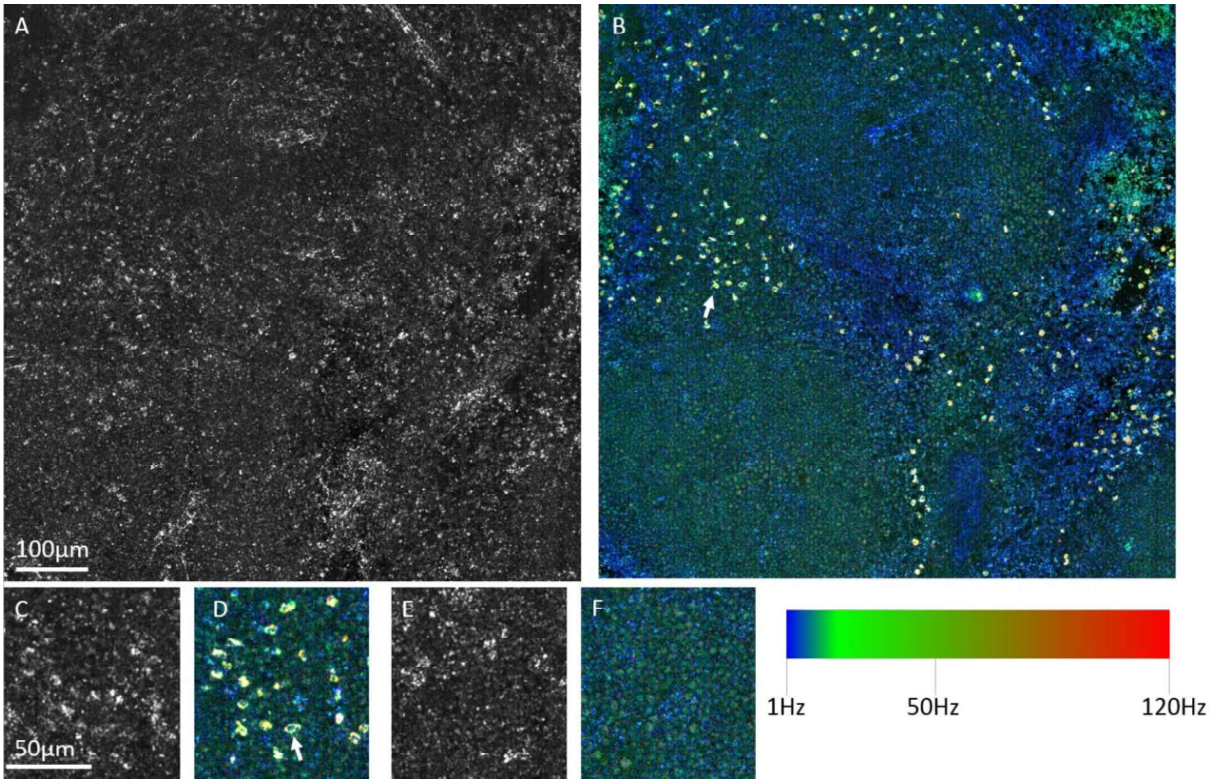

Figure 4.9 : rate de rat en OCT plein champ (A), (C), (E) et en imagerie dynamique (B), (D), (F). (→) indique une cellule immunitaire. (D) montre un zoom d'une zone présentant une forte densité de cellules immunitaires avec (C) la même zone en OCT plein champ. (F) montre un autre type cellulaire qui semble constitutif de cette partie de la rate. Echantillons de rate mis à disposition par le laboratoire Dynamique et Structure Neuronale de l'ESPCI.

Nous remarquons pour ces cellules immunitaires un indice métabolique élevé avec une largeur spectrale importante. Ces deux caractéristiques permettent notamment de les séparer des érythrocytes qui sont spectralement moins larges et d'indice métabolique plus faible.

IV.4.c- Intestin

L'intestin se devait d'avoir une place dans cette présentation, il s'agit en effet du premier échantillon cancéreux que nous avons pu imagé dès les débuts de l'imagerie dynamique. Cet échantillon de duodénum tumoral nous a permis de comprendre les particularités du contraste obtenu par ce type d'imagerie, et de souligner la complémentarité des approches statique et dynamique de l'OCT plein champ. D'un point de vue applicatif, gardons à l'esprit que les cancers intestinaux occupent la seconde place en termes de décès aux Etats Unis[12] et en France[13]. La figure 4.10 présente les éléments caractéristiques que nous avons pu observer sur de tels échantillons.

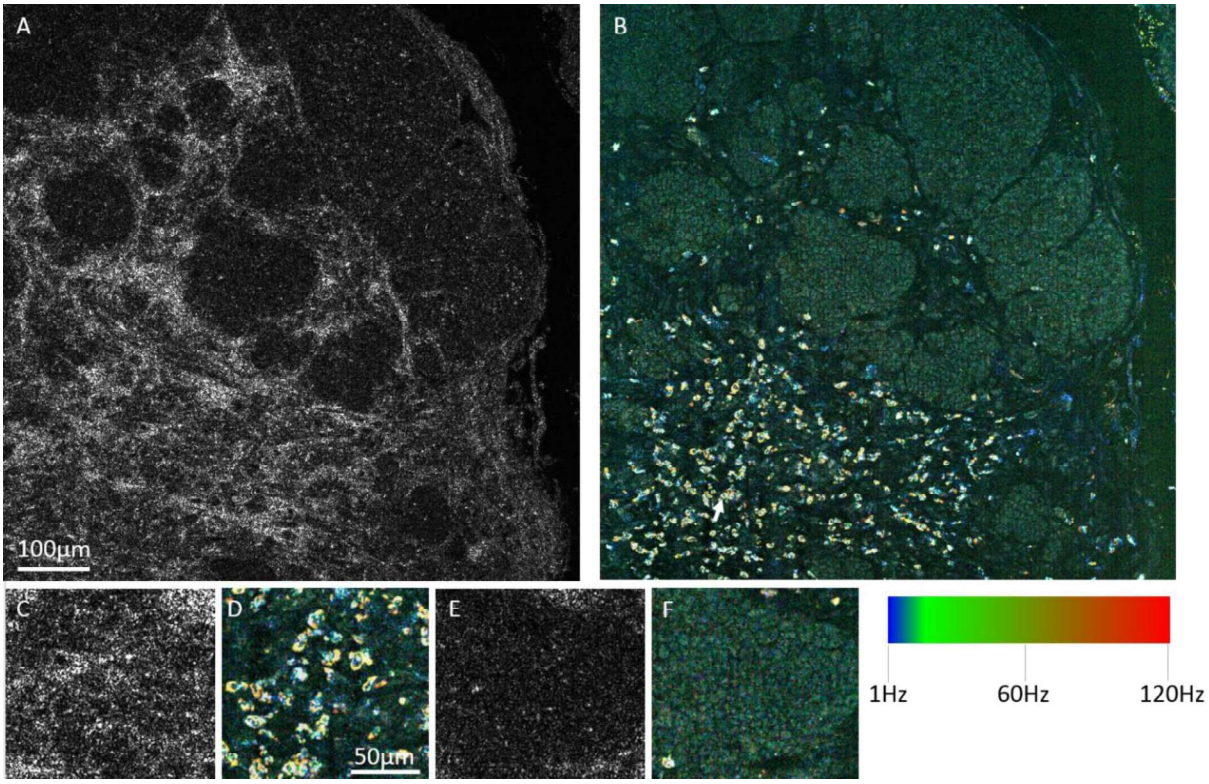

Figure 4.10 : image en OCT plein champ (A), (C), (E) et imagerie dynamique (B), (D), (F) d'un échantillon cancéreux de duodénum de souris. (→) indique un ensemble de cellules immunitaires présentes dans la matrice de collagène visible sur (A) par une forte rétrodiffusion. (D) montre un agrandi de cette zone de forte densité en cellules immunitaires avec (C) le même champ en OCT plein champ. (F) et (E) montrent un zoom sur un nid de cellules cancéreuses très denses. Echantillons de rate mis à disposition par le laboratoire Migration et invasion cellulaire de l'Institut Curie.

La structure que ces échantillons présentent a été retrouvé à plusieurs reprises pour différents cancers, les figures 4.12 pour le pancréas et 4.14 pour le cerveau montrent eux aussi une architecture en poches tumorales distinctes enveloppées d'une capsule fibreuse.

IV.4.d- Pancréas

Le pancréas a une double fonction : endocrine – visant notamment à la régulation de la glycémie via la sécrétion d'insuline et de glucagon – et exocrine – avec la sécrétion du suc pancréatique composé de bicarbonates et d'enzymes. Ces fonctions sont prises en charge par deux tissus différents, les cellules endocrines rassemblées au sein des ilots de Langerhans d'une part et les cellules exocrines rassemblées en acini d'autre part. La figure 4.11, prise sur un échantillon de pancréas sain, présente ces structures. Le pancréas est un organe sensible et ses pathologies sont généralement fortement handicapantes, que ce soit avec le diabète (disfonctionnement endocrine) ou avec des pancréatites chroniques (disfonctionnement exocrine). Dans le cas de cancers, les statistiques de survie à court et moyen terme sont très mauvaises, principalement à cause de la difficulté pour opérer cet organe. Si l'on ajoute à cette difficulté opératoire l'aspect asymptomatique du développement tumoral, on conçoit alors aisément que le diagnostic et la prise en charge soit souvent tardive. Compte tenu de ces remarques, nous sommes donc en droit de s'interroger sur l'utilité de l'imagerie dynamique dans ce cas. En revanche, l'évaluation de nouvelles thérapies permettrait d'accélérer leur transfert vers l'utilisation clinique et ainsi de prolonger au mieux l'espérance de vie des patients. Cette évaluation bénéficierait de l'imagerie

dynamique, notamment pour les tests animaux où il y a analyse *ex vivo* de l'organe. Nous avons eu l'opportunité de collaborer sur une courte période à des recherches de ce type, la quantité de résultats n'est pour l'instant pas assez importante pour effectuer d'analyses statistiques significatives. Lors de cette collaboration nous avons pu imager des modèles de tumeurs pancréatiques exocrines sous-cutanées et orthotopiques, la figure 4.12 présente une image typique obtenue lors de cette étude.

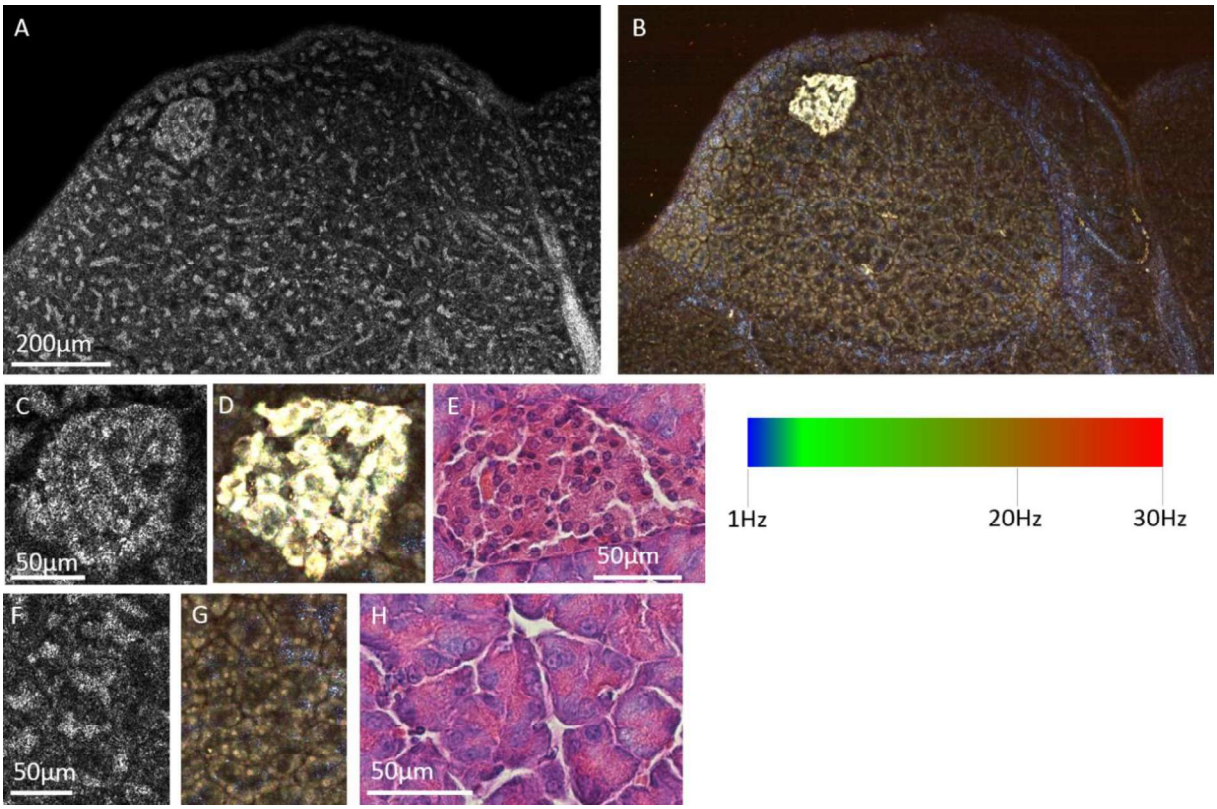

Figure 4.11 : image d'un échantillon de pancréas de rat en OCT plein champ (A), (C), (F) et en imagerie dynamique (B), (D), (G). Le décalage entre (A) et (B) provient de la relaxation lente de l'échantillon entre l'acquisition de (A) et celle de (B). (C), (D) et (E) montrent un ilot de Langerhans (pancréas endocrine) respectivement en OCT plein champ, imagerie dynamique et microscopie classique sur lame d'histologie colorée à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). (F), (G), (H) quant à eux présentent dans les mêmes modalités des acini (pancréas exocrine). Echantillons de pancréas mis à disposition par le laboratoire Oxidative stress, cell proliferation and inflammation de l'Institut Cochin.

Les ilots de Langerhans apparaissent très nettement, que ce soit en OCT plein champ ou en imagerie métabolique. Cela est principalement dû à leur forte diffusion de la lumière causée par la présence de cristaux de zinc[14] ce qui permet d'évaluer leur état[15]. Notre méthode pourrait permettre une qualification de greffons d'ilots dans le cadre d'une transplantation intrahépatique[16], ou un suivi de la croissance, de l'angiogenèse et de l'activité de ces ilots lors d'une transplantation dans l'œil dans un cadre de recherche[17].

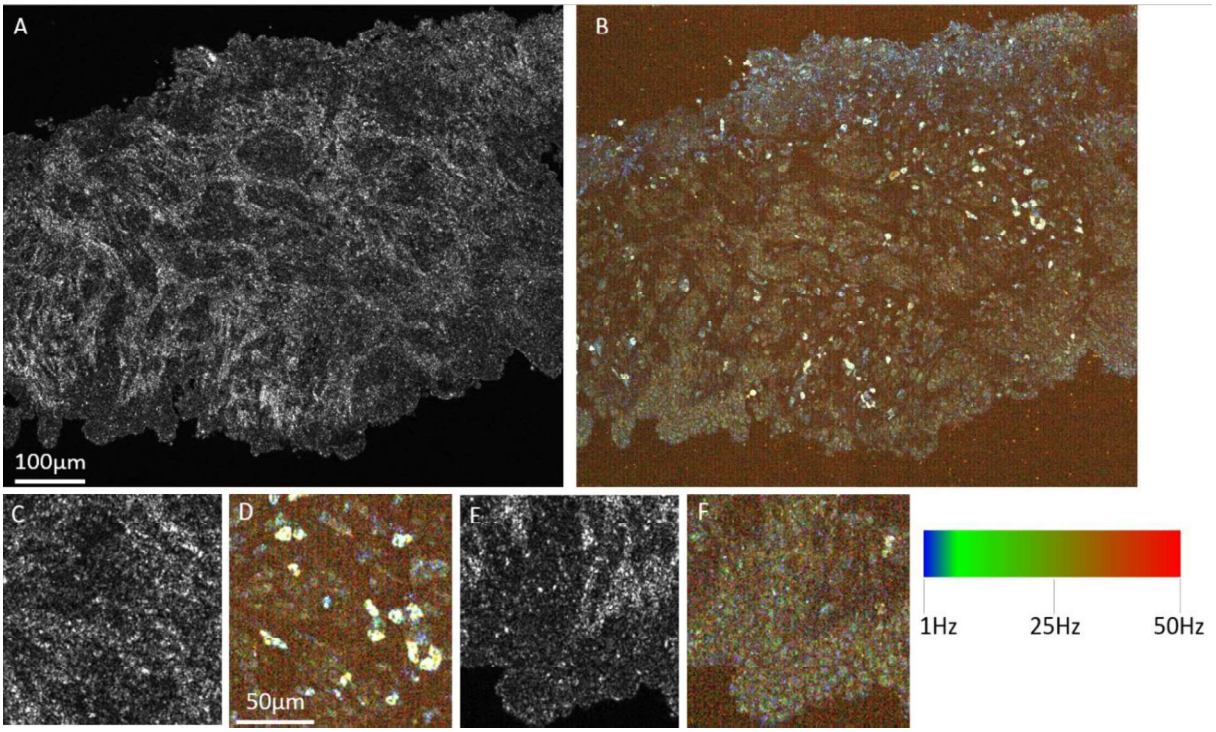

Figure 4.12 : Image OCT plein champ (A), (C), (E) et dynamique (B), (D), (F) d'une tumeur pancréatique exocrine sous-cutanée avec en haut la limite extérieure de la tumeur et en bas une cavité formée par un kyste s'étant développé au centre de la tumeur. On retrouve des cellules immunitaires dispersées dans la matrice de collagène (D) et des cellules cancéreuses présentant une forte densité (F). Echantillons de pancréas mis à disposition par le laboratoire Oxidative stress, cell proliferation and inflammation de l'Institut Cochin.

IV.4.e- Cerveau

Nous avons évoqué dès le début l'intérêt d'une chirurgie conservatrice des tissus ; ce constat est d'autant plus important pour un organe tel que le cerveau où le retrait de tissus peut entrainer des troubles fonctionnels parfois rééducables, parfois définitifs. Même si l'on dispose d'une cartographie fonctionnelle détaillée du cerveau – et qu'il puisse y avoir des tests en état d'éveil au cours de l'opération – nous n'avons pas aujourd'hui une compréhension exhaustive du connectome ; cela rend d'autant plus hasardeux le retrait de tissus superflu. Dans ce contexte, l'évaluation peropératoire des marges tumorales permettrait de réduire efficacement le taux de réopération et la quantité de matériel excisé. Cela est d'autant plus critique que les tissus se réorganisent entre la première opération et l'éventuelle seconde opération. Cela rend l'orientation complexe, ce qui conduit, par mesure de sécurité à retirer une quantité de tissu sains qui aurait pu être évité. Une claire différence architecturale a pu être mise en évidence à l'aide de l'OCT plein champ[18] et nous présentons ici l'apport non négligeable de la modalité dynamique pour compléter ce diagnostic. Nous présentons à la figure 4.13 un échantillon de cortex cérébral sain chez le rat, puis nous montrons deux types de tumeurs chez l'humain : à la figure 4.14 un échantillon de métastase pulmonaire au cerveau et à la figure 4.15 un cas de méningiome.

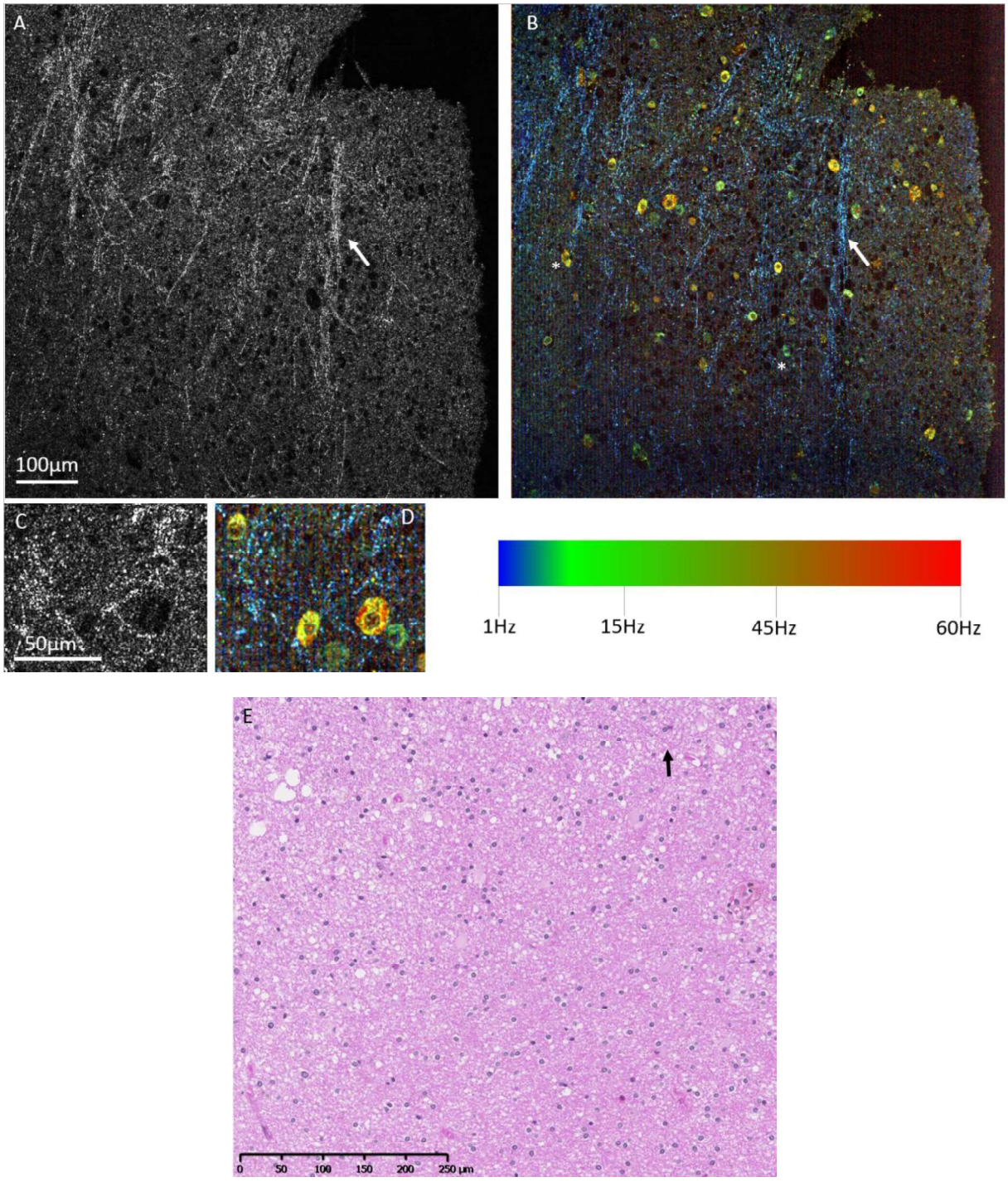

Figure 4.13 : Cortex cérébral de rat sain en (A), (C) OCT plein champ et (B), (D) imagerie dynamique. (→) indique la présence d'axones fortement diffusant à cause de la gaine de myéline qui les entourent. (D) présente un agrandissement sur quelques cellules que l'on peut supposer être des cellules gliales de par leur forme et leur taille. (*) indique de possibles neurones pyramidaux. (E) image d'histologie colorée en H&E sur un cortex cérébral humain sain, (→) indique un axone qui peut échapper à un œil non entrainé. Echantillons de cerveau mis à disposition par le laboratoire Dynamique et Structure Neuronale de l'ESPCI et l'hôpital Sainte Anne.

L'OCT plein champ permet d'imager correctement les axones dans le cerveau sain, mais les cellules (neurones ou cellules gliales) apparaissent sombres et homogènes. Ainsi nous n'avons pas de moyen de différencier les capillaires sanguins des cellules. L'imagerie dynamique résout cette indétermination en révélant les cellules, leur activité et les détails de leurs structures.

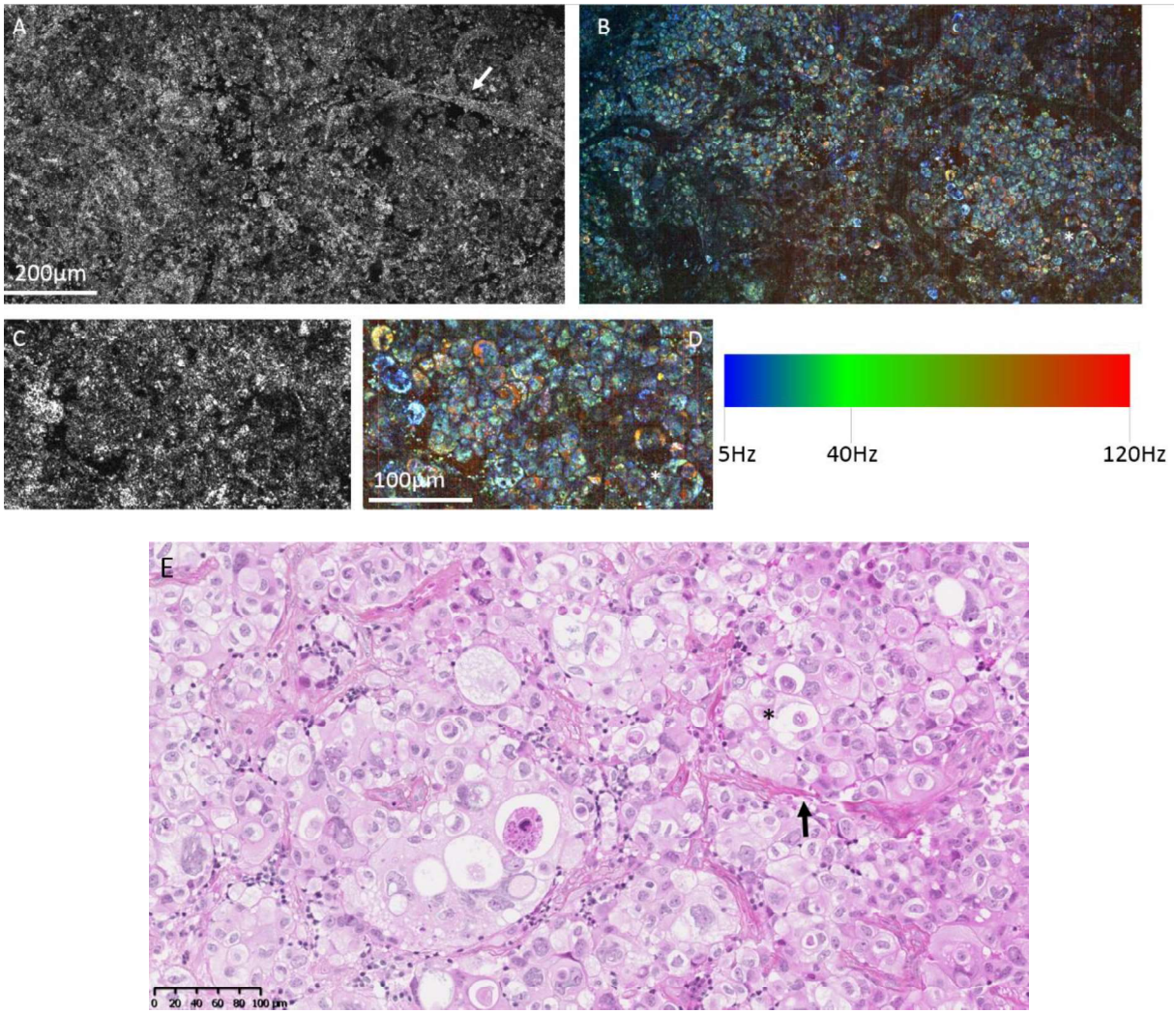

Figure 4.14 : Tumeur métastatique au cerveau chez l'homme en OCT plein champ (A), (C) ; en imagerie dynamique (B), (D) ; et en microscopie classique sur coupe histologique colorée en H&E (E). (→) pointe la capsule de collagène entourant un nodule cancéreux. On peut observer des cellules incluses dans d'autres (*) ainsi que des zones de nécrose. Le tissu est désorganisé avec des cellules de tailles et de formes très diverses. Echantillons de cerveau mis à disposition par l'hôpital Sainte Anne.

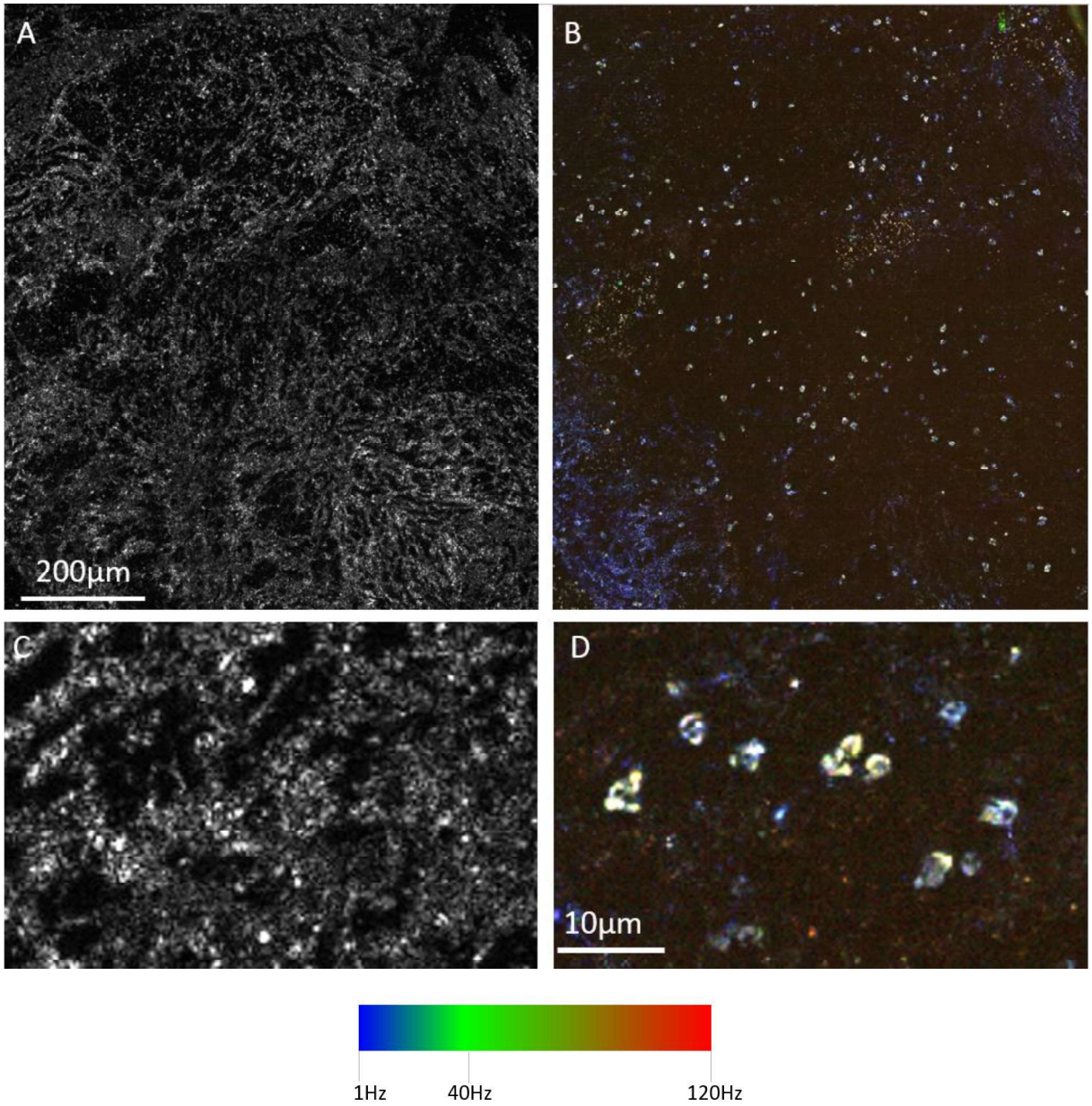

Figure 4.15 : Méningiome chez l'homme en imagerie OCT plein champ (A), (C) et dynamique (B), (D). Nous remarquons une hyper-vascularisation de la zone, constituant un indice de tumeur (angiogenèse tumorale). L'imagerie dynamique révèle des cellules immunitaires comme dans d'autres cas de cancers. Echantillons de cerveau mis à disposition par l'hôpital Sainte Anne.

IV.4.f- Sein

Le cancer du sein reste le cancer le plus diagnostiqué chez la femme, que ce soit en France, au sein de l'Union Européenne ou aux Etats Unis[19]. Compte tenu du diagnostic de plus en plus précoce, la chirurgie peut tendre vers des formes de plus en plus conservatrices comme nous l'avons déjà souligné (I.3.a, I.5.a, I.5.c) et ainsi limiter l'impact de la procédure ; notamment au niveau identitaire. Ainsi, la vérification des marges d'exérèse est cruciale et demande une meilleure fiabilité et une plus grande flexibilité pour adapter le geste chirurgical au cours de l'opération. Nous montrons ici avec la figure 4.16 un échantillon de sein humain cancéreux. Nous développerons au prochain chapitre la distinction entre tissu sain et tissu tumoral pour le cas du sein chez l'homme basé sur la valeur des métriques de l'imagerie dynamique (V.4.a).

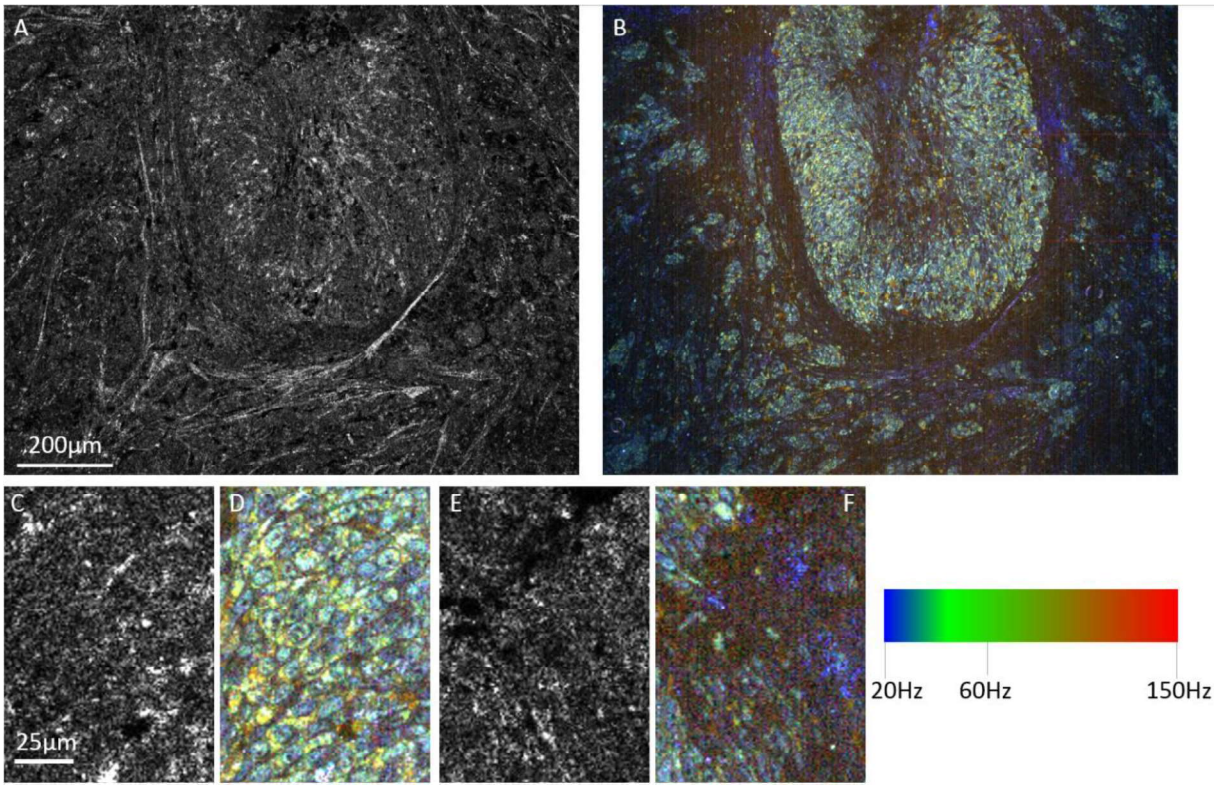

Figure 4.16 : Echantillon de sein cancéreux, ici une invasion intra-canalaire (DCIS) imagé en (A), (C), (E) OCT plein champ et (B), (D), (F) imagerie dynamique. (D) présente un agrandissement d'une zone dense en cellules tumorales et (F) une zone nécrosée. Echantillons de sein mis à disposition par l'institut Gustave Roussy.

IV.5- Discussion

De nombreux éléments expérimentaux ont été rapportés dans ce chapitre, allant des considérations de conservation des tissus aux corrélats biologiques des métriques dynamiques. Dans cette section nous allons assembler ces éléments hétéroclites pour rétablir une cohérence entre ces thèmes simultanément présents lors de chaque expérience. Cette discussion nous permettra de dégager les intérêts majeurs de la modalité dynamique de l'OCT plein champ et d'en cerner les limites et les zones d'ombres qui nécessitent des recherches plus approfondies.

Nous pouvons à partir des différents cas présentés précédemment (IV.4) constater l'intérêt de l'imagerie dynamique sur plusieurs points. Tout d'abord la capacité de cette technique à révéler les cellules et à mettre en évidence les limites du cytoplasme et du noyau nous permet de franchir une étape supplémentaire vers l'histologie par rapport aux capacités de l'OCT plein champ statique. Néanmoins, notons que ces deux modalités présentent une forte complémentarité avec une imagerie statique révélant des structures fortement diffusantes qui se révèle souvent statiques (comme les fibres de collagène par exemple) et une modalité dynamique permettant de prendre le relai pour des structures faiblement diffusantes mais fortement actives ; même masquées par de forts signaux fixes. De plus, la procédure menant à l'image dynamique supprime spontanément le speckle de l'image – sauf dans le cas de dérives lentes de structures fixes (IV.2.b) – ce qui permet d'accéder à la résolution optique réelle du système sans être perturbé par les hautes fréquences spatiales du speckle. Il existe néanmoins des méthodes pour réduire le speckle dans le cas de l'OCT[20] que nous ne discutons pas ici.

Cette méthode dynamique présente l'avantage de disposer de mesures quantitatives de l'activité métabolique (III.4 et IV.3). Cette mesure nous permet de comparer différents échantillons entre eux et d'espérer pouvoir déduire de la mesure seule un indice menant et/ou aidant un diagnostic possible comme nous le verrons au prochain chapitre. Néanmoins, de nombreuses précautions sont à prendre dans de telles entreprises, comme la fraicheur du tissu (IV.3), les conditions d'extraction et de conservation (IV.2.a) et la profondeur d'imagerie. Ces limites demandent à être précisées, notamment pour pouvoir affirmer qu'il est possible de standardiser une procédure d'imagerie sur un type de tissu particulier.

Nous avons consacré une partie de ce chapitre aux premiers pas faits dans la direction d'une imagerie *in vivo* dynamique en montrant comment nous avons pu neutraliser l'impact des sources naturelles de bruits mécaniques (IV.2.b et IV.2.c). Les discussions que nous avons pu avoir avec le personnel impliqué directement dans les procédures cliniques semblent indiquer que la miniaturisation – vers un modèle d'endoscopie – et la capacité à imager les tissus *in vivo* constituent des axes de développement pouvant générer une plus-value significative dans leur pratique quotidienne.

L'exploration de différents tissus (IV.5) a mis en évidence les limites de nos capacités à reconnaitre les structures que nous imageons. En effet, dans de rares cas où une collaboration le permettait, nous avons pu bénéficier d'une comparaison avec une lecture de lame d'histologie. Néanmoins, ces cas ont été peu nombreux et la correspondance difficile à effectuer (orientation de la pièce et différence de profondeur d'imagerie). C'est donc par interprétation directe de nos images dynamiques – de la part de différents pathologistes – que nous avons obtenu la majorité des identifications que nous présentons. Cela laisse la place à des incertitudes et mérite un travail de longue haleine de biologie médicale pour établir de claires correspondances entres les structures visibles en imagerie dynamique et celles bien connues des pathologistes en histologie.

IV.6- Conclusion et perspectives

Au cours de ce chapitre focalisé sur l'aspect expérimental de l'OCT plein champ dynamique nous avons eu l'occasion de baliser les limites expérimentales actuelles de cette méthode. Nous avons mis en lumière les précautions d'extraction, de manipulation, de transport et de conditionnement des tissus (IV.2.a) et nous avons examiné l'impact de différentes sources de bruits et de signaux parasites pouvant perturber l'image (IV.2.b). Mais nous avons également exploré d'autres limites, celles de nos connaissances actuelles vis-à-vis des éléments détectés par imagerie dynamique, en soulignant les directions stimulantes que cela ouvre à une recherche orientée vers la biologie médicale (IV.4). Parmi ces limites qui semblent dépeindre un tableau où la méfiance vis-à-vis de l'expérience et l'incertitude d'interprétation prévalent, des résultats consolident la confiance que l'on peut accorder à cette méthode et à son futur. Cette confiance nous la retrouvons dans les premiers tests *in vivo* qui établissent la compatibilité de l'imagerie dynamique avec les contraintes du vivant. Mais ce sont les différences notables entre tissus sains et tissus pathologiques – ouvrant un large champ d'exploration clinique – qui constituent le principal argument en faveur de l'imagerie dynamique. Dans le prochain chapitre, nous verrons comment ces différences – au niveau quantitatif – peuvent permettre d'assister la prise de décision dans un contexte clinique.

Bibliographie du chapitre IV :

1. A. Latrive and A. C. Boccara, "In vivo and in situ cellular imaging full-field optical coherence tomography with a rigid endoscopic probe" Biomed. Opt. Express **2**(10), 2897–2904 (2011)
2. A. Latrive and C. Boccara, "Flexible and rigid endoscopy for high-resolution in-depth imaging with Full-Field OCT" in Biomedical Optics and 3-D Imaging (2012), paper BTu4B.4, p. BTu4B.4, Optical Society of America (2012)
3. W. Y. Oh et al., "Spectrally-modulated full-field optical coherence microscopy for ultrahigh-resolution endoscopic imaging" Opt. Express **14**(19), 8675–8684 (2006)
4. H. D. Ford and R. P. Tatam, "Fibre imaging bundles for full-field optical coherence tomography" Meas. Sci. Technol. **18**(9), 2949 (2007)
5. "Single fiber endoscopic full-field optical coherence tomography (OCT) imaging probe."
6. L. M. Loew et al., "Imaging in five dimensions: time-dependent membrane potentials in individual mitochondria" Biophys. J. **65**(6), 2396–2407 (1993)
7. G. Popescu et al., "Coherence properties of red blood cell membrane motions" Phys. Rev. E **76**(3), 031902 (2007).
8. G. Popescu et al., "Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy" Blood Cells. Mol. Dis. **41**(1), 10–16 (2008).
9. "IHC World Image Gallery - H&E Stains,"
10. L. Fong and E. J. Small, "Anti–Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 Antibody: The First in an Emerging Class of Immunomodulatory Antibodies for Cancer Treatment" J. Clin. Oncol. **26**(32), 5275–5283 (2008)
11. J. Couzin-Frankel, "Cancer Immunotherapy," Science **342**(6165), 1432–1433 (2013)
12. "Statistics - Colon Cancer Alliance - Prevention, Research, Patient Support," Colon Cancer Alliance,
13. "Le cancer colorectal - Les cancers les plus fréquents | Institut National Du Cancer,"
14. L. H. Kristiansen et al., "Autometallography allows ultrastructural monitoring of zinc in the endocrine pancreas" Histochem. Cell Biol. **115**(2), 125–129 (2001)
15. E. Ilegems et al., "Light scattering as an intrinsic indicator for pancreatic islet cell mass and secretion," Sci. Rep. **5** (2015)
16. C. Ricordi et al., "HUMAN ISLET ISOLATION AND ALLOTRANSPLANTATION IN 22 CONSECUTIVE CASES" Transplantation **53**(2), 407–414 (1992).
17. S. Speier et al., "Noninvasive in vivo imaging of pancreatic islet cell biology," Nat. Med. **14**(5), 574–578 (2008)
18. O. Assayag et al., "Imaging of non-tumorous and tumorous human brain tissues with full-field optical coherence tomography" NeuroImage Clin. **2**, 549–557 (2013).
19. "Quelques chiffres - Cancer du sein | Institut National Du Cancer,"
20. J. M. Schmitt, S. H. Xiang, and K. M. Yung, "Speckle in Optical Coherence Tomography," J. Biomed. Opt. **4**(1), 95–105 (1999)

Chapitre V : Outils issus du traitement de données appliqués à la tomographie optique plein champ dynamique

V.1- Introduction……103
V.2- Problématique liée à la classification……104
V.2.a- Linear Discriminant Analysis……105
V.2.b- Quadratic Discriminant Analysis……106
V.2.c- Dépasser la non-séparabilité……106
V.3- Chaine de traitement pour l'aide au diagnostic……107
V.3.a- Présentation générale de la chaine de traitement……107
V.3.b- Constitution de structures……109
V.3.c- Analyse et classification……113
V.4- Résultats……115
V.5- Conclusion……121

V.1- Introduction

Les développements de l'informatique et des méthodes numériques ont naturellement eu un impact fort sur le domaine de l'imagerie médicale depuis plus de 50 ans[1,2], et cette relation n'a eu de cesse de se renforcer depuis. Le traitement de l'image en particulier – loin de se contenter d'une simple correction de l'image – permet d'en extraire une information qui demanderait habituellement l'intervention d'un opérateur humain. Ce domaine a généré un grand nombre de solutions visant à assister ou remplacer certaines tâches de lecture ou d'interprétations, allant du simple comptage de cellules[3] au diagnostic automatisé[4–7]. Dans le cadre de la problématique exposée au chapitre I (I.4), de telles méthodes pourraient permettre :

- La génération d'indicateurs de diagnostic quantitatifs clairs dérivés des données d'OCT plein champ et d'imagerie dynamique. En effet, la lecture d'image par un opérateur humain – particulièrement dans un contexte où le temps est un facteur limitant – fait intervenir des quantificateurs heuristiques généralement flous comme « une grande concentration de cellules avec un noyau déformé ». Cela peut générer des différences d'interprétation d'un opérateur à l'autre et constitue une limite à la transmission des critères de diagnostic.
- Un gain de temps. Dans une logique de diagnostic peropératoire, la rapidité de la réponse est un facteur déterminant. C'est pourquoi – par-delà la rapidité d'acquisition – l'interprétation des données acquises par OCT plein champ doit être facilitée. Cela passe par une plus grande abstraction des indicateurs de diagnostic (Figure 1), allant – dans les cas où cela est possible – jusqu'à la génération d'un diagnostic automatisé.

De telles pistes ont déjà été explorées pour l'analyse de lames d'histologie[8–10] et offrent l'espoir d'une transposition simple des techniques déjà développées dans ce domaine de par la similitude que présentent nos images avec les images d'histologie.

Nous présenterons dans ce chapitre un aperçu des problématiques que pose une méthode de classification simple, ce qui nous a poussés à développer une chaine de traitement sur mesure pour notre problème. Dans un deuxième temps nous présenterons les méthodes que nous avons utilisées pour créer ce processus intégré partant des données brutes de l'imagerie dynamique pour, par traitements successifs, arriver au plus proche du diagnostic. Nous commencerons par une vue globale de ce processus de traitement, puis nous prendrons le temps de détailler le traitement conduisant à une métrique de haut niveau, étape par étape. Une dernière partie regroupera les résultats obtenus à l'aide de cette procédure pour la classification de tissus mammaires humains sains et cancéreux.

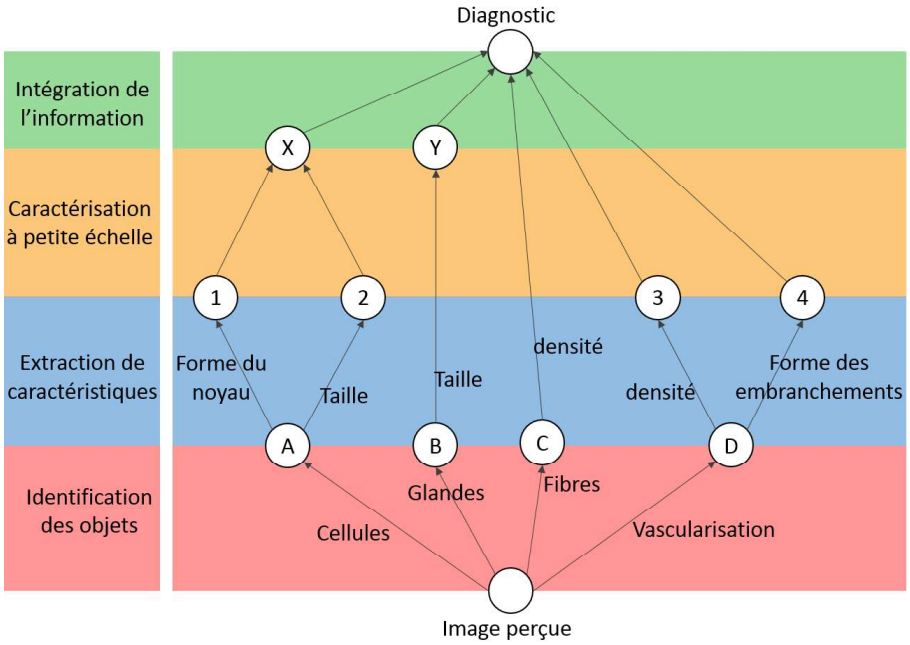

Figure 1 : Illustration de différents niveaux d'abstractions – de l'image perçue par l'opérateur jusqu'au diagnostic. Dans cet exemple d'illustration, l'opérateur va segmenter l'image d'après son expérience en repérant différentes structures (A, B, C, D) qu'il sait reconnaitre comme des cellules (A), des structures glandulaires (B), un développement fibreux (C) et des vaisseaux sanguins (D). Ce premier niveau d'abstraction permet par la suite une analyse de ces structures (1, 2, 3, 4) où le noyau des cellules sera identifié comme normal ou difforme (1) ; la cellule sera identifiée comme petite ou grande (2) ; le réseau vasculaire sera considéré comme dense ou non (3) ; et des critères plus fins comme la forme des embranchements des vaisseaux en « bois de cerf » par exemple pourront être notés (4). Certaines structures pourront alors être identifiées (X, Y) comme cellules cancéreuses (X) ou glandes tumorales (Y). Cette cascade de critères permet de classifier des sous-ensembles de l'image de façon toujours plus abstraite, jusqu'à fournir une évaluation globale portant sur l'image : le diagnostic.

V.2- Problématique liée à la classification

Nous avons vu au chapitre II comment obtenir une image FFOCT et au chapitre III trois métriques dérivées de l'imagerie dynamique. Ces quatre métriques constituent ainsi l'espace paramétrique (de dimension 4) dans lequel se positionnent chaque pixel de l'image. Dans un premier temps nous avons tenté une approche frontale pour résoudre le problème de classification en cherchant une hypersurface séparant l'espace paramétrique en deux régions : une région contenant les pixels appartenant à une tumeur et une région contenant les pixels appartenant au tissu sain. Nous allons brièvement montrer quelques résultats qui mettront en lumière les limitations qui nous ont poussés vers des moyens de segmentation plus sophistiqués.

V.2.a- Linear Discriminant Analysis

L'hypersurface la plus simple est bien évidement un hyperplan, et la méthode LDA[11] (Linear Discriminant Analysis) permet de trouver l'équation de celui-ci. En utilisant cette méthode éprouvée sur deux listes de pixels pris pour l'un dans un échantillon de sein cancéreux et pour l'autre dans un échantillon de sein normal, nous buttons sur un problème très tôt. En effet, une fois le classificateur trouvé (ie : les paramètres de l'hyperplan) à partir des ensembles d'entrainement, si nous l'appliquons directement à ces mêmes ensembles nous trouvons déjà un taux de mauvaise classification très important (Figure 2). Remarquons qu'il est important d'avoir une masse de données équilibrée entre les deux groupes, faute de quoi la classification favorisera la bonne classification (vrai positifs) d'un groupe au détriment de l'autre.

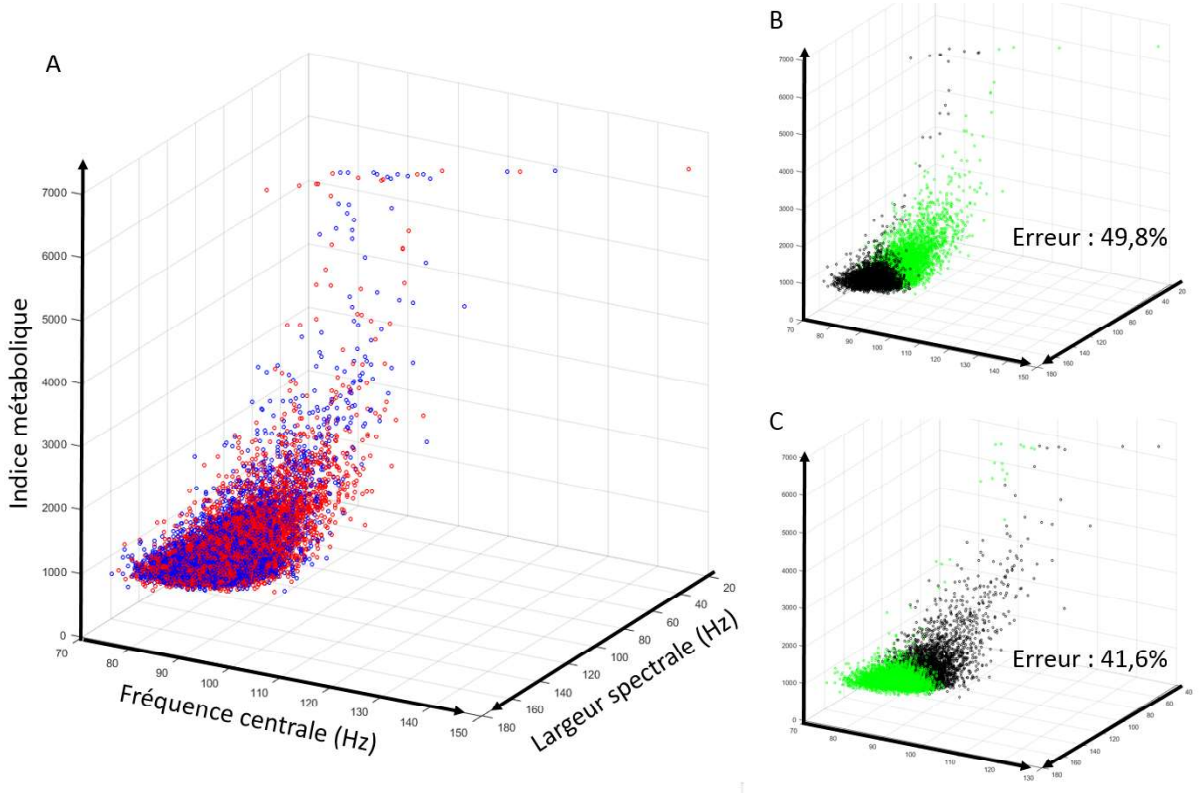

Figure 2 : Démonstration de l'échec d'une segmentation par LDA sur pixel unique avec un exemple de cancer du sein. (A) montre les deux populations de test avec en rouge les pixels appartenant à l'échantillon cancéreux et en bleu les pixels appartenant à l'échantillon sain. (B) montre pour l'ensemble des pixels appartenant à l'échantillon cancéreux ceux qui ont été bien classifiés (vert) ou non (noir). (C) montre, de la même façon, pour l'ensemble des pixels appartenant à l'échantillon sain ceux qui ont été bien classifiés (vert) ou non (noir).

Nous avons en effet une erreur de classification de 41,6% sur l'ensemble de test sain et 49,8% pour l'ensemble de test cancéreux. Cette méthode ne fonctionne tout simplement pas pour notre exemple comme le montre la figure 2 (A), les ensembles sont trop mélangés pour réaliser une séparation pixel par pixel.

V.2.b- Quadratic Discriminant Analysis

Nous pourrions avoir l'espoir qu'une hypersurface d'ordre plus élevée (une hyper-ellipse / parabole / hyperbole) permettrait de mieux isoler chaque population, ce que permet la méthode QDA[12] (Quadratic discriminant analysis). Pour cette méthode également, la taille des deux groupes doit être identique. Nous montrons avec la figure 3 des résultats semblables à la méthode LDA avec des améliorations notables, mais toujours très loin d'une classification acceptable.

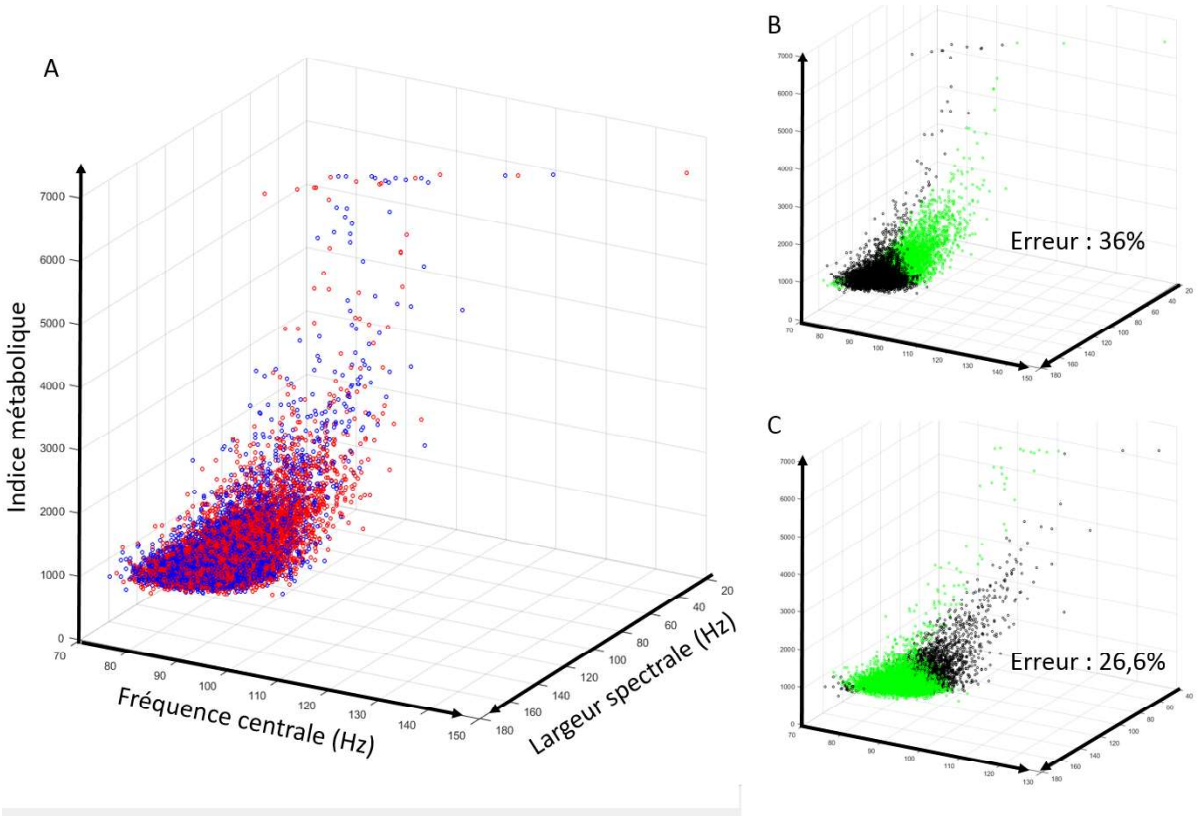

Figure 3 : Démonstration de l'échec d'une segmentation par QDA sur pixel unique avec un exemple de cancer du sein. (A) montre les deux populations de test avec en rouge les pixels appartenant à l'échantillon cancéreux et en bleu les pixels appartenant à l'échantillon sain. (B) montre pour l'ensemble des pixels appartenant à l'échantillon cancéreux ceux qui ont été bien classifiés (vert) ou non (noir). (C) montre, de la même façon, pour l'ensemble des pixels appartenant à l'échantillon sain ceux qui ont été bien classifiés (vert) ou non (noir).

Nous avons pour la méthode QDA une erreur de classification de 26,6% sur l'ensemble de test sain et 36% pour l'ensemble de test cancéreux.

V.2.c- Dépasser la non-séparabilité

Comme nous venons de le voir – avant même de vouloir généraliser notre outil de segmentation à un ensemble de test– il ne s'applique pas de façon convaincante à l'ensemble de données d'entrainement pour lequel il est optimal. Nous avons souligné le fait que les données appartenant à chacun des deux ensembles (sain et cancéreux) sont bien trop mélangés, ce qui rend toute classification de pixel unique caduque par avance. Se pose alors la question – si l'on veut persévérer dans cette voie – de savoir comment dépasser cette non-séparabilité. Une piste que nous avons choisi de poursuivre, consiste à réaliser des moyennes d'ensemble sur plusieurs pixels voisins (géographiquement proches) de façon à réduire la dispersion autour de la moyenne pour chacun des ensembles à classer. Mais sans laisser planer

de doutes plus longtemps, cette méthode – même si l'on prend des variantes plus élaborées – ne permet pas à elle seule de supprimer la non-séparabilité. Et pour cause, l'ensemble de pixels montrés précédemment viennent d'une image réelle, et comme toute image de tissu biologique, nous avons à faire face à une grande hétérogénéité de structures. Pour un observateur humain, il est tout à fait naturel et intuitif de segmenter les images en différentes structures correspondant à ses apprentissages. En ce qui concerne la machine, des solutions existent qui tentent d'imiter cette faculté humaine d'une performance redoutable, mais elles sont pour la plupart d'une moindre précision et peuvent se révéler complexe à mettre en œuvre. Le défi que nous présente la non-séparabilité est donc de jongler entre l'espace paramétrique d'un côté, l'espace géographique d'un autre, et enfin ce que nous savons à propos de l'objet que nous observons. Nous allons maintenant explorer plus en détail les pistes que nous venons d'évoquer et aboutir à l'exposé de la chaine de traitement permettant de résoudre au moins en partie ce problème central qu'est la non-séparabilité.

V.3- Chaine de traitement pour l'aide au diagnostic

L'aide au diagnostic, comme nous l'avons vu (V.1), peut se situer à différents niveaux d'abstraction (cf : Figure 1). Nous présentons ici une chaine de traitement complète, allant des données brutes au diagnostic. En réalité, différents aspects de cette chaine peuvent être utilisés pour aider au diagnostic tout en gardant un opérateur humain dans le rôle d'agent d'intégration de l'information et garant du diagnostic.

V.3.a- Présentation générale de la chaine de traitement

L'algorithme se compose de plusieurs étages (Figure 4) qui ne sont pas sans rappeler l'organisation en différentes strates d'abstraction présentée précédemment (cf : Figure 1).

Les chapitres II et III ont présentés l'ensemble des processus à l'œuvre dans la mesure par OCT plein champ et les traitements qui permettent l'extraction des paramètres physiques quantitatifs que sont :

- La quantité locale de lumière rétrodiffusée (dérivée de la mesure FFOCT).
- L'indice métabolique, qui mesure l'activité métabolique (cf : IV.3), dérivée de l'imagerie métabolique.
- Le temps caractéristique de fluctuation (ou la fréquence centrale dans le domaine fréquentiel), dérivée elle aussi de l'imagerie métabolique.
- La pureté spectrale (ou largeur spectrale), qui découle de la même mesure.

Nous avons vu que ces quatre paramètres ne permettaient pas de produire une proposition de diagnostic satisfaisante (V.2), c'est pourquoi nous cherchons d'abord à rassembler des pixels proches à la fois dans l'espace paramétrique et dans l'espace géographique au sein d'une même structure. Pour cela nous utilisons une technique que nous avons spécialement développée pour ce problème, inspirée de la méthode « mean shift[16–18] » et « flood-fill[19] » que nous détaillons à la sous-section V.3.b. Cette étape de segmentation permet d'introduire un certain nombre de paramètres libres dépendant du type d'échantillon examiné, ce qui permet une grande adaptabilité de la méthode.

A la sortie de cette étape, nous avons un ensemble de groupes de pixels constitués par différentes propriétés de proximités. Si l'algorithme est suffisamment performant, et que les paramètres de contrôle sont bien ajustés, ces structures doivent correspondre fortement avec les structures qu'un humain repère naturellement dans l'image. Si tel est le cas, il est enfin temps d'extraire de cet amas complexe de données un ensemble clair de critères pour établir le diagnostic. Ici encore, les traitements mis en œuvre pour calculer ces critères sont inspirés fortement des savoir-faire des pathologistes d'une part, et des particularités de la mesure par tomographie optique plein champ dynamique d'autre part. Quand tous les critères sont disponibles, il est temps de retourner à l'origine de notre problème : ce nouveau jeu de paramètres est-il plus performant pour l'établissement d'un diagnostic ? Grâce à une validation par une méthode éprouvée – l'histologie – nous pouvons constituer un groupe d'entrainement pour créer un classificateur robuste puis le tester sur un autre groupe pour évaluer son efficacité sur un groupe de test.

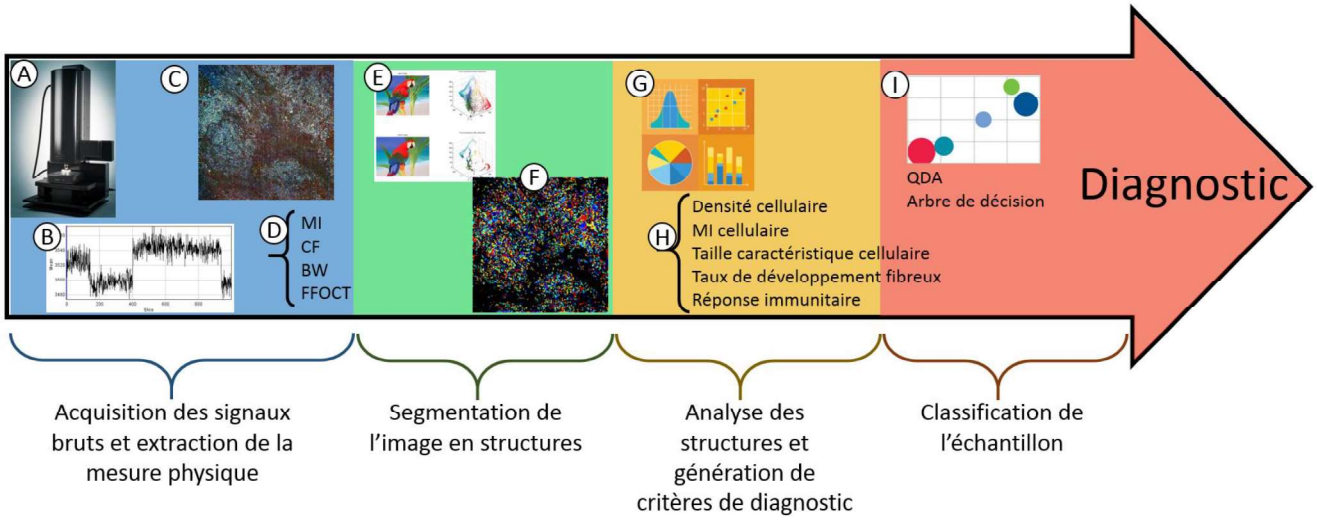

Figure 4 : Ensemble du processus de traitement, de l'acquisition au diagnostic. Le système d'OCT plein champ (A) permet l'acquisition de signaux bruts (B) qui permettent la mesure de paramètres physiques (D) qui peuvent être représentés sous formes d'images (C). Dans un second temps, ces images sont segmentées en différentes structures (F) à l'aide d'algorithmes s'appuyant sur une méthode que nous avons développée (E). Une fois identifiées, ces structures sont testées à l'aide d'outils morphologiques et statistiques (G) pour en déduire des valeurs sur lesquelles le diagnostic va pouvoir s'appuyer : ce sont des critères de diagnostic (H). Dans une dernière étape, l'ensemble de ces valeurs va permettre de réaliser la classification (I) de l'échantillon et ainsi proposer un diagnostic. Pour chaque étape du processus, un ensemble de paramètres libres doivent être définis, ce qui permet à la procédure de s'adapter au type de tissu examiné. C'est à travers ces paramètres qui seront détaillés plus loin que l'on peut utiliser le savoir *a priori* que l'on a sur l'échantillon.

Nous allons désormais rentrer dans le détail de cette procédure, étape par étape, dans le cas particulier de la constitution d'une métrique unique quantifiant la probabilité qu'une structure soit cancéreuse ou saine.

V.3.b- Constitution de structures

Si l'on se positionne par rapport à la représentation visuelle du processus (Figure 4) nous allons décrire ici l'ensemble de la seconde étape (en vert sur la figure 4). Au début de cette étape, nous disposons d'un ensemble de pixels avec deux ensembles de coordonnées :

- Coordonnées géographiques : c'est la position du pixel dans l'espace réel, reliée à la partie de tissu correspondante dans l'échantillon.
- Coordonnées paramétriques : il s'agit de l'ensemble des valeurs mesurées liées à l'emplacement géographique.

Le but de cette étape de traitement est de rajouter un troisième élément d'identification du pixel : l'appartenance à un groupe. Ce groupement de pixels, comme nous l'avons évoqué précédemment va permettre d'émuler numériquement, ce que nous faisons de façon intuitive : grouper un ensemble de pixels pour en faire une forme qui se détache d'un fond. Chez l'humain, cette procédure cognitive de bas niveau (certains de ces traitements sont effectués directement au niveau de la rétine[13]) est réalisée par des réseaux de neurones[14]. Il serait possible d'utiliser une approche basée sur les réseaux de neurones artificiels[15] pour émuler cette fonction, mais ces derniers sont complexes à mettre en œuvre. Nous préférerons utiliser une méthode plus simple directement inspirée des algorithmes « mean shift »[16–18] et « flood-fill »[19] que nous avons baptisé méthode Géographique-Paramétrique (GP).

Avant de tenter une segmentation de l'image brute, nous pouvons commencer par faciliter le travail en appliquant en amont un traitement visant à rendre plus homogène les structures que l'on souhaite détecter. Nous avons ici, dès la première étape, l'utilisation d'une connaissance *a priori* sur le tissu : la taille de la plus petite structure que l'on veut être capable de repérer. Cette information permet de sélectionner les paramètres de l'opérateur morphologique que l'on applique à l'image. Nous avons choisi d'utiliser une ouverture-fermeture par reconstruction[20] qui permet d'isoler et de conserver la forme attendue des cellules tout en homogénéisant les variations des paramètres aux échelles spatiales plus petites (Figure 6 B). Une fois cette étape passée, les paramètres sont normalisés de façon à occuper le segment [0 ; 1].

Décrivons maintenant le fonctionnement de cette méthode GP. Inspiré de la méthode « flood-fill »[19], nous partons d'un premier pixel de l'image que nous appellerons « pixel graine » et nous construisons à partir de lui une liste de pixels à tester contenant ses quatre voisins directs. Par un processus itératif, nous testons un à un chaque pixel de cette liste de test pour savoir si nous l'intégrons à la structure du pixel graine. Si le pixel testé satisfait tous les critères d'admission, il est intégré à la structure en cours et les paramètres de cette dernière sont mis à jour. De même, la liste de test vient s'enrichir des pixels voisins à celui nouvellement intégré. Le processus se répète jusqu'à ce que tous les pixels de la liste de test aient été testés. Nous passons alors à la graine suivante – si elle n'est pas déjà incluse dans une structure – et constituons une nouvelle structure jusqu'à épuisement de l'ensemble des pixels de l'image.

A partir de cette vision globale de la méthode GP, détaillons quelques points clefs. Tout d'abord regardons de quelle façon nous sélectionnons les pixels graines. De manière intuitive, pour que la prolifération (c'est-à-dire l'agrégation à une structure) soit optimale, nous voulons nous placer au cœur des structures visuellement apparentes sur l'image. Cela se traduit par un indice métabolique fort, signe

d'une activité importante, et nous pouvons donc classer les pixels de l'image selon leur valeur sur ce paramètre. Pour recontextualiser, l'algorithme va donc commencer par le pixel le plus actif (MI le plus important) en tant que graine et va tenter d'agréger autour de lui une première structure de pixels satisfaisant une série de tests. Une fois cette structure complète, le prochain pixel le plus actif ne faisant pas déjà parti de cette première structure servira de graine. Le processus se répète jusqu'à épuisement de tous les pixels de l'image comme nous l'avons déjà souligné, ce qui signifie que chaque pixel possède à la fin de cette procédure une structure d'appartenance.

Voyons sur quel ensemble de tests est jugé chaque pixel avant d'être intégré ou rejeté de la structure en cours. Pour le pixel aspirant, quatre conditions doivent être remplies pour être intégré :

- Distance paramétrique à la graine : il s'agit de la distance euclidienne dans l'espace paramétrique entre le pixel testé et le pixel graine. Le pixel de la liste de test le plus proche dans l'espace paramétrique de la graine sera favorisé pour être intégré à la structure.
- Distance géométrique à la graine : il s'agit là aussi de la distance euclidienne, mais dans l'espace géométrique cette fois entre le pixel testé et le pixel graine. Le pixel de la liste de test le plus proche dans l'espace géométrique de la graine sera favorisé pour être intégré à la structure.
- Surface de la structure : le pixel testé ne peut être intégré si la structure a déjà acquis sa surface limite (dans l'espace géométrique). Cette surface limite est fixée par l'utilisateur doit être de l'ordre de grandeur de la plus petite structure que l'on veut segmenter. S'il existe de plus grandes structures, elles seront sur-segmentées, mais nous reviendrons sur ce point plus loin.
- Horizon paramétrique : il s'agit de la distance paramétrique maximale autorisée. S'il n'y a plus de pixels concomitants à la structure à agréger se trouvant dans l'horizon paramétrique, la structure arrête sa croissance et l'algorithme enchaine sur la structure suivante.

Il y a donc deux paramètres de contrôle qui sont la surface et l'horizon paramétrique. Ces deux paramètres sont en concurrence puisqu'il s'agit pour l'un comme pour l'autre de limiter la taille de la structure soit dans l'espace géométrique soit dans l'espace paramétrique. Deux autres paramètres viennent influencer la façon dont les structures sont formées : la distance à la graine dans l'espace géométrique et paramétrique. En effet, une fois la graine choisie, le premier pixel à être intégré n'est pas choisi aléatoirement parmi les quatre voisins directs, c'est le plus proche dans les deux espaces qui est prioritaire. Par la suite, à chaque itération la liste de pixels à tester va croitre et l'algorithme agrégera toujours le pixel de cette liste qui est le plus proche de la graine (dans les deux espaces). Le paramètre P de discrimination permettant de tirer parmi ces pixels quel est le suivant :

$$\forall i \; dans \; la \; liste \; de \; test: P(\overrightarrow{g_i}, \overrightarrow{p_i}) = \sqrt{\mu . \alpha . \left|\left|\overrightarrow{g_i}\right|\right|^2 + (1 - \mu) . ||\overrightarrow{p_i}||^2}$$

Avec $\overrightarrow{g_i}, \overrightarrow{p_i}$ les positions du pixel i dans l'espace géométrique et paramétrique respectivement, α un coefficient d'homogénéisation entre les deux espaces calculé tel que :

$$\alpha = \frac{\left|\left|\overrightarrow{p_{moy}}\right|\right|^2}{\left|\left|\overrightarrow{g_{moy}}\right|\right|^2}$$

Avec $\overrightarrow{g_{moy}}, \overrightarrow{p_{moy}}$ les distances moyennes et μ un facteur modulateur variant dans [0 ; 1] qui nous permet de limiter l'anisotropie des structures. En effet, si μ = 1, la distance géométrique seule sera le facteur de sélection et l'on aura alors une structure ronde. Dans le cas contraire, si μ = 0, la structure pourra croitre avec une forme quelconque selon la proximité maximale dans l'espace paramétrique, ce qui conduit dans le cas extrême à des structures filiformes. Ces tests reflètent ce que nous présentions de façon schématique précédemment par une « proximité dans l'espace géographique et paramétrique ».

Introduisons une nuance supplémentaire. Nous avons parlé pour les tests précédents de « distance euclidienne », mais en pratique pour notre ensemble de paramètres, cela ne serait pas le plus judicieux. En effet, certains paramètres sont – de façon absolue ou contextuelle – plus importants que d'autres pour juger de la proximité paramétrique de deux pixels. Ainsi, nous avons introduit un opérateur de calcul de la distance paramétrique pondéré :

$$opérateur\ de\ distance\ paramétrique\ pondéré:$$

$$d(\overrightarrow{p_0}, \overrightarrow{p_1}) = \sqrt{\sum_{i=1}^{N} \beta_i (p_{0,i} - p_{1,i})^2}$$

Avec $\overrightarrow{p_0}, \overrightarrow{p_1}$ les positions des pixels dans l'espace paramétrique, N la dimension de l'espace paramétrique, β_i le coefficient de pondération pour le paramètre i et $p_{0,i}$, $p_{1,i}$ les valeurs des pixels sur le paramètre i. Dans notre cas, nous avons quatre paramètres déjà évoqués précédemment (FFOCT, MI, CF, BW), la pondération idéale reste à définir, mais nous pouvons faire les remarques suivantes :

- Pour tous les pixels de l'image, la somme des β_i doit être constante. Nous avons choisi de fixer cette somme à 1.
- Dans le cas particulier de nos métriques, nous avons déjà remarqué que la largeur spectrale a pour rôle de nuancer la fréquence centrale (III.4). Nous avons donc choisi de pondérer le paramètre de fréquence centrale par $1 - \frac{BW - \min(BW)}{max(BW) - \min(BW)}$ de façon à ne prendre en compte ce paramètre que lorsque la largeur spectrale est élevée.

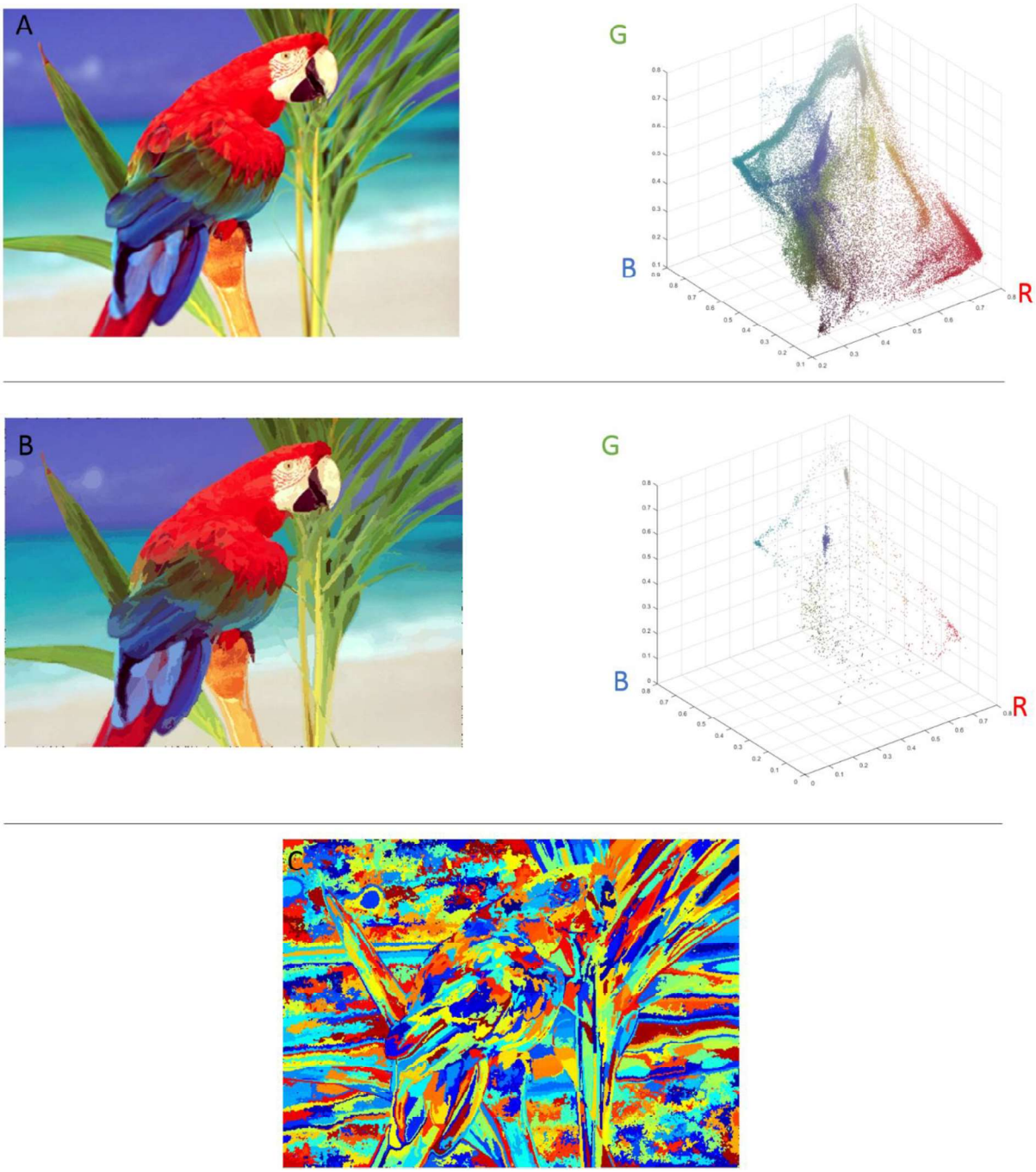

Figure 5 : Illustration de la méthode GP avec à gauche la représentation géographique des pixels (l'image) et à droite l'espace paramétrique (espace de couleur RGB). La ligne du haut (A) montre l'image de départ avant traitement ; la ligne du milieu présente le résultat (B) ; tandis que la ligne du bas montre la segmentation de l'image en différents groupes colorés de façon arbitraire (C). Nous pouvons noter l'uniformisation autour de la couleur dominante des régions dont les pixels étaient initialement proches dans l'espace paramétrique et concomitants dans l'espace géographique. Notons également la sur-segmentation de l'image, notamment des grandes plages uniformes comme le ciel, la mer ou la plage à cause de la taille limite de surface.

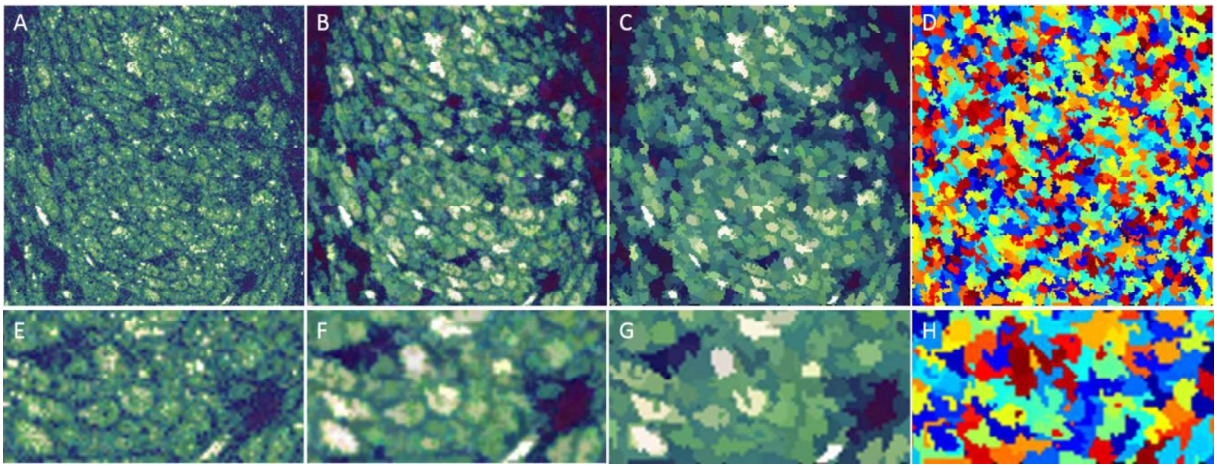

Figure 6 : Illustration de la méthode GP sur un tissu cancéreux. (A) tissu avant segmentation, en espace de couleur HSV dont les paramètres correspondent aux métriques CF, BW, MI comme décrit au III.3.b. (B) image (A) après ouverture-fermeture par reconstruction pour tirer le meilleur parti de l'algorithme GP comme décrit précédemment. (C) image après segmentation GP, chaque structure a reçu la valeur moyenne des pixels qui la compose. (D) image présentant les différentes structures segmentées en couleurs arbitraires. (E), (F), (G) et (H) sont des zoom sélectifs de (A), (B) et (C) sur quelques cellules.

L'utilisation de la méthode nous a donc permis de segmenter nos images en groupes, mais notre tâche n'est pas achevée pour autant. En effet, ces structures sont pour l'instant non identifiées. Nous allons donc devoir analyser les particularités de chaque structure pour réaliser une classification de ces dernières. Dans le cas présent, nous resterons à une analyse de la moyenne paramétrique de chaque structure, mais d'autres possibilités comme l'analyse de la taille, de la forme ou de la densité peuvent être utilisés.

V.3.c- Analyse et classification

Nous voici donc en possession d'une liste de structures contenant des pixels rassemblés par une proximité paramétrique et géographique. Il convient maintenant d'utiliser cette partition en groupes pour générer des critères de diagnostic de haut niveau, comme évoqué dans la figure 4 (bloc jaune (G) et (H)). Commençons par analyser les groupes de pixels sur la base de leur moyenne paramétrique (barycentre dans l'espace des paramètres). Nous pouvons classer les groupes de pixels en deux familles : les structures ne contenant pas de signal utile (que nous appellerons fond ou bruit par commodité) et celles présentant un signal d'intérêt. Nous allons ici encore pouvoir utiliser les connaissances que nous possédons sur le tissu pour réaliser ce tri. Nous avons réalisé l'étiquetage d'un nombre raisonnable de structures que nous pouvions clairement identifier comme signal ou bruit sur la base de nos connaissances, de la forme et du contraste de la structure par rapport à son environnement. Nous avons ensuite naturellement réparti aléatoirement ces structures étiquetées en deux groupes, un groupe d'apprentissage et un groupe de test. Pour déterminer une surface de séparation, nous avons utilisé une QDA (présentée au V.2.b) avec les résultats présentés à la figure 7.

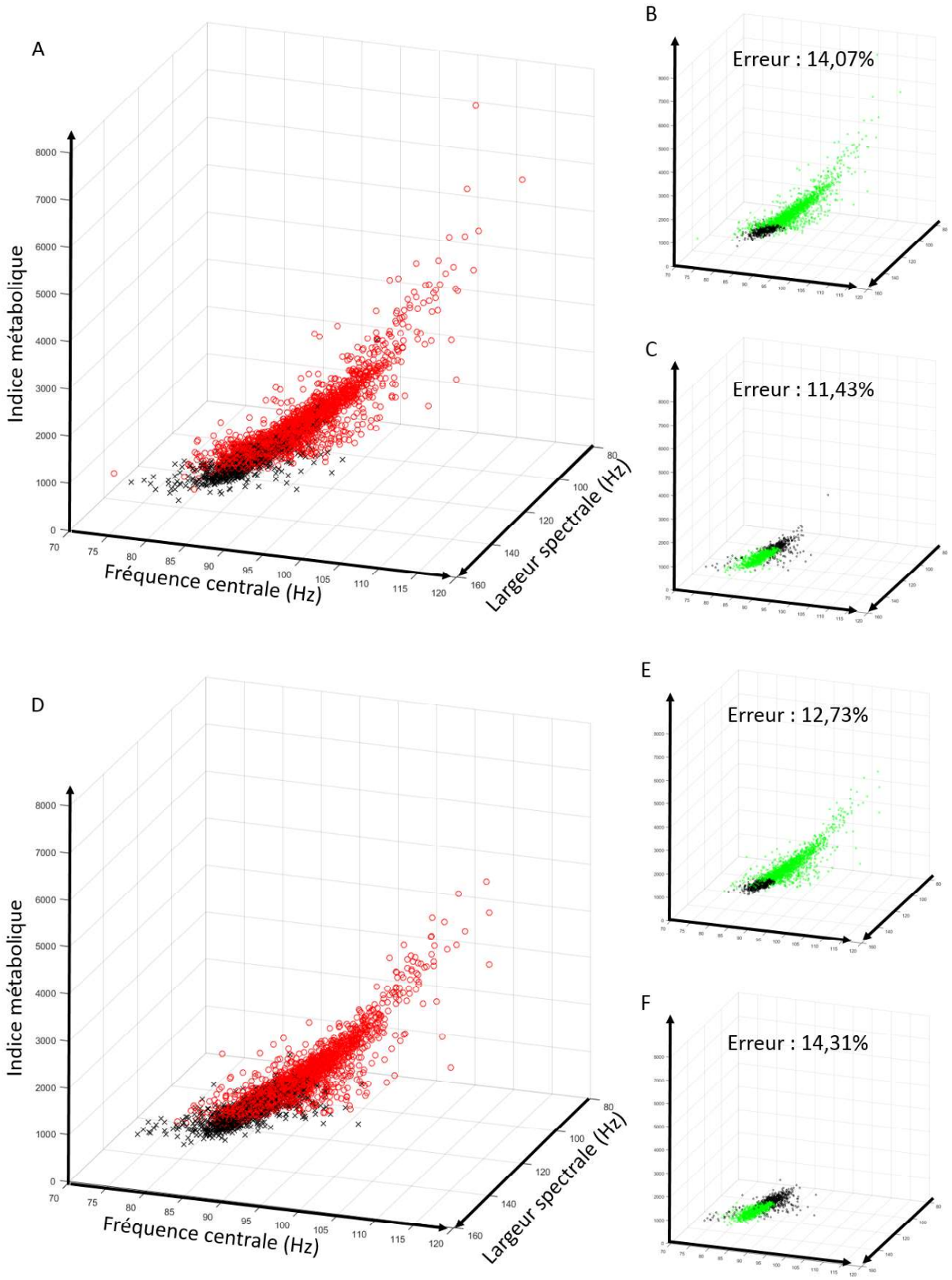

Figure 7 : (A) ensemble des pixels du groupe d'apprentissage, séparés en « bruit » (noir) et « signal » (rouge). (B) et (C) montrent respectivement le groupe « signal » et le groupe « bruit » avec en vert les pixels correctement segmentés et en noir les autres. Les erreurs correspondent à la fraction des pixels mal classifiés en rapport du nombre total de pixels dans ce groupe. (D) est l'ensemble des pixels du groupe de test avec le même code couleur que (A). (E) et (F) correspondent aux groupes « signal » et « bruit » pour le groupe de test avec le même code couleur que (C) et (D).

Nous notons une zone de recouvrement malgré la segmentation réalisée (V.3.b), avec dans tous les cas entre 10 et 15% de pixels mal étiquetés. Nous pouvons attribuer cette erreur à deux origines, la première est la proximité paramétrique du signal provenant de cellules peu actives et donc proches du bruit. La seconde est simplement la mauvaise classification de quelques pixels isolés lors de la constitution du groupe d'entrainement. Dans les deux cas, nous pouvons prendre une marge de sécurité autour de la surface de classification pour obtenir une erreur plus faible, cela exige simplement de laisser quelques pixels avec un statut incertain dans la zone médiane. Nous notons une bonne généralisation du séparateur avec des erreurs stables entre le groupe d'apprentissage et le groupe de test. Avec cette opération de segmentation, nous avons désormais accès au signal utile provenant des cellules. Cela permet en outre d'accéder à la moyenne des paramètres de notre signal indépendamment de la densité de structures actives dans le champ. Nous pouvons ainsi comparer ces valeurs globales de l'échantillon entre des tissus sains et d'autres atteints de pathologies.

V.4- Résultats

Si nous récapitulons les étapes qui séparent l'acquisition des données brutes à l'interprétation des résultats que nous nous apprêtons à faire, nous voyons se dessiner une logique simple en trois temps :

- Acquisition des données et production des métriques dynamiques (chapitres III et IV)
- Constatation de la non-séparabilité initiale des groupes sains et cancéreux (V.2)
- Prétraitements, segmentation de l'image et sélection du signal utile (V.3)

A la suite de ces étapes nous sommes donc en possession de données utiles (le fond a été retiré) et agrégées (la moyenne paramétrique sur chaque structure réduit la dispersion). Voyons maintenant comment ces étapes nous permettent de réaliser une séparation correcte entre tissus sains et cancéreux. Nous commencerons par montrer la séparabilité entre groupe sain et groupe cancéreux (figure 8), avant d'utiliser un classificateur (QDA, comme précédemment) pour effectuer la séparation entre eux. L'évaluation des performances de cette classification sera alors abordée (figure 9) et nous exposerons un outil simple basé sur cette classification pour fournir au pathologiste une première évaluation de l'échantillon (figure 10). Nous finirons par une perspective possible de quantification de l'impact de traitements anticancéreux (chimiothérapies et immunothérapies notamment) sur le tissu dans un contexte de recherche pharmaceutique (figure 11).

Nous avons commencé ce chapitre en montrant que les groupes sains et cancéreux sélectionnés sur des échantillons de sein ne pouvaient pas de prime abord être séparés (V.2). Cela a motivé la chaine de traitement présentée au (V.3). Si l'on représente de nouveau les groupes sains et cancéreux dans l'espace paramétrique (Figure 8) nous voyons qu'ils semblent présenter – par-delà leur zone de recouvrement – un décalage significatif. Si nous continuons d'agglomérer des structures voisines ensemble, nous pouvons réduire d'avantage la dispersion de chaque groupe jusqu'à supprimer leur recouvrement. Il convient ici d'être prudent : en effet, quel que soit le problème envisagé, il existe un seuil à partir duquel nous sommes toujours capables de séparer deux groupes sans aucun recouvrement. Pour s'en convaincre, il suffit d'imaginer le cas limite où l'on réalise la moyenne sur l'ensemble du groupe sain et sur l'ensemble du groupe cancéreux : dans ce cas on obtient simplement deux points non colocalisés.

La taille de groupe que l'on utilise lors de l'agrégation est donc fondamentale si l'on veut que cette séparabilité ait un sens lorsque l'on veut entrainer et utiliser un classificateur sur de nouvelles données.

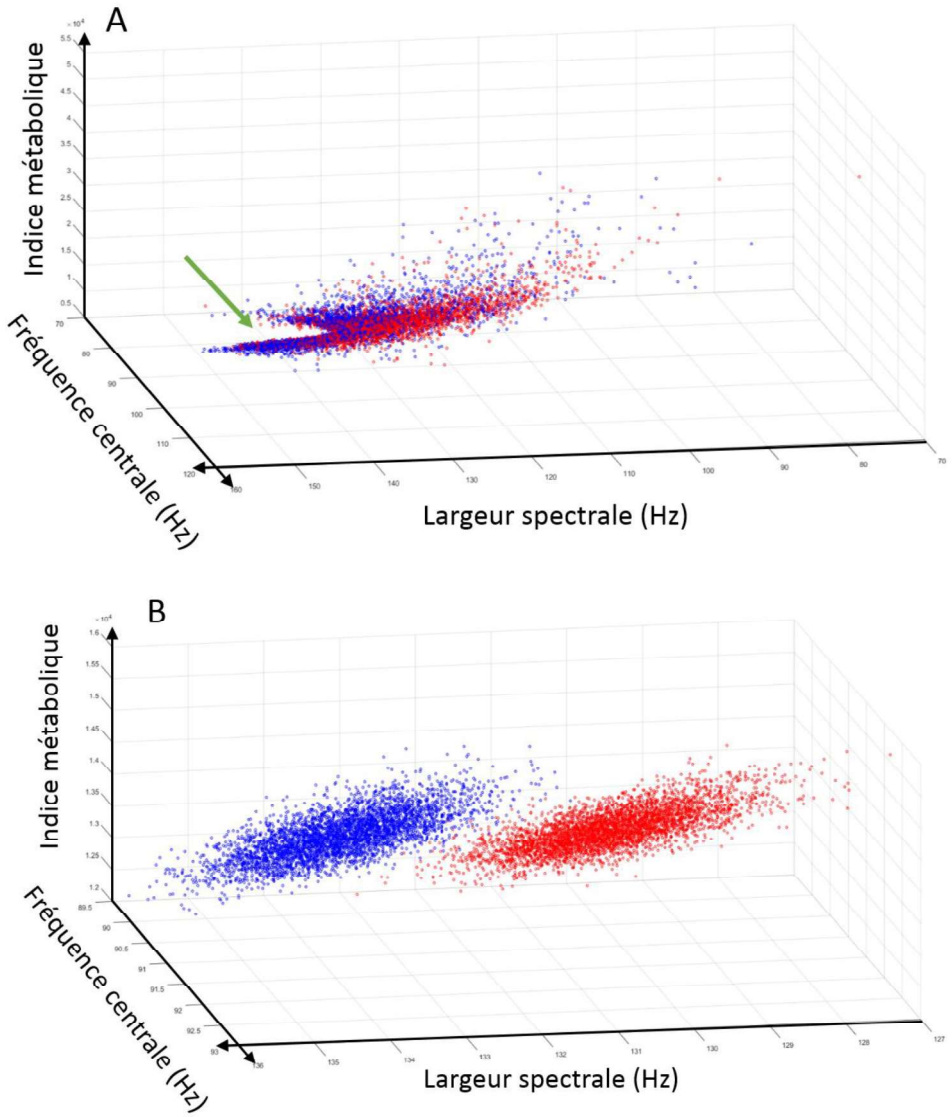

Figure 8 : (A) espace paramétrique avec en rouge les structures appartenant au groupe cancéreux et en bleu les structures appartenant au groupe sain. La flèche pointe la trace laissée par le retrait des pixels appartenant au fond (V.3.c), l'ellipse (surface de classification) est visible en négatif. (B) espace paramétrique après moyenne sur 100 structures (chaque cercle est le résultat de cette moyenne). (B) montre une claire distinction entre les deux groupes.

Compte tenu des remarques précédentes, nous avons entrainé un QDA pour discriminer au mieux entre les deux groupes. Pour évaluer les performances de cette classification, nous avons effectué plusieurs tirages aléatoires (n = 100) en sélectionnant à chaque fois 90% de nos données au hasard pour entrainer le classificateur QDA et en évaluant sur les 10% restants en termes de vrais positifs et de faux positifs. Nous avons répété ces tirages pour différentes tailles de groupes (sur lesquels nous prenons les moyennes paramétriques) ; les résultats sont présentés à la figure 9.

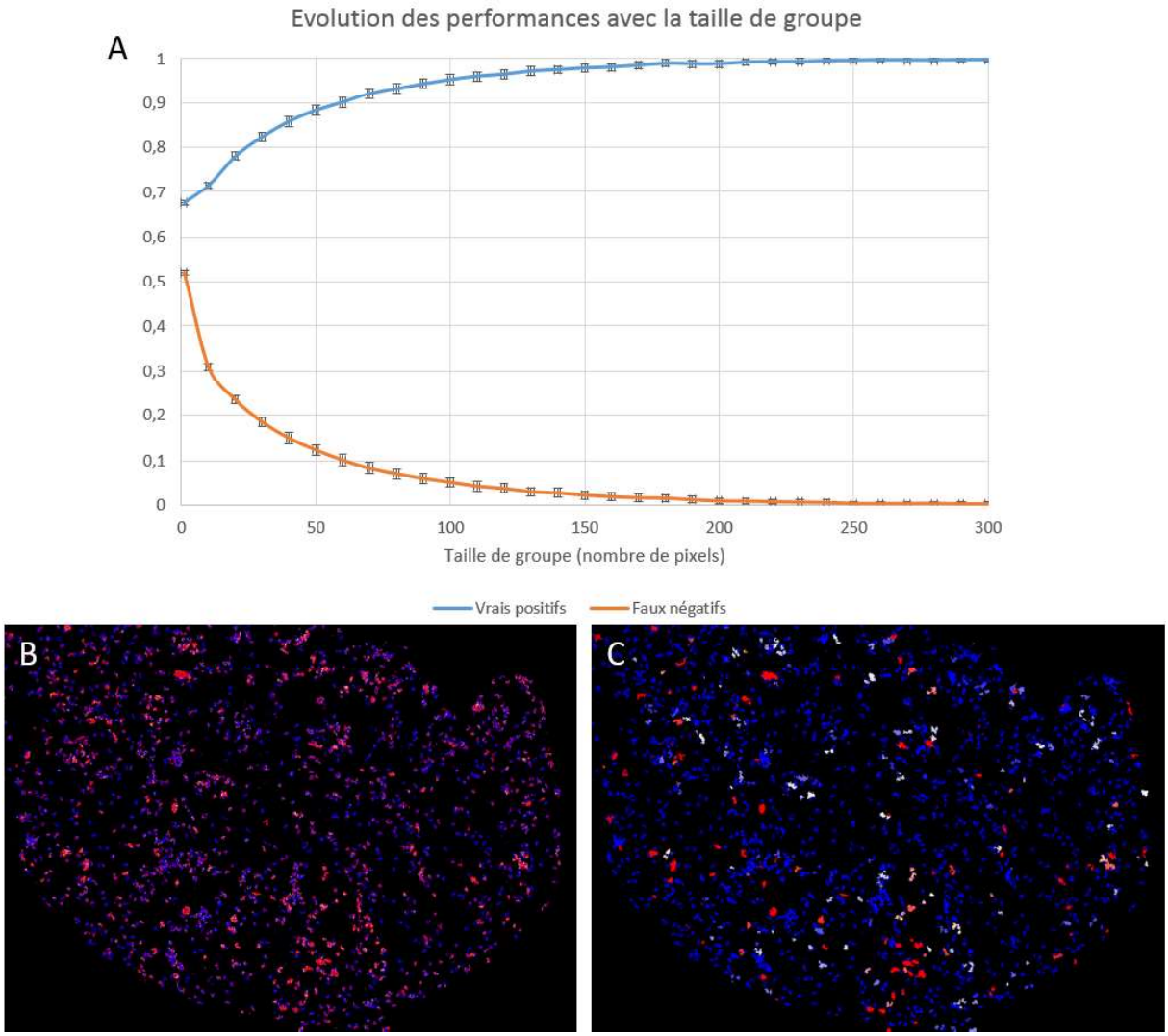

Figure 9 : (A) évaluation des performances de classification en fonction de la taille de groupe choisi, les coordonnées du graphe correspondent à la performance moyenne sur 100 tirages aléatoires du groupe d'entrainement et du groupe de test (proportions 90/10), les barres d'erreur représentent deux écarts types. (B) un ensemble de cellules saines classifiées sans groupement, on remarque un fort taux de mauvaises classifications. (C) même ensemble de cellules saines avec une taille de groupe maximale de 100 pixels (cette taille est fixée par le paramètre « surface de la structure » de la segmentation (V.3)). L'erreur de classification est effectivement plus faible comme le montre (A) lorsque l'on augmente la taille de groupe : les faux positifs (détection de cancer dans un tissu sain ; en rouge sur (B) et (C)) chutent.

Nous avons désormais une évaluation claire des performances du classificateur, nous pouvons donc l'utiliser sur toute image acquise sur des tissus similaires pour évaluer leur probabilité d'être cancéreux. Nous aurions pu nous contenter d'une approche de classification binaire, mais force est de constater que la confiance que nous avons dans cette classification n'est pas équivalente selon que la structure considérée se trouve proche de la surface de classification ou au contraire proche du barycentre d'un des groupes.

Pour synthétiser cette valeur de confiance, nous avons opté pour une simple distance euclidienne de la structure concernée à la surface séparatrice S ; ce qui correspond à la distance entre le barycentre de la structure et sa projection sur la surface S. Cette projection P_i de la structure i sur S nous permet de calculer :

$$C_i = \min\left(\frac{\overline{B_i P_i}}{\overline{O_c P_c}}; 1\right) si\ P_i\ identifié\ comme\ cancéreux$$

$$C_i = \min\left(\frac{\overline{B_i P_i}}{\overline{O_s P_s}}; 1\right) si\ P_i\ identifié\ comme\ sain$$

Avec Bi le barycentre de la structure i, Oc le barycentre de l'ensemble des structures cancéreuses, et Os celui des structures saines, Pc et Ps la projection de ces barycentres sur la surface de séparation S.

C_i est donc une valeur de l'intervalle [0 ; 1] nous permettant de juger la confiance de classification. Maintenant, si l'on combine le résultat de la classification (que l'on peut exprimer par deux couleurs comme à la figure 9 avec le rouge et le bleu), le résultat de l'indice de confiance (que l'on peut exprimer comme la saturation de la couleur générée par la classification) et la carte d'indice métabolique (que l'on peut exprimer comme l'intensité), nous obtenons un nouvel outil : une carte présentant la morphologie du tissu ainsi que les cellules avec un indice coloré attirant l'attention vers les zones les plus suspectes (dans notre exemple, les zones présentant une forte densité de rouge vif). Cet outil peut avoir un double intérêt :

- Il peut permettre une qualification automatique de zones de l'échantillon présentant une très forte densité de cellules identifiées comme tumorales avec une forte certitude, laissant au pathologiste l'analyse des zones douteuses. Cette application permettrait un gain de temps de lecture, évitant à l'opérateur d'explorer des zones où le diagnostic ne fait aucun doute.
- Cet outil peut également être utilisé comme outil complémentaire de diagnostic, attirant l'attention de l'opérateur sur certaines structures ou cellules suspectes que d'autres critères de diagnostic (comme la forme ou la relation à l'environnement) viendront éclaircir. Par la proportion de tissu classé comme sain ou comme tumoral, cet outil fourni un critère supplémentaire que le pathologiste pourra intégrer aux autres critères (morphologie, densité cellulaire, etc.) pour formuler le diagnostic et influer sur la procédure de chirurgie.

Nous présentons à la figure 10 deux exemples de cet outil, sur tissu sain et sur tissu tumoral respectivement.

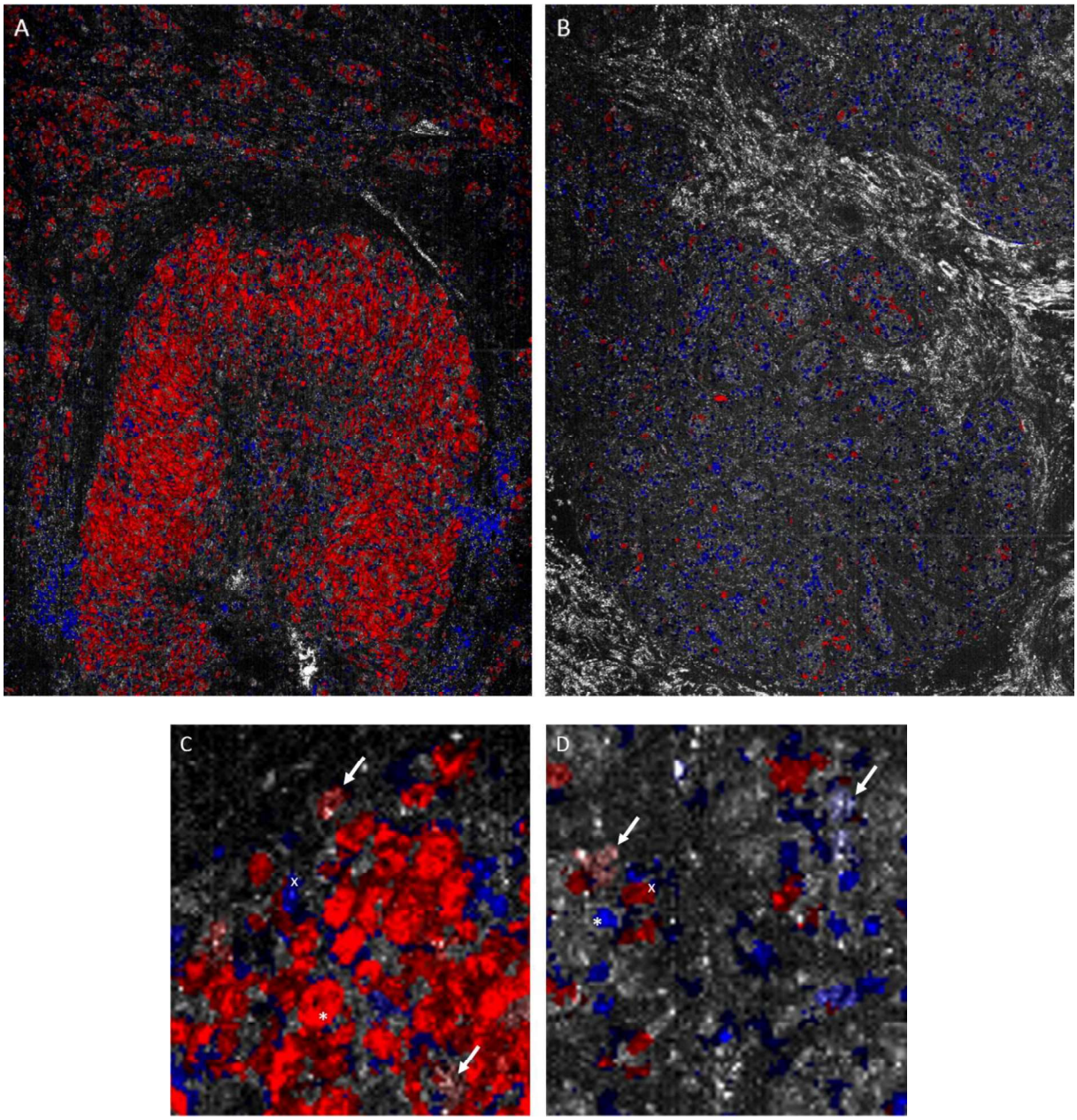

Figure 10 : Outil d'aide au diagnostic utilisé sur un échantillon de cancer du sein (A) – DCIS présenté à la figure 4.15 – et (B) un échantillon sain. (C) et (D) sont des agrandissements respectifs de (A) et (B). (→) indiquent des structures présentant une incertitude sur la classification (saturation plus faible). (*) indiquent des cellules correctement identifiées alors que (x) marquent des structures où la classification a échouée.

Cet outil, par-delà son utilisation pour l'aide au diagnostic, pourrait être utilisé dans un contexte de recherche pharmaceutique pour l'évaluation de l'efficacité de traitements anticancéreux. En effet, comme nous le montrons à la figure 11, le niveau de signal semble chuter fortement pour un tissu cancéreux traité par chimiothérapie. Le faible nombre d'échantillons de ce type ne permet pas de tirer une conclusion mais propose plutôt une perspective : si l'ensemble des échantillons cancéreux occupent une région paramétrique bien définie d'une part (ce qui semble effectivement le cas comme nous le montrons à la figure 11), d'autre part que les tissus morts occupent eux aussi une région bien définie (ce qui a été montré au IV.3), et finalement que les tissus traités par chimiothérapie se placent dans l'espace intermédiaire entre ces deux régions ; alors nous avons là une possibilité de quantifier l'effet du

traitement en termes de suppression de l'activité cancéreuse dans le tissu. Cette approche aurait un intérêt tout particulier pour la chimiothérapie, notamment pour évaluer son action au sein du tissu (par exemple évaluer si une cible en particulier présente une résistance au traitement). Pour l'immunothérapie, l'utilisation de l'imagerie dynamique permettrait une double quantification, à la fois de la chute du signal en provenance des cellules tumorales, mais aussi de la mobilisation de cellules immunitaires dans le tissu. En effet, comme nous l'avons vu du IV.4.b au IV.4e, les cellules immunitaires ont une signature dynamique bien particulière qui les différencie aisément des cellules tumorales. Pour l'évaluation de la chute de signal à la suite d'un traitement, une simple distance euclidienne peut être utilisée. Il suffit pour cela de calculer les coordonnées du projeté P_{chimio} du barycentre du groupe traité par chimiothérapie sur la droite (O_cO_m) passant par le barycentre du groupe cancéreux O_c et celui du groupe constitué par les tissus morts O_m ; puis avec ce projeté, nous pouvons calculer la métrique :

$$E = \frac{\overline{O_c P_{chimio}}}{\overline{O_c O_m}}$$

Cette métrique nous donne une évaluation de l'effet du traitement. Nous pouvons différencier deux moyens de calculer cette métrique, la première est une évaluation globale sur l'ensemble du tissu qui présente le défaut de ne pas prendre en compte la densité cellulaire (comme nous l'avons vu précédemment au V.2 et V.3). La seconde est la combinaison de deux indicateurs :

- Un indicateur d'activité cellulaire relatif : il s'agit ici du même indicateur E que l'on a présenté précédemment mais calculé uniquement sur les cellules détectées (comme présenté au V.3).
- Un indicateur de densité cellulaire : cet indicateur est important car avec le traitement anticancéreux, une grande proportion du tissu passera en dessous du seuil de sélection du signal utile (cf figure 7), ce qui faussera l'évaluation dans le cas où une sous-population de cellules tumorale a parfaitement résisté au traitement mais où le reste des cellules tumorales ont été totalement éradiquées.

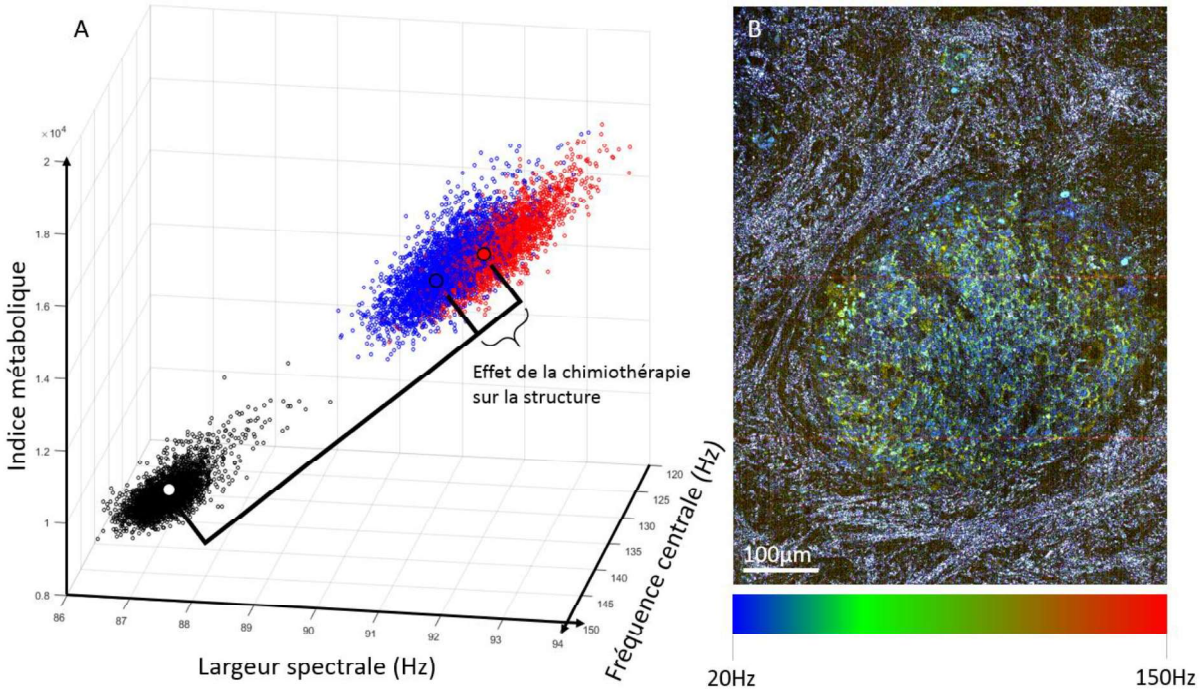

Figure 11 : (A) espace paramétrique avec en noir un échantillon représentatif de tissu mort, en rouge un échantillon représentatif de cellules tumorales et en bleu un échantillon tumoral traité par chimiothérapie. L'échelle allant du barycentre du groupe tumoral au centre du tissu mort permet d'évaluer l'impact du traitement sur les cellules restantes, ici l'impact est non négligeable, mais reste faible. (B) image dynamique du tissu traité par chimiothérapie.

V.5- Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons mis en lumière la possibilité d'utiliser certains outils issus du domaine du traitement et de l'analyse de données pour tirer parti des métriques proposées par l'OCT plein champ dynamique. Nous avons montré qu'une approche simpliste ne permettait pas de différencier entre tissu sain et tissu tumoral et nous avons donc présenté une approche originale pour contourner ce problème. Nous avons enfin exposé les performances de cette approche géographique-paramétrique et montré deux outils que l'on peut dériver de cette approche, l'un pour l'aide au diagnostic, le second pour l'évaluation de l'efficacité de nouveaux traitements anticancéreux. Si l'on se reporte à l'exposition globale du problème avec lequel nous avons débuté ce chapitre (cf figures 1 et 4), nous pouvons constater que les développements réalisés dans la suite de ce chapitre ne constituent qu'une possibilité parmi bien d'autres pour dégager des marqueurs de hauts niveau d'abstraction de la masse de données brutes que constituent nos images. Cette génération de marqueurs profite du dialogue continu entre amélioration instrumentale et développements des traitements. En effet, l'apport de modalités supplémentaires permettrait d'ajouter des dimensions à l'espace paramétrique, ce qui ouvre la possibilité à de nouveaux traitements adaptés à la signification de chaque modalité d'imagerie. D'autre part, l'architecture de traitement réalisé peut à son tour guider le développement instrumental dans le but de franchir certaines limites ou pour gagner en performances. Nous pouvons à ce titre noter l'impact du passage à une caméra permettant un meilleur RSB sans laquelle les résultats présentés ici n'auraient pu être obtenus. Les résultats présentés dans ce chapitre tendent à confirmer une intuition que nous avons proposé dès le premier chapitre (I.5.a) : la combinaison d'indicateurs imparfaits, présentant tous leurs spécificités semble se dessiner comme une voie de développement plus réaliste et apportant une plus-

value plus importante que la recherche du mode d'imagerie parfait. Non seulement l'approche multimodale semble proposer des solutions d'avenir pour le diagnostic médical, mais c'est aussi par les méthodes permettant l'agrégation de ces modes d'imagerie en un tout cohérent pour l'utilisateur que passent les principaux défis de l'innovation de ce secteur.

Bibliographie du chapitre V :

1. J. M. S. Prewitt and M. L. Mendelsohn, "The Analysis of Cell Images" Ann. N. Y. Acad. Sci. **128**(3), 1035–1053 (1966)
2. H. C. Andrews, W. K. Pratt, and K. Caspari, "Computer techniques in image processing" CERN Document Server, 1970, (http://cds.cern.ch/record/103727)
3. C. G. Loukas et al., "An image analysis-based approach for automated counting of cancer cell nuclei in tissue sections" Cytometry A **55A**(1), 30–42 (2003)
4. M. Goldbaum et al., "Automated diagnosis and image understanding with object extraction, object classification, and inferencing in retinal images" in Proceedings of 3rd IEEE International Conference on Image Processing **3**, pp. 695–698 vol.3 (1996)
5. P. Rubegni et al., "Automated diagnosis of pigmented skin lesions" Int. J. Cancer **101**(6), 576–580 (2002)
6. M. G. Tsipouras et al., "Automated Diagnosis of Coronary Artery Disease Based on Data Mining and Fuzzy Modeling" IEEE Trans. Inf. Technol. Biomed. **12**(4), 447–458 (2008)
7. J. Nayak et al., "Automated Diagnosis of Glaucoma Using Digital Fundus Images," J. Med. Syst. **33**(5), 337 (2009)
8. P. Lescure et al., "Color segmentation of biological microscopic images" (1999), 182–193
9. V. Meas-Yedid, S. Tilie, and J. C. Olivo-Marin, "Color image segmentation based on Markov random field clustering for histological image analysis" in Object recognition supported by user interaction for service robots **1**, pp. 796–799 vol.1 (2002)
10. N. Hervé et al., "Statistical color texture descriptors for histological images analysis" in 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro, pp. 724–727 (2011)
11. A. J. Izenman, "Linear Discriminant Analysis" in Modern Multivariate Statistical Techniques, pp. 237–280, Springer New York (2013)
12. G. McLachlan, *Discriminant Analysis and Statistical Pattern Recognition*, John Wiley & Sons (2004).
13. G. D. Field and E. J. Chichilnisky, "Information Processing in the Primate Retina: Circuitry and Coding" Annu. Rev. Neurosci. **30**(1), 1–30 (2007)
14. E. Kandel, J. Schwartz, and T. Jessell, *Principles of Neural Science*, McGraw-Hill Medical (2000).
15. B. YEGNANARAYANA, *ARTIFICIAL NEURAL NETWORKS*, PHI Learning Pvt. Ltd. (2009).
16. K. Fukunaga and L. Hostetler, "The estimation of the gradient of a density function, with applications in pattern recognition" IEEE Trans. Inf. Theory **21**(1), 32–40 (1975)
17. D. Comaniciu and P. Meer, "Mean shift analysis and applications" in Proceedings of the Seventh IEEE International Conference on Computer Vision **2**, pp. 1197–1203 vol.2 (1999)
18. D. Comaniciu and P. Meer, "Mean shift: a robust approach toward feature space analysis" IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell. **24**(5), 603–619 (2002)
19. S. Torbert, *Applied Computer Science*, 2nd ed., Springer Publishing Company, Incorporated (2016).
20. B. Jähne, *Digital image processing*, 6th rev. and ext. ed, Springer, Berlin ; New York (2005).

Conclusion générale

A l'heure de conclure ce manuscrit de thèse, il est nécessaire de replacer les cinq chapitres que nous avons parcourus ensemble dans le contexte plus large de la question qui a structuré ces travaux : comment augmenter les performances de l'OCT plein champ pour atteindre le « gold standard » fixé par le diagnostic histologique ? Cette question nous a d'abord porté à comprendre les bases physiques de l'OCT plein champ puis à suivre l'idée suivante : « la vie se dévoile à travers le mouvement ». Il n'en fallait pas plus pour engendrer ce que nous avons été amenés à appeler « imagerie métabolique ». Issue de l'OCT plein champ, ne nécessitant aucune modification instrumentale, et révélant un contraste insoupçonné, cette méthode s'est rapidement imposée comme la modalité centrale de ces travaux de thèse, qu'il convenait de comprendre et de développer. Nous avons dès lors tenté d'appréhender les phénomènes dynamiques à travers une compréhension des phénomènes mis en jeu au carrefour de la physique et de la biologie. De ces recherches découlaient naturellement un ensemble de métriques permettant de quantifier ces phénomènes dynamiques. Au-delà de l'aspect théorique qui a soutenu et guidé nos démarches expérimentales, la dimension exploratoire a été mise à l'honneur. En effet, c'est toujours avec un réel plaisir que nous avons découvert, un à un, les différents tissus et leurs caractéristiques dynamiques. Ces observations, à mesure qu'elles se succédaient, nous portaient vers de nouvelles hypothèses, de nouvelles énigmes.

De nombreuses questions restent encore en suspens, des questions qui mériteraient des recherches approfondies dans des disciplines aussi éloignées en apparence que la biologie cellulaire, la physique des milieux complexes ou le traitement de l'image et l'apprentissage par ordinateur. En parallèle de ces questions, un certain nombre de pistes ont été ouvertes par nos travaux. En effet, il semblerait que l'observation de phénomènes métaboliques à cette échelle, avec les avantages proposées par l'OCT plein champ, réponde à un véritable manque dans la palette d'outils de l'imagerie biomédicale. Cela ouvre donc des perspectives variées motivant l'utilisation de cet outil pour explorer de nouvelles hypothèses dans des spécialités diverses.

Le développement de l'imagerie métabolique a non seulement permis de conserver une relative simplicité instrumentale, mais a surtout débloqué l'accès à des structures cellulaires invisibles auparavant. Cela nous conforte dans l'idée que l'OCT plein champ s'imposera comme un outil diagnostique de premier plan pour bon nombre d'applications manquant aujourd'hui de réponses rapides. Ce besoin est notamment présent dans l'ensemble des chirurgies minimalement invasives comme la chirurgie de Mohs pour la peau, l'exérèse de pièces tumorale dans le cerveau ou d'autres organes à forte valeur fonctionnelle ou identitaire.

L'ajout de nouveaux modes d'imagerie permettra de poursuivre ces avancées. Il y a indubitablement d'importantes innovations à découvrir dans la manière de combiner au mieux différents modes d'imagerie avec des particularités aussi marquées. Nous pensons que l'avenir de l'imagerie médicale pourra tirer de grands bénéfices de synthèses multimodales intelligentes, permettant à l'utilisateur de se concentrer sur son expertise pour poser un diagnostic plus rapide, plus simple, plus fiable.

Dans un système de santé en proie à de nombreuses mutations et d'importants défis, l'apport de nouvelles technologies telles que la tomographie plein champ dynamique permettrait d'alléger plusieurs fardeaux. Bien sûr nous pensons immédiatement aux réductions de coûts pour les hôpitaux, permettant des investissements là où il y en a tant besoin, que ce soit en matériel plus moderne, en capacité d'accueil accru ou en personnel médical en plus grand nombre. Mais c'est aussi – de façon moins quantifiable, mais potentiellement plus important encore – le bien-être des patients, la qualité de travail du personnel médical et au-delà : vers une santé plus humaine.

Remerciements

Je souhaite avant toute chose remercier les rapporteurs – le professeur GIOUX et le professeur TAVITIAN – et membres du jury – Mme. VINCENT-SALOMON, Mme LAPLACE, Mme. MEAS-YEDID et Mme DALIMIER – pour le temps et le travail consacrés à l'examen de ce manuscrit.

Les travaux de thèses présentés dans ce manuscrit n'auraient pas été possibles sans le concours de nombreuses personnes à divers niveaux. Je pense en premier lieu à Claude BOCCARA, pour son encadrement, sa bienveillance et sa présence ; mais aussi pour avoir su tenir à la perfection le rôle de chef d'orchestre de ce projet.

Mes pensées vont naturellement ensuite aux personnes avec lesquelles j'ai eu le plaisir de collaborer durablement, les membres de l'équipe OCT de l'institut Langevin (Olivier THOUVENIN, Viacheslav MAZLIN, Peng XIAO, Egidijus AUKSORIUS, Amir NAHAS, Thu Mai NGUYEN, Amory BADON, Victor BAROLLE, Yasmina FEDALA, Charles-Edouard LEROUX et tous les autres) et toute l'équipe LLTech (Bertrand Le Conte de Poly, Eugénie DALIMIER, Emilie BENOIT, Franck MARTINS, Alban MOUNIER et les anciens : Charles BROSSOLLET et Fabrice HARMS).

Je souhaite remercier tous les partenaires et collaborateurs externes, notamment les membres de l'équipe de Zsolt Lenkei (Dynamique et Structure Neuronale) et tout particulièrement Diana ZALA et Maureen Mc FADDEN pour nous avoir permis d'expérimenter très tôt sur tissu animal frais. Mais aussi l'équipe de Danijela MATIC VIGNJEVIC (Migration et invasion cellulaire – Institut Curie) et en particulier Ralitza STANEVA pour les premiers tests sur échantillons cancéreux. Parmi les partenaires externes figurent également les collaborateurs hospitaliers qui ont permis par leur investissement lors des expériences ou lors des discussions de faire avancer de façon significative notre compréhension des images que l'imagerie dynamique permettait. Parmi eux – sans pouvoir être exhaustif – je remercie Marine CAMUS et Carole NICCO de l'hôpital Cochin pour nos collaborations sur le cancer du pancréas ; Bertrand DEVAUX et son équipe à l'hôpital St Anne pour son investissement dans l'étude pilote que nous avons menée sur les tumeurs cérébrales ; Vincent SERVOIS de l'hôpital Curie ; et pour finir Muriel ABBACI, Corine LAPLACE, Aicha BEN LAKHDAR, Odile CASITRAGHI, Marie-Christine MATHIEU, Khadija CHERIF-REBAI et leurs collègues de l'Institut Gustave Roussy pour leur contribution aux expérimentations ciblant le cancer du sein.

Il serait difficile d'évaluer l'impact qu'ont eu toutes les discussions, souvent informelles, sur nos travaux ; et il serait aussi difficile de citer ici tous ceux qui ont tant apporté par leurs conseils. Au risque de n'en sélectionner que quelques-uns : Vannary MEAS-YEDID HARDY de l'institut Pasteur pour le traitement d'image et l'apprentissage par ordinateur, Pierre ROUSSEL de l'institut Langevin et l'équipe de Habib AMMARI pour les discussions passionnantes concernant la décomposition en valeur singulières.

J'aimerais saluer le travail des stagiaires avec lesquels j'ai eu le loisir d'interagir au cours de ces années de thèses : Michel AULELEY (UPMC), Virgile DREYFUS (IOGS), Pierrick MONTAGNE (Université Toulouse III), Clément Gastaud (ENS Lyon), Clément ROBERT-RALISON (ESPCI) et Jorge ALARCO-PEREZ (BME Paris).

Cette thèse a été financée par une bourse CIFRE obtenue avec LLTech et je souhaite donc saluer l'ANRT pour avoir rendu ce projet possible.

Pour finir je ne saurais comment remercier ma famille et amis qui m'ont soutenu tout au long de ce parcours.

Résumé

La tomographie de cohérence optique plein champ est une technique de microscopie permettant d'imager un plan d'intérêt en profondeur dans un milieu diffusant. Cette technique a été utilisée pour l'examen de pièces opératoires dans un but de diagnostic en cancérologie. L'utilisation de cette technique permettrait en effet de fournir un outil de diagnostic peropératoire rapide et fiable, évitant ainsi de nombreuses procédures de réopération. Ces réopérations peuvent survenir lorsque – lors du diagnostic final par analyse de coupes histologiques – le pathologiste décèle la présence de tissus cancéreux restant, non retirés au cours de l'opération.
L'OCT plein champ a montré de bons résultats pour cette application. Néanmoins, cette technique ne fournit qu'un contraste morphologique des tissus, ne permettant pas d'utiliser des critères de qualification des pièces opératoires basées – par exemple – sur la morphologie ou la densité cellulaire.
Nous avons développé une nouvelle modalité d'imagerie basée sur l'OCT plein champ permettant de révéler un contraste métabolique dans le tissu à une échelle subcellulaire. Ce contraste permet de révéler les cellules précédemment non distinguées en OCT plein champ. Nous avons également utilisé la mesure quantitative de cette modalité pour réaliser des outils d'aide au diagnostic utilisant des approches d'apprentissage par ordinateur.

Mots Clés

Imagerie biomédicale, Imagerie multimodale, Tomographie de cohérence optique plein champ, Dynamiques cellulaires, Métabolisme, Contraste endogène.

Abstract

Full filed optical coherence tomography is a microscopy imaging technique allowing to image a specific slice in a scattering medium, in depth. This technique has been used for the diagnosis of biopsy in cancerology. This technique could be an efficient and fast way to diagnose excised tissues during surgery. This would avoid numerous reoperations procedures. These reoperations are necessary when a pathologist suspects cancerous tissue to still be present in the patient, based on histological slide examination.
FFOCT has shown promising results for that purpose. Nevertheless, this technique only gives a morphological contrast of tissues, which is not enough for applying some diagnostic criteria such as cell morphology or cell density.
We developed a new imaging modality based on FFOCT allowing to reveal metabolic contrast in tissues at the subcellular scale. This contrast reveals cells previously indistinguishable with FFOCT. We also used this quantitative metric to propose tools to facilitate diagnosis, using machine learning approaches.

Keywords

Biomedical imaging, multimodal imaging, Full field optical coherence tomography, cell dynamics, metabolism, endogenous contrast.