

## Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire (LC-OCT) basée sur un interféromètre de Mirau pour le diagnostic des cancers de la peau

Wei Xue

### ► To cite this version:

Wei Xue. Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire (LC-OCT) basée sur un interféromètre de Mirau pour le diagnostic des cancers de la peau. Optique [physics.optics]. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT: 2022UPAST070. tel-03827082

## HAL Id: tel-03827082 https://pastel.hal.science/tel-03827082

Submitted on 24 Oct 2022

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Tomographie par cohérence optique confocale linéaire (LC-OCT) basée sur un interféromètre de Mirau pour le diagnostic des cancers de la peau

Line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) based on a Mirau interferometer for skin cancer diagnosis

## Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°575 : electrical, optical, bio : physics and engineering (EOBE) Spécialité de doctorat : Electronique et Optoélectronique, Nano- et Microtechnologies Graduate School : Sciences de l'ingénierie et des systèmes. Référent : Institut d'Optique

Thèse préparée dans l'unité de recherche Laboratoire Charles Fabry (Université Paris-Saclay, Institut d'Optique Graduate School, CNRS), sous la direction d'Arnaud DUBOIS, professeur des universités.

## Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 11 mai 2022, par

# Wei Kai XUE

## **Composition du Jury**

Manuel FLURY Rapporteur & Examinateur Maître de Conférences, INSA Strasbourg **Guillaume MAIRE** Rapporteur & Examinateur Maître de Conférences, Institut Fresnel Marie-Claire SCHANNE-KLEIN Présidente & Examinatrice Directrice de Recherche, LOB **Cathie VENTALON Examinatrice** Chargée de Recherche, IBENS **Fabian ZOMER** Examinateur Professeur, IJCLab Arnaud DUBOIS Directeur de thèse Professeur, Laboratoire Charles Fabry

NNT : 2022UPAST070



**ÉCOLE DOCTORALE** Physique et ingénierie: Electrons, Photons, Sciences du vivant (EOBE)

**Titre :** Tomographie par cohérence optique confocale linéaire (LC-OCT) basée sur un interféromètre de Mirau pour le diagnostic des cancers de la peau

Mots clés : tomographie par cohérence optique, interféromètre de Mirau, instrumentation optique, imagerie médicale.

**Résumé :** Les cancers de la peau sont le type de cancer le plus commun, dont les conséquences peuvent cependant être facilement stoppées en cas de détection précoce. Seulement, les diagnostics sont aujourd'hui réalisés après un simple examen visuel, éventuellement suivi d'un prélèvement de peau suspecte. Des coupes histologiques sont alors extraites de cet échantillon en le découpant en fines tranches puis en le colorant. Malgré la complexité de la procédure, l'observation de ces coupes au microscope permet de confirmer ou non la présence d'une tumeur. La tomographie par cohérence optique confocale linéaire

(LC-OCT) est une méthode optique récente particulièrement adaptée à l'imagerie de la peau : elle en forme des images jusqu'à ~500  $\mu m$  de profondeur, ce qui est suffisant pour observer la jonction épiderme-derme où la prolifération des cellules cancéreuses devient dangereuse. La LC-OCT offre une résolution quasi-isotrope de 1  $\mu m$  qui permet l'observation des tissus cutanés à l'échelle cellulaire. Pour cela, elle met à profit les interférences d'ondes lumineuses qui rendent possible l'imagerie *in vivo* de manière non invasive, sans avoir recours aux biopsies. Cette facilité d'imager la peau entraine ainsi un meilleur suivi des patients.

Les systèmes de LC-OCT sont habituellement basés sur un interféromètre de Linnik utilisant deux objectifs de microscope. Cette thèse présente le développement d'un système de LC-OCT basé cette fois sur un interféromètre de Mirau qui n'a besoin que d'un seul objectif dans le but d'en faciliter l'intégration dans une sonde portative et d'augmenter la vitesse d'acquisition des images. Ce système d'imagerie parvient ainsi à acquérir des coupes verticales de taille 940 µm × 350 µm (latéral x × axial z) à 17 Hz, en plus d'images 3D de taille 940 µm × 600 µm × 350 µm (x × y × z) avec une résolution de 1,9 µm × 1,3 µm × 1,1 µm (x × y × z) de qualité similaire à celles des systèmes de LC-OCT conventionnels.

**Title :** Line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) based on a Mirau interferometer for skin cancer diagnosis

Keywords : optical coherence tomography, Mirau interferometer, optical instrumentation, medical imaging.

**Abstract**: Skin cancers are the most common type of cancer, but if detected early, their consequences can be easily stopped. However, nowadays, diagnoses are made after a simple visual examination, possibly followed by the extraction of a sample of suspicious skin. Histological sections are then extracted from this sample by slicing it thinly then staining it. It is a time-consuming process that can, nevertheless, ascertain the presence of a tumor by observing the sections with a microscope.

Linear-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) is a recent optical imaging technique particularly adapted to skin imaging: it can penetrate in the skin up to  $\sim$ 500 µm deep, which is sufficient to observe the dermal-epidermal junction where the growth of tumors becomes dangerous. LC-OCT offers a quasi-isotropic resolution of 1 µm to resolve details at a cellular level. To do so, it takes

advantage of light wave interference that makes *in vivo* imaging possible in a non-invasive way, without needing biopsies. Making skin imaging easy thus results in better patient follow-up.

LC-OCT systems are usually based on a Linnik interferometer using two microscope objectives. This thesis presents the development of an LC-OCT system based on a Mirau interferometer that requires only one objective in order to facilitate its integration into a portable probe and to increase the image acquisition speed. This imaging system is able to acquire vertical sections of 940  $\mu m \times 350 \mu m$  (lateral  $x \times axial z$ ) at 17 Hz, in addition to 3D images of 940  $\mu m \times 600 \mu m \times 350 \mu m$ ( $x \times y \times z$ ) with an anisotropic resolution of 1.9  $\mu m \times$ 1.3  $\mu m \times 1.1 \mu m$  ( $x \times y \times z$ ) and with an image quality similar to those of conventional LC-OCT systems.

# Avant-propos

Ces trois années de thèse m'ont permis de connaître le monde de l'enseignement et de me confronter à la difficulté constante de la transmission de connaissances, mais ô combien gratifiante une fois surmontée. J'écris ce manuscrit en essayant de respecter cette doctrine et en faisant le nécessaire pour qu'un étudiant en fin d'école d'ingénieur, comme moi il y a trois ans, puisse comprendre aisément, et peut-être avec plaisir, ce qu'est la tomographie par cohérence optique. Essayer d'inclure un plus grand public demanderait des rappels sur beaucoup trop de bases, et, on le sait, le temps du doctorant est toujours compté pendant la rédaction du manuscrit.

# Remerciements

Je tiens à remercier Arnaud Dubois, mon directeur de thèse, qui m'a permis de travailler sur un domaine aussi passionnant que la tomographie par cohérence optique. Il a été mon professeur lorsque j'étudiais à l'Institut d'Optique Graduate School, et il a continué à assumer ce rôle de guide et de mentor avec brio, en particulier pour le côté technique de l'OCT mais aussi pour les aspects plus globaux de la recherche scientifique, en faisant preuve de patience et de pédagogie à mon égard. Je le remercie également pour l'autonomie et la confiance qu'il m'a accordées et qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux comme je l'entendais durant ma préparation au doctorat. Enfin, je le remercie pour toutes ces discussions, scientifiques ou non, que nous avons eues au sein du laboratoire et que j'ai grandement appréciées.

Je remercie mes rapporteurs Manuel Flury et Guillaume Maire pour avoir pris le temps de relire ce manuscrit dans les détails, ainsi que Marie-Claire Schanne-Klein, Cathie Ventalon et Fabian Zomer pour avoir examiné mes travaux de thèse. Globalement, je remercie les membres de jury de thèse pour leur bienveillance, leur enthousiasme par rapport à mon sujet de thèse, et les discussions que nous avons eues le jour de ma soutenance.

Je remercie Anne-Lise Coutrot, ingénieure à l'IOGS, qui s'est occupé des dépôts d'or dont j'avais besoin pour mon montage. Je remercie également Pavel Bulkin, du LPICM à l'Ecole Polytechnique, pour les séparatrices à intégrer au montage. Sans leur aide, l'interféromètre de Mirau n'aurait pas pu exister.

Je remercie l'atelier d'optique de l'IOGS de m'avoir appris à modeler mes lames de verre et à les coller convenablement. Je remercie l'atelier mécanique de l'IOGS qui m'a aidé tout le long de ma thèse à régler les problèmes optomécaniques de mon montage, allant du perçage d'une plaque métallique à l'élaboration d'une mécanique complexe pour maintenir l'interféromètre en passant par l'entretien d'un vélo. Je remercie aussi le service électronique de l'IOGS pour son aide sur les connectiques. Je remercie tout le personnel des ateliers et du service électronique pour m'avoir accueilli de manière aussi chaleureuse parmi eux, pour les discussions et les rigolades.

Je remercie DAMAE Medical, en particulier Anaïs Barut et David Siret pour leur accueil dans leurs locaux, puis Jonas Ogien, Olivier Levecq et Hicham Azimani pour m'avoir aidé à mettre le pied à l'étrier par rapport au montage. Je remercie également Arthur Davis, le doctorant présent avant moi, pour m'avoir montré les ficelles du métier.

Je tiens à remercier le groupe Biophotonique dont j'ai fait partie pendant ma préparation de doctorat. Je remercie en particulier Julien Moreau, toujours présent et disponible pour apporter son aide dès qu'un doctorant rencontre un problème. Je remercie aussi Karen Perronet, aussi prompte à apporter son aide, bien qu'elle ait dû quitter le laboratoire. Je remercie Nathalie Westbrook, ainsi que Christophe Hecquet pour leur aide par rapport à mon orientation professionnelle. Je remercie Frédéric Pain pour la fabrication de fantômes très utiles pour mon montage, et pour ses leçons sur la Bretagne. Je remercie, bien sûr, les doctorants du groupe : Lionel Lartigue, Marc Chammas, Léna Waszczuk, Camille Dubois, Marlo Vega, et plus anciennement Zhor Khadir et Paul Bresson pour les nombreuses discussions dans les couloirs, les nouvelles idées, le partage alternatif de l'espoir et du désespoir entre doctorants, et les rigolades autour des pintes et des cafés. N'oublions pas que l'OCT, « Oh C'est Top » !

Je remercie le Laboratoire Charles Fabry dans son ensemble pour son accueil et ses grandes salles de manip optiques. Je remercie en particulier son directeur d'unité inspirant la confiance, Patrick Georges, qui m'a été d'une grande aide en tant qu'intermédiaire avec mon école doctorale par rapport à la prolongation liée au confinement. Je remercie aussi Hervé Sauer dont les discussions et cours ont fait avancer mes réflexions sur mes travaux.

D'un point de vue plus personnel, je remercie ma famille pour son soutien durant ma thèse, en particulier mes sœurs pour avoir relu mon manuscrit et avoir pointé du doigt les phrases moyennement françaises, et mon père pour son intérêt et ses questions peut-être un peu trop nombreuses sur mon sujet de thèse à chaque repas de famille.

Plus formellement, je remercie l'Université Paris-Saclay, anciennement Université Paris-Sud, ainsi que l'école doctorale EOBE pour m'avoir accordé ma bourse de thèse.

# Table des matières

| Avant-proposi       |   |      |  |  |
|---------------------|---|------|--|--|
| Remerciementsiii    |   |      |  |  |
| Table des matièresv |   |      |  |  |
| Introduction1       |   |      |  |  |
| Chapitre 1          | Imagerie de la peau   | 3    |  |  |
| 1.1 Co              | ntexte médical : la détection du cancer cutané                  | 3    |  |  |
| 1.2 Mc              | odalités d'imagerie de la peau déjà existantes                  | 5    |  |  |
| 1.2.1               | La propagation de la lumière dans un milieu complexe            | 5    |  |  |
| 1.2.1               | La microscopie confocale en réflectance                         | 6    |  |  |
| 1.2.2               | La microscopie non linéaire                                     | 9    |  |  |
| 1.2.3               | La tomographie par cohérence optique                            | . 11 |  |  |
| Chapitre 2          | La Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire         | . 13 |  |  |
| 2.1 La              | Tomographie par Cohérence Optique (OCT)                         | . 13 |  |  |
| 2.1.1               | Analogie avec l'imagerie à ultrason                             | . 13 |  |  |
| 2.1.2               | Introduction à l'interférométrie à deux ondes monochromatiques  | . 14 |  |  |
| 2.1.3               | L'OCT dans le domaine temporel, ou TD-OCT                       | . 17 |  |  |
| 2.1.4               | L'OCT dans le domaine fréquentiel, ou FD-OCT                    | . 21 |  |  |
| 2.1.5               | Comparaison entre la TD-OCT et la FD-OCT                        | . 23 |  |  |
| 2.2 Me              | illeure résolution latérale et parallélisation de l'acquisition | . 24 |  |  |
| 2.2.1               | Microscopie par Cohérence Optique (OCM)                         | . 24 |  |  |
| 2.2.2               | Microscopie par Cohérence Optique plein champ (FF-OCM)          | . 27 |  |  |
| 2.3 La              | Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire            | . 30 |  |  |
| 2.3.1               | Eléments optiques de la microscopie conventionnelle             | . 31 |  |  |
| 2.3.2               | Eclairage et détection en ligne                                 | . 32 |  |  |
| 2.3.3               | Signal interférométrique et démodulation                        | . 37 |  |  |
| 2.3.4               | La superposition des plans de cohérence et de focalisation      | . 41 |  |  |
| 2.3.5               | Le balayage axial avec différents interféromètres               | . 44 |  |  |
| 2.3.6               | Dispersion  | . 48 |  |  |
| 2.4 Cri             | tères de performance  | . 50 |  |  |
| 2.4.1               | Résolution axiale   | . 51 |  |  |
| 2.4.2               | Résolution latérale   | . 59 |  |  |
| 2.4.3               | Vitesse d'acquisition   | . 60 |  |  |
| 2.4.4               | Sensibilité   | . 62 |  |  |
| 2.4.5               | Comparaison avec l'état de l'art                                | . 66 |  |  |

| Chapit | re 3  | LC-OCT basée sur l'interféromètre de Mirau                                 | 69  |
|--------|-------|--|-----|
| 3.1    | Mor   | ntage expérimental   | 69  |
| 3.1    | .1    | Description de l'interféromètre de Mirau                                   | 69  |
| 3.1    | .2    | Description du montage optique   | 71  |
| 3.1    | .3    | Description de l'électronique pour l'acquisition d'image                   | 72  |
| 3.2    | Des   | ign de l'interféromètre de Mirau   | 73  |
| 3.2    | .1    | Choix de la séparatrice  | 73  |
| 3.2    | 2     | Miroir de référence et obturation  | 78  |
| 3.2    | .3    | Etude des aberrations après avoir détaché la fenêtre de l'objectif         | 85  |
| 3.2    | .4    | Mesure expérimentale du contraste en fonction de la position de la fenêtre | 89  |
| 3.2    | 5     | Choix du collage de la référence sur l'objectif et nouvelle mécanique      | 94  |
| 3.3    | Am    | élioration de la vitesse d'acquisition des images 2D                       | 98  |
| 3.3    | .1    | Les facteurs limitants de la vitesse d'acquisition                         | 98  |
| 3.3    | .2    | Platine piézoélectrique : réduction de poids                               | 99  |
| 3.3    | .3    | Gestion fine des signaux TTL envoyés à la caméra                           | 99  |
| 3.3    | .4    | Trajectoire sinusoïdale  | 102 |
| 3.3    | .5    | Acquisition des images brutes avec la carte FPGA                           | 103 |
| 3.4    | Ima   | gerie 3D   | 104 |
| 3.4    | .1    | Linnik dans le champ : vignettage et courbure du plan de cohérence         | 105 |
| 3.4    | .2    | Méthodes de construction d'un volume 3D                                    | 107 |
| 3.4    | .3    | Optimisation de l'éclairage pour l'imagerie 3D                             | 109 |
| 3.4    | .4    | Obturation et déformation de la ligne dans le champ                        | 110 |
| 3.4    | .5    | Exemples d'images 3D   | 113 |
| 3.5    | Perf  | ormances   | 113 |
| 3.5    | .1    | Résolution axiale  | 113 |
| 3.5    | .2    | Résolution latérale  | 113 |
| 3.5    | .3    | Sensibilité  | 117 |
| 3.5    | .4    | Spectre détecté  | 118 |
| Conclu | ision |  | 121 |
| Annex  | e A   | Microscopie  | 123 |
| A.1    | Ecla  | irage Köhler   | 123 |
| A.2    | Télé  | écentricité  | 125 |
| Annex  | e B   | Etude des aberrations  | 127 |
| B.1    | Not   | ions d'optique géométrique utiles  | 127 |
| B.2    | For   | nalisme utilisé  | 128 |
| B.3    | Exp   | ression des coefficients d'aberration avec les sommes de Seidel            | 129 |
| B.4    | Con   | tribution d'un dioptre plan dans le coefficient d'aberration sphérique     | 130 |
|        |       |  |     |

| Bibliographie143 |   |               |  |  |
|------------------|---|---------------|--|--|
| Annex            | e C Balayage latéral dans un seul bras de l'interféromètre                    |               |  |  |
| B.6              | Remplacement et décalage de la fenêtre de l'objectif                          |               |  |  |
| B.5              | Contribution d'une lame à faces parallèles dans le coefficient d'aberration s | sphérique 131 |  |  |

# Introduction

L'imagerie médicale regroupe les méthodes utilisées pour observer les structures internes du corps humain et aide notamment à dresser ou à confirmer un diagnostic précis chez un patient. Elle est historiquement introduite par la découverte des rayons X en 1895 qui a permis d'obtenir la première radiographie. D'autres phénomènes physiques sont utilisés dans le développement de nouvelles techniques pour obtenir des images de l'intérieur du corps : on peut citer, en plus des méthodes basées sur les rayons X, la résonance magnétique nucléaire (IRM) ou encore les méthodes échographiques, qui sont largement utilisées aujourd'hui et permettent de faire de l'imagerie structurelle, c'est-à-dire une cartographie du corps. La lumière, quant à elle, a des difficultés à pénétrer dans la peau qui est très diffusante et absorbante. Dans un premier temps, elle n'est donc utilisée que pour des observations avec des microscopes optiques conventionnels pour de l'imagerie en surface et non en profondeur. C'est à partir de 1990 que ses propriétés sont mises à profit avec l'adoption de la Tomographie par Cohérence Optique (OCT) en ophtalmologie, qui permet d'imager les structures de l'œil jusqu'à la rétine. À la suite de ce succès, cette technique d'imagerie optique en profondeur se développe pour s'appliquer dans des domaines différents de l'ophtalmologie, en particulier celui de la dermatologie. On s'intéresse notamment à la détection des cancers cutanés qui demande une résolution à l'échelle cellulaire et une profondeur d'imagerie que l'OCT peut apporter.

Ce manuscrit retranscrit mes travaux de thèse dont le but était de fabriquer un outil optique basé sur l'OCT capable de faire des images de la peau en profondeur afin de détecter les cancers cutanés de manière précoce. Il s'articule autour de trois chapitres : le premier d'entre eux pose le contexte dans lequel s'inscrit la thèse. Les méthodes utilisées de manière classique par les dermatologues et les problématiques à résoudre y sont ensuite dévoilées. Une synthèse des techniques optiques déjà utilisées dans le commerce sont également décrites pour fournir un point de comparaison à nos travaux.

Le deuxième chapitre explicite la théorie sur laquelle repose le système d'imagerie développé : on démarre avec la théorie de l'OCT, puis ses variantes plus aptes à voir des détails fins qui sont la microscopie par cohérence optique et la microscopie par cohérence optique plein champ. Les avantages et inconvénients de ces derniers mènent naturellement à la Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire (LC-OCT) qui est la technique d'imagerie utilisée dans cette thèse et dont on expose les subtilités et les performances générales.

Le troisième chapitre détaille l'intégration d'un interféromètre de Mirau à la place d'un interféromètre de Linnik, plus couramment utilisé, dans un système d'imagerie de LC-OCT. Fort de cette nouveauté, le système a le potentiel, en réduisant le nombre d'éléments optiques, de gagner en vitesse de balayage et donc en vitesse d'acquisition tout en rendant le montage plus compact. Les réflexions qui ont mené aux choix des pièces optiques et mécaniques composant l'interféromètre sont retranscrites. On y voit ensuite les méthodes déployées pour augmenter d'autant plus la vitesse d'acquisition en utilisant la caméra à une fréquence variable, puis celles pour construire des images en 3D. Enfin, ce chapitre s'achève avec la présentation des performances du montage optique développé grâce aux travaux décrits précédemment.

## Chapitre 1 Imagerie de la peau

### **1.1** Contexte médical : la détection du cancer cutané

Un cancer est une maladie caractérisée par la prolifération non contrôlée de cellules au sein d'un organisme vivant, qui entraîne l'apparition de tumeurs grossissant au cours du temps. Elles parviennent alors à envahir certaines zones du corps et à endommager les organes aux alentours. Si elles sont assez développées, des cellules cancéreuses sont capables de transiter dans l'organisme et de développer de nouvelles tumeurs dans des zones initialement non touchées : elles forment des métastases. Un cancer peut donc porter atteinte à la vie de l'individu concerné.

Il existe une multitude de types de cancers mais on s'intéresse notamment aux cancers cutanés, qui se développent au niveau de la peau. Ceux-ci sont particulièrement présents : on estime qu'ils représentent 40% des cancers dans le monde [1] et que leur taux d'incidence connaîtra une augmentation dans les années à venir [2]. On impute cette recrudescence à la plus grande exposition aux rayons ultraviolets mais aussi au vieillissement de la population [3]. Les cancers cutanés se divisent en deux catégories distinctes : les carcinomes et les mélanomes. Les premiers sont eux-mêmes divisés en deux sous-catégories : les carcinomes basocellulaires qui se développent à partir de la couche basale de l'épiderme mais restent localisés, et les carcinomes épidermoïdes qui se développent à partir des couches supérieures de l'épiderme et ont plus de chances de créer des métastases. Les carcinomes représentent 90% des cancers de la peau mais sont associés à un taux de mortalité faible. Quant aux mélanomes, ils n'en représentent que 10% mais sont plus agressifs et causent la majeure partie des décès liés aux cancers cutanés. De manière globale, ces derniers peuvent être facilement traités en cas de détection précoce par ablation des tissus touchés. En revanche, en cas de détection tardive et de mélanome métastasé, le taux de survie chute à 15% [4].

De plus, les coûts du traitement du cancer varient grandement en fonction de son avancement. La Figure 1.1 [5] montre le coût des traitements du mélanome ainsi que le taux de survie dans les 5 années suivantes en fonction de son état d'avancement. Au stade 4, c'est-à-dire quand le cancer a métastasé, le taux de survie chute drastiquement à l'inverse des coûts qui augmentent substantiellement. Ainsi, en plus de devenir mortel, le mélanome cutané peut aussi être qualifié de fardeau économique quand il est détecté tardivement. La détection précoce revêt ainsi une importance majeure.

De nos jours, la détection est faite par les dermatologues à l'œil nu ou à l'aide d'un dermatoscope qui est un outil optique grossissant. L'examen se fait donc en surface en observant des caractéristiques clés des grains de beauté, comme l'asymétrie, la bordure, la couleur, le diamètre et l'évolution dans le temps. Une lésion suspecte est inspectée plus en détails grâce à l'histopathologie qui regroupe les techniques de l'histologie, c'est-à-dire l'étude des tissus vivants au microscope. Pour ce faire, un échantillon de la zone suspecte est prélevé de manière précise par biopsie, puis traité pour être observé au microscope : il est d'abord déshydraté, puis plongé dans du conservateur. Par la suite, il est figé dans un bloc de paraffine et découpé en tranches appelées « coupes histologiques » de quelques micromètres d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Des colorants sont appliqués pour améliorer le contraste de la coupe, et le tout peut enfin être observé au microscope (cf. Figure 1.2 [6]). A l'aide de ces résultats, le dermatologue peut statuer sur la présence d'un cancer ou non. Ce processus est malheureusement douloureux, long et anxiogène pour le patient, en plus d'être coûteux à cause du besoin en personnel et en matériel pour l'exécuter. En outre, il est à noter que les coupes histologiques réalisées révèlent que la lésion était de nature bégnine dans 60% des cas. De même, on estime que 20% des cancers cutanés et 33% des mélanomes ne sont pas diagnostiqués avec ces méthodes.



FIGURE 1.1 - Taux de survie à 5 ans et coût moyen annuel de traitement d'un patient en fonction du stade du mélanome. Aux stades 1 et 2, le mélanome reste localisé. Au stade 3, il a suffisamment grossi pour commencer à transiter dans un ganglion lymphatique. Au stade 4, le mélanome s'est propagé et a produit des métastases dans différentes zones du corps.



FIGURE 1.2 – Coupe histologique de peau humaine. Le nom des différentes couches superficielles sont indiquées, de haut en bas : la couche cornée, la couche claire, la couche granuleuse, la couche épineuse, la couche basale et le derme. L'ensemble des couches au-dessus du derme constitue l'épiderme. [6]

Il existe ainsi un besoin chez les dermatologues d'outils et de méthodes plus simples et fiables dans le but d'augmenter l'efficacité de détection des cancers de la peau de manière précoce. Il serait nécessaire pour un tel outil de satisfaire les besoins suivants :

- Avoir une résolution et un contraste suffisants : il faut être capable de séparer les différents éléments dans la peau les uns des autres. L'origine des cancers exige donc une résolution à l'échelle cellulaire afin de distinguer un début de prolifération incontrôlée. Etant donné que les cellules dans la peau ont une taille d'environ 5 µm, une résolution de l'ordre du micromètre est suffisante. Atteindre la résolution des coupes histologiques de 1 µm dans toutes les directions de l'espace serait idéal. Le contraste, c'est-à-dire la différence de luminosité dans l'image, doit en outre être assez important pour différencier deux milieux différents. A titre d'exemple, dans la Figure 1.2, le contraste est donné par la différente coloration de chaque structure, tandis que la bonne résolution de la coupe histologique nous permet de voir distinctement les frontières de chaque noyau de cellule. Résolution et contraste vont donc de pair pour faire des observations satisfaisantes ;
- Avoir une profondeur de pénétration suffisante : les cancers cutanés sont originaires de la frontière entre la couche basale et le derme, située typiquement entre 150 et 200 µm selon la zone du corps. Le système optique aura donc besoin de faire des images au-delà de cette profondeur en conservant un signal de qualité convenable ;
- Être capable de faire de l'imagerie *in vivo* et en temps réel : la complexité de l'histopathologie repose sur le besoin d'extraire et de traiter un échantillon avant visualisation, ce qui rallonge significativement la durée nécessaire pour confirmer un diagnostic. L'imagerie *in vivo*, c'est-à-dire directement dans les tissus vivants, et en temps réel permettrait de contourner cette complexité et d'obtenir un diagnostic beaucoup plus rapidement, pour le confort du patient et du dermatologue ;
- Être non invasif et non ionisant : bien qu'effectuer des biopsies soit anodin pour les praticiens, cette étape peut être désagréable pour le patient et susceptible de laisser des cicatrices. La supprimer permettrait de simplifier les examens de routine des dermatologues et de les multiplier sans incident sur le patient pour un meilleur suivi. De même, on cherchera à éviter d'injecter des agents de contraste. En outre, il sera nécessaire d'éviter les radiations ionisantes afin de réduire au maximum le risque de développement de cancer dû à l'utilisation même de l'outil de surveillance ;
- Être **compact** : le dermatologue doit pouvoir inspecter toutes les zones du corps du patient et donc pouvoir orienter le système optique comme bon lui semble, en particulier pour atteindre les zones difficiles d'accès.

On propose dans cette thèse le développement d'un outil optique qui vise à vérifier chacune des conditions citées plus haut. D'autres méthodes d'imagerie de tissus biologiques en profondeur existent et sont déjà utilisées : nous allons passer en revue celles susceptibles de respecter le cahier des charges pour pouvoir situer nos propres travaux dans l'écosystème des modalités d'imagerie.

## 1.2 Modalités d'imagerie de la peau déjà existantes

#### 1.2.1 La propagation de la lumière dans un milieu complexe

L'objectif est d'obtenir des images de la peau similaires à des coupes histologiques et sans phase de préparation. La lumière, qu'on va utiliser comme vecteur de signal, possède le potentiel pour faire de l'imagerie à haute résolution sans endommager le spécimen à observer, par exemple avec la microscopie optique conventionnelle. Seulement, un échantillon de peau n'est pas un milieu simplement transparent pour la lumière. Au contraire, c'est un milieu très diffusant qui va empêcher la lumière de s'y propager en ligne droite comme dans l'air. Ainsi, la principale difficulté de l'imagerie de la peau est d'être capable d'introduire les ondes lumineuses dans l'échantillon puis de les restituer de manière ordonnée pour former une image. Qu'arrive-t-il à la lumière quand elle pénètre dans un milieu diffusant ?

La lumière peut être modélisée comme une onde, ou bien comme un ensemble de corpuscules. Pour décrire les interactions entre la lumière et le milieu diffusant, on va la considérer comme un ensemble de particules appelées photons. De même, on peut voir le milieu diffusant comme un espace jonché d'obstacles pour les photons. Quand l'un d'entre eux pénètre dans le milieu, une série de phénomènes différents illustrés dans la Figure 1.3 peut lui arriver avec une certaine probabilité :

- Il peut interagir directement avec le milieu et se faire absorber ;
- Il peut traverser tout le milieu sans encombre en conservant sa trajectoire initiale : c'est un photon balistique ;
- Il peut « rebondir » une fois sur une structure du milieu et donc être dévié de sa trajectoire initiale : c'est un photon diffusé. En particulier, si ce photon retourne vers la direction d'où il venait, on parle de <u>photon rétrodiffusé</u>. Dans le cadre de cette thèse, ce sont ces photons qui auront de l'importance ;
- Il peut être dévié plusieurs fois de suite sans être absorbé : c'est un photon multidiffusé.

Nous avons décrit les interactions possibles pour un seul photon, mais il faut considérer qu'un nombre bien plus grand atteint l'échantillon dès qu'il est éclairé. Ainsi, un certain nombre d'entre eux est absorbé, tandis que les autres sont diffusés dans toutes les directions de l'espace avec une certaine probabilité qui dépend de la lumière et du milieu.

Seuls les photons qui ont interagi avec le milieu diffusant sans être absorbés peuvent être porteurs d'informations sur le milieu. C'est donc eux qu'on va chercher à collecter pour créer les images de peau. L'absorption, à l'inverse, est à minimiser : on privilégiera les longueurs d'onde dans la gamme entre 600 et 1300 nm qui est aussi appelée « fenêtre thérapeutique » (cf. Figure 1.4, modifiée de [7]). De cette manière, un plus grand nombre de photons pourra éclairer l'échantillon puis revenir et être collectés pour former une image de l'échantillon en profondeur.

#### 1.2.1 La microscopie confocale en réflectance

La microscopie confocale en réflectance (RCM pour « Reflectance Confocal Microscopy ») est formellement brevetée en 1961 par Marvin Minsky [8] et est le premier instrument utilisé pour faire de l'imagerie des tissus biologiques en profondeur. Son principe de fonctionnement est illustré dans la Figure 1.5. Contrairement à la microscopie optique conventionnelle, la RCM consiste à éclairer et à détecter le signal point par point, le but étant de collecter du signal provenant uniquement du point dans l'échantillon où la lumière se focalise. On utilise donc une source équivalente à une source spatialement ponctuelle qui est focalisée sur le point à imager par un objectif de microscope. Seulement, la lumière convergente en aval de l'objectif éclaire aussi les plans au-dessus et en-dessous du plan focal qui vont également envoyer du signal vers le détecteur, au risque de noyer le signal utile provenant du point focal. Afin d'atténuer le signal indésirable et qu'on peut considérer comme du bruit, on conjugue le point focal à un sténopé, c'est-à-dire un trou circulaire de petite taille, derrière lequel on place un détecteur. Par conséquent, la lumière originaire du point focal passe en totalité à travers le sténopé pour être détectée, tandis qu'une grande partie de la lumière provenant des plans défocalisés est stoppée. Ainsi, la majorité du signal indésirable est filtrée : on parle de filtre confocal, ou encore d'effet confocal. Comme on éclaire l'échantillon seulement en un point, un système de balayage en amont de l'objectif est nécessaire pour obtenir des images de l'échantillon.

On comprend alors que c'est l'effet confocal qui permet d'imager un échantillon diffusant en profondeur : en microscopie conventionnelle, qui ne bénéficie pas de cet effet, on éclairerait une large surface de l'échantillon et la caméra 2D collecterait le signal d'une multitude de plans en même temps, ce qui aurait pour effet de brouiller complètement l'image.



FIGURE 1.3 – Interactions entre un photon et un milieu diffusant. Pour faire des images des échantillons de peau plus en profondeur, on fait en sorte de diminuer la quantité de photons absorbés. Dans cette thèse, on utilisera les photons rétrodiffusés par l'échantillon.



FIGURE 1.4 – Coefficient d'absorption des principaux éléments de la peau humaine en fonction de la longueur d'onde. Plus ce coefficient est grand, plus le milieu associé a de chances d'absorber un photon incident. On prend en compte le collagène, la mélanine, l'hémoglobine oxygénée ou désoxygénée et l'eau. Ce dernier élément est particulièrement important car il constitue une grande partie du corps humain. Il existe une fenêtre de transparence pour les longueurs d'onde entre 600 et 1300  $\mu$ m qui est la « fenêtre thérapeutique ». Il est préférable d'utiliser des longueurs d'onde dans cette gamme si l'on veut pénétrer profondément dans les échantillons de peau. Modifié de [7].



FIGURE 1.5 - Principe de la microscopie confocale en réflectance. L'échantillon est éclairé à l'aide d'une source de lumière équivalente à une source ponctuelle et focalisée dans l'échantillon à l'aide d'un objectif de microscope. Ce point de focalisation est conjugué à un sténopé. De cette manière, toute la lumière provenant du point focal atteint le détecteur, tandis qu'une grande partie de la lumière provenant des plans défocalisés de l'échantillon se fait bloquer par le sténopé. Un système de balayage du point source est nécessaire pour sonder une surface ou un volume de l'échantillon.

En traversant un système optique, on sait que l'image d'un point est une tache d'Airy qui a un certain diamètre latéral. L'image du point focal au niveau du sténopé a donc un certain diamètre également. Le diamètre du sténopé prend donc de l'importance, puisque s'il est trop grand, alors on réduit l'effet confocal en laissant passer de la lumière parasite, tandis que s'il devient trop petit, alors on collecte globalement moins de lumière. Il faut donc faire un compromis entre l'effet confocal et la quantité de lumière. Le plus souvent, on choisit un diamètre de sténopé un peu plus grand que le diamètre de la tache d'Airy.

On pourrait penser que balayer le point latéralement pour reconstruire une coupe horizontale de l'échantillon serait équivalent à un microscope conventionnel dont on aurait supprimé le signal parasite des plans défocalisés, mais il n'en est rien : le comportement optique de la RCM est drastiquement différent de la microscopie conventionnelle. Sans entrer dans les détails, en RCM, on traite le signal de manière spatialement cohérente et donc on opère algébriquement sur l'amplitude des ondes lumineuses. En microscopie conventionnelle, on traite le signal de manière spatialement incohérente et on opère donc sur l'intensité des ondes lumineuses, c'est-à-dire le module carré de leurs amplitudes. La conséquence la plus connue de cela est que la réponse impulsionnelle d'un système de RCM est le carré de celle d'un système de microscopie conventionnelle [9]. Par conséquent, la taille de la réponse impulsionnelle sera affinée en RCM comparée au cas conventionnel, octroyant à la première une meilleure résolution dans les trois directions de l'espace. De plus, les « lobes » de la réponse impulsionnelle seront aplanis grâce à l'effet confocal.

Cependant, la réponse impulsionnelle garde tout de même une forme d'ellipsoïde étirée le long de l'axe optique, de sorte que la résolution n'est pas spatialement isotrope. De plus, il est plus rapide de balayer le point dans le plan horizontal à l'aide de miroirs galvanométriques placés en amont de l'objectif, plutôt que le long de l'axe optique en déplaçant l'objectif ou l'échantillon. Par conséquent, la RCM est plutôt utilisée pour faire de l'imagerie en face, c'est-à-dire pour obtenir des coupes horizontales de l'échantillon.

La RCM fait partie des technologies très utilisées pour faire de l'imagerie de tissus biologiques en profondeur, puisqu'elle est non-invasive et ne nécessite pas de préparation de l'échantillon. En particulier, elle sert aussi à obtenir des images de peau (cf. Figure 1.6 [10]). Son mode de fonctionnement en imagerie en face reste cependant désavantageux pour notre application puisqu'on cherche à avoir des images proches des images histologiques, qui sont des coupes verticales. En outre, étant donné que la résolution axiale repose essentiellement sur la profondeur de champ de l'objectif, ce dernier doit avoir grande ouverture numérique de l'ordre de 0,8 afin que le sectionnement optique, c'est-à-dire l'épaisseur du plan imagé, soit assez fin. La RCM a ainsi tendance à avoir un champ restreint et à être sensible aux aberrations.

#### 1.2.2 La microscopie non linéaire

La microscopie non linéaire est documentée pour la première fois en 1990 [11] et repose sur des phénomènes qui n'ont lieu qu'avec l'aide d'une forte puissance lumineuse amenée par le développement de lasers à impulsions ultra-courtes. On peut mettre en avant trois méthodes de microscopie qui profitent des phénomènes non linéaires : la microscopie de fluorescence à deux photons, la microscopie par génération de seconde harmonique (SHG pour « Second-Harmonic Generation »), et celle par génération de troisième harmonique (THG pour « Third-Harmonic Generation »).

Pour comprendre la première de ces méthodes, discutons dans un premier temps du phénomène de fluorescence à un photon : il consiste à amener les électrons d'une molécule fluorescente dans un état d'énergie excité en lui faisant absorber un photon possédant l'énergie adéquate. Les électrons se désexcitent au cours du temps en faisant des transitions décroissantes entre les paliers d'énergie disponibles. Certaines de ces transitions sont dites non radiatives, et n'émettent aucun photon. D'autres, au contraire, sont radiatives et convertissent l'énergie de la transition en un photon qui sera émis dans l'espace : on observe alors le phénomène de fluorescence (cf. Figure 1.7). Etant donné la perte d'énergie due aux transitions non radiatives, l'énergie d'un photon fluorescent émis sera plus faible que celui du photon initialement absorbé. Puisque l'énergie d'un photon s'écrit  $E = hc/\lambda$  avec h la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide et  $\lambda$  la longueur d'onde du photon concerné, on en déduit que le photon émis par fluorescence a une longueur d'onde plus grande que celle du photon absorbé. Ainsi, en utilisant un jeu de filtres et une caméra adéquate, on peut détecter uniquement les photons émis par fluorescence sans être gêné par la lumière ayant servi à éclairer l'échantillon, pour obtenir finalement un meilleur contraste dans l'image. En outre, les molécules fluorescentes peuvent être fabriquées pour s'accrocher spécifiquement à certaines structures de l'échantillon, pour imager seulement celles-ci.

La microscopie de fluorescence à deux photons reprend le même schéma d'émission du photon fluorescent, mais a une méthode d'excitation différente : au lieu de n'utiliser qu'un seul photon pour amener les électrons à l'état d'énergie excité recherché, on en utilise deux simultanément dont la somme énergétique permet la transition énergétique ascendante (cf. Figure 1.7). L'intérêt de cette méthode



FIGURE 1.6 – Exemples d'images de la peau prises avec un système de RCM. (a) Coupe horizontale de la couche cornée. (b) Coupe horizontale de la couche épineuse. [10]



FIGURE 1.7 – Diagramme de Jablonski illustrant le mécanisme de fluorescence à un photon, à deux photons, la génération de seconde harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG). Dans le cas de la fluorescence, les électrons sont dans leur état fondamental d'énergie la plus basse, puis atteignent un niveau d'énergie supérieur en absorbant un ou deux photons. Au cours du temps, ils se relaxent et passent à des niveaux d'énergie plus bas, avec ou sans émission de photon. En SHG et THG, deux ou trois photons incidents sont convertis en un seul photon émis qui a le double ou le triple de l'énergie des photons incidents.

d'imagerie repose sur les conditions d'excitation, beaucoup plus restrictives que dans le cas de la fluorescence à un photon : absorber deux photons simultanément est un événement beaucoup moins fréquent et qui demande donc une grande concentration de la lumière en un point pour avoir lieu. De cette manière, la fluorescence n'a lieu qu'aux alentours du point focal de l'objectif, ce qui produit un effet confocal inhérent sans avoir forcément besoin d'un sténopé devant la caméra comme en RCM. En comparaison, avec la fluorescence à un photon, tous les fluorophores dans le trajet de la lumière incidente émettraient des photons, même sans être dans le plan focal de l'objectif (cf. Figure 1.8 [12]). De plus, avec la fluorescence à deux photons, l'énergie des photons absorbés est moins grande que celle des photons émis. Autrement dit, la longueur d'onde des photons incidents est plus grande que celle des photons émis. Ainsi, il est possible d'utiliser une longueur d'onde d'excitation dans la gamme de l'infrarouge qui pénètre mieux dans les tissus biologiques (cf. Figure 1.4), pour une émission dans les longueurs d'onde visibles. Finalement, cette méthode d'imagerie bénéficie d'un effet confocal intrinsèque grâce aux conditions d'excitation et d'une profondeur de pénétration accrue grâce à l'utilisation de lumière dans l'infrarouge.

La microscopie par génération d'harmoniques bénéficie également de ces avantages, même si le phénomène d'excitation et d'émission diffèrent. La microscopie de fluorescence à deux photons repose sur l'excitation d'une molécule par absorption, puis sa désexcitation avec émission de photon fluorescent. Dans le cas de la microscopie SHG et THG, il n'y a pas besoin d'absorption : ce sont les structures mêmes de l'échantillon qui se polarisent et qui réémettent un signal lumineux avec, entre autres, des photons qui ont le double ou le triple de l'énergie de la lumière incidente (cf. Figure 1.7). La microscopie SHG et THG ne nécessite donc pas de fluorophores ou d'autre agents de contraste et n'est donc pas soumise aux problèmes de photoblanchiment et de phototoxicité comme en microscopie de fluorescence.

Le phénomène de SHG et de THG sont tout de même basés sur des interactions simultanées de 2 et 3 photons, de sorte à produire des photons avec le double ou le triple de ceux utilisés pour l'excitation. Comme en microscopie de fluorescence à deux photons, ces phénomènes ont peu de chance de survenir et nécessitent donc une grande quantité de lumière. Ils n'ont donc lieu qu'au niveau du point focal de l'objectif et bénéficient aussi d'un effet confocal. Une condition supplémentaire est nécessaire pour la SHG : seules les structures non centrosymétriques, c'est-à-dire sans centre de symétrie, peuvent générer des secondes harmoniques. La microscopie SHG permet donc d'imager spécifiquement des structures



FIGURE 1.8 – Comparaison entre la fluorescence à un photon et à deux photons. L'objectif utilisé a une ouverture de 0,16 dans les deux cas. La molécule émettant le signal fluorescent est la fluorescéine. (a) Démonstration de la fluorescence à un photon en utilisant une source lumineuse à 488 nm. Toutes les molécules atteintes par le cône de lumière incident émettent du signal fluorescent. (b) Démonstration de la fluorescence à deux photons en utilisant une source à 960 nm. Du signal fluorescent émane du point focal de l'objectif uniquement, où l'intensité de la lumière incidente est assez forte pour déclencher le phénomène. [12]

linéaires comme les fibres de collagène (cf. Figure 1.9 [13]) ou encore les microtubules des cellules. La microscopie THG est moins spécifique et permet d'imager des milieux d'indice optique important, comme les organelles des cellules ou encore les tissus adipeux.

Les systèmes de microscopie non linéaire ne sont pas encore démocratisés pour l'imagerie des tissus biologiques, principalement à cause du coût élevé des lasers nécessaires à la production d'une puissance lumineuse suffisante pour produire ces effets non linéaires.

#### 1.2.3 La tomographie par cohérence optique

La tomographie par cohérence optique (OCT pour « Optical Coherence Tomography ») est proposée en 1991 [14]. Son principe de fonctionnement est analogue au principe du radar ou de l'échographie, où une onde ultrasonore est envoyée dans le milieu étudié puis réfléchie par des obstacles. L'intensité de l'écho produit par la réflexion sur un obstacle et la durée de propagation de l'onde ultrasonore permettent de déduire la position et le taux de réflexion de l'obstacle. L'OCT, en revanche, utilise des ondes



FIGURE 1.9 – Images obtenues en microscopie SHG. On peut y observer les fibres de collagène dans le derme (**a**) de peau humaine et (**b**) de peau de souris. [13]

lumineuses qui ont l'avantage de produire des images de meilleure résolution grâce aux plus courtes longueurs d'onde que celles des ondes ultrasonores. Cependant, la lumière est bien plus rapide que les ondes ultrasonores et il n'est plus aussi simple d'en mesurer la durée de propagation.

A la place, on utilise de l'interférométrie à faible cohérence temporelle, c'est-à-dire avec une source dont le spectre d'émission couvre une large gamme de longueurs d'onde, ce qui revient à faire de l'interférométrie en lumière blanche. Cela produit des franges d'interférences très localisées spatialement qui permettent de retrouver la position et le taux de réflexion de l'obstacle. Ce moyen de détection permet également de ne sélectionner que les photons qui ont parcouru une distance bien précise : on peut alors sélectionner uniquement les photons rétrodiffusés qui se seraient réfléchis dans un plan bien défini tout en rejetant ceux hors de ce plan et les photons multidiffusés dont l'origine dans le milieu diffusant est trouble. On arrive ainsi à effectuer des sectionnements optiques de l'ordre de 1  $\mu$ m d'épaisseur, avec une résolution latérale entre 1 et 15  $\mu$ m tout en atteignant une profondeur de pénétration de quelques millimètres.

Cette méthode d'imagerie a l'avantage d'être non invasive : elle ne nécessite aucune préparation de l'échantillon et aucun agent de contraste, tout en travaillant sans contact direct avec l'échantillon. L'une de ses forces est la dépendance de la résolution axiale par rapport au spectre de la source et non des optiques utilisées : une source adéquate implique donc une bonne résolution axiale et rend l'OCT particulièrement apte à prendre des images d'échantillons structurés en strates superposées. Par conséquent, elle est très utilisée en ophtalmologie, par exemple pour l'imagerie de la rétine, mais aussi en cardiologie. Des applications en dermatologie ont eu lieu, mais sans satisfaire nos besoins quant à la détection des cancers de la peau du fait de la résolution latérale insuffisante.

L'OCT sera présentée plus en détails dans le chapitre suivant. En effet, le montage optique que nous avons développé au cours de cette thèse repose sur la méthode de la tomographie par cohérence optique confocale linéaire, elle-même basée sur l'OCT.

# Chapitre 2 La Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire

La Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire (LC-OCT pour « Line-Field Confocal Optical Coherence Tomography » en anglais) est une technique d'imagerie à haute résolution récente reposant sur le principe de l'interférométrie à faible cohérence. Elle est inspirée de l'OCT, mais aussi de la Microscopie Confocale par Réflectance (RCM). La LC-OCT permet d'obtenir des images en coupe verticale, voire des images en 3D d'échantillons semi-transparents, c'est-à-dire dans lesquels peut se propager la lumière utilisée. Il est donc possible d'utiliser cette technologie en tant que modalité d'imagerie médicale non invasive, notamment pour détecter les cancers de la peau de manière précoce dans le domaine de la dermatologie.

Ce chapitre va retracer l'histoire, en termes de technologie, de la conception de la LC-OCT. La première section sera consacrée à l'OCT, base fondatrice, de son principe de fonctionnement et de ses implémentations dans le domaine temporel et fréquentiel. Elle sera suivie d'une section qui expliquera les méthodes employées afin d'affiner la résolution et l'acquisition en parallèle par rapport à l'OCT originale. La troisième section concernera la LC-OCT en elle-même, ainsi que ses subtilités générales. Enfin, la quatrième et dernière section formalisera les critères de performances utilisés pour juger de la qualité d'un système basé sur l'OCT.

## 2.1 La Tomographie par Cohérence Optique (OCT)

La tomographie désigne la formation d'image en 3D tranche par tranche. Nombre de techniques d'imagerie médicale utilisent le principe de la tomographie comme l'imagerie par résonance magnétique, la tomodensitométrie ou l'échographie. Mais, l'OCT, formellement inventée en 1991 [14] dans le cadre de l'imagerie non-invasive de tissus biologiques, se démarque par sa capacité à produire des images proches de l'histologie sans besoin d'extraire l'échantillon ni de le préparer, en temps réel, avec une résolution de l'ordre de 1-15  $\mu$ m et une profondeur de pénétration de l'ordre du millimètre. L'OCT est donc devenue incontournable dans le domaine de l'ophtalmologie pour diagnostiquer les pathologies rétiniennes [15], mais aussi en cardiologie [16], [17], et, dans notre cas, en dermatologie [18], [19].

#### 2.1.1 Analogie avec l'imagerie à ultrason

Il est fréquent d'être familier avec le concept des ondes ultrasonores, qui permettent de surveiller les grossesses ou de repérer des obstacles. Il me semble donc que la manière la plus simple de saisir le principe de fonctionnement de l'OCT est son analogie avec l'imagerie à ultrasons, aussi appelée échographie.

Le principe de l'imagerie à ultrasons est illustré dans la Figure 2.1. L'échantillon à scanner doit être un milieu « semi-transparent » dans lequel peuvent se propager les ondes sonores, comme le corps humain. L'échantillon peut alors être modélisé comme une succession de surfaces réfléchissant partiellement les ondes sonores. Il suffit donc de placer une sonde contre l'échantillon, y envoyer une onde sonore, puis d'écouter les multiples échos qui en reviennent. L'onde sonore met un certain temps à parcourir l'échantillon, se réfléchir partiellement sur une surface, et être détectée : on parle de « temps de vol ». Plus ce dernier est long, plus la surface réfléchissante se situe en profondeur. En connaissant la vitesse de propagation de l'onde dans l'échantillon, il devient alors aisé de déterminer sa position. Mais comme les réflexions ne sont que partielles, une onde sonore envoyée résulte en une multitude d'échos avec des temps de vol différents, correspondant à chaque surface réfléchissante. La seconde



FIGURE 2.1 – Illustration du principe de fonctionnement de l'imagerie à ultrasons et de la tomographie par cohérence optique. L'onde incidente, sonore ou lumineuse, se propage dans l'échantillon semitransparent dont on veut reconstruire l'image et est partiellement réfléchie par les surfaces partiellement réfléchissantes. Les ondes réfléchies contiennent les informations nécessaires pour situer chaque surface réfléchissante et déterminer leur taux de réflexion, afin d'en dessiner une carte.

information qui diffère entre chaque écho est leur amplitude, représentative de la capacité de la couche à réfléchir plus ou moins bien l'onde sonore, et qui est fonction des impédances des deux milieux de part et d'autre de la surface. C'est cette information qui nous permet de faire la différence entre deux milieux différents au sein de l'échantillon.

Ce sont donc le temps de vol et l'amplitude qui sont traduits en termes de position et de taux de réflexion, et qui permettent de reconstruire une carte de réflectivité de l'intérieur de l'échantillon. Si l'on envoie des ondes sonores et ne les détectons que dans la direction de la profondeur, on produit une image en forme de ligne : il s'agit d'un A-scan. Paralléliser l'acquisition de plusieurs A-scans adjacents permet de créer une image en 2D appelée section en coupe verticale ou encore B-scan. Plusieurs B-scans adjacents peuvent finalement former une image en 3D.

La tomographie par cohérence optique suit le même principe, en utilisant cette fois des ondes lumineuses. Cependant, bien que les appareils électroniques disponibles puissent mesurer le temps de vol d'ondes sonores sur de courtes distances, cela n'est plus vrai pour des ondes lumineuses, bien plus rapides. Pour obtenir l'information sur la position des surfaces réfléchissantes, on utilise cette fois une méthode de sectionnement basée sur l'interférométrie à faible cohérence.

# 2.1.2 Introduction à l'interférométrie à deux ondes monochromatiques

L'interférométrie est la capacité d'ondes lumineuses à se superposer et à créer des figures d'interférence, c'est-à-dire des franges sombres et lumineuses, au lieu de n'avoir que l'addition de l'éclairement moyen de chaque onde prise séparément. Les conditions expérimentales pour observer de telles figures sont assez restrictives, et la manière la plus simple d'en créer est d'utiliser deux ondes issues d'une même onde initiale, par division de front d'onde ou d'amplitude. Dans notre cas, il est commun d'utiliser la division d'amplitude afin de limiter les pertes énergétiques, puisqu'elle consiste à dévier une partie de l'énergie de la première onde tout en laissant passer l'autre partie à l'aide d'une séparatrice pour engendrer les deux ondes qui interférences. Il en existe plusieurs sortes, mais

nous nous intéresserons principalement, dans cette section, à l'interféromètre de Michelson pour faciliter la compréhension du principe d'interférométrie. Voyons le rôle qu'elle a à jouer dans l'OCT.

Nous décrirons les ondes lumineuses comme la somme d'ondes électriques scalaires planes monochromatiques, qui possèdent chacune un certain nombre de caractéristiques propres :

- Spatiales : la longueur d'onde dans le vide λ<sub>0</sub> et son inverse le nombre d'onde σ<sub>0</sub>, ainsi que le vecteur d'onde dans le vide k<sub>0</sub> = 2π/λ<sub>0</sub> u avec u la direction de propagation de l'onde. Quand l'onde se propage dans un milieu d'indice optique n, il est intégré dans la longueur d'onde λ = λ<sub>0</sub>/n et le vecteur d'onde k = 2πn/λ<sub>0</sub> u. On utilisera surtout la norme du vecteur d'onde k;
- Temporelles : la période temporelle T et son inverse la fréquence f, ainsi que la pulsation  $\omega = 2\pi f$ ;
- Ces deux catégories de caractéristiques physiques sont liées entre elles par la vitesse de la lumière dans le vide c<sub>0</sub> = fλ<sub>0</sub> = ω/k<sub>0</sub>, et dans un milieu d'indice n : c = c<sub>0</sub>/n = fλ = ω/k. Il est ainsi équivalent de désigner une onde par sa longueur d'onde, sa fréquence, sa norme de vecteur d'onde, ou sa pulsation ! On prendra donc la liberté de jongler entre ces termes, pour gagner en lisibilité et pour faciliter les calculs.

Dans un premier temps, nous allons traiter le cas des interférences de deux ondes monochromatiques, c'est-à-dire avec une seule longueur d'onde, et dans l'air, pour ignorer les effets de l'indice optique. Nous verrons que dans cette situation, il est théoriquement possible d'observer des interférences même si la différence de trajet parcouru entre les deux ondes est infinie...

La Figure 2.2 représente un interféromètre de Michelson dans l'air. La source envoie un rayon lumineux collimaté parallèle à l'axe optique, qui rencontre une séparatrice réfléchissant la moitié de l'onde incidente dans un bras de l'interféromètre et laisse passer l'autre moitié dans le second bras. A l'extrémité de chaque bras se trouve un miroir réfléchissant les rayons lumineux pour qu'ils se regroupent au niveau de la séparatrice puis aillent jusqu'au détecteur. L'un des bras est appelé le « bras objet » car il contient l'objet à détecter ; tandis que le second s'appelle le « bras de référence » puisqu'il comporte une surface réfléchissante servant à la création d'interférences. L'objectif de ce montage est donc d'être capable de retrouver la position et le coefficient de réflexion du miroir objet. Les principaux paramètres sur lequel on peut agir sont les longueurs des bras, notées  $l_o$  et  $l_r$ , l'indice o désignant le bras objet et r celui de référence. Ce ne sont pas directement leurs valeurs, mais la différence du chemin optique parcouru par la lumière entre les deux bras qui importe : on définit donc la « différence de marche »  $\delta = 2(l_r - l_o)$ , le facteur 2 traduisant l'aller-retour effectué dans chaque bras. On définit également le « plan de cohérence » dans le bras objet comme le plan de différence de marche nulle qui se superpose au miroir objet quand  $\delta = 0$ . Translater le miroir de référence aura donc pour effet de translater le plan de cohérence dans le bras objet. Les positions du plan de cohérence z et du miroir objet  $z_o$  sont indiquées pour une meilleure visualisation. On a ainsi la relation  $\delta = 2(z - z_o)$ .

Dans le cas monochromatique, avec une seule norme de vecteur d'onde k, les ondes dans chacun des bras peuvent être décrits en amplitudes complexes :

$$E_{o,r}(k, l_{o,r}) = (E_t/2)S(k)r_{o,r}e^{-j\omega t + jk2l_{o,r}}$$
(2.1)

Avec *j* le nombre imaginaire unitaire,  $E_t$  l'amplitude totale de la source, pondérée par sa densité spectrale de puissance normalisée *S* de sorte que  $\int_0^\infty S(k) dk = 1$ , et  $r_{o,r}$  les coefficients de réflexion en amplitude des miroirs dans chacun des bras. L'intensité détectée par la caméra, définie comme un éclairement en radiométrie en  $W/m^2$ , est donc :



FIGURE 2.2 – Schéma de l'interféromètre de Michelson dans l'air. La source envoie un faisceau lumineux collimaté en direction d'une séparatrice 50:50 qui sépare sa puissance de manière égale dans les deux bras de l'interféromètre. Les rayons ainsi divisés parcourent les bras, se réfléchissent sur les surfaces aux extrémités, reviennent vers la séparatrice, se recombinent puis vont sur le détecteur. Le plan de cohérence est le plan symétrique du miroir de référence par rapport à la séparatrice dans le bras objet.

$$I_{mono}(k, l_o, l_r) = |E_o + E_r|^2$$
  
=  $(E_o + E_r)(E_o^* + E_r^*)$   
=  $||E_o||^2 + ||E_r||^2 + E_o E_r^* + E_o^* E_r$   
=  $||E_o||^2 + ||E_r||^2 + 2\Re(E_o E_r^*)$   
=  $(E_t^2/4)S(k)\left(r_o^2 + r_r^2 + 2r_o r_r \Re(e^{jk2(l_o - l_r)})\right)$  (2.2)

Avec  $\Re$  l'opérateur de la partie réelle. Les termes utilisés dans la dernière égalité concernent les ondes exprimées pour des amplitudes complexes. On les remplace par les termes associés aux intensités et on utilise la différence de marche  $\delta$  comme intermédiaire de calcul :

$$I_{mono}(k,\delta) = (I_t/4)S(k)\left(R_o + R_r + 2\sqrt{R_oR_r}\cos(k\delta)\right)$$
(2.3)

Avec  $I_t$  l'intensité totale de la source,  $R_{o,r}$  les coefficients de réflexions des miroirs dans chacun des bras en intensité. Dans le membre de droite de cette équation, les deux premiers facteurs sont de simples coefficients de proportionnalité. Le troisième terme, essentiellement un signal sinusoïdal apparaissant en faisant varier  $\delta$ , est la manifestation des interférences due à la superposition des deux ondes lumineuses. On voit que pour toute valeur de  $\delta$ , le signal sinusoïdal est présent ! Il comporte l'information qui nous intéresse le plus : le coefficient de réflexion du miroir objet qu'on remplacera, plus tard, par un échantillon à scanner.

Ce dernier résultat est la base à partir de laquelle se développent les deux branches principales de l'OCT : l'OCT en domaine temporel (TD-OCT pour « Time Domain OCT ») et l'OCT en domaine fréquentiel (FD-OCT pour « Frequency Domain OCT » ou « Fourier Domain OCT »). L'information sur la position des miroirs est encore manquante mais elle apparaîtra en sommant la contribution de toutes les longueurs d'onde.

#### 2.1.3 L'OCT dans le domaine temporel, ou TD-OCT

La manière la plus directe d'utiliser l'interféromètre de Michelson est de faire varier la longueur des bras, donc la différence de marche  $\delta$ , pour enregistrer des interférogrammes.  $\delta$  va donc varier linéairement dans le temps, ce qui a valu son nom à la TD-OCT, bien qu'il me semble justifié de parler d'OCT « spatiale » car nous jouons sur une variable spatiale. L'idée de la TD-OCT vient de l'observation suivante : lorsqu'on utilise un interféromètre de Michelson en faisant varier la différence de marche  $\delta$ , il est difficile de faire apparaître des franges d'interférences en lumière blanche, c'est-àdire avec une source de spectre large, contrairement au cas où on utilise une source monochromatique. Dans le premier cas, il faut être extrêmement proche du contact optique, c'est-à-dire avoir  $\delta \approx 0$ , et dans le second, les franges sont visibles pour toute valeur de  $\delta$ , comme le montre l'équation (2.3). Le revers de cette difficulté est que la position du miroir objet est alors très bien connue par rapport à celle du miroir de référence. Peut-on exploiter une telle précision pour former des images ? La réponse est oui, et nous allons formaliser le constat ci-dessus.

# Interférométrie à deux ondes polychromatiques pour des franges localisées spatialement

Considérons une source polychromatique. On verra que, contrairement au cas monochromatique, les interférences seront très localisées. Il suffit de sommer la figure d'interférences générée par chacune des longueurs d'onde de la source, puisque deux ondes de longueur d'onde différente sont décorrélées l'une par rapport à l'autre, ce qui les empêche d'interférer. Supposons, pour simplifier les calculs, que les coefficients de réflexion en intensité  $R_o$  et  $R_r$  sont indépendants de k. Le signal total détecté est l'intégration de l'équation (2.3) par rapport à k:

$$I_{TD}(\delta) = \int_0^\infty I_k(\delta) \, dk$$
  
=  $(I_t/4)(R_o + R_r) + (I_t/2)\sqrt{R_o R_r} \int_0^\infty S(k) \cos(k\delta) \, dk$  (2.4)

Le premier terme du membre de droite est une constante, qui représente simplement la superposition des deux ondes s'il n'y avait aucune interférence, dont nous n'avons pas l'utilité pour des images OCT. Il faut expliciter l'intégrale, notée Mod, terme responsable des modulations du signal. En considérant que la densité spectrale de puissance S de la source est nulle pour les valeurs de k inférieures à zéro, les bornes de l'intégrale peuvent passer de  $0 \rightarrow \infty$  à  $-\infty \rightarrow +\infty$ , faisant apparaître la partie réelle d'une transformée de Fourier (TF) :

$$Mod(\delta) = \int_{0}^{\infty} S(k) \cos(k\delta) dk$$
  
=  $\int_{-\infty}^{+\infty} S(k) \cos(-k\delta) dk$   
=  $\Re \left( \int_{-\infty}^{+\infty} S(k) e^{-jk\delta} dk \right)$   
=  $\Re \left( \mathcal{F}(S(k))(\delta) \right)$  (2.5)

Avec  $\mathcal{F}$  l'opérateur de transformée de Fourier. On peut noter que grâce à la parité du cosinus, la transformée de Fourier directe ou inverse est équivalente dans ces calculs. La modulation des interférences est donc la partie réelle de la transformée de Fourier de la densité spectrale de puissance.

En se rappelant le théorème de Wiener-Khintchin, on sait donc que la modulation est la partie réelle du degré d'autocorrélation temporel de l'onde, qui donne une idée de la similarité de l'onde avec ellemême décalée dans le temps. Cela indique donc un temps de cohérence caractéristique de l'onde durant laquelle elle a une chance d'interférer avec elle-même. En multipliant cette grandeur par la vitesse de la lumière, on obtient une longueur de cohérence caractéristique qui indique la différence de marche endessous de laquelle les interférences sont possibles. Ces notions sont à ramener au concept de trains d'ondes de lumière capables d'interférer avec eux-mêmes durant un laps de temps déterminé par le temps de cohérence. Finalement, l'interféromètre de Michelson peut être vu comme un outil de mesure d'autocorrélation temporelle.

Reprendre l'exemple d'un spectre monochromatique à la norme de vecteur d'onde  $k_0$  revient à écrire  $S(k) = \delta_k (k - k_0)$  avec  $\delta_k$  la fonction de Dirac dans le domaine des fréquences spatiales, dont la partie réelle de la transformée de Fourier donne bien  $\cos(k_0\delta)$ , et on retrouve ainsi la même modulation que dans l'équation (2.3). Pour décrire le cas polychromatique, prenons l'exemple classique d'une densité spectrale de puissance gaussienne  $S_g$  de barycentre  $\overline{k}$  de sorte que  $\overline{k} = \int_{-\infty}^{+\infty} kS(k) dk$ , et de largeur à mi-hauteur  $\Delta k$ . On a :

$$S_g(k) = \frac{1}{\sigma_g \sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{\left(k - \bar{k}\right)^2}{2\sigma_g^2}\right)$$
(2.6)

Et

$$\sigma_q = \Delta k / 2\sqrt{2\ln 2} \tag{2.7}$$

Avec  $\sigma_g$  le paramètre de la gaussienne assurant une largeur à mi-hauteur égale à  $\Delta k$ . Le calcul de la modulation donne donc :

$$Mod_{g}(\delta) = \Re\left(\exp\left(-j\bar{k}\delta\right) \mathcal{F}\left(\frac{1}{\sigma_{g}\sqrt{2\pi}}\exp\left(-\frac{k^{2}}{2\sigma_{g}^{2}}\right)\right)\right)$$
$$= \Re\left(\exp\left(-j\bar{k}\delta\right)\exp\left(-\sigma_{g}^{2}\delta^{2}/2\right)\right)$$
$$= \cos\left(\bar{k}\delta\right)\exp\left(-\Delta k^{2}\delta^{2}/16\ln 2\right)$$
$$= \cos\left(\bar{k}2(z-z_{o})\right)\exp\left(-\Delta k^{2}(z-z_{o})^{2}/4\ln 2\right)$$
(2.8)

Pour rappel, z et  $z_o$  sont les positions du plan de cohérence et du miroir objet. Les faire apparaître dans cette équation permet de mieux interpréter leur interaction. Finalement, le signal détecté en TD-OCT avec un spectre gaussien est :

$$I_{TDg}(z) = (I_t/4)(R_o + R_r) + (I_t/2)\sqrt{R_o R_r} V_{coh}(z) \cos\left(\bar{k}2(z - z_o)\right)$$
(2.9)

Avec

$$V_{coh}(z) = \exp(-\Delta k^2 (z - z_o)^2 / 4 \ln 2)$$
(2.10)

La figure d'interférence obtenue, ou interférogramme, est illustrée dans la Figure 2.3. La modulation de l'équation (2.9) du cas polychromatique ressemble furieusement à celle de l'équation (2.3) du cas monochromatique ! A la différence de la fonction  $V_{coh}$ , appelée enveloppe cohérente, qui est <u>une</u> gaussienne centrée autour de  $z_o$ , c'est-à-dire de la position du miroir objet. Cela veut dire que la caméra détectera des interférences seulement quand le plan de cohérence sera « proche » du miroir objet.  $V_{coh}$  agit donc comme une fenêtre de détection qui permet de repérer la position de l'objet. Sachant que  $\Delta k \approx 2\pi\Delta\lambda/\bar{\lambda}^2$  avec  $\Delta\lambda$  la largeur du spectre en longueur d'onde et  $\bar{\lambda}$  la longueur d'onde centrale du spectre, on obtient la valeur classique de la largeur à mi-hauteur  $\Delta z_{coh}$  de  $V_{coh}$ , qu'on peut aussi lier à la longueur de cohérence  $l_c$ , qui est la différence de marche au-delà de laquelle deux ondes ne peuvent plus interférer :



FIGURE 2.3 – Illustration du phénomène d'interférences à deux ondes dans le cas d'un spectre polychromatique gaussien centré autour de la longueur d'onde 700 nm et de largeur à mi-hauteur de 100 nm. Seule la partie modulée de l'équation (2.9) est représentée. a) Intensités normalisées des figures d'interférences associées aux longueurs d'onde 700 et 750 nm. Ces deux longueurs d'onde, et toutes les autres du spectre, sont en phase au contact optique. Elles se déphasent au fur et à mesure que  $\delta$  varie au point qu'une des intensités atteint un maximum et l'autre un minimum, ce qui annule le phénomène d'interférences. b) Intensité normalisée de la somme des interférogrammes de chaque longueur d'onde. L'enveloppe de l'intensité est maximale au contact optique et diminue au fur et à mesure qu'on s'en éloigne. Elle s'exprime mathématiquement avec l'enveloppe cohérente  $V_{coh}$ . Sa largeur à mi-hauteur est de l'ordre de 2 microns.

$$\Delta z_{coh} = \frac{l_c}{2} \approx \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\bar{\lambda}^2}{\Delta \lambda}$$
(2.11)

On voit que plus le spectre de la source sera large, plus la largeur à mi-hauteur  $\Delta z_{coh}$  sera restreinte, et plus la détection de l'objet sera précise. C'est un effet qu'on explique aussi par la propriété de contraction-dilatation de la TF : la TF de la gaussienne spectrale est une gaussienne spatiale, et l'une est d'autant plus large que l'autre est fine. Ne prendre en compte que les interférences du signal revient à observer le plan du miroir objet avec une profondeur de champ de l'ordre de  $l_c$ , donc en rejetant les signaux de plans plus haut ou plus bas : les interférences jouent donc le rôle de « filtrage cohérent » pour un meilleur sectionnement de l'échantillon. Pour avoir un ordre de grandeur, avec  $\overline{\lambda} = 700 nm$  et  $\Delta \lambda =$ 100 nm, on a  $\Delta z_{coh} \approx 2 \mu m$ . Ceci explique la difficulté à observer des franges de Newton directement en lumière blanche avec un interféromètre de Michelson : il faut déplacer les miroirs pour être au contact optique au micron près.

Cette enveloppe cohérente due à un large spectre permet d'obtenir la position du miroir objet, tandis que l'amplitude de la modulation est proportionnelle à  $\sqrt{R_o}$ . Nous possédons donc tous les ingrédients nécessaires pour construire des cartes de réflectivité d'échantillons semi-transparents.

#### Imagerie d'un échantillon à plusieurs couches réfléchissantes

A présent, intéressons-nous à l'étude d'un échantillon plus complexe qu'un simple miroir, comme un tissu biologique. Utiliser un interféromètre de Michelson avec une source à spectre large permet d'obtenir un signal d'où l'on peut extraire la position du miroir objet et sa réflectivité en translatant le miroir de référence, et le plan de cohérence en même temps. Or, un tissu biologique peut être vu simplement comme une série de couches réflectives les unes sur les autres. Remplacer le miroir objet par un échantillon biologique aura pour conséquence d'enregistrer un interférogramme avec plusieurs signaux modulés les uns à la suite des autres, chacun centré à la position des différentes interfaces et avec une certaine amplitude, lors d'un balayage. Cependant, la donnée qui nous est vraiment compréhensible est l'enveloppe des modulations. Il faut donc traiter informatiquement l'interférogramme pour en supprimer le fond constant indépendant de la différence de marche, et les modulations en elles-mêmes : on parle de démodulation. Une variété d'algorithmes à décalage de phase y parvient, et le A-scan recherché apparaît. Ces étapes sont illustrées et résumées sur la Figure 2.4.

Cependant, maintenant qu'on considère plusieurs couches réfléchissantes, il faut prendre garde à la signification du coefficient  $R_o$  dans les équations précédentes. La quantité totale de photons revenant du bras objet est toujours globalement constante, mais nous avons vu plus tôt que la longueur de cohérence est relativement courte. Cela signifie que, parmi tous les photons venant du bras objet, seule une faible partie participe effectivement aux interférences : ce sont ceux originaires du plan de cohérence, ou du très fin volume de cohérence, qui se déplace au cours du temps. On sépare donc le coefficient  $R_o$  en deux termes, l'un proportionnel à la quantité de photons participant aux interférences, et l'autre proportionnel au nombre de photons n'y participant pas, tous deux dépendants de la position z du plan de cohérence. On a donc :

$$R_o = R_{coh}(z) + R_{inc}(z) \tag{2.12}$$

Cette séparation entre photons cohérents et incohérents devient particulièrement pertinente quand on sonde des échantillons très diffusants comme la peau. En prenant cela en compte, la formule décrivant l'interférogramme s'en trouve modifiée, notamment dans le terme de la modulation :

$$I_{TDg}(z) = \frac{I_t}{4} \Big[ R_{inc}(z) + R_{coh}(z) + R_r + 2\sqrt{R_{coh}(z)R_r} V_{coh}(z) \cos\left(\bar{k}2(z-z_o)\right) \Big]$$
(2.13)

Dans la somme,  $R_{coh}$  peut être omis car sa valeur est souvent beaucoup plus faible que celle de  $R_{inc}$ . Pour les mêmes raisons, on ne va considérer que la valeur moyenne de  $R_{inc}$  et retirer sa dépendance



FIGURE 2.4 – Principe de fonctionnement de l'OCT dans le domaine temporel (TD-OCT). Le plan de cohérence se translate en même temps que le miroir de référence. Dès qu'il se superpose à une couche réflective de l'échantillon, un signal modulé dont la largeur dépend du spectre de la source est enregistré par le détecteur. L'interférogramme est donc constitué d'une série de signaux modulés les uns à la suite des autres. Une fois l'interférogramme démodulé, on obtient un A-scan de l'échantillon !

avec la position z. On retombe alors sur une expression qui ressemble à l'équation (2.9) mais est plus précise par rapport à la cohérence des photons considérés :

$$I_{TDg}(z) = \frac{I_t}{4} (R_{inc} + R_r) + \frac{I_t}{2} \left( \sqrt{R_{coh}(z)R_r} \, V_{coh}(z) \cos\left(\bar{k}2(z - z_o)\right) \right)$$
(2.14)

Jusqu'à présent dans ce chapitre, les schémas du montage optique étaient très simplifiés pour faciliter la compréhension du principe de fonctionnement. Les dispositifs typiques de TD-OCT ressemblent plutôt à la Figure 2.5 [20]. La propagation de la lumière y est assurée par un jeu de fibres, et, de manière plus intéressante, une optique fixe est placée devant l'échantillon avec un miroir oscillant juste avant pour assurer un balayage latéral, dans le but de produire des A-scans adjacents et de les concaténer pour avoir un B-scan.

La présence de l'optique n'altère pas le principe de fonctionnement fondamental de l'OCT mais permet d'augmenter la qualité des A-scans en améliorant la résolution latérale. Dans une moindre mesure, un tel dispositif de TD-OCT bénéficie d'un filtrage confocal grâce à la sortie de fibre vers le bras objet, mais c'est surtout le filtrage cohérent qui assure la résolution dans la direction axiale. Cet ajout au système pose de nouvelles problématiques : sachant que la profondeur de champ d'une optique diminue en  $1/ON^2$  avec ON son ouverture numérique, et la résolution latérale en 1/ON, il y a un compromis à faire entre ces deux caractéristiques, ce qui empêche ce système de faire de l'imagerie à ultra-haute résolution latérale et en profondeur. En réalité, ces questionnements se posent car l'optique ne bouge pas et n'est donc pas toujours focalisée sur le plan de cohérence pour optimiser la résolution latérale : l'immobilité de l'optique permet en contrepartie une plus grande vitesse de balayage du miroir de référence, et donc d'acquisition, au détriment de la résolution.

#### 2.1.4 L'OCT dans le domaine fréquentiel, ou FD-OCT

La FD-OCT, qui a rapidement émergé après la TD-OCT, est une méthode qui exploite toujours le phénomène d'interférences, par exemple en sortie d'un interféromètre de Michelson, afin de trouver la position et la réflectance des couches réflectives de l'échantillon. Mais, comme son nom l'indique, elle exploite cette fois le domaine des fréquences spatiales pour y parvenir.

L'idée de la TD-OCT était la suivante : faire apparaître des figures d'interférences en faisant un balayage « temporel », c'est-à-dire du miroir de référence. Mais ne serait-il pas possible de récupérer le même type d'informations sans le balayage spatial, en laissant le miroir de référence fixe ? L'observation des interférences exige tout de même la variation d'un paramètre autre que la variable spatiale  $\delta$ . En se référant à l'équation de base (2.3) des interférences à deux ondes monochromatiques,



FIGURE 2.5 – Schéma typique d'un montage de TD-OCT. La lumière est transmise à travers un jeu de fibres, puis une optique focalise le faisceau dans l'échantillon à imager et un miroir oscillant se trouve en amont pour dévier le faisceau et effectuer un balayage transverse afin d'obtenir des B-scans. [20]

on voit que cela ne peut être que la norme du vecteur d'onde k, qui représente l'espace des fréquences spatiales. Au lieu de mesurer en sortie de l'interféromètre un interférogramme qui varie en fonction de  $\delta$  (ou z), on mesure donc le spectre qui varie en fonction de k. En pratique, il est mesuré grâce à un spectromètre à réseau à la place du détecteur, mais le reste du montage est similaire à celui de la TD-OCT. Ainsi, toutes les couches réfléchissantes de l'échantillon contribuent au signal en sortie, contrairement à la TD-OCT. Il existe une variante où chaque longueur d'onde de la source est injectée une à une dans l'interféromètre pour reconstruire le spectre en sortie, sans avoir besoin de spectromètre. On parle alors d'OCT à source à balayage, ou SS-OCT pour « Swept-Source OCT ». On observerait alors le spectre de la source avec des cannelures, dont la transformée de Fourier donnerait la position et la réflectance des différentes couches de l'échantillon. En effet, la phase des modulations du spectre varie proportionnellement à la différence de marche entre le plan de cohérence fixe et un plan réfléchissant. Ce principe est illustré dans la Figure 2.6.

Pour en comprendre le principe de fonctionnement, considérons un échantillon avec une seule couche réfléchissante, de réflectivité  $R_o$  et située à une distance  $z_o$  du plan de cohérence, lui-même à la position  $z_r$ . Si l'on reprend l'équation (2.3), on a :

$$I_{FD}(k,\delta_{o}) = (I_{t}/4)S(k)(R_{o} + R_{r} + 2\sqrt{R_{o}R_{r}}\cos(k\delta_{o}))$$
(2.15)

Avec  $\delta_o = 2(z_o - z_r)$  la différence de marche fixe entre le plan de cohérence et la couche réfléchissante. En collectant ce signal en fonction de la norme de vecteur d'onde k, on obtient une courbe qui est le spectre de la source modulée par le cosinus, dont l'amplitude est fonction de  $R_o$ . Plus la couche réfléchissante objet est éloignée du plan de cohérence, plus les modulations seront resserrées. De même, plus la couche aura un fort taux de réflexion, plus l'amplitude des oscillations sera grande. Il suffit donc d'appliquer une transformée de Fourier à ce signal pour en extraire la position et le taux de réflexion de la couche réfléchissante : en effet, la transformée de Fourier d'une fonction cosinus est simplement deux fonctions Dirac symétriques par rapport au zéro des abscisses dans l'espace de Fourier situées à  $\pm \delta_0$  et de hauteur proportionnelle à  $\sqrt{R_o}$ :



FIGURE 2.6 – Principe de la FD-OCT. Il s'agit plus précisément d'une illustration du bras objet d'un système de FD-OCT, avec une seule surface réflective. On ne fait plus varier la différence de marche en balayant le plan de cohérence. A la place, ce sont les fréquences spatiales qui sont balayées afin de mesurer le spectre de la lumière en sortie. Les modulations dans le spectre varient d'autant plus rapidement en fonction de k que la distance entre le plan de cohérence et la surface réfléchissante est grande. Calculer la transformée de Fourier du spectre permet d'en extraire la position des surfaces réfléchissantes dans l'échantillon par rapport à la position du plan de cohérence.

$$\mathcal{F}(I_{FD}(k))(\delta) = \mathcal{F}(I_t/4) * \mathcal{F}(S(k)) * \left(\mathcal{F}(R_o + R_r) + 2\sqrt{R_oR_r}\mathcal{F}(\cos(k\delta_o))\right) = \frac{I_t}{4}\mathcal{F}(S(k))(R_o + R_r) + \frac{I_t}{4}\sqrt{R_oR_r}\mathcal{F}(S(k)) * \left(\hat{\delta}(\delta - \delta_o) + \hat{\delta}(\delta + \delta_o)\right)$$
(2.16)

Avec \* le produit de convolution et  $\hat{\delta}$  la fonction de Dirac. En retraduisant la différence de marche  $\delta_o$  en termes de position axiale, on aurait deux fonctions Dirac centrées en  $\pm 2(z_o - z_r)$ . Le premier terme du membre de droit constitue le « fond constant » du signal interférométrique, sans modulation, et donc à la position nulle des abscisses. Le deuxième donne l'information sur la position de la couche réfléchissante et son taux de réflexion. On remarque tout de même que les fonctions Dirac sont convoluées par la TF du spectre de la source, ce qui indique que sa largeur est encore une fois un paramètre déterminant pour obtenir une bonne résolution dans le domaine spatial, à cause de la propriété de dilatation-contraction de la TF. Donc globalement, l'OCT, que ce soit dans le domaine « temporel » ou fréquentiel, a besoin d'utiliser une source à spectre large.

Si l'échantillon comportait plusieurs couches réfléchissantes, le signal détecté serait essentiellement la TF du spectre de la source modulée par la somme des cosinus engendrés par chaque couche. Pour obtenir une formule analytique de cette situation, il faudrait reprendre les calculs depuis l'équation (2.2) en incluant une onde scalaire supplémentaire pour chaque couche ajoutée dans le bras objet. Cela ferait intervenir des modulations additionnelles dues aux interférences entre les différentes couches dans l'échantillon et considérées comme des artefacts [21].

#### 2.1.5 Comparaison entre la TD-OCT et la FD-OCT

Ces deux méthodes reposent toutes deux sur les interférences, mais leur mode de détection diffère en plusieurs points. En particulier, le nombre total de photons contribuant à l'image finale est bien différent : la capacité de sectionnement de la TD-OCT contribue à sa bonne résolution axiale, mais cela signifie aussi que ce ne sont que les photons provenant du plan de cohérence qui forment le A-scan final ; contrairement à la FD-OCT qui se sert de la totalité des photons dans la profondeur de champ de l'optique. De plus, l'acquisition en TD-OCT se fait grâce au balayage du miroir de référence qui peut prendre un certain temps, comparé à la FD-OCT qui peut acquérir la totalité du spectre de tout l'échantillon en une fois. La FD-OCT possède donc un avantage certain en termes de puissance de signal en sortie et en vitesse d'acquisition, et donc en rapport signal à bruit dans les images, par rapport à la TD-OCT. Une comparaison de performance entre ces deux méthodes est montrée à la Figure 2.7 [22].

Tout porte à croire que la FD-OCT prévaut sur la TD-OCT, mais c'est sans compter sur la potentielle mobilité de l'optique en TD-OCT. En effet, les deux méthodes utilisent des optiques fixes à grande profondeur de champ, mais, tandis que cela s'avère être une nécessité en FD-OCT, cela reste un confort en TD-OCT pour un montage plus simple : un jeu de lentilles est relativement lourd et donc plus lent à translater qu'un simple miroir plan de référence. En gardant le montage classique de la TD-OCT, l'accent a été mis sur la vitesse de balayage et donc de l'acquisition de A-scans.

Que se passerait-il si l'on troquait l'optique actuelle par une autre à forte ouverture numérique, comme un objectif de microscope ? Vous l'aurez compris, il y aurait une amélioration substantielle dans la résolution latérale. Mais seulement dans le plan de focalisation de l'objectif, car la profondeur de champ diminue fortement avec l'augmentation de l'ouverture numérique. La profondeur de pénétration s'en retrouverait drastiquement affectée, et il deviendrait nécessaire de translater l'objectif en même temps que le plan de cohérence dans l'échantillon pour profiter de la résolution microscopique en profondeur, au détriment de la vitesse de scan selon l'axe optique. Le gain en résolution reste tout de même intéressant : à titre de comparaison, la résolution latérale en FD-OCT peut descendre jusqu'à 10-15  $\mu$ m à 890 nm en pratique en imageant la rétine [23], tandis que celle théorique d'un objectif de microscope 20x d'ouverture numérique 0,5 est de l'ordre de 2  $\mu$ m à la même longueur d'onde, même si les aberrations ne sont pas prises en compte. Il est bien sûr possible d'utiliser des objectifs à ouvertures numériques plus ou moins grandes. Malgré la perte en vitesse et en puissance de signal, la TD-OCT


FIGURE 2.7 – Comparaison d'images de rétine *in vivo* obtenues en TD-OCT et FD-OCT. (a) Image obtenue dans le domaine temporel à l'aide d'un appareil commercial OCT 3 Stratus (Zeiss), avec une résolution axiale de l'ordre de 10  $\mu$ m et une vitesse d'acquisition de 400 A-scans/s. (b) Image obtenue en domaine fréquentiel à l'aide d'un montage de laboratoire avec une résolution axiale de 2  $\mu$ m et une vitesse d'acquisition de 30000 A-scans/s. La qualité d'image est grandement affectée par la vitesse d'acquisition, proportionnelle à la quantité de signal collecté. Dans cet exemple, l'amélioration de la résolution axiale est due à l'utilisation d'une source à spectre large. [22]

affublée d'une optique performante ouvre la voie vers un gain d'un ordre de grandeur en termes de résolution, et donc à l'imagerie ultra-haute résolution nécessaire à la visualisation de cancers de la peau de manière précoce.

# 2.2 Meilleure résolution latérale et parallélisation de l'acquisition

Nous avons présenté le principe de l'OCT, et en particulier celui de la TD-OCT qui permet potentiellement une meilleure résolution malgré quelques concessions sur la vitesse d'acquisition. Une méthode d'imagerie s'est naturellement mise en place pour exploiter cette amélioration en résolution : la microscopie par cohérence optique (OCM pour « Optical Coherence Microscopy »). On présentera ensuite une méthode qui découle de l'OCM et qui supprime le besoin de scanner latéralement en parallélisant l'acquisition de l'image : la microscopie par cohérence optique plein champ (FF-OCM pour « Full-Field OCM »).

# 2.2.1 Microscopie par Cohérence Optique (OCM)

La TD-OCT utilise typiquement une optique de faible ouverture numérique pour conserver une profondeur de champ suffisante et éviter de la mouvoir. Seul le miroir de référence est balayé pour augmenter la vitesse d'acquisition, mais limite la résolution latérale à environ 10 µm. Il reste cependant possible d'utiliser des objectifs de microscope à plus grande ouverture numérique pour améliorer la résolution latérale : c'est l'OCM. Un montage d'OCM ressemble à celui de TD-OCT classique (cf. Figure 2.5), avec un objectif de microscope comme optique dans le bras objet juste avant l'échantillon, qui devient donc un microscope confocal grâce à l'entrée de la fibre monomode dans le rôle de sténopé, et éventuellement avec un système de balayage axial. Cette méthode est une suite naturelle de la TD-OCT pour observer des échantillons biologiques à l'échelle cellulaire, combinée avec le principe de la microscopie confocal par réflectance (RCM pour « Reflectance Confocal Microscopy »).

Afin de surmonter la faible profondeur de champ des objectifs pour imager les échantillons en profondeur, différentes méthodes de balayage ont été utilisées. La première donne la priorité au scan axial : c'est la plus naturelle, et est similaire à celle de l'OCT, à savoir l'acquisition consécutives de A-scans concaténés pour former un B-scan. Les plans de cohérence et de focalisation de l'objectif sont balayés en même temps pour rester superposés. Pour cela, l'objectif a besoin d'être translaté dans la direction axiale grâce à, par exemple, une platine de translation piézoélectrique : on parle de mise au point dynamique. Un objectif étant relativement lourd par rapport à un simple miroir de référence, une lenteur du scan axial se fait ressentir et la vitesse d'acquisition est moins performante qu'en TD-OCT. Et, malgré ses avantages en termes de rapidité et de rapport signal à bruit, la FD-OCT ne se prête pas à la mise au point dynamique, puisque le plan de cohérence est fixe. Pour l'utiliser, il faudrait allonger la profondeur de champ tout en conservant la résolution, par exemple en créant un champ de Bessel comme éclairage, mais qui diminue malheureusement l'intensité du signal.

Une deuxième méthode de balayage priorise le scan latéral : le miroir galvanométrique en amont de l'objectif balaye rapidement le faisceau laser tandis que l'objectif est lentement translaté dans la direction axiale pour obtenir un B-scan. On profite de la propriété d'aplanétisme des objectifs : le rayon lumineux se concentre toujours en un point dans le plan focal de l'objectif après l'avoir traversé tout en conservant la résolution latérale, même après déviation du rayon en amont. Il n'y a donc plus besoin de scanner dans la direction axiale aussi rapidement que dans la première méthode, ce qui optimise grandement la vitesse d'acquisition des données.

On se rend donc compte que pour augmenter la vitesse d'acquisition, il vaut mieux bouger le moins possible l'objectif de microscope. La troisième méthode est l'imagerie en face : l'objectif est immobile mais le point lumineux est balayé dans tout le plan focal grâce à deux miroirs galvanométriques qui déterminent la limite de vitesse d'acquisition. Les plans de cohérence et de focalisation sont donc toujours superposés. On obtient ainsi des images dites « en face », c'est-à-dire des images en coupe horizontales, comme pour les microscopes classiques. Il s'agit de la méthode de balayage la plus robuste et donc la plus utilisée pour l'imagerie biologique en OCM. Paradoxalement, utiliser la FD-OCT pour l'imagerie en face est nettement moins efficace que la TD-OCT : en effet, la FD-OCT a besoin d'acquérir l'information provenant de toutes les profondeurs en même temps. Produire une image en face exige donc d'acquérir les données de tout un volume 3D tandis que la TD-OCT n'a besoin que d'informations provenant du plan qu'on veut imager. Il reste possible d'obtenir des images 3D en concaténant les images en face à différentes profondeurs et en utilisant le principe de la mise au point dynamique.

La TD-OCT est donc toute désignée pour être utilisée en OCM ! Dans le reste du manuscrit, le terme d'OCM désignera donc de l'imagerie en face en utilisant le principe de TD-OCT en utilisant un objectif de microscope.

Nous avons vu dans la sous-section 2.1.3 sur le principe de fonctionnement de la TD-OCT que le signal utile provenait de sa partie modulée qui apparaît lorsqu'il y a une variation de la différence de marche. En TD-OCT, où l'on utilise des balayages axiaux pour obtenir des A-scans, le déplacement du plan de cohérence par rapport aux couches réflectives de l'échantillon créait naturellement cette différence de marche. En OCM, où l'on produit des images en face, ce balayage « naturel » du plan de cohérence n'a plus lieu et il faut donc créer ce déphasage en bougeant le miroir de référence sans pour autant faire sortir le plan de cohérence de la profondeur de champ de l'objectif. Les modulations sont révélées le plus fréquemment à l'aide d'actionneurs piézoélectriques [24], [25]. D'autres méthodes ont été utilisées, par exemple en mettant à profit le déphasage que le balayage latéral du point engendre [26].

L'OCM, qui est la combinaison de la TD-OCT et de la RCM, combine les avantages de chacun. En effet, on y retrouve la bonne résolution latérale due à l'utilisation d'objectifs de microscopes performants en plus de la bonne résolution axiale apportée par la combinaison des filtrages cohérent et confocal, comme illustré dans la Figure 2.8 [27]. L'effet combiné des deux filtres est plus efficace que chaque



FIGURE 2.8 – Comparaison de la résolution axiale d'un système d'OCM lorsqu'il bénéficie de la combinaison des filtres confocal et cohérent et du filtre confocal seul, en décibels. La combinaison des filtres permet clairement un sectionnement axial plus fin. En effet, le filtre confocal sélectionne les photons détectés par rapport à leur zone d'émission, et le filtre cohérent par rapport à leur trajet optique pour éliminer les photons multidiffusés. [27]

filtre seul : le filtre confocal restreint l'espace de détection aux plans proches du plan focal de l'objectif et le filtrage cohérent sélectionne les photons selon leur trajet optique, éliminant les photons diffusés plusieurs fois dans l'échantillon. On estime l'amélioration de la profondeur de pénétration d'un facteur 2 ou 3 [27] par rapport à la RCM. Quand bien même, le filtre cohérent peut être beaucoup plus efficace pour assurer la résolution axiale puisqu'il suffit d'utiliser une source à spectre large. Il est alors possible de relâcher les contraintes sur l'ouverture numérique de l'objectif, typiquement de l'ordre de 0,7-1,2 en RCM, pour ne rechercher qu'une résolution latérale suffisante et avoir un système optique beaucoup plus simple. La miniaturisation ou une plus grande distance de travail sont dès lors beaucoup plus accessibles.

Puisque l'OCM acquiert ses images point par point, elle a besoin d'un système de balayage pour sonder l'échantillon dans le plan en face. Le plus direct serait de déplacer l'objectif de microscope latéralement à l'aide de platines de translations pour couvrir le champ souhaité, mais cela pose des problèmes de vitesse de scan, bien que la conservation de la différence de marche de cette configuration assure la superposition des plans de focalisation et de cohérence dans tout le champ. C'est pourquoi les OCM sont typiquement équipés d'appareils pour dévier le rayon incident et d'optiques supplémentaires de relais et de collimation, comme illustré dans la Figure 2.9 [28]. On préfère en particulier les miroirs galvanométriques qui peuvent tourner à une fréquence jusqu'à 10-15 kHz, suffisante pour de l'imagerie en temps réel. Le premier montage de la Figure 2.9 est dit totalement télécentrique car les miroirs galvanométriques se trouvent dans des plans conjugués de la pupille de l'objectif qui travaille ici en conjugaison infini-foyer. La « télécentricité du montage » assure l'équivalence entre la rotation d'un miroir et la rotation du rayon incident autour de la pupille de l'objectif. Autrement dit, en supposant que le rayon incident éclaire initialement la totalité de la pupille de l'objectif, quelle que soit l'orientation angulaire d'un miroir, le faisceau lumineux éclaire toujours toute la pupille et seul l'angle d'incidence varie. Il s'agit de la manière idéale d'effectuer le balayage pour un objectif infini-foyer, car la puissance lumineuse transmise est constante dans tout le champ latéral, en supposant les optiques parfaites. La contrepartie majeure est l'encombrement, ainsi que la longueur du trajet de la lumière entre la sortie de la fibre jusqu'à l'objectif. Le second montage de la Figure 2.9 n'est qu'approximativement télécentrique mais beaucoup plus compact. Il a l'avantage d'être plus facile à incorporer dans une sonde portable au détriment de la qualité d'image : en bord de champ, elle sera sujette à une baisse de puissance lumineuse



FIGURE 2.9 – Designs pour le balayage latéral du point typiquement utilisés en OCM. (a) Montage dit totalement télécentrique, avec les miroirs galvanométriques X et Y conjugués optiquement à la pupille de sortie de l'objectif de microscope, lui-même télécentrique objet et qui travaille en conjugaison infinifoyer. (b) Montage approximativement télécentrique, plus compact mais qui engendre des aberrations dans l'image finale. [28]

ainsi qu'à l'apparition de courbure de champ. Ces considérations aideront à la conception de l'éclairage en LC-OCT pour l'imagerie 3D (cf. section 3.4).

L'OCM est finalement une technique d'imagerie essentiellement en face à balayage qui tire son intérêt de la combinaison des filtrages confocal et cohérent. Mais, pour gagner encore en vitesse d'acquisition, ne serait-il pas plus malin de se débarrasser des problématiques de balayage en parallélisant l'acquisition et en se contentant seulement du filtrage cohérent ? Nous aborderons cette question avec l'OCM plein champ.

2.2.2 Microscopie par Cohérence Optique plein champ (FF-OCM) La microscopie par cohérence optique plein champ, ou FF-OCM pour « Full-Field OCM », parfois aussi dénommée FF-OCT par abus de langage, est la concrétisation de la parallélisation de l'acquisition en OCM. Elle est proposée en 1998 [9] et permet de supprimer le système de balayage de l'OCM qui en est un élément limitant la vitesse d'acquisition. En pratique, l'éclairage est parallélisé à la manière d'un microscope conventionnel et une surface de l'échantillon est éclairée pendant que l'acquisition effective est assurée par un détecteur en deux dimensions. On obtient donc l'information provenant de plusieurs points de l'échantillon en même temps, contrairement à l'OCM où les points sont acquis les uns après les autres grâce au balayage du faisceau lumineux en amont de l'objectif. Ainsi, seule la mise au point dynamique est nécessaire pour obtenir des images en 3D. De manière simplifiée, cette méthode peut être vue comme de la microscopie conventionnelle avec la capacité supplémentaire de pouvoir sonder l'échantillon en profondeur.

Un montage typique de FF-OCM est présenté à la Figure 2.10. Il comporte un certain nombre de changements par rapport aux montages d'OCM ou d'OCT. Comme nous passons d'un éclairage point par point à un éclairage plein champ, la source de lumière s'en retrouve changée : dans le premier cas, l'utilisation d'un laser était préconisée pour sa nature spatialement cohérente qui permettait de focaliser efficacement la lumière jusqu'à la limite de diffraction et donc améliorer la résolution. Pour l'éclairage plein champ, par analogie avec la microscopie conventionnelle, on reprend un schéma d'éclairage similaire, à savoir un éclairage Köhler comme illustré dans la Figure 2.11 [29] (cf. Annexe A.1 pour des détails supplémentaires) qui permet d'éclairer l'échantillon de manière uniforme tout en contrôlant le degré de cohérence spatial de la source et le champ éclairé. En outre, il est préférable d'utiliser une



FIGURE 2.10 – Montage de FF-OCM. CS : cube séparateur ; OM : objectif de microscope ; PZT : platine de translation piézoélectrique. La source n'est plus un laser ponctuel mais une source spatialement large combinée à un éclairage Köhler pour éclairer une large surface de l'échantillon. Seuls les rayons parallèles à l'axe optique sont représentés pour une meilleure visibilité. L'interféromètre est constitué d'un objectif de microscope identique dans chacun des bras : il s'agit de l'interféromètre de Linnik. Dans le bras de référence à droite, la lumière se focalise sur une surface de référence accrochée à une monture piézoélectrique pour faire apparaître les modulations dans les images enregistrées. Dans le bras objet, la lumière se concentre dans l'échantillon dont on peut choisir le plan à imager grâce à une platine de translations motorisée. Il est possible de reconstruire une image 3D de l'échantillon en l'imageant à différentes profondeurs à la suite.

source spatialement incohérente [30], donc une source spatialement large et non ponctuelle afin d'éviter naturellement l'effet de speckle (ou cross-talk) qui détériore la qualité des images finales [31], [32], même si l'élimination de telles interférences parasites a été étudiée [33]–[35]. Les lampes halogènes étaient privilégiées en FF-OCM car peu onéreuses et émettant des spectres larges de corps noirs [36], [37], pour une très bonne résolution axiale [38]. Aujourd'hui, on utilise des LED qui arrivent maintenant à émettre des spectres assez larges pour l'OCT. C'est pourquoi l'éclairage n'est plus fibré dans ce montage, mais en espace libre. L'interféromètre a dû, lui aussi, changer : l'objectif de microscope dans le bras objet est présent pour une bonne résolution latérale mais l'objectif dans le bras de référence sert à symétriser l'interféromètre. En effet, maintenant que la source est spatialement incohérente, les rayons provenant d'un point de la source doivent parcourir le même trajet optique dans les deux bras pour pouvoir interférer correctement, sans quoi la résolution et le contraste seront amoindris. De plus, cette symétrie permet aussi de compenser l'effet de dispersion entre les deux bras (notion abordée dans la sous-section 2.3.6), c'est-à-dire la variation d'indice optique en fonction de la longueur d'onde et donc de la différence de marche.

Le principe de fonctionnement ressemble très fortement à celui de l'OCM : lorsque l'objectif a fait la mise au point sur un plan de l'échantillon à imager, plusieurs images plein champ sont acquises par la caméra, chacune avec le plan de cohérence à une position légèrement différente, sans pour autant sortir de la profondeur de champ de l'objectif en translatant la surface de référence. Cela fait apparaître les modulations en chaque point des images en face dont on extrait l'enveloppe en utilisant un algorithme de démodulation.



FIGURE 2.11 - Principe de l'éclairage Köhler en diascopie. La partie éclairage est constituée du bloc Illuminateur et Condenseur. dép : dépoli ; I : optique de l'illuminateur ; DC : diaphragme de champ ; DO : diaphragme d'ouverture ; C : optique du condenseur ; Pr : préparation (échantillon) ; Obj : objectif de microscope ; Pu : pupille ; Dc : diaphragme de champ de l'oculaire ; Oc : oculaire ; c.o. : cercle oculaire. L'éclairage Köhler permet d'illuminer la préparation de manière uniforme et de contrôler indépendamment le champ éclairé et le degré de cohérence spatial de la source grâce au DC et au DO, respectivement. Cette configuration repose sur les conjugaisons DC  $\leftrightarrow$  Pr, dép. $\leftrightarrow$  DO  $\leftrightarrow$  infini dans l'espace de la préparation. L'objectif représenté ici travaille à distance finie, contrairement aux autres objectifs mentionnés dans le manuscrit. Cf. Annexe A.1 pour des détails supplémentaires. [29]

La FF-OCM permet donc d'obtenir des images en face sans avoir recours à des balayages latéraux, ce qui en fait une technique potentiellement à haute vitesse d'acquisition, mais au prix du filtrage confocal. En effet, il n'est plus possible de simplement conjuguer le point imagé de l'échantillon avec un sténopé. Par conséquent, chaque pixel du capteur peut recevoir du signal provenant de photons qui ont été diffusés au sein de l'échantillon et qui ne sont plus cohérents, ainsi que de toute réflexion parasite dans le système optique. Le terme décrivant la quantité de photons incohérents de l'équation (2.15) augmente donc drastiquement sans participer au signal utile, ce qui nuit donc au rapport signal à bruit du système d'imagerie. Il n'est donc plus possible de pénétrer dans l'échantillon aussi bien que lorsqu'on avait un filtrage confocal, à moins de faire de l'« accumulation », c'est-à-dire du moyennage de mêmes images de l'échantillon. Cette astuce réduit artificiellement le bruit dans l'image mais rend difficile l'acquisition in vivo de qualité. En effet, l'accumulation suppose que l'échantillon ne bouge pas pendant toute la durée de l'acquisition. Il faut ajouter à cela l'effet du temps d'intégration des caméras, c'est-àdire le temps qu'elles mettent à collecter les photons, les convertir en électrons et les transmettre, qui est beaucoup plus long pour les caméras 2D (typiquement quelques millisecondes [39]) que les capteurs ponctuels utilisés en TD-OCT (typiquement quelques microsecondes [40]), et favorise l'effet de flou de bougé et donc de brouillage des franges pour des échantillons vivants. On peut aussi prendre en compte le besoin de prendre 4 ou 5 images brutes de l'échantillon pour procéder à la démodulation qui résulte en une seule image de FF-OCM... La durée d'obtention d'une image de FF-OCM de qualité prend donc beaucoup plus de temps que la simple durée d'intégration de la caméra, pendant laquelle l'échantillon doit rester immobile.

La FF-OCM n'en reste pas moins une modalité d'imagerie non invasive très puissante mais qui ne répond pas tout à fait à notre cahier des charges pour l'imagerie de la peau. La parallélisation de l'éclairage a amené un gain de vitesse dans l'acquisition qui a cependant été contrebalancé par la baisse du rapport signal à bruit. Par conséquent, une plus grande limitation de la profondeur de champ est apparue. En outre, le besoin d'accumulation rend difficile l'imagerie *in vivo* et l'obtention de B-scans en temps réel. La prochaine étape pour atteindre nos objectifs initiaux est toujours de paralléliser l'acquisition par rapport à l'OCM pour gagner en vitesse, mais en conservant une partie du filtrage confocal pour éviter les inconvénients de la FF-OCM : l'OCT confocale linéaire.

# 2.3 La Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire

Nous en arrivons à l'émergence de l'OCT confocale linéaire (LC-OCT), qui est, en termes de parallélisation de l'éclairage et de filtrage confocal, entre l'OCM et la FF-OCM. En effet, l'idée est de gagner en vitesse d'acquisition grâce à la parallélisation de l'éclairage dans une dimension, tout en conservant le filtrage confocal dans une dimension. Cette technique a été proposée en 2018 [41].

Le schéma typique d'un montage LC-OCT est illustré dans la Figure 2.12. La source est un laser super-continuum fibré dont le faisceau est collimaté pour entrer dans le système optique. Il passe à travers une lentille cylindrique pour entrer dans les bras de l'interféromètre de Linnik. Au lieu d'être focalisé en un point dans le plan focal des objectifs, il converge en une ligne de lumière grâce à l'action de la lentille cylindrique. Après réflexion dans l'échantillon et sur la surface de référence, la lumière des deux bras se recombine au niveau du cube séparateur et est focalisée sur la caméra linéaire, c'est-à-dire avec un capteur en forme de ligne.

Il s'agit, comme en FF-OCM, d'un interféromètre de Linnik, avec un objectif similaire dans chacun des bras. D'autres interféromètres peuvent être utilisés, mais celui de Linnik est le plus présent du fait de sa facilité d'application. Afin de se placer dans un cas général, des milieux d'immersion ont été représentés en bleu devant chacun des objectifs puisqu'ils constituent un degré de liberté qui se révèlera très utile par la suite. De même, on a représenté chacun des objectifs sur deux platines piézoélectriques indépendantes, celui du bras objet pour scanner le plan de focalisation, et celui du bras de référence pour contrôler la position du plan de cohérence dans l'échantillon. Cependant, on verra dans la sous-section 2.3.4 qu'il est possible de simplifier la mécanique pour le balayage axial. Comme en FF-OCM, la lumière ne peut être fibrée dans l'interféromètre et doit donc se propager en espace libre puisqu'elle n'est plus simplement collimatée, contrairement à l'OCM.



FIGURE 2.12 – Montage de LC-OCT en configuration Linnik. CS : cube séparateur ; OM : objectif de microscope ; PZT : platine de translation piézoélectrique. Les traits rouges pleins représentent la trajectoire de la lumière dans le plan du schéma et ceux en pointillé dans un plan orthogonal. La lumière incidente provient d'un laser super-continuum fibré et est collimatée en entrant dans le système optique. Elle entre dans chacun des bras de l'interféromètre de Linnik après être passée par une lentille cylindrique, de sorte qu'elle se concentre en une ligne dans les plans focaux des objectifs au lieu de se concentrer en un point. La lumière réfléchie dans les deux bras se recombine dans le cube séparateur puis est détectée sur le capteur linéaire de la caméra.

Le fonctionnement détaillé, les avantages et les limitations de la LC-OCT en général seront présentés dans les prochaines sous-sections.

# 2.3.1 Eléments optiques de la microscopie conventionnelle

Malgré l'utilisation de la technique d'OCT pour obtenir des images d'« échographie optique », la colonne vertébrale de la LC-OCT reste son système de microscopie conventionnelle constitué de l'objectif, la lentille de tube et de la caméra, qu'il convient de dimensionner correctement en fonction de l'échantillon observé pour avoir une chance d'avoir de belles images. Si l'on pouvait visualiser la « qualité image » sur un segment de droite, la qualité du microscope conventionnel en constituerait la borne haute et la qualité des images de LC-OCT serait un curseur qui s'y déplacerait au gré de l'optimisation des autres éléments plus spécifiques à la LC-OCT.

Le premier élément du microscope est l'objectif utilisé, qu'il fasse partie intégrante de l'interféromètre ou non. Il détermine effectivement la résolution latérale qu'il est possible d'obtenir et influence le champ visualisable de l'échantillon. Pour notre application, nous cherchons à imager la peau dont les structures cellulaires ont une taille de l'ordre de 5 µm. Il convient alors de choisir des objectifs capables de résoudre des objets plus petits que cela. En pratique, des objectifs avec une ouverture numérique de 0,3 ou 0,5 sont satisfaisants pour une utilisation à 700 nm. En outre, l'imagerie OCT requiert la superposition constante du plan focal de l'objectif et du plan de cohérence durant le scan de l'échantillon, qui dépend du différentiel d'indices optiques entre les différents milieux devant l'objectif (notions détaillées dans la sous-section 2.3.4). L'utilisation d'objectifs de microscope à immersion devient alors un confort non négligeable, non pas pour une augmentation d'ouverture numérique, mais pour une adaptation indicielle. Les échantillons à observer étant des régions de peau dont l'indice optique peut être évalué aux alentours de 1,43 pour l'épiderme et 1,38 pour le derme à 700 nm [42], nous avons jugé l'utilisation d'huile d'immersion d'indice 1,4 adéquate. Malheureusement, l'huile est utilisée en microscopie comme milieu d'immersion surtout pour atteindre des ouvertures numériques supérieures à 1 et est donc associée à des objectifs de très grand grandissement, ce qui améliorerait la résolution latérale mais jouerait fortement en notre défaveur en termes de champ et d'aberrations. C'est pourquoi nous nous sommes plutôt intéressés à des objectifs à immersion dans l'eau de grandissements plus faibles, à utiliser avec de l'huile pour immersion, afin de permettre une observation de l'échantillon en profondeur avec l'OCT, au détriment de la qualité d'image. En effet, détourner un objectif de son mode de fonctionnement optimal entraîne des aberrations sphériques qui dégradent l'image mais qui pourraient être potentiellement corrigées (cf. sous-section 3.2.3).

Aujourd'hui, les objectifs de microscope travaillent généralement en conjugaison infini – foyer et ont donc besoin d'une lentille de tube pour focaliser l'image formée dans le plan focal d'un oculaire, ou, dans notre cas, directement sur le capteur de la caméra. Les caractéristiques des objectifs sont données en supposant qu'on utilise les lentilles de tube de la même marque, qui ont chacune une focale spécifique qui peut varier de 180 mm à 200 selon le fabricant, mais c'est bien la combinaison {objectif + lentille de tube} et non l'objectif seul qui spécifie le grandissement du système d'imagerie : le grandissement global est en effet le rapport de la focale de la lentille de tube sur celle de l'objectif (cf. Figure 2.13). Il peut donc être trompeur de se fier uniquement aux inscriptions sur l'objectif pour en connaître le grandissement réel sans faire attention à la focale de la lentille de tube. En somme, tandis que l'objectif fixe la résolution latérale qu'on peut obtenir au mieux (limitation physique au niveau des fréquences spatiales transmises vers le capteur), le choix de la lentille de tube fixe la taille de l'image agrandie de l'échantillon, qui doit être en adéquation avec le pas de pixels de la caméra pour respecter le critère de Shannon-Nyquist et réussir à enregistrer sur l'ordinateur toutes les fréquences spatiales transmises par l'objectif. Ce sont finalement les éléments optiques formant le microscope conventionnel du système – objectif, lentille de tube et caméra – qu'il faut dimensionner correctement pour obtenir la meilleure image possible. Tous les autres éléments sont propres à l'éclairage en ligne et à la formation de franges d'interférences dans les bons plans.



FIGURE 2.13 – Schéma pour illustrer le calcul de grandissement d'un objectif de microscope associé à une lentille de tube. Le grandissement est le rapport des focales des deux optiques, généralement la grande focale sur la petite pour un grandissement supérieur à 1 en valeur absolue.

#### 2.3.2 Eclairage et détection en ligne

L'idée principale de la LC-OCT est de paralléliser l'éclairage dans une dimension latérale pour illuminer l'échantillon le long d'une ligne plutôt qu'en un point. De cette manière, lors d'un balayage axial des plans de focalisation et de cohérence, une série de A-scans adjacents sont acquis en parallèle, formant directement des B-scans comparables à des images histologiques utilisées en dermatologie, au lieu d'avoir à les extraire d'un volume 3D comme en FF-OCM. Pour rappel, en OCM, une méthode de balayage axiale pour acquérir les A-scans un par un avec une focalisation dynamique de l'objectif était possible mais jugée inefficace à cause d'une contrainte de vitesse de scan axial de l'ordre du m/s pour de l'imagerie *in vivo*. L'éclairage de la LC-OCT allège considérablement cette condition à une vitesse axiale de l'ordre du mm/s, tout à fait atteignable en gardant un contrôle fin sur la position du plan focal, et permet donc l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique, et donc une résolution latérale suffisante pour la microscopie. Et finalement, la détection du signal par une caméra linéaire limite grandement la quantité de lumière parasite grâce au filtrage confocal unidimensionnel.

#### Source

Notre objectif étant de faire de l'imagerie de la peau *in vivo* à une résolution cellulaire, un certain nombre de contraintes est à prendre en considération pour le choix de la source utilisée en LC-OCT. Il y a besoin, comme on a vu pour l'OCT en général, d'un spectre large, mais aussi de puissance lumineuse et de cohérence spatiale.

Un laser supercontinuum permet de former un continuum, c'est-à-dire un faisceau lumineux de spectre très large qui a été généré à partir d'un laser impulsionnel utilisé comme pompe et envoyé dans des milieux non linéaires. Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1970 [43], [44]. La génération d'un continuum repose sur une variété d'effets non linéaires, comme l'auto-modulation de phase (SPM pour « self-phase modulation »), la diffusion Raman, ou la dynamique des solitons. Cependant, la méthode la plus répandue pour une telle génération est l'injection de la pompe laser pulsée dans une fibre micro-structurée hautement non linéaire appelée fibre à cristal photonique (PCF pour « photonic crystal fiber »). Paradoxalement, aucune substance cristalline n'est utilisée pour la fabrication des PCF, qui sont communément faites de silice fondue pure et de trous d'air [45]. Les lasers supercontinuum utilisent typiquement une pompe laser à 1064 nm avec une durée d'impulsion de quelques picosecondes injectée dans une PCF, pour obtenir en sortie un faisceau laser dont le spectre s'étend dans la gamme 400-2400 nm avec une puissance de quelques Watts et un profil énergétique distribué spatialement comme une gaussienne.

Le spectre du continuum est donc adapté à l'OCT, et même trop large par rapport au spectre de détection de la caméra, pour améliorer au mieux la résolution axiale (cf. équation (2.11)). De plus, la grande puissance délivrée par ces lasers aide à collecter un signal suffisant de la part de l'échantillon dans un laps de temps très court, de sorte à être moins sensible aux mouvements de l'échantillon et donc faciliter l'acquisition in vivo. Enfin, ces systèmes utilisant des fibres monomodes, la source est ponctuelle et possède donc une forte cohérence spatiale, ce qui permet de rendre la ligne de l'éclairage la plus fine possible pour une meilleure résolution latérale (cf. Figure 2.14). En effet, éclairer un objectif avec une source spatialement incohérente, donc spatialement large, revient à éclairer l'objectif avec différents angles d'incidence qui résulteront chacun en la formation d'une tache de diffraction dans le plan de focalisation légèrement décalés les uns par rapport aux autres. La somme de ces taches aura donc un diamètre plus grand qu'une tache individuelle, ce qui aura tendance à détériorer la résolution latérale. En d'autres termes, dans la Figure 2.14, comme on conjugue la source avec le plan focal de l'objectif, il vaut mieux que la source soit la plus petite possible... Ceci explique l'utilisation de sources avec des fibres monomodes, et donc cohérentes, dans les systèmes d'imagerie à balayage vus jusqu'à maintenant. Les sources spatialement incohérentes sont surtout utiles pour éclairer tout le champ, comme en FF-OCM.

#### Eclairage linéaire

L'intérêt de la LC-OCT est l'éclairage en ligne au sein de l'échantillon, assuré par la lentille cylindrique. Cette dernière joue donc un rôle central et relativement simple. En effet, en imaginant le système optique sans lentille cylindrique, la lumière se concentrerait simplement en un point dans le plan focal des objectifs ; et la présence de la lentille cylindrique permet de défocaliser ce point dans une direction latérale, le transformant en une ligne dont la largeur est de la même taille que le diamètre du point initial. La lentille n'a donc pas besoin de posséder des performances hors du commun car elle sert à défocaliser la lumière plutôt que de la focaliser, comme on en a l'habitude. Cependant, il reste à déterminer sa focale ainsi que sa position dans le système d'éclairage.

En théorie, il semble naturel de s'inspirer de la microscopie conventionnelle et donc de l'éclairage de Köhler en épiscopie (imagerie par réflexion, Figure Annexe A.2, sous-section A.1) qui permet un éclairage de l'échantillon le plus uniforme possible sur tout le champ. Nous n'avons pas besoin d'installer des diaphragmes de champ ou d'ouverture, mais l'idée à en tirer est de superposer le plan focal image de la lentille cylindrique avec la pupille de sortie de l'objectif. De cette manière, l'image de



FIGURE 2.14 – Avantage en termes de résolution de l'éclairage spatialement cohérent par rapport à l'éclairage incohérent. Une source cohérente ponctuelle éclaire l'objectif seulement avec des rayons avec un seul angle d'incidence qui se concentrent en une seule tache de diffraction dans le plan focal. Une source spatialement incohérente, donc large et constituée de plusieurs point sources temporellement incohérents entre eux, éclaire l'objectif selon plusieurs angles, chacun associé à une tache de diffraction. La somme de ces taches aura un diamètre plus grand, ce qui détériore la résolution latérale.

la source par la lentille – une ligne ! – est dans le plan focal image de l'objectif, de sorte qu'elle est renvoyée à l'infini dans l'espace objet, où se trouve l'échantillon. Cette configuration a l'avantage de donner une géométrie simple à appréhender à l'éclairage dans l'espace objet ainsi que de minimiser les risques de bloquer des rayons avec la pupille de l'objectif, et peut être considérée comme une référence à partir de laquelle affiner les réglages ; le plus important étant d'éclairer l'échantillon sur un champ suffisamment grand pour couvrir la totalité du capteur de la caméra. Former l'image de la source en amont de la pupille aura pour effet de restreindre le champ éclairé et d'y concentrer la lumière de la source, tandis que former son image en aval agrandira le champ éclairé en distribuant la puissance lumineuse sur une plus grande surface de l'échantillon.

Un autre facteur à considérer est l'uniformité de la puissance lumineuse le long de la ligne de lumière. Le faisceau lumineux introduit dans le système optique provient d'un laser dont la distribution de puissance transversale n'est pas uniforme une fois projeté sur un écran : la distribution est généralement gaussienne, avec un maximum de puissance au centre de la tache de l'écran, et une diminution de puissance au fur et à mesure qu'on se déplace vers le bord. Cette non-uniformité peut se répercuter jusqu'au niveau de la ligne de lumière de la LC-OCT, ce qui peut gêner l'observation des échantillons à cause d'un signal plus faible sur les extrémités de la ligne. Les paramètres qui influencent l'uniformité de l'éclairage sont l'ouverture numérique image effective de la lentille cylindrique et sa position (cf. Figure 2.15). L'ON de la lentille, régie par le diamètre du faisceau en entrée et par la focale de la lentille, détermine les angles des rayons lumineux transmis et donc leur « dispersion angulaire ». Plus celle-ci est grande, plus les rayons de faible puissance seront inclinés et propices à être bloqués par la pupille, et seuls les rayons de grande puissance – donc proches de l'axe optique en aval de la lentille – seront transmis par l'objectif. En d'autres termes, de cette manière, on n'utilise que les rayons qui constituent le centre de la gaussienne et on les étale le long de la ligne d'éclairage, de sorte à ne choisir que des



FIGURE 2.15 – Effet de la lentille cylindrique sur l'uniformité de l'éclairage en ligne de l'échantillon. Deux cas sont présentés : on y fait varier la focale et la position de la lentille de sorte que son plan focal reste dans la même position et que seul l'effet de l'ouverture numérique soit visible. Quand l'ON augmente, les rayons lumineux sont plus dispersés et la distribution énergétique de la ligne de lumière est plus étalée sur l'échantillon. Vue par la caméra, la variation en énergie le long de la ligne est moins visible car le champ de la caméra limite en général le champ du système optique global. Le plan focal de la lentille cylindrique a été placé hors de la pupille de l'objectif pour illustrer le vignettage plus prononcé dans ce type de situation.

rayons à peu près à la même puissance pour éclairer l'échantillon. On supprime donc délibérément les rayons les plus inclinés pour avoir un éclairage uniforme mais en perdant en puissance lumineuse totale transmise. De même, éloigner le plan focal image de la lentille cylindrique de la pupille de l'objectif augmentera la quantité de rayons bloqués.

Il faut tout de même garder à l'esprit que la lentille cylindrique affecte l'uniformité de la ligne de lumière si jamais le faisceau laser incident possède une distribution de puissance transversale gaussienne. Il reste possible de modeler le profil de puissance du laser avant la lentille cylindrique pour atténuer la non-uniformité. Une première méthode est d'agrandir la taille transversale du faisceau à l'aide de télescopes ou de lunettes afocales, de sorte à n'utiliser que le centre du faisceau en l'ayant étalé spatialement : le profil du laser est déjà quasiment uniforme avant la lentille cylindrique. Une autre méthode consisterait à utiliser une densité optique avec un profil gaussien, c'est-à-dire plus absorbante au milieu que sur les bords, pour rendre le profil du laser plat. Malheureusement, elle a été proscrite d'emblée dans les systèmes LC-OCT à cause de la perte phénoménale de puissance due à l'absorption. On préfère effectivement une non-uniformité à une pure perte de puissance.

En pratique, le choix de la lentille cylindrique et de sa position sont déterminés par la longueur des bras de l'interféromètre, en particulier du bras objet. Dans la Figure 2.12, la lentille cylindrique est placée avant le cube séparateur pour une question de symétrie des deux bras et aussi pour laisser passer la lumière vers le capteur. Or, nous avons vu avec la Figure 2.15 que le plan focal de la lentille devait se rapprocher de la pupille de l'objectif pour éclairer l'échantillon sur un champ suffisant, et que plus la focale de la lentille était courte, plus la ligne d'éclairage était uniforme. Pour favoriser l'uniformité de et la taille du champ éclairé, il faut donc placer la lentille cylindrique le plus proche possible du cube séparateur et choisir judicieusement sa focale pour superposer son plan focal et la pupille de l'objectif. Il reste quand même possible d'éloigner la lentille et prendre une focale plus longue pour laisser passer plus de puissance lumineuse sur l'échantillon au prix de l'uniformité. Ce choix se basera sur la puissance délivrable par la source. En outre, il existe une tolérance par rapport à la superposition entre le plan focal de la lentille et l'objectif : les éloigner restreindra le champ total éclairé de l'échantillon, mais cela n'est pas gênant tant que le champ de la caméra reçoit de la lumière.

La quantité de lumière éclairant l'échantillon est un sujet critique pour des systèmes qui ne disposent pas d'une grande puissance, comme dans les sondes portatives. Certaines pistes ont donc été avancées pour utiliser la totalité de la lumière mais sans être développées au cours de la thèse. La première est l'utilisation de lentilles de Powell, qui génèrent un ensemble de rayons lumineux en forme d'éventail dont la puissance lumineuse est distribuée de manière homogène, avec en entrée un faisceau laser à profil gaussien. On peut donc former une ligne lumineuse homogène qu'il faudrait conjuguer avec la pupille de l'objectif pour atteindre un résultat similaire qu'avec une lentille cylindrique, et une meilleure homogénéité. La seconde est l'utilisation de masques de phase « top-hat » permettant de modeler la distribution de puissance d'un laser de profil gaussien pour la rendre plate grâce à des éléments optiques diffractifs. En utilisant cette méthode, le rôle de la lentille cylindrique se résumerait à simplement éclairer le champ, sans prendre en compte l'uniformité du faisceau. Cependant, ces deux technologies sont conçues pour être utilisées à des longueurs d'onde données, il y a donc besoin de vérifier leur comportement avec une source à spectre large. Enfin, pour le seul confort visuel, il est aussi possible de rehausser informatiquement la valeur des pixels au bord des images acquises. La quantité de signal effective reste tout de même inférieure par rapport au milieu de l'image et cette correction peut faire ressortir des défauts dus aux bruits sur les régions concernées.

#### Caméra

La caméra est un élément central dans le système d'imagerie. En effet, ses propriétés propres impactent la résolution des images acquises, la taille de l'image, la vitesse d'acquisition, la qualité du signal, le spectre du signal détecté... En LC-OCT, où les images sont acquises ligne par ligne, le choix de la caméra influence aussi la qualité du filtrage confocal.

La taille du capteur est un facteur déterminant pour la résolution finale de l'image, le champ imagé sur l'échantillon et la qualité du filtrage confocal. En effet, les pixels le long du capteur de la caméra ont besoin d'être assez resserrés pour échantillonner correctement le signal, sans quoi l'image sera pixelisée et la caméra deviendra le facteur limitant la résolution latérale globale du système d'imagerie. Pour éviter cela, un critère viable à respecter est l'égalité de la largeur de deux pixels ou plus et de celle de la réponse impulsionnelle du système, ou PSF (« point spread function »), afin de respecter le critère de Shannon-Nyquist sur l'échantillonnage de signaux. Ensuite, la largeur totale du capteur, ce dernier étant conjugué avec le plan de focalisation de l'objectif du bras objet via la lentille de tube et l'objectif luimême, détermine le champ imagé par le système. Il est facile de faire varier ce paramètre en remplaçant la lentille de tube par une autre de focale différente. Enfin, la longueur des pixels influe sur la quantité de signal collecté et réciproquement sur la finesse de la ligne de lumière détectée : en effet, resserrer la fente confocale permettrait d'améliorer la résolution latérale en réduisant la largeur de la ligne de lumière enregistrée par le capteur, mais en même temps d'amoindrir la quantité de lumière transmise et donc compromettre le rapport signal à bruit. Il faut donc choisir cette longueur de pixels judicieusement pour atteindre un bon compromis entre ces deux propriétés. En pratique, prendre une longueur de pixel de la taille du diamètre de la PSF donne de bonnes performances en termes de résolution et de sectionnement [46]. La Figure 2.16 illustre un avantage du filtrage confocal, même s'il n'est effectif que dans une seule direction : elle représente les signaux lumineux dans le plan du capteur du système de LC-OCT, ainsi qu'une représentation d'un capteur linéaire à disposition. Ce dernier possède la taille adéquate pour capter le signal utile et pour rejeter facilement les signaux parasites ne provenant pas de l'objet, comme la réflexion sur le cube séparateur, contrairement à l'éclairage plein champ.

La rapidité de la caméra est un des facteurs limitant la vitesse d'acquisition d'un système LC-OCT. En effet, pour créer un B-scan, on a besoin de balayer la ligne de lumière en profondeur de l'échantillon



FIGURE 2.16 – Avantage de l'effet confocal linéaire par rapport à la détection plein champ. L'image représente les signaux dans le plan de la caméra en LC-OCT, prise à l'aide d'une caméra 2D avec  $1024 \times 1024$  pixels de taille  $10.6 \ \mu m \times 10.6 \ \mu m$ . La ligne rouge représente la taille d'un capteur de caméra linéaire à disposition, avec des pixels de taille  $10 \ \mu m \times 20 \ \mu m$  (largeur × longueur), qui est donc une ligne dont l'épaisseur est égale à 2 pixels dans l'image. Le signal utile est la ligne associée à la couleur orange, qui est la réflexion sur la surface de référence, bien focalisée. Le capteur linéaire possède la bonne taille pour collecter le flux du signal utile en rejetant les réflexions parasites directes dues au cube séparateur ou autres optiques dans le système optique global. En FF-OCM, les signaux parasites auraient contribué au signal total, ce qui aurait inutilement augmenté la quantité de lumière incohérente.

et d'en acquérir des images lignes équidistantes les unes des autres. Donc plus la caméra est rapide, plus on peut augmenter la vitesse de balayage pour avoir une vitesse d'acquisition globale plus grande. Ceci apporte un avantage certain pour l'imagerie *in vivo* où l'échantillon est sujet à des mouvements non contrôlés, afin de le « figer » dans le temps et éviter un flou de bougé, donc un brouillage des franges d'interférences. Il est donc plus judicieux d'utiliser une caméra linéaire doté d'un capteur CMOS (« complementary metal oxide semicondutor ») plutôt que CCD (« charge coupled device ») du fait de la parallélisation de l'acquisition plus marquée et avantageuse avec le CMOS.

La réponse spectrale de la caméra doit être en adéquation avec le spectre de la source pour détecter le signal avec une intensité suffisante. Comme nous cherchons à faire des images à l'intérieur de la peau, on choisit de travailler aux alentours de la jonction entre le visible et le proche infrarouge afin de minimiser l'absorption des tissus (cf. Figure 1.4). Les capteurs en silicium sont donc de bons candidats pour notre application, leur spectre de détection s'étalant sur tout le spectre visible jusqu'au proche infrarouge vers 1000 nm. Une bonne efficacité quantique est donc à privilégier dans ces gammes de longueurs d'onde, afin de collecter un maximum de flux lumineux, et donc gagner en sensibilité pour pouvoir imager les échantillons plus en profondeur. Un autre facteur permettant d'améliorer la sensibilité est la capacité de charge du capteur, qui est la quantité d'électrons que chaque pixel peut emmagasiner avant de numériser la valeur du pixel et l'envoyer vers l'ordinateur. En effet, collecter un grand nombre de photons, et a fortiori d'électrons, permet de réduire le bruit de photons, ainsi que d'utiliser toute la dynamique de la caméra pour mieux distinguer de petites variations d'intensité (notions détaillées dans la sous-section 2.4.4). Il est donc préférable de choisir un capteur avec une grande capacité de charge.

#### 2.3.3 Signal interférométrique et démodulation

Pour obtenir un B-scan, le système de LC-OCT balaye la ligne de lumière à l'intérieur de l'échantillon et la caméra linéaire collecte le flux réfléchi au fur et à mesure du scan. Une image « brute » est formée en concaténant ces images lignes les unes en dessous des autres. Cependant, ce signal brut est dit « modulé » car chaque surface réfléchissante apparaît comme un ensemble de franges avec une enveloppe large d'environ  $\bar{\lambda}^2/\Delta\lambda$  avec  $\bar{\lambda}$  le barycentre du spectre détecté et  $\Delta\lambda$  sa largeur à mi-hauteur (cf. sous-section 2.1.3 sur la théorie de base de la TD-OCT). On peut voir le signal brut acquis comme le B-scan de l'échantillon convolué à l'interférogramme illustré par la Figure 2.3. Pour rendre l'image interprétable, il faut procéder à l'extraction de l'enveloppe de l'interférogramme. On utilise pour cela des algorithmes d'imagerie à décalage de phase, qui consistent à prendre un certain nombre de lignes adjacentes de l'image brute et de leur faire subir des opérations mathématiques simples comme des soustractions et des élévations au carré afin de supprimer les composantes constantes et ne garder que l'amplitude de la partie oscillante (cf. Figure 2.17). Pour les besoins des algorithmes, on fait en sorte qu'une ligne de l'image brute soit décalée d'un déphasage  $\pi$  ou  $\pi/2$  par rapport à la précédente. Un exemple d'un tel algorithme est l'algorithme de Wyant qui utilise quatre images lignes, chacune décalée de  $\pi/2$  [47]. Nous allons illustrer les algorithmes par le calcul. Dans les prochaines lignes de calcul, chaque terme représente ce qui est détecté par le capteur linéaire et est donc un vecteur ligne dont on a omis la dépendance en x pour plus de clarté. Chaque opérateur d'addition ou de produit représente donc une opération termes à termes, c'est-à-dire que le terme numéro m d'un vecteur n'interagit qu'avec les termes numéro m des autres vecteurs. Reprenons le signal de l'équation (2.14) en remplaçant l'enveloppe de cohérence  $V_s$  par une fonction porte de même largeur que  $V_s$  et en rendant  $R_{coh}$  constant pour simplifier les calculs :

$$I(z,\varphi) = I_f + A(z)\Pi_{\rm coh}(z)\cos(\varphi)$$
(2.17)

Avec le signal « de fond », partie constante du signal

$$I_f = (I_t/4)(R_{inc} + R_r)$$
(2.18)

Et l'amplitude simplifiée des oscillations



FIGURE 2.17 – Illustration de l'étape de démodulation en négligeant la profondeur de champ de l'objectif. (a) Simulation d'une image brute d'un signal interférométrique engendré par une surface réfléchissante dans le bras objet de l'interféromètre. (b) Signal échantillonné tous les  $\pi/2$ , plus proche de ce qu'un système LC-OCT collecte en réalité. (c) Signal démodulé avec l'algorithme de Larkin. Le fond constant de l'image a été supprimé et seule l'enveloppe de l'interférogramme a été conservée. A noter que la valeur des pixels de la 3<sup>e</sup> image est montée au carré par rapport aux premières images.

$$A(z) = (I_t/2)\sqrt{R_{coh}(z)R_r}$$
(2.19)

 $\Pi_{coh}$  étant la fonction porte autour de la position de la surface réfléchissante et de même largeur que l'enveloppe de cohérence. Les variables z et  $\varphi$  sont proportionnelles l'une par rapport à l'autre mais on fait apparaître une séparation à cause de la différence d'échelle relative : quand  $\varphi$  varie de  $4 \times \pi/2$  ou  $5 \times \pi/2$  pour les besoins des algorithmes, cela correspond à une variation maximale de z valant 313 nm à la longueur d'onde centrale de 700 nm dans un échantillon d'indice 1,4, plus petite que la résolution axiale recherchée. Par conséquent, dans ces calculs, on considère que z est constant à chaque cycle d'un algorithme. En numérotant la ligne considérée dans l'image brute avec un entier positif p, et en supposant que nous sommes à une position z telle que  $\Pi_{coh}$  est non nulle pour quatre lignes adjacentes et déphasées de  $\pi/2$  par rapport à la précédente de l'image brute, on peut écrire leur expression :

$$I_{p+q} = I_f + A(z)\cos(\varphi_p + q\pi/2)$$
(2.20)

Avec  $q \in [0,3]$ . On effectue ensuite le calcul suivant pour démoduler le signal :

$$I_{Wyant}^{2}(p) = \left(I_{p} - I_{p+2}\right)^{2} + \left(I_{p+1} - I_{p+3}\right)^{2} = A(z)^{2} \propto R_{coh}(z)$$
(2.21)

On obtient l'amplitude du signal en ayant supprimé le fond de l'image. Plus précisément, on a extrait l'amplitude au carré grâce à cette méthode, et le signal calculé est directement proportionnel à la réflectivité  $R_o$  de la surface réfléchissante. Cette opération est faite de manière glissante en incrémentant les valeurs entières de p jusqu'à avoir parcouru toute l'image brute pour construire l'image dite démodulée : on l'appelle l'étape de « démodulation ».

La méthode de démodulation à quatre images permet d'illustrer le principe de manière assez directe par le calcul. Il existe en réalité une multitude de méthodes pour atteindre le même but, avec des performances différentes. En pratique, l'algorithme utilisé dans le cadre de cette thèse est l'algorithme de Larkin [48], qui utilise cette fois 5 images lignes au lieu de 4, chacune déphasée de  $\pi/2$  par rapport à la précédente. Considérons 5 lignes adjacentes de l'image brute de sorte que la fonction porte soit non nulle. On a :

$$I_{p+q} = I_f + A(z)\cos(\varphi_p + q\pi/2)$$
(2.22)

Et  $q \in [0,4]$ . L'algorithme de Larkin effectue le calcul suivant :

$$I_{Larkin}^2(p) = a_p^2 - b_p \times c_p$$
(2.23)

Avec

$$a_{p} = I_{p+3} - I_{p+1}$$

$$b_{p} = I_{p} - I_{p+2}$$

$$c_{p} = I_{p+2} - I_{p+4}$$
(2.24)

Ce sont ces calculs qui seront appliqués pour démoduler les images de LC-OCT. Nous pouvons cependant aller plus loin en prenant en compte le temps d'exposition de la caméra. En effet, en regardant les expressions ci-dessus, il semble tout à fait possible de prendre les images pas à pas, c'est-à-dire en fixant la phase, puis en prenant l'image, puis en modifiant la phase et en recommençant. Seulement, pour des questions de vitesse d'acquisition, on aura tendance à privilégier un mouvement continu de la platine piézoélectrique et donc une variation continue de la phase au cours du temps. L'acquisition de chaque ligne image ne se fait donc pas à phase constante. Idéalement, la variation de phase se fait linéairement, de sorte que le signal s'écrive :

$$I(z,t) = I_f + A(z)\cos(\varphi_0 + 2\pi t/T)$$
(2.25)

Avec

$$A(z) = (I_t/2)\sqrt{R_{coh}(z)R_r}$$
(2.26)

Où *t* est la variable temporelle et *T* la période temporelle des oscillations. Les lignes images acquises sont théoriquement déphasées de  $\pi/2$  les unes à la suite des autres, la caméra peut donc intégrer le signal au maximum pendant une durée T/4 sous peine de brouiller les franges. En supposant qu'on utilise cette durée d'intégration :

$$I_{p+q}(z) = \int_{(p+q)T/4}^{(p+q+1)T/4} I(z,t) dt$$

$$= \frac{I_t T}{16} \Big[ R_{inc} + R_{ref} + \frac{4}{\pi} \sqrt{R_{coh}(z)R_r} \Big( \cos\left(\varphi_p + \frac{q\pi}{2}\right) - \sin\left(\varphi_p + \frac{q\pi}{2}\right) \Big) \Big]$$
(2.27)

On obtient finalement :

$$I_{Larkin}^{2}(z) = \left(\frac{I_{t}T}{\sqrt{2}\pi}\right)^{2} R_{r}R_{coh}(z) \propto R_{coh}(z)$$
(2.28)

Le résultat en sortie de l'algorithme de Larkin est bien proportionnel à  $R_{coh}$ , ce à quoi on s'attendait. Ce calcul permet néanmoins de connaître le coefficient de proportionnalité, notamment en fonction de la période temporelle du signal.

La complexité de calcul de l'algorithme de Larkin reste similaire à celui de Wyant mais assure une robustesse en cas de variation du déphasage. En effet, la Figure 2.18 présente une comparaison des résultats des algorithmes de Larkin et de Wyant pour différents pas d'échantillonnage de l'interférogramme de la Figure 2.3. On peut notamment y voir qu'en prenant en compte l'enveloppe de cohérence du signal, l'algorithme de Wyant réduit les modulations mais ne parvient pas à les effacer complètement, même avec un pas d'échantillonnage optimisé de  $\pi/2$ . En outre, faire varier ce pas accentue la présence d'oscillations et baisse l'amplitude du signal calculé. Quant à l'algorithme de Larkin, les modulations sont systématiquement effacées pour différents pas d'échantillonnage, bien que l'amplitude du signal baisse en s'éloignant du pas de  $\pi/2$ . Cette robustesse par rapport à l'échantillonnage des lignes dans l'image brute gagne de l'importance quand on utilise l'OCT dans le domaine temporel : en effet, les systèmes d'imagerie font toujours la course à la vitesse d'acquisition, et donc à la rapidité de balayage, et, en LC-OCT en particulier, au balayage du plan de focalisation. Un



FIGURE 2.18 – Comparaison entre l'algorithme de Larkin et l'algorithme de Wyant pour différents pas d'échantillonnage. (a) Résultats de l'algorithme de Larkin. (b) Résultats de l'algorithme de Wyant. L'algorithme de Larkin supprime plus efficacement les oscillations du signal modulé, même quand le pas d'échantillonnage n'est pas à la valeur optimale de  $\pi/2$ . Cette robustesse par rapport au pas d'échantillonnage est particulièrement utile lors de scans axiaux rapides en LC-OCT.

objectif de microscope ayant une certaine inertie, la linéarité de la trajectoire est très certainement compromise par un balayage à haute vitesse, même avec du matériel piézoélectrique de haute qualité. En utilisant l'algorithme de Larkin, il reste donc possible de procéder à la démodulation même s'il y a une variation de pas d'échantillonnage, au prix d'une perte de contraste dans l'image démodulée. Nous détaillerons cependant dans la sous-section 3.3.3 une méthode utilisée pour corriger l'effet de cette non-linéarité.

Nous associons l'amplitude du signal en sortie de l'algorithme à un « contraste » puisque la composante constante de l'image brute est supprimée et que seule l'enveloppe du signal modulé est extraite en étant plus ou moins visible selon son amplitude dans l'image démodulée. La Figure 2.19 présente la courbe dudit contraste en fonction du pas d'échantillonnage. On voit que le contraste est bien optimisé pour un pas de  $\pi/2$  et qu'il chute de manière symétrique quand on s'éloigne de cette valeur. En particulier, le contraste devient nul pour un pas de  $\pi$  mais remonte ensuite pour atteindre un second maximum local à  $3\pi/2$  avec une chute de contraste de 13% par rapport à l'optimum atteint en  $\pi/2$ . D'autres maximas locaux apparaissent à chaque incrémentation de  $\pi$ , avec une chute de contraste de plus en plus importante. Cela signifie qu'il est possible d'utiliser l'algorithme de Larkin en n'enregistrant qu'une ligne sur trois, au prix d'une légère baisse de contraste, pour avoir potentiellement un gain de vitesse d'acquisition par un facteur trois, en supposant que le balayage axial et la caméra ne soient pas limitants. A la place du gain de vitesse, on pourrait espérer un gain de flux par un facteur trois en allongeant le temps d'exposition de la caméra, mais les figures d'interférences défilent en même temps que le balayage axial, et accumuler le signal lumineux sur plusieurs oscillations de l'interférogramme ne ferait que brouiller les franges.

Les signaux démodulés par l'algorithme de Larkin avec un pas d'échantillonnage large de la Figure 2.18 montrent un écrêtage sur la partie haute des enveloppes : plus le pas est grand, plus la pointe des signaux de sortie est coupée, et plus la partie constante est large. Plus précisément, la largeur vaut le double du pas d'échantillonnage, qui est donc la meilleure résolution qu'on puisse espérer obtenir en sortie de l'algorithme. On retrouve le critère de Shannon-Nyquist dans le sens où pour mesurer correctement un détail d'une certaine taille, il faut l'échantillonner avec un pas au moins deux fois plus petit que ce détail. Les abscisses du graphe correspondent à la phase du signal modulé, qu'il est possible de convertir en termes de différence de marche, puis en termes de position du plan de cohérence : en revenant sur la phase dans l'équation (2.9) des interférences à deux ondes en lumière polychromatique,



FIGURE 2.19 – Courbe de contraste en fonction du pas d'échantillonnage pour l'algorithme de Larkin. L'optimum est atteint pour un pas de  $\pi/2$ , puis baisse de manière symétrique pour devenir nul à  $\pi$ . Il remonte néanmoins pour atteindre un autre maximum local de 0,87 à  $3\pi/2$ .

on en déduit qu'un déphasage de  $\pi/2$  correspond à variation d'altitude du plan de cohérence de  $\lambda/8$ avec  $\overline{\lambda}$  la longueur d'onde centrale du signal détecté dans l'échantillon, soit  $\overline{\lambda_0}/8n$  avec n l'indice optique de l'échantillon, de l'ordre de 1,4 pour la peau. En supposant avoir une longueur d'onde centrale dans le vide à 700 nm, un déphasage du signal modulé de  $\pi/2$  correspondrait à une variation de position du plan de cohérence égale à 63 nm et donc à une meilleure résolution possible en sortie de l'algorithme de 125 nm ; un déphasage de  $3\pi/2$  à 375 nm. Sachant que l'on cherche à atteindre une résolution isotrope de l'ordre du micromètre pour distinguer les détails cellulaires, acquérir une image ligne tous les  $\pi/2$  est un suréchantillonnage certain et on peut clairement se contenter d'échantillonner par exemple tous les  $3\pi/2$  sans que la résolution axiale ne dépasse le micromètre. Dans les faits, durant ce doctorat, nous nous sommes contentés de rester proche d'un échantillonnage de  $\pi/2$  en optimisant d'autres paramètres pour gagner en vitesse et en flux collecté. Ce point reste néanmoins intéressant à développer pour le potentiel gain de vitesse susmentionné, en plus d'une optimisation en termes de mémoire et de ressources de calcul de l'ordinateur.

La Figure 2.18 et la Figure 2.19 montrent des valeurs particulières à un pas d'échantillonnage  $4\pi/7$  qui correspond à celui qui est utilisé dans le montage de la thèse. Cela vient du fait que le montage travaillait initialement à la longueur d'onde centrale de 800 nm, en proche infrarouge, pour réussir à mieux pénétrer dans la peau. Le pas d'échantillonnage des images lignes a donc été réglé à cette longueur d'onde centrale. Un décalage est survenu en travaillant avec une puissance supérieure de la part de la source pour passer à 700 nm. D'où le pas d'échantillonnage de  $800/700 \times \pi/2 = 4\pi/7$ . Mais la robustesse de l'algorithme de Larkin nous a permis de conserver ces réglages sans pertes significatives, comme le montrent les deux figures.

#### 2.3.4 La superposition des plans de cohérence et de focalisation

Depuis le début de la section sur la LC-OCT, la profondeur de champ n'a pas été mentionnée car sa prise en compte n'aidait pas à la compréhension. Elle gagne pourtant toute son importance en prenant du recul par rapport au système de détection d'un côté et l'origine de l'information utile de l'autre. En effet, l'intérêt de la LC-OCT étant d'obtenir des images de haute résolution, des objectifs de microscope avec une certaine ouverture numérique sont utilisés et ont donc une profondeur de champ limitée. Comme on fait de la microscopie par réflexion, l'éclairage passe par l'objectif de microscope et se concentre donc dans le plan focal de l'objectif. De même, ce plan étant conjugué au capteur de la caméra, on ne collecte efficacement que la lumière qui provient de ce plan. Or, ce sont les signaux modulés autour du plan de cohérence qui comportent les informations d'intérêt (cf. équation (2.9)), à savoir la position de la surface réfléchissante et son taux de réflexion, via son enveloppe de cohérence associée. Il est donc capital de chercher à superposer le plan focal de l'objectif et le plan de cohérence pour créer

les franges d'interférences à l'endroit où on les voit le mieux. Autrement, cela reviendrait à ne pas faire la mise au point sur ce qu'on veut observer, et la perte du signal peut être considérable (notion quantifiée dans la sous-section 2.4.1). Heureusement, leurs positions respectives peuvent être réglées indépendamment l'une de l'autre avec l'interféromètre de Linnik : la position du plan de cohérence est déterminée par la différence de trajet optique entre le bras objet et le bras de référence. Il suffit donc d'allonger ou de raccourcir le bras de référence pour translater le plan de cohérence, comme en TD-OCT. Quant à la position du plan de focalisation, elle est déterminée par la position de l'objectif de microscope fixé à une platine piézoélectrique. Il est donc relativement aisé de superposer ces deux plans à un instant donné. Cependant, notre but est de maintenir cette superposition pendant tout le scan axial et de garder une mise au point optimale, même en profondeur de l'échantillon : on veut procéder à une mise au point dynamique. Cependant, puisque la position des plans est contrôlée par des phénomènes différents et que l'épaisseur des milieux devant l'objectif varie, les plans auront tendance à s'éloigner l'un de l'autre au cours du scan, si l'on n'agit pas sur le bras de référence de manière active. On pourrait d'ores et déjà avoir l'intuition qu'il suffit de supprimer la variation d'indice optique durant le scan pour régler le problème. Pour formaliser ces notions, on va supposer que l'objectif de microscope est éclairé en amont par des rayons lumineux parallèles à l'axe optique sans lentille cylindrique, et qu'initialement, les plans de focalisation et de cohérence sont tous deux superposés à la surface de l'échantillon. On s'intéressera de plus près à ce qu'il se passe quand l'objectif est translaté, mais sans modifier le trajet optique en amont de l'objectif.

Inspectons d'abord le plan focal. La Figure 2.20 illustre en rouge la variation de position du plan focal en nous basant sur les rayons lumineux marginaux en sortie de l'objectif, qui sont les plus à même d'être déviés par le phénomène de réfraction à la surface de l'échantillon. Un milieu d'immersion avec un indice  $n_{im}$  représente le degré de liberté que nous possédons par rapport aux indices optiques. Lorsque l'objectif se baisse d'une distance d vers l'échantillon, en supposant que  $n_{im} < n$ , les rayons marginaux deviennent moins inclinés en se réfractant à l'interface immersion-échantillon et le plan de focalisation se retrouve plus en profondeur que dans la situation nominale où l'échantillon serait absent. La déviation suit la loi de réfraction de Snell-Descartes :

$$n_{im}\sin i_1 = n\sin i_2 \tag{2.29}$$

De plus, les conditions géométriques imposent l'égalité suivante :

$$a_0 = a_1 + a_2 \tag{2.30}$$

En se plaçant dans l'hypothèse des petits angles, de sorte que sin  $i \approx \tan i \approx i$ , et en exprimant les distances en fonction des angles, on a un système à deux équations et deux inconnues (la position du plan de focalisation et l'angle du rayon réfracté) dont la résolution donne la nouvelle position  $z_{foc}$  du plan de focalisation en fonction de d:

$$z_{foc} = \frac{n}{n_{im}}d$$
(2.31)

La position du plan de focalisation est donc proportionnelle à la distance parcourue par l'objectif depuis sa position initiale, avec un coefficient de proportionnalité  $n/n_{im}$ . En réalité, il s'agit de la position où seuls les rayons marginaux se croisent, tandis que les rayons plus proches de l'axe optique seraient beaucoup plus proches de la position nominale du plan de focalisation. En supposant que tout le système optique était parfait initialement, cette perte de stigmatisme est due à de l'aberration sphérique engendrée par le déplacement d'un dioptre plan avec des indices différents de part et d'autre, relativement à l'objectif. Mais le calcul effectué est une approximation au premier ordre qui est largement suffisante pour ce que l'on veut montrer.

Intéressons-nous maintenant au cas du plan de cohérence, illustré dans la Figure 2.20 en vert. Nous ne prendrons pas en compte le phénomène de réfraction, mais l'effet du trajet optique parcouru par la



FIGURE 2.20 – Illustration du phénomène de séparation des plans de cohérence et de focalisation lors du balayage axial de l'objectif du bras objet. (a) Situation initiale où la mise au point est faite sur le dessus de l'échantillon, avec les plans superposés l'un sur l'autre. (b) Position des plans lorsque l'objectif de microscope se rapproche de l'échantillon d'une distance d. Les variables utilisées pour les calculs y sont représentées. Plus l'objectif se rapproche de l'échantillon, plus les plans s'écartent l'un de l'autre, ce qui revient à perdre la mise au point du microscope.

lumière dans le bras objet. On considère un faisceau collimaté constitué de plusieurs rayons lumineux parallèles à l'axe optique qui convergent en un point dans le plan focal de l'objectif. On s'intéresse plus particulièrement au rayon principal qui passe par l'axe de symétrie de l'objectif et qui reste donc parallèle à l'axe optique tout le long de son trajet. Considérons ce rayon en sortie de l'objectif dans la situation initiale. Il parcourt la distance  $d_0$  dans le milieu d'immersion avant d'atteindre le plan de cohérence. Le trajet optique initial qui doit se conserver est donc :

$$L_0 = n_{im} d_0 \tag{2.32}$$

On baisse ensuite l'objectif d'une distance d pour que le plan de cohérence se forme à l'intérieur de l'échantillon. Le rayon parcourt une distance moindre dans le milieu d'immersion, mais parcourt maintenant une distance  $z_{coh}$  dans l'échantillon. Le nouveau trajet optique s'écrit :

$$L = n_{im}(d_0 - d) + nz_{coh}$$
(2.33)

Le trajet optique doit se conserver, et l'égalité entre les deux trajets optiques précédents permet d'isoler la position du plan de cohérence :

$$z_{coh} = \frac{n_{im}}{n}d \tag{2.34}$$

La variation de la position du plan de cohérence est aussi proportionnelle à la distance d parcourue par l'objectif de microscope, mais cette fois avec un coefficient de proportionnalité  $n_{im}/n$ . On parle de « plan de cohérence », mais cela reste une approximation, car en réalité, la surface de cohérence prend dans ce cas la forme d'une portion de sphère. En effet, dans le calcul précédent, nous n'avons considéré que le rayon principal passant par le milieu de l'optique, mais il faut prendre en compte tous les rayons lumineux du cône de lumière sous l'objectif. Le principe du retour inverse de la lumière nous autorise à considérer de manière équivalente le trajet optique le long d'un rayon dans un sens ou dans le sens opposé. De plus, sur le rayon principal, un certain trajet optique sépare la surface de cohérence et le point de focalisation. Pour trouver la position de la surface de cohérence sur les autres rayons, il suffit donc de reporter ce trajet optique à partir du point de focalisation, le long de chaque rayon. Autrement dit, la surface de cohérence est le front d'onde sphérique centré sur le point de focalisation et passant par la portion du rayon principal où la différence de marche est nulle. Mais, en pratique, ce sera toujours le « sommet » de cette surface de cohérence qui sera utilisée pour l'imagerie, par lequel on trace un plan orthogonal à l'axe optique et qu'on désigne comme le « plan de cohérence » pour une modélisation simplifiée et suffisante.

Les équations (2.31) et (2.34) montrent que la position des plans de cohérence et de focalisation sont proportionnels au déplacement de l'objectif, mais avec des coefficients de proportionnalité inverses l'un de l'autre. Par conséquent, avec nos hypothèses initiales, plus l'objectif se rapproche de l'échantillon, plus les plans de focalisation et de cohérence s'enfonceront dans l'échantillon mais se sépareront l'un de l'autre d'autant plus rapidement que la différence d'indice entre l'échantillon et le milieu d'immersion est grande. Cet effet devient d'autant plus visible que l'ouverture numérique de l'objectif est grande, puisque la profondeur de champ centrée autour du plus focal devient plus restreinte et le signal modulé centré autour du plan de cohérence ne peut plus être détecté en dehors de la profondeur de champ.

Une solution simple pour remédier à la séparation des plans est l'utilisation du milieu d'immersion adéquat, de sorte que son indice optique soit égal à celui de l'échantillon. Cela reste néanmoins imparfait du fait de la variation d'indice qu'on ne peut pas prévoir précisément dans les échantillons de peau, ainsi que de la variation en fonction des régions sondées et finalement des variations en fonction des individus. Le mieux que nous puissions faire est de nous appuyer sur des données, pas toujours exhaustives, de la peau : on rappelle qu'une étude a mesuré un indice optique autour de 1,43 pour l'épiderme et 1,38 pour le derme à 700 nm [42], et qu'on a donc décidé d'utiliser de l'huile de silicone d'indice 1,4 pour notre système. C'est un des éléments qui a déterminé le choix des objectifs de microscope à utiliser, c'est-à-dire des objectifs à immersion. Seulement, les objectifs pour la biologie utilisent l'huile d'immersion comme un moyen d'augmenter l'ouverture numérique et ont donc un fort grandissement, associé à un champ et une frontale faibles. De notre côté, l'huile sert seulement pour une adaptation des indices optiques, et un grandissement modéré pour une résolution latérale de l'ordre du micromètre est suffisant pour notre application. Le gain en champ imagé et en distance de frontale n'en est que plus confortable. D'où le choix d'objectifs à immersion dans l'eau, qui correspondent aux caractéristiques recherchées, sont largement accessibles dans le commerce, et permettent de limiter les aberrations introduites par l'utilisation d'huile par rapport à un objectif qui n'utilise pas de milieu d'immersion.

Une deuxième solution pour remédier à la séparation des plans pendant le scan est de repositionner le plan de cohérence de manière dynamique en jouant sur le bras de référence. En effet, comme le plan de cohérence remonte trop pendant le scan, il suffit de le rabaisser vers le plan focal en allongeant le bras de référence. Cette méthode nécessite néanmoins l'utilisation d'une platine piézoélectrique dans le bras objet, d'une autre dans le bras de référence, et d'une très bonne synchronisation entre les deux. Dans l'hypothèse où l'on puisse parfaitement contrôler la trajectoire de la platine dans le bras de référence, cette configuration permettrait de garder les plans superposés dans tous les échantillons, quelles que soient les variations d'indice. Mais à haute vitesse, cette hypothèse semble difficilement réalisable à cause de la non-linéarité de la trajectoire de chacune des platines au cours du temps. En outre, cette configuration ne reste réalisable qu'avec l'interféromètre de Linnik où le bras de référence est facilement manipulable, interdisant l'utilisation d'autres interféromètres qui peuvent être plus avantageux.

# 2.3.5 Le balayage axial avec différents interféromètres

Créer des B-scans ou des images 3D de l'échantillon à l'aide d'une ligne de lumière comme éclairage nécessite le balayage de cette ligne au moins dans la profondeur de l'échantillon. Plus précisément, c'est le plan de cohérence qui doit être balayé pour effectivement sonder l'échantillon, mais le plan de focalisation de l'objectif doit être superposé dessus afin de faire apparaître le signal (éclairage) et le collecter (transmission vers le capteur). La solution proposée et utilisée dans cette thèse pour faciliter la superposition de ces plans sans avoir à régler activement la référence est l'utilisation d'une huile d'immersion de même indice que la peau (cf. sous-section 2.3.4). A partir d'ici, le balayage axial des

plans est assuré par le mouvement de l'objectif du bras objet en supposant que la différence de marche dans l'air reste constante, ce qui va être explicité dans cette sous-section.

Nous cherchons à faire de l'imagerie *in vivo* en temps réel, avec au moins un taux de rafraîchissement de l'image de l'ordre de quelques Hertz. De plus, l'objectif principal pour l'imagerie de la peau est de pouvoir montrer la jonction épiderme-derme, qui est située à une profondeur de l'ordre de 150-200 µm selon les régions du corps étudiées. Pour des B-scans, il s'agit donc de translater au minimum l'objectif du bras objet pour qu'il parcourt au moins cette fourchette de profondeurs de manière périodique, répétable et à une fréquence d'au moins quelques Hertz. Une platine de translation piézoélectrique permet de remplir tous ces critères.

Nous avons vu dans la sous-section 2.3.3 que le processus de démodulation nécessite un déphasage à peu près constant entre chaque ligne acquise, sous peine de perdre en contraste dans les images démodulées. C'est donc la combinaison du scan axial et du matériel d'acquisition qui influe sur la qualité des images brutes et qu'il faut donc optimiser ensemble. Dans le cadre de cette thèse, nous avons utilisé une carte FPGA pour collecter les données de la caméra et pour les traiter. La manière la plus simple d'acquérir des images lignes avec cette carte est d'envoyer périodiquement des signaux TTL – un signal électrique pour signifier une réponse binaire « vraie » – vers la caméra pour qu'elle collecte les photons du capteur, les traite, puis les renvoie à la carte. L'acquisition par la carte est donc linéaire dans le temps. Or, la variation de phase du signal est proportionnelle à la variation de position du plan de cohérence lors du scan. Il faut donc que le scan axial soit aussi linéaire dans le temps pour que le contraste de l'image finale soit maximal. C'est pourquoi nous avons choisi une trajectoire triangulaire pour la platine de translation. Nous avons pensé à rendre le signal symétrique pour prendre des images pendant la montée et la descente de la platine, mais ces deux sous-trajectoires ne sont pas tout à fait symétriques en pratique à cause de l'effet de la gravité, notamment à la montée de l'objectif. Deux B-scans acquis à la suite ne pourraient donc pas se superposer proprement, même après retournement de l'une d'entre elle. A la place, nous avons décidé d'utiliser une trajectoire triangulaire avec un rapport cyclique de 80% en général, c'est-à-dire qui atteint son maximum après 80% de sa période temporelle (cf. Figure 2.21), mais avec une période plus courte que ce qu'on aurait eu avec la trajectoire symétrique. Mais, comme on peut s'y attendre, la réponse de la platine piézoélectrique suit moins bien la commande au fur et à mesure que la vitesse d'oscillation augmente, qu'il vaut donc mieux limiter pour améliorer la qualité d'image. Cependant, nous verrons dans la sous-section 3.3.3 qu'il est possible de s'affranchir de cette limite en rendant l'acquisition des images lignes non linéaire par rapport au temps et gagner en vitesse d'acquisition.



FIGURE 2.21 – Exemple de commande en dents de scie envoyée au PZT, sur trois périodes temporelles. La commande a une fréquence de 17 Hz, et un rapport cyclique de 80%, c'est-à-dire que son maximum est atteint à 80% de la période temporelle. L'augmentation de *z* entraîne l'abaissement de l'objectif vers l'échantillon sur tous les schémas de montages optiques.

Un des facteurs qui limite la vitesse d'oscillation de la platine est son inertie, directement liée au poids de ce qu'elle doit porter, qui dépend de l'interféromètre utilisé. En effet, l'ensemble {cube séparateur + objectifs} de la Figure 2.12 représente un interféromètre de Linnik, mais d'autres configurations permettraient de remplir un rôle similaire, à savoir la production de franges d'interférences en imageant l'intérieur de l'échantillon avec une résolution suffisante. Nous allons lister quelques interféromètres qu'on peut utiliser en LC-OCT, et les possibilités de balayage qu'elles offrent.

#### Interféromètre de Linnik

Le premier interféromètre auquel on s'intéresse est l'interféromètre de Linnik, représenté dans la Figure 2.12, qui est celui utilisé par défaut en LC-OCT. Il est composé d'un cube séparateur qui fait la jonction entre le bras objet et le bras de référence avec un objectif de microscope placé dans chacun d'entre eux. Sa popularité vient de sa facilité de manipulation, car cet interféromètre est relativement éclaté dans le sens où tout est ouvert et déplaçable indépendamment des éléments autour. A titre d'exemple, il est très simple de couper le bras de référence en glissant un morceau de papier entre le cube et l'objectif du bras de référence pour simplement observer l'échantillon avec un microscope conventionnel dont l'objectif est celui du bras objet. Si besoin, des éléments optiques peuvent aussi être introduits indépendamment dans chacun des bras. Enfin, l'un des avantages les plus importants de cet interféromètre est la possibilité de contrôler à volonté la longueur du bras de référence et par conséquent la position du plan de cohérence. Il est donc possible de motoriser indépendamment les deux bras de l'interféromètre à l'aide de platines de translation piézoélectriques (cf. Figure 2.12). Nous avons d'ailleurs mentionné dans la sous-section 2.3.4 que cette configuration était une solution envisageable pour maintenir la superposition des plans de cohérence et de focalisation pendant le scan axial de l'échantillon sans forcément utiliser un milieu d'immersion. Avec deux platines piézoélectriques, il s'agit de la configuration avec le plus de degrés de liberté et de contrôles possibles, au prix de plus grands moyens matériels et d'une complexité accrue. Cependant, l'astuce de l'huile d'immersion apporte des simplifications possibles au système de balayage : maintenant que les plans de cohérence et de focalisation restent superposés, il suffit de balayer seulement l'objectif du bras objet, en prenant garde à conserver la différence de marche dans l'air, qui était une hypothèse de départ lors du calcul de la focalisation dynamique.

La Figure 2.22 permet de clarifier les grandeurs utiles pour décrire le trajet optique de la lumière dans les deux bras d'un interféromètre de Linnik et de voir comment ne pas altérer le trajet de la lumière dans l'air pendant le scan. Pour calculer la différence de marche entre les deux bras, il faut considérer le trajet optique de la lumière à partir de la séparation du faisceau laser à la diagonale du cube séparateur. L'interféromètre est, par construction, symétrique dans une certaine mesure : le trajet optique est le même dans les deux bras depuis la séparation du faisceau jusqu'à la face du cube. De même, les objectifs sont supposés similaires et le trajet optique engendré par leur traversée par la lumière est considéré égal dans chaque bras. Ces grandeurs n'interviennent donc pas dans l'expression de la différence de marche. Ce dernier prendra en compte le trajet optique dans l'air entre le cube et les objectifs et celui prenant en compte ce qui se trouve devant les objectifs jusqu'à leur plan focal, notés respectivement  $L_{o,r}^{air}$  et  $L_{o,r}$ , avec les indices o ou r pour le bras objet ou de référence. Lorsqu'un milieu d'immersion est choisi,  $L_r$ est fixé en faisant la mise au point sur la surface réfléchissante de référence, tandis qu'allonger ou raccourcir le bras de référence permet de faire varier  $L_r^{air}$ , afin de déplacer facilement le plan de cohérence. Déplacer l'objectif objet seul fait varier à la fois  $L_o^{air}$  et  $L_o$ , ce qui peut être compensé par la variation de  $L_r^{air}$  avec deux platines piézoélectriques. Mais, dans le cadre de la simplification du système de balayage, l'étude de la focalisation dynamique ne prenait en compte que la variation de  $L_0$  en fixant les trois autres trajets optiques, en particulier en supprimant la variation de  $L_r^{air}$  et la platine piézoélectrique associée. Une solution pour ne faire varier que Lo pendant le balayage, ou autrement dit pour rendre  $L_0^{air}$  constant, est d'accrocher à la fois l'objectif objet, l'objectif de référence, et le cube séparateur - tout l'interféromètre - sur la même platine piézoélectrique [20], [49]-[53]. Par conséquent, l'échantillon est scanné et seul le faisceau laser en entrée du cube se décale au cours du temps, ce qui ne



FIGURE 2.22 – Mise en évidence des trajets optiques en jeu et méthodes de balayage axial dans l'interféromètre de Linnik pour conserver la différence de marche dans l'air. Les platines piézoélectriques sont représentées en pointillé. (a) Balayage axial en déplaçant l'interféromètre entier. Le faisceau laser éclaire les deux objectifs de la même manière pendant tout le scan. (b) Balayage axial en déplaçant le cube séparateur et l'objectif objet. (c) Balayage axial en déplaçant seulement l'objectif objet et un miroir de renvoi. Le faisceau laser se décale par rapport à l'objectif objet pendant le scan, ce qui crée une asymétrie dans l'interféromètre.

change pas la différence de marche grâce à la symétrie propre à l'interféromètre, mais peut faire varier la quantité de lumière atteignant l'échantillon et la surface de référence. Cette configuration permet de n'utiliser qu'une seule platine mais augmente le poids qu'elle doit porter, ce qui limite la vitesse d'oscillation maximale tout en gardant une linéarité de scan acceptable. Une deuxième solution est de faire osciller le cube séparateur en même temps que l'objectif. Dans ce cas, le trajet optique dans l'air des deux bras est altéré symétriquement, ce qui ne change pas la différence de marche. Une troisième solution consiste à utiliser au moins un miroir de renvoi dans le bras objet et de balayer l'objectif et le miroir en même temps grâce à la même platine (cf. Figure 2.22). Pendant l'oscillation de la platine, le chemin optique dans l'air n'est pas altéré. Et, contrairement à la configuration précédente, celle-ci permet de limiter le poids porté par la platine et d'atteindre de plus hautes vitesses de balayage. Le faisceau laser en entrée de l'objectif objet se décalera légèrement au cours du scan, ce qui crée une asymétrie en termes d'éclairement entre les deux bras. En général, garder le plan de cohérence superposé au plan de focalisation durant le scan axial nécessite, en utilisant un milieu d'immersion adéquat, la translation d'au moins un élément en plus de l'objectif objet, que ce soit l'objectif de référence ou un miroir de renvoi, voire l'interféromètre entier. Il n'est d'ailleurs pas exclu de mouvoir les deux objectifs en même temps avec la même platine.

# Interféromètre de Michelson

Contrairement à l'appellation, on ne retourne pas au montage de TD-OCT. On utilise maintenant un objectif de microscope devant lequel on incorpore un interféromètre de Michelson, où les rayons lumineux convergent (cf. Figure 2.23). Il s'agit donc de placer un cube séparateur dans le trajet du cône de lumière en aval de l'objectif pour le renvoyer dans une direction orthogonale à l'axe optique, où est placé un miroir de référence. On retrouve ainsi la séparation entre un bras de référence et un bras objet en n'utilisant qu'un seul objectif et qu'une seule platine piézoélectrique, ce qui demande moins de moyens que pour l'interféromètre de Linnik. De plus, si un système de balayage latéral est utilisé en amont, la symétrie entre les deux bras de l'interféromètre est assurée, contrairement à l'interféromètre de Linnik qui demanderait un système de balayage à chaque bras bien synchronisés entre eux. Introduire un cube séparateur sous l'objectif demande néanmoins de l'espace, donc un objectif avec une longue frontale, donc le plus souvent une faible ouverture numérique et une résolution latérale moindre. On peut aussi noter que faire traverser un épais morceau de verre par des rayons convergents favorise



FIGURE 2.23 – Autres interféromètres utilisables en LC-OCT. (a) Interféromètre de Michelson. Le bras de référence se situe sous l'objectif et est créé à l'aide d'un cube séparateur et d'un miroir. Il est orthogonal à l'axe optique. (b) Interféromètre de Mirau. Le bras de référence se situe aussi sous l'objectif et est replié sur l'axe optique lui-même.

l'apparition d'aberrations dans l'image, bien que l'effet soit atténué par la faible ouverture numérique. Enfin, la manipulation du bras de référence devient plus difficile que pour l'interféromètre de Linnik car elle a lieu dans un espace beaucoup plus confiné qui doit être plongé dans de l'huile d'immersion. Il s'agit en fait de la configuration utilisée pour le premier montage de FF-OCM [54].

#### Interféromètre de Mirau

L'interféromètre de Mirau utilise aussi un seul objectif de microscope, qu'il suffit de balayer dans la direction axiale pour acquérir des images. Le principe est proche de celui de l'interféromètre de Michelson, à la différence que le bras de référence n'est plus orthogonal à l'axe optique, mais parallèle (cf. Figure 2.23). Le miroir de référence et la séparatrice sont donc orthogonaux à l'axe optique. Un rayon lumineux du bras de référence se réfléchit sur la séparatrice, puis sur le miroir de référence, et encore une fois sur la séparatrice ; en même temps, un rayon dans le bras objet est transmis par la séparatrice, réfléchi par l'échantillon, puis retransmis par la séparatrice. La séparatrice et la référence sont moins encombrantes que dans l'interféromètre de Michelson puisqu'elles sont orthogonales à l'axe optique, ce qui relâche la contrainte sur la distance de travail. En outre, la symétrie des deux bras est aussi conservée en cas de balayage. Le désavantage substantiel de cet interféromètre est l'obturation centrale causée par le miroir de référence placé au milieu du faisceau incident, qui limite la quantité de lumière qui arrive et repart de l'échantillon, tout en provoquant une figure de diffraction qui peut détériorer la résolution des images. De plus, comme pour l'interféromètre de Michelson, la manipulation du bras de référence reste difficile, ce qui rend d'autant plus important l'utilisation de l'huile d'immersion pour permettre la focalisation dynamique en fixant le trajet optique dans le bras de référence. L'étude de cet interféromètre est le sujet principal de cette thèse, qui sera décrit dans le Chapitre 3.

# 2.3.6 Dispersion

On appelle dispersion la variation de l'indice optique d'un milieu en fonction de la longueur d'onde. La source étant spectralement large pour une utilisation en OCT, le système est sujet aux perturbations liées à la dispersion, et en particulier à l'élargissement de l'interférogramme créé par le signal d'une couche réfléchissante.

En effet, quand le plan de focalisation de l'objectif objet est dans le milieu d'immersion, les deux bras de l'interféromètre sont symétriques en tout point, et la largeur de l'interférogramme est la plus fine

possible. En revanche, pendant le scan axial, l'intérieur de l'échantillon est imagé et le trajet optique est modifié : une partie du trajet au sein de l'immersion a maintenant lieu dans l'échantillon qui a une dispersion a priori différente du milieu d'immersion. Une asymétrie sur la dispersion entre les deux bras de l'interféromètre apparaît donc. Or, la sous-section 2.3.4 sur la superposition des plans de cohérence et de focalisation a montré que le plan de cohérence se déplaçait proportionnellement au rapprochement de l'objectif vers l'échantillon, avec un coefficient de proportionnalité égal à un rapport entre les indices du milieu d'immersion et de l'échantillon. Seulement, cette étude supposait la dispersion négligeable, de sorte que le décalage du plan de cohérence – plan de différence de marche nulle – était le même pour toutes les longueurs d'onde. En prenant en compte la dispersion, ce décalage est en fait différent entre les différentes longueurs d'onde et devient plus important au fur et à mesure qu'on scanne en profondeur. C'est pourquoi l'interférogramme, qui est la somme des figures d'interférence engendrées par chaque longueur d'onde, se verra élargie. De même, puisque l'énergie lumineuse contenue dans l'interférogramme se conserve, le maximum de l'enveloppe de l'interférogramme aura diminué.

Ces notions peuvent être formalisées mathématiquement, en supposant que la source a toujours un spectre gaussien centré à la pulsation  $\omega_0$ , en fonction de la largeur initiale  $\Delta z_0$  de l'enveloppe de l'interférogramme, des indices optiques en  $\omega_0$  du milieu d'immersion et de l'échantillon  $n_{im}$  et n, de la dispersion de vitesse de groupe GVD (« Group Velocity Dispersion » en anglais) et de la profondeur z du plan de l'échantillon scanné [55] :

$$\Delta z = \Delta z_0 \sqrt{1 + 4\left(\frac{c_0}{n\Delta z_0}\right)^4 \left(\text{GVD} - \frac{n_{im}}{n} \text{GVD}_{im}\right)^2 z^2}$$
(2.35)

Avec GVD qui s'exprime en fonction de la vitesse de groupe de l'onde  $v_g(\omega) = \partial \omega / \partial k$  ou en fonction de la norme du vecteur d'onde k :

$$\text{GVD} = \frac{\partial}{\partial \omega} \left( \frac{1}{v_g(\omega)} \right)_{\omega = \omega_0} = \left( \frac{\partial^2 k}{\partial \omega^2} \right)_{\omega = \omega_0}$$
(2.36)

GVD est un terme souvent utilisé pour évaluer l'élargissement d'un pulse lumineux passant à travers un milieu dispersif exprimé en  $fs^2/mm$ .

La largeur de l'interférogramme est optimale et vaut  $\Delta z_0$  lorsque z = 0, c'est-à-dire à la surface de l'échantillon, puis augmente quasiment linéairement avec z. En outre, plus la largeur initiale de l'interférogramme est faible, et donc plus la résolution axiale est bonne, plus l'effet de l'élargissement de l'interférogramme en fonction de la profondeur est accentué. Avoir un spectre large est donc à double tranchant, puisque d'un côté, cela contribue à réduire  $\Delta z_0$  et donc à la bonne résolution à la surface de l'échantillon, mais de l'autre, cela contribue aussi à la détérioration de la résolution axiale durant tout le scan de l'échantillon, on pourrait alors chercher à réduire la largeur du spectre de la source afin de limiter les effets de la dispersion s'ils deviennent trop prononcés, ce qui va à l'encontre de ce qui est habituellement fait en OCT. De plus, comme on pouvait s'y attendre, l'élargissement est fonction de la différence des GVD du milieu d'immersion et de l'échantillon, avec une influence du rapport des indices optiques de ces milieux. Il devrait donc être théoriquement possible d'annuler complètement l'effet de la dispersion qui a le même indice optique moyen et le même GVD que ceux de l'échantillon, ce qui paraît difficilement réalisable à cause de la variabilité des propriétés de la peau.

La quantification de la baisse du maximum de l'enveloppe de la figure d'interférence peut être déduite de l'équation (2.35). En effet, en ayant supposé le spectre de la source gaussienne, l'enveloppe de cohérence de l'interférogramme est aussi de forme gaussienne. En ne considérant que l'effet d'élargissement de la part de la dispersion, et le fait que l'énergie lumineuse se conserve dans

l'interférogramme, on en déduit que l'amplitude du signal détecté par la caméra diminue avec le même coefficient que celui de l'élargissement de l'interférogramme :

$$I(z) = \frac{I(0)}{\sqrt{1 + 4\left(\frac{c_0}{n\Delta z_0}\right)^4 \left(GVD - \frac{n_{im}}{n}GVD_{im}\right)^2 z^2}}$$
(2.37)

Tracer la courbe de l'équation (2.35) permet d'illustrer le phénomène de dispersion dans nos images. Il suffit d'avoir une estimation des paramètres de dispersion de la part de milieux d'immersion et de la peau. Ces paramètres sont par exemple connus pour l'eau, qui peut être utilisé comme milieu d'immersion : à  $\bar{\lambda} = 700 nm$ , on a  $n_{eau} = 1,33$  et  $\text{GVD}_{eau} = 35 f s^2 mm^{-1}$  [56]. L'air est aussi un autre milieu d'immersion dont les caractéristiques dispersives sont négligeables :  $n_{air} = 1$  et GVD<sub>air</sub>  $\approx$ 0. Un autre milieu bien connu en optique qu'on peut utiliser comme référence est le BK7 : toujours à la même longueur d'onde,  $n_{BK7} = 1,51$  et GVD<sub>BK7</sub> = 55  $fs^2mm^{-1}$  [57]. Le corps humain étant composé en grande partie d'eau, on va supposer que ses propriétés dispersives sont comprises entre celles de l'eau et du BK7 : on va prendre  $n_{peau} = 1,4$  [42] et  $GVD_{peau} = 45 fs^2mm^{-1}$ . On peut alors tracer la courbe de la largeur de l'interférogramme (~ résolution) en fonction de la profondeur de la peau scannée, qui peut aller jusqu'à 500 µm, par exemple (cf. Figure 2.24). On y voit notamment que la dégradation de la résolution est fortement atténuée en utilisant un milieu d'immersion dont les propriétés dispersives sont proches de celles de la peau. Il en va de même de la diminution du maximum de l'enveloppe de cohérence et donc de la puissance du signal détecté. Ce sont des raisons additionnelles pour choisir d'utiliser des objectifs de microscope à immersion. Les courbes montrent que la résolution se dégrade au pire d'un facteur deux, ce qui entraînerait une perte de quantité de lumière d'un facteur deux également. Cependant, en utilisant un milieu d'immersion adapté, les effets de la dispersion deviennent négligeables.

# 2.4 Critères de performance

Les critères de performance sont les caractéristiques mesurables ou calculables des systèmes d'imagerie dont on a fait mention et qui permettent de les comparer entre eux. On y regroupe principalement la résolution dans les trois directions de l'espace pour la capacité à distinguer de petits éléments, la vitesse d'acquisition qui permet de faire de l'imagerie en temps réel et *in vivo*, et la



FIGURE 2.24 – Variation de la résolution axiale du système en fonction de la profondeur en tenant compte des effets dispersifs. Les courbes bleus représentent le cas où le milieu d'immersion est de l'eau et les courbe en rouge pointillées de l'air. Les courbes, de bas en haut, ont été tracées avec une largeur spectrale de 125, 100 et 75 nm à une longueur d'onde moyenne de 700 nm.

sensibilité qui donne une indication de la qualité de l'image. Des aspects théoriques permettent d'avoir une idée de ces performances via le calcul, mais les mesures en pratique restent supérieures dans le sens où elles donnent la valeur de la caractéristique recherchée en prenant en compte tous les phénomènes physiques et en particulier ceux qu'on ne sait pas modéliser théoriquement. Ces mesures réelles n'en restent pas moins imparfaites car différentes méthodes et conventions peuvent être utilisées pour la mesure d'une même grandeur, rendant la comparaison entre les différents systèmes moins pertinente. On se consacrera ici au développement théorique des performances dans un système de LC-OCT.

#### 2.4.1 Résolution axiale

L'un des points forts en OCT est la décorrélation entre la résolution axiale et la résolution latérale, la première étant régie par le spectre de la source et la seconde par la qualité des optiques. Généralement, en TD-OCT, on définit la résolution axiale comme la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme d'un signal provenant de la réflexion sur une surface plane. En effet, un tel interférogramme est ce qui se rapproche le plus de la réponse impulsionnelle axiale, ou PSF, en sortie d'un système d'OCT avant tout traitement d'image et dont la largeur donne une indication sur la capacité de distinguer deux couches réflectives proches l'une de l'autre. De plus, la forme globale de l'interférogramme est aussi un gage de la qualité d'imagerie dans la direction axiale : la présence de rebonds indique si jamais une couche voisine de celle qu'on veut imager va s'ajouter au signal mesuré et donc réduire le rapport signal à bruit en brouillant l'image. Il faut néanmoins noter que l'interférogramme mesuré a les dimensions d'une intensité lumineuse (ou d'un éclairement en termes photométriques) contrairement à une image démodulée qui, en sortie des algorithmes de démodulation, a les dimensions d'une intensité au carré. La définition reposant sur la largeur de l'interférogramme est donc à interpréter avec précaution puisqu'elle ne reflète pas ce qu'on pourrait voir effectivement dans une image finale d'OCT, bien qu'elle ait été unanimement adoptée par la communauté scientifique. En effet, une fois l'interférogramme monté au carré, les largeurs ont tendance à s'affiner, et les rebonds à s'atténuer par rapport au pic central de l'enveloppe. De plus, pour des questions de visualisation, les images OCT sont souvent affichées en échelle logarithmique pour compresser la répartition des hautes valeurs et étaler celle des plus faibles. Une telle définition permet finalement de comparer plus facilement différents systèmes qui pourraient utiliser des méthodes de démodulation et traitements d'image différents.

#### *Résolution axiale en négligeant l'ouverture numérique*

Le calcul de la résolution axiale en LC-OCT est similaire à celui en TD-OCT, pour lequel on a calculé la forme de l'interférogramme en prenant une simple surface réfléchissante en tant qu'objet dans la soussection 2.1.3. Cependant, les optiques utilisées en TD-OCT ont une faible ouverture numérique dont l'effet a donc été négligé dans les calculs. Ces derniers restent tout de même valables en respectant la même hypothèse. On va supposer cette fois qu'on image une couche réfléchissante à l'intérieur d'un milieu de même indice optique *n* que la peau. Il peut être incorporé soit dans la norme du vecteur d'onde *k*, soit dans la différence de marche  $\delta$ . On va arbitrairement l'associer à  $\delta = 2n(z - z_0)$ , avec *z* la position du plan de cohérence et on va utiliser les notations  $k_0$  et  $\lambda_0$  pour désigner la norme du vecteur d'onde et la longueur d'onde dans le vide. En reprenant les calculs faits pour la TD-OCT en supposant le spectre de la source gaussienne, l'interférogramme en LC-OCT est de la forme suivante :

$$I_{LCOCTg}(z) = (I_t/4)(R_{inc} + R_r) + (I_t/2)\sqrt{R_{coh}R_r} V_{coh}(z)\cos(\bar{k}_0 2n(z - z_o))$$
(2.38)

Avec l'enveloppe de cohérence :

$$V_{coh}(z) = \exp(-\Delta k_0^2 n^2 (z - z_0)^2 / 4 \ln 2)$$
(2.39)

Et sa largeur à mi-hauteur, aussi vue comme la résolution axiale du système en négligeant l'ouverture numérique :

$$\Delta z_{coh} \approx \frac{2 \ln 2}{\pi n} \frac{\bar{\lambda}_0^2}{\Delta \lambda}$$
(2.40)

Avec  $\overline{k_0}$  le barycentre du spectre gaussien de la source en norme de vecteur d'onde,  $\Delta k_0$  sa largeur à mi-hauteur,  $\overline{\lambda_0}$  et  $\Delta \lambda_0$  les équivalents en longueur d'onde, et  $z_o$  la position de la couche réfléchissante imagée. En prenant n = 1,4,  $\overline{\lambda_0} = 700 nm$  et  $\Delta \lambda = 100 nm$ , on obtient numériquement  $\Delta z_{coh} =$  $1,5 \ \mu m$ .

#### Résolution axiale en prenant en compte l'ouverture numérique

Avec l'ajout d'objectif de microscope d'ouverture numérique plus forte qu'en TD-OCT, il devient intéressant d'en voir l'effet dans les calculs. On peut s'attendre à la mise en évidence de la profondeur de champ de l'objectif de microscope et donc à la formalisation mathématique du besoin de superposer les plans de cohérence et de focalisation. A l'instar de l'enveloppe de cohérence qui est centrée autour de la position du plan de cohérence, on peut s'attendre à avoir une enveloppe liée à l'ouverture numérique centrée autour du plan de focalisation et d'une largeur égale à la profondeur de champ de l'objectif. Cela dit, pour simplifier les calculs dans une moindre mesure, on va éviter le décalage des plans en supposant l'égalité des indices de l'immersion et de l'échantillon, avec une couche réfléchissante à imager dans le bras objet à la position  $z_0$ . Les deux enveloppes seront donc toutes les deux centrées en  $z_0$  au lieu de la position respective des deux plans, qu'on pourra rajouter artificiellement au résultat final pour une meilleure interprétation.

Nous ne nous intéresserons qu'à la lumière collectée par l'objectif de microscope, sans prendre en compte l'éclairage de l'échantillon qui peut avoir n'importe quelle forme géométrique. Si l'on s'intéresse au signal rétrodiffusé par le point éclairé au centre de l'échantillon, on doit prendre en compte chacun des rayons lumineux provenant de ce point et qui est collecté par l'objectif, avec un certain angle  $\alpha$  par rapport à l'axe optique. La forme de ce signal pourra se généraliser sur tous les points de l'échantillon, grâce à la propriété de télécentricité objet, illustrée dans l'Annexe A.2, et commune à quasiment tous les objectifs de microscope modernes. Le calcul qui va suivre est donc valable dans tout le champ de l'objectif.

Le calcul se déroulera en plusieurs étapes : il faut dans un premier temps connaître la forme du signal pour un angle  $\alpha$  donné et voir ce qu'il influence, dans le cas monochromatique. Dans un deuxième temps, il faut pouvoir intégrer l'effet de tous les angles  $\alpha$ . Et enfin, une intégration sur toutes les longueurs d'onde finalisera cette étude et nous permettra de connaître une forme approchée du signal détecté en ayant pris en compte l'ouverture numérique.

Comme la géométrie de l'éclairage entre en jeu, on va utiliser des notions de radiométrie pour poser le problème. Les paramètres sont décrits dans la Figure 2.25. On va notamment chercher à calculer l'émittance, c'est-à-dire le flux émis par unité de surface en  $W.m^{-2}$  de la zone autour du point considéré. Une hypothèse raisonnable est de considérer la luminance L (flux par unité d'étendue géométrique, en  $W.m^{-2}.sr^{-1}$ ) du flux émis constante : chaque pinceau de lumière émis par le point et qui arrive à passer à travers l'objectif a la même luminance. On peut alors calculer le flux infinitésimal  $d^3F$  du pinceau émis incliné d'un angle  $\alpha$ :

$$d^{3}F = L d^{3}G$$
  
=  $L dS_{app} d^{2}\omega_{\acute{e}ch\rightarrow obj}$   
=  $L dS \cos \alpha \ d^{2}\omega_{\acute{e}ch\rightarrow obj}$   
=  $L dS \cos \alpha \sin \alpha \ d\alpha \ d\varphi$  (2.41)

Avec  $d^3G$  l'étendue géométrique infinitésimale entre la surface émettrice de l'échantillon et la surface réceptrice de l'objectif,  $dS_{app}$  la surface apparente de la surface émettrice,  $d^2\omega_{\acute{e}ch\rightarrow obj}$  l'angle solide dont l'origine est le point émetteur et qui se dirige vers la surface réceptrice, dS la surface réelle



FIGURE 2.25 – Aides au calcul de radiométrie. (a) Schéma utilisé pour modéliser le problème sous l'objectif de microscope. La plupart des variables utilisées dans l'équation (2.43) y sont représentées. (b) Représentation de l'angle solide dans les coordonnées sphériques. (c) Définition de l'étendue géométrique. Sa formule est symétrique entre les surfaces 1 et 2.

de la surface émettrice,  $d\alpha$  la variation infinitésimale de l'angle  $\alpha$  appelé colatitude en coordonnées sphériques et variant dans  $[0, \pi]$ , et  $d\varphi$  la variation infinitésimale de la latitude qui varie dans  $[0,2\pi]$ . L'émittance M s'écrit alors :

$$d^{2}M = d^{3}F/dS$$
  
=  $L \cos \alpha \sin \alpha \ d\alpha \ d\varphi$  (2.42)

On intègre cette quantité selon la variable  $\varphi$  entre 0 et  $2\pi$ , ce qui revient à sommer la contribution de tous les pinceaux de lumière avec un angle d'inclinaison  $\alpha$ , qui forment un anneau de lumière sur l'objectif :

$$dM = 2\pi L \cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha \tag{2.44}$$

On voit dans ces équations comme l'effet de l'ouverture numérique, ou de l'angle  $\alpha$ , vient purement de la géométrie de l'éclairage, notamment du produit  $\cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha$ . Pour une longueur d'onde donnée, la lumière émise en anneau décrite par dM interfère en passant dans l'interféromètre et se fait détecter par la caméra. Le signal détecté a donc la même forme que dans le cas des interférences à deux ondes monochromatiques (équation (2.3)), mais est pondéré par le produit  $\cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha$  qui correspond à l'effet de l'ouverture numérique, en termes infinitésimaux. On cherche à sommer, donc intégrer l'effet des pinceaux de lumière avec tous les angles  $\alpha \in [0, \alpha_M]$  : les termes négatifs de  $\alpha$  ont été pris en compte par l'intégrale par rapport à  $\alpha$ , inverse de l'intégrale suivante :  $\int_0^{\alpha_M} \cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha = \left[\frac{\sin^2 \alpha}{2}\right]_0^{\alpha_M} = \frac{\sin^2 \alpha_M}{2}$ . L'intensité  $I(k_0, z)$  détectée en sortie de l'interféromètre à une longueur d'onde donnée et en prenant en compte tous les rayons avec différentes inclinaisons  $\alpha$  s'écrit :

$$I(k_{0},z) = \frac{2}{\sin^{2}\alpha_{M}} \int_{0}^{\alpha_{M}} \frac{I_{t}}{4} S(k) \left( R_{inc} + R_{r} + 2\sqrt{R_{coh}(z)R_{r}} \cos(k_{0}\delta(z,\alpha)) \right) \cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha$$
  
$$= \frac{I_{t}}{4} S(k_{0}) \left( R_{inc} + R_{r} + 2\sqrt{R_{coh}(z)R_{r}} \frac{2}{\sin^{2}\alpha_{M}} \int_{0}^{\alpha_{M}} \cos(k_{0}\delta(z,\alpha)) \cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha \right) (2.45)$$
  
$$= \frac{I_{t}}{4} S(k_{0}) \left( R_{inc} + R_{r} + 2\sqrt{R_{coh}(z)R_{r}} F_{ON}(k_{0},z) \right)$$

Avec

$$F_{ON}(k_0, z) = \frac{2}{\sin^2 \alpha_M} \int_0^{\alpha_M} \cos(k_0 \delta(z, \alpha)) \cos \alpha \sin \alpha \, d\alpha$$
(2.46)

Et  $\delta(z, \alpha) = \delta(z) \cos \alpha = 2n(z - z_o) \cos \alpha$  la différence de marche dans l'interféromètre. La variable z est la position des plans superposés de cohérence et de focalisation, dont on omet la dépendance dans la différence de marche z pour simplifier l'écriture. Le  $\cos \alpha$  apparaît à cause de l'inclinaison des rayons et est un résultat très classique vérifié dans la plupart des interféromètres dès qu'une inclinaison est présente. Pour rappel, S est la densité spectrale de puissance normalisée de la source, supposée gaussienne.  $F_{ON}$  est la fonction qui comporte les effets de l'ouverture numérique, qu'il faut savoir exprimer plus simplement pour mieux l'interpréter. Elle ne semble pas commode, mais s'exprime analytiquement avec un changement de variable  $u = \cos \alpha$  de sorte que  $du = -\sin \alpha \, d\alpha$  et que les bornes de l'intégrale deviennent 1 et  $\cos \alpha_M$ . Une intégration par partie, non détaillée ici, permet d'obtenir le résultat suivant :

$$F_{ON}(k_0, z) = \frac{2}{\sin^2 \alpha_M} \left( \frac{\sin(k_0 \delta) - \sin(k_0 \delta \cos \alpha_M) \cos \alpha_M}{k_0 \delta} + \frac{\cos k_0 \delta - \cos(k_0 \delta \cos \alpha_M)}{k_0^2 \delta^2} \right) \quad (2.47)$$

Cette dernière expression n'est pas pratique à utiliser mais son développement à l'ordre 2 en fonction de  $\alpha_M$  permet de retrouver le terme oscillatoire habituel qu'on a en négligeant l'ouverture numérique :  $F_{NA}^{DL2}(z) = \cos k\delta$ .

On peut simplifier grandement l'expression de  $F_{ON}$  en considérant que le  $\cos \alpha$  en facteur dans l'intégrale est proche de 1. Ce cosinus venait de la surface apparente dans le calcul de radiométrie et cette approximation revient à considérer que la surface apparente est toujours à peu près perpendiculaire aux rayons incidents. On conserve cependant l'effet de l'angle dans la différence de marche. En utilisant le changement de variable  $u = \cos \alpha$  et des égalités trigonométriques, on a alors :

$$F_{ON}^{approx}(k_0,\delta) = \frac{2}{\sin^2 \alpha_M} \int_0^{\alpha_M} \cos(k_0 \delta \cos \alpha) \sin \alpha \, d\alpha$$
  
=  $\frac{2}{1 + \cos \alpha_M} \frac{\sin\left(k_0 \delta \frac{1 - \cos \alpha_M}{2}\right)}{k_0 \delta \frac{1 - \cos \alpha_M}{2}} \cos\left(k_0 \delta \frac{1 + \cos \alpha_M}{2}\right)$  (2.48)  
 $\approx \operatorname{sinc}(k_0 \delta \sin^2(\alpha_M/2)) \cos(k_0 \delta \cos^2(\alpha_M/2))$ 

L'approximation à la dernière ligne n'affecte qu'une constante, qui n'a donc pas une grande influence dans les résultats et qui permet même de rapprocher la fonction approximée de la courbe réelle. Dans cette dernière expression, on retrouve l'oscillation caractéristique de l'OCT en monochromatique avec le facteur supplémentaire  $(1 + \cos \alpha_M)/2$  dans la phase qui espace un peu plus les franges. La nouveauté est le terme en sinus cardinal qui va écraser les oscillations dès que la différence de marche deviendra trop grande et qui sera l'origine d'une seconde enveloppe liée à l'ouverture numérique avec un rôle similaire à l'enveloppe de cohérence. De plus, cette approximation est empiriquement très proche de la formule analytique exacte de  $F_{ON}$  en utilisant une ouverture numérique de 0,5, avec z entre ±500 µm, largement suffisant pour notre application, et  $\lambda_0 = 700 nm$ . On va donc utiliser cette dernière expression pour le reste des modélisations. On a explicité tous les termes dus à l'intégration par rapport à  $\alpha$ , il reste à intégrer le signal par rapport à  $k_0$ , ce qui donne :

$$I(\delta) = \frac{I_t}{4} \int_0^\infty S(k_0) \left( R_{inc} + R_r + 2\sqrt{R_{coh}(z)R_r} F_{ON}^{approx}(k_0, \delta) \right) dk_0$$
  
=  $\frac{I_t}{4} \left( R_{inc} + R_r + 2\sqrt{R_{coh}(z)R_r} \int_0^\infty S(k_0) \operatorname{sinc}\left(k_0 \delta \sin^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)\right) \cos\left(k_0 \delta \cos^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)\right) dk_0 \right)$   
(2.49)

Notons Mod( $\delta$ ) l'intégrale de la dernière égalité. Quand on négligeait l'ouverture numérique, cette intégrale était égale à la partie réelle de la transformée de Fourier de *S*. C'est ici plus compliqué de faire apparaître la TF à cause du sinus cardinal, dépendant de  $k_0$ . On peut néanmoins s'en sortir en supposant que l'impact du sinus cardinal n'est pas primordial et qu'on peut l'approximer par la valeur moyenne  $\operatorname{sinc}(\overline{k_0}\delta \sin^2(\alpha_M/2))$ , en remplaçant la variable  $k_0$  par le barycentre de *S*, noté  $\overline{k_0}$ . Le sinus cardinal peut alors sortir de l'intégrale. On retrouve une TF en utilisant le changement de variable  $k'_0 = k_0 \cos^2(\alpha_M/2)$ , de sorte que  $dk_0 = dk'_0/\cos^2(\alpha_M/2)$ . On a alors, en se rappelant que *S* est de forme gaussienne de largeur  $\Delta k_0$  et des calculs de l'équation (2.8) :

$$\operatorname{Mod}(z) = \frac{1}{\cos^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)}\operatorname{sinc}\left(\overline{k_0}\delta(z)\sin^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)\right)\Re\left(\mathcal{F}\left(S(k_0')\right)\left(\delta(z)\right)\right)$$
$$= \frac{1}{\cos^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)}\operatorname{sinc}\left(\overline{k_0}\sin^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)2n(z-z_0)\right)\exp\left(-\frac{\Delta k_0'^2n^2(z-z_0)^2}{4\ln 2}\right)\cos\left(\overline{k_0'}2n(z-z_0)\right)$$
(2.50)

On peut réécrire le résultat final :

$$I(z) = \frac{I_0}{4} \left( R_{inc} + R_r + \frac{2\sqrt{R_{coh}(z)R_r}}{\cos^2(\alpha_M/2)} V_{ON}(z) V_{coh}(z) \cos\left(\frac{1}{k_0}\cos^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right) 2n(z-z_0)\right) \right)$$
(2.51)

Avec :

$$\begin{cases} V_{ON}(z) = \operatorname{sinc}\left(\overline{k_0} \sin^2(\alpha_M/2) 2n(z - z_o)\right) \\ V_{coh}(z) = \exp\left(-\left(\Delta k_0 \cos^2(\alpha_M/2) n(z - z_o)\right)^2 / 4\ln 2\right) \end{cases}$$
(2.52)

Avec  $V_{ON}$  l'enveloppe de l'ouverture numérique, et  $V_{coh}$  l'enveloppe de cohérence, qui sont ici centrées autour de la surface réfléchissante. La phase du terme responsable des modulations est diminuée d'un facteur  $\cos^2(\alpha_M/2)$  par rapport au cas où l'ouverture numérique était négligée, ce qui étale les franges vues par le système et ce qui avantage l'utilisation de l'algorithme de Larkin pour la démodulation vu à la sous-section 2.3.3 grâce à sa robustesse et en utilisant un pas d'échantillonnage un peu plus grand que l'optimum théorique au premier ordre. Les deux enveloppes ont chacune une largeur caractéristique,  $\Delta z_{ON}$  étant l'abscisse de la première annulation du sinus cardinal et  $\Delta z_{coh}$  la largeur à mi-hauteur de la gaussienne :

$$\begin{cases} \Delta z_{ON} = \frac{\bar{\lambda}_0}{4n\sin^2(\alpha_M/2)} \\ \Delta z_{coh} \approx \frac{2\ln 2}{\pi n\cos^2(\alpha_M/2)} \frac{\bar{\lambda}_0^2}{\Delta \lambda} \end{cases}$$
(2.53)

 $\Delta z_{ON}$  est la profondeur de champ des objectifs de microscope. On en retrouve une expression simplifiée plus connue grâce à un développement limité d'ordre 2 par rapport à l'angle  $\alpha_M : \Delta z_{ON} \approx n\bar{\lambda}_0/ON^2$ .  $\Delta z_{coh}$  est similaire au cas où l'ouverture numérique était négligée, à la différence du facteur  $\cos^2(\alpha_M/2)$  qui élargit l'enveloppe de cohérence, de la même manière que les franges des modulations. Ces deux largeurs peuvent être prises en compte en même temps pour avoir une expression de la résolution axiale globale :

$$\Delta z = \frac{1}{\sqrt{1/\Delta z_{\rm ON}^2 + 1/\Delta z_{\rm coh}^2}}$$
(2.54)

#### 56 2.4 : CRITERES DE PERFORMANCE

La résolution axiale globale est tracée en fonction de l'ouverture numérique pour différentes largeurs spectrales dans la Figure 2.26. Dans la formule ci-dessus, on voit que la plus petite largeur d'enveloppes détermine la résolution axiale. Si  $\Delta z_{ON} \gg \Delta z_{coh}$ , c'est-à-dire à faible ON, la profondeur de champ de l'objectif ne contribuera en aucun cas à l'amélioration de la résolution et seule la cohérence temporelle déterminera la résolution. Dans le cas inverse, la haute ouverture numérique permettrait un sectionnement similaire à la microscopie confocale. Globalement, l'augmentation de l'ouverture numérique améliore la résolution axiale, dans l'hypothèse où les plans de focalisation et de cohérence restent bien superposés. Ces courbes montrent qu'en se reposant sur la largeur de l'enveloppe de cohérence seulement, il est possible d'atteindre des résolutions axiales raisonnables sans avoir à choisir des objectifs à trop fortes ouvertures numériques, qui sont généralement plus encombrants et moins faciles d'utilisation.

En effet, restreindre la largeur de la profondeur de champ n'a pas que des avantages : si jamais l'égalité des indices n'est pas bien respectée, les plans de focalisation et de cohérence auront tendance à se séparer pendant le scan axial (cf. sous-section 2.3.4). Plus la profondeur de champ est faible, moins les deux enveloppes auront de chances de se recouvrir pendant tout le scan et le signal n'en sera que diminué puisque l'amplitude des modulations est proportionnelle au produit des deux enveloppes. On peut prendre en compte ce décalage dans les calculs en supposant  $n \neq n_{im}$ , les deux plans superposés à la surface de l'échantillon où z = 0, et en reprenant les derniers résultats, mais en changeant de point de vue sur les variables : lorsqu'on prend des images, le signal collecté est celui en provenance du plan de focalisation. Il faudrait donc interpréter la variable z comme la position du plan de focalisation. En adoptant ce référentiel, l'enveloppe de l'ouverture numérique se retrouve toujours centrée autour de la couche réfléchissante. L'enveloppe de cohérence, elle, s'en désolidarise selon les résultats de la soussection 2.3.4 : elle sera donc centrée autour de la position  $z_{coh}(z_o) = (n/n_{im})^2 z_o$  et on aura alors :

$$I(z) = \frac{I_0}{4} \left( R_{inc} + R_r + \frac{2\sqrt{R_{coh}(z)R_r}}{\cos^2(\alpha_M/2)} V_{ON}(z) V_{coh}(z) \cos\left(\overline{k_0}\cos^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right) 2n\left(z - \left(\frac{n}{n_{im}}\right)^2 z_o\right) \right) \right)$$
(2.55)

Avec :



FIGURE 2.26 – Résolution axiale globale en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif de microscope pour différentes largeurs spectrale de la source, centrée à 700 nm. A faible ouverture numérique, l'effet de cohérence sur la résolution axiale prédomine. Ensuite, plus l'ouverture numérique augmente, plus l'effet de la réduction de la profondeur de champ permet d'améliorer la résolution. Globalement, plus l'ouverture numérique augmente, plus la résolution axiale s'améliore.

$$\begin{cases} V_{ON}(z) = \operatorname{sinc}\left(\overline{k_0} \operatorname{sin}^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right) 2n(z-z_o)\right) \\ V_{coh}(z) = \exp\left(-\left(\Delta k_0 \cos^2\left(\frac{\alpha_M}{2}\right)n\left(z-\left(\frac{n}{n_{im}}\right)^2 z_o\right)\right)^2/4\ln 2\right) \end{cases}$$
(2.56)

Ces expressions permettent de parler de décalage des enveloppes de cohérence et de focalisation plutôt que de plans. La Figure 2.27 illustre en particulier le décalage de ces enveloppes en prenant un indice d'échantillon n = 1,4, un indice de milieu d'immersion  $n_{im} = 1,39$ , une longueur d'onde centrale  $\bar{\lambda}_0 = 700 nm$ , une largeur de spectre  $\Delta \lambda = 100 nm$  et une ouverture numérique ON = 0,5, avec une distance de la surface objet  $z_o = 150 \,\mu m$  et en supposant que les enveloppes étaient superposées à la surface de l'échantillon. Même avec le décalage, les franges dans les images brutes restent visibles, mais leur amplitude baisse, ce qui affecte le contraste dans les images démodulées. La courbe du maximum de l'amplitude de l'enveloppe globale par rapport à la position de la couche réflective est dessinée dans la Figure 2.28. Elle suit globalement la même forme que le sinus cardinal de l'enveloppe de l'ouverture numérique, et on voit en particulier que la courbe s'annule presque avant de voir sa valeur réaugmenter : l'enveloppe de cohérence s'est superposée à un lobe du sinus cardinal. Les franges peuvent donc rester visibles même avec un décalage important des enveloppes, mais, comme en microscopie conventionnelle, la mise au point ne sera pas faite sur la surface à imager, dont les détails seront flous. Le choix du milieu d'immersion est donc primordial pour obtenir des images en profondeur de l'échantillon, surtout si on ne contrôle pas en permanence la longueur du bras de référence



FIGURE 2.27 – Illustration du décalage des enveloppes dû à un différentiel d'indice entre l'échantillon (n = 1.4) et le milieu d'immersion (n = 1.39) avec une couche réfléchissante située à la profondeur  $z_o = 150 \mu m$ . La source est centrée à 700 nm avec une largeur de 100 nm. L'ouverture numérique est égale à 0,5. (a) Courbes en valeur absolue des enveloppes de l'ouverture numérique, de cohérence, et du produit des deux. L'amplitude de l'enveloppe du produit baisse à cause du décalage entre les deux premières enveloppes. (b) Simulation des franges vues dans une image brute s'il y a égalité des indices. (c) Simulations des franges dans le cas où les indices ne sont pas égaux. On peut y distinguer une baisse de contraste et le décalage des franges. Il faut noter que toutes ces données n'ont pas subi le traitement de démodulation. Après démodulation, cette perte de contraste est d'autant plus prononcée à cause de la mise au carré.



FIGURE 2.28 – Courbe représentant le maximum d'amplitude du produit des enveloppes en fonction de la position de la couche réfléchissante objet, dans les mêmes conditions que la Figure 2.27. Avec un différentiel d'indice de 0,01, les enveloppes de cohérence et d'ouverture numérique se désolidarisent à  $\sim$ 275 µm de profondeur, et le signal des franges est perdu. Au-delà de cette profondeur, la mise au point du microscope est complètement perdue, tout comme la résolution latérale du système.

#### Limites de cette modélisation

Essayer de prendre en compte l'ouverture numérique de cette manière permet de développer un modèle théorique sur lequel se raccrocher mais qui ne reflète pas tout à fait la réalité. En effet, en manipulant des systèmes de LC-OCT, on se rend vite compte de l'apparition d'une incohérence par rapport à ce qu'on a écrit plus haut. Il s'agit de la largeur des deux enveloppes, simulées dans la Figure 2.27 comme ayant des largeurs du même ordre de grandeur, bien que dans une image brute acquise avec un montage réel, on puisse considérer que l'enveloppe de l'ouverture numérique soit environ 10 fois plus large que l'enveloppe de cohérence (cf. Figure 2.29). Les différents graphes dessinés dans le cadre de cette sous-section doivent donc être vus avec un œil critique : la bonne résolution axiale est largement due à l'enveloppe de cohérence et la séparation des plans n'a pas un effet aussi dramatique que ce que les simulations pouvaient laisser croire.

On rappelle que les calculs précédents reposaient sur les hypothèses suivantes : seule la lumière émanant d'un point de l'échantillon et atteignant l'objectif de microscope était prise en compte, ce qui modifiait la différence de marche. L'éclairage, ainsi que le capteur, ont été ignorés : on se targue d'avoir un système optique à moitié confocal sans prendre la peine d'inclure ce qui lui donne cette propriété dans les calculs ! Pourquoi, vous demanderiez-vous ? La raison est relativement simple : les calculs ont l'air compliqués et demandent une connaissance approfondie de la microscopie confocale, souvent reléguée au second plan quand on travaille sur l'OCT, bien qu'elle possède des propriétés intéressantes. La plus connue est le fait que la réponse impulsionnelle d'un microscope confocal est égale au carré de celle d'un microscope conventionnel [46], ce qui rend la première plus étroite que la seconde et améliore donc la résolution dans les trois directions de l'espace. Ce résultat, non trivial et modifiant complètement le système, repose sur des hypothèses souvent vérifiées en microscopie confocale : les images sont acquises point par point grâce à un système de balayage, le système d'éclairage possède des caractéristiques identiques au système de collecte de lumière et surtout le détecteur est supposé ponctuel. L'expression de la réponse impulsionnelle est ensuite déduite suite à de longs calculs d'optique de Fourier [58]. Prendre en compte la confocalité de la LC-OCT demanderait donc de transposer ces calculs du début, sachant qu'aucune des hypothèses citées au-dessus n'est vérifiée dans notre système et que la géométrie de l'éclairage n'est pas commune. Bien que chronophage, développer cette direction afin de



FIGURE 2.29 – Franges d'interférences et enveloppe de l'ouverture numérique visibles sur une image brute de LC-OCT en imageant une interface réfléchissante. Une coupe de l'image le long de l'axe z est aussi affichée : on y distingue clairement l'enveloppe de cohérence qui entoure les franges. En considérant leurs bases, l'enveloppe de l'ouverture numérique est à peu près 10 fois plus large que celle de cohérence. En outre, on ne distingue pas de rebonds caractéristiques d'un sinus cardinal.

mieux modéliser la LC-OCT semble faisable. On pourrait naïvement croire que cette mise au carré de la réponse impulsionnelle s'effectuerait seulement dans la direction orthogonale à la ligne, pour une meilleure résolution latérale dans cette même direction. Ce qui se passerait le long de l'axe optique est moins clair, mais on espère un allongement de la réponse impulsionnelle dans cette direction, vu que les rayons lumineux ne convergent que dans une seule direction latérale et du fait de la plus grande profondeur de champ observée dans les images. En attendant, on se contente du modèle développé dans cette sous-section en étant conscient de ses limites.

# 2.4.2 Résolution latérale

La résolution latérale est la taille du plus petit détail qu'on est capable de distinguer à l'aide du système optique. Cette première définition peut paraître subjective puisque deux personnes différentes ne voient pas forcément les mêmes détails à travers un microscope, par exemple, et il reste difficile de s'accorder pour une frontière nette et universelle entre « distinguer deux points » ou « ne pas les distinguer ». La notion de résolution latérale repose donc sur des conventions acceptées par toute la communauté scientifique, ou qui demandent au moins d'être explicitées à chaque fois que le sujet est abordé. L'une des conventions les plus utilisées est le critère de Rayleigh : la réponse impulsionnelle d'un système optique parfait avec une pupille circulaire étant une tache d'Airy, deux points imagés qui se rapprochent l'un de l'autre sont jugés discernables jusqu'à ce que le centre d'une tache soit à la première annulation de l'autre. Autrement dit, le plus petit détail discernable à travers un système optique à pupille en forme de disque est le rayon de la tache d'Airy, soit :

$$\Delta r_{Airy} = \frac{1,22\lambda}{20N} \tag{2.57}$$

Avec  $\lambda$  la longueur d'onde utilisée et *ON* l'ouverture numérique du système optique. Une étude sur les fonctions de modulation de transfert (FTM, courbe de contraste en fonction de la fréquence spatiale) basée sur l'optique de Fourier permet aussi de déduire des fréquences spatiales de coupure dépendant de la cohérence spatiale de la source et dont on prend parfois l'inverse pour déterminer théoriquement la résolution spatiale en microscopie conventionnelle :
$$\begin{cases} \Delta r_{Fourier}^{coh} = \frac{\lambda}{ON} \\ \Delta r_{Fourier}^{incoh} = \frac{\lambda}{2ON} \end{cases}$$
(2.58)

Il faut souligner que ces valeurs viennent de fréquences de coupure, donc de valeurs en-dessous desquelles le contraste de l'image est non-nulle, mais pas forcément haute. En éclairage cohérent, par exemple, le contraste reste optimal pour toutes les faibles fréquences jusqu'à la fréquence de coupure, puis chute à zéro : il est donc possible de voir des détails associés à cette fréquence de coupure. En éclairage incohérent, en revanche, la FTM diminue petit à petit jusqu'à atteindre zéro à la fréquence de coupure : les fréquences qui en sont proches sont en pratique très difficilement observables du fait du faible contraste associé. Un autre cas qui nous intéressera particulièrement est celui du faisceau laser à profil énergétique gaussien en sortie d'une fibre monomode. Après avoir traversé une optique, la réponse impulsionnelle n'est plus une tache d'Airy, mais une tache au profil gaussien également. En effet, l'optique de Fourier affirme que la réponse dans le plan focal de l'optique est la transformée de Fourier de l'amplitude d'entrée au niveau de la pupille, qui est gaussienne si l'on suppose que la pupille est assez grande pour ne pas couper le faisceau. Ce dernier se concentre alors au niveau du plan de focalisation et forme un « waist », comme illustré dans la Figure 2.30. On écrit son expression [59] dans un milieu d'indice n dans les conditions paraxiales et qui peut être considéré comme la résolution latérale :

$$\Delta r_g = \frac{\lambda}{\pi n \theta_d} = \frac{\lambda}{\pi O N} \tag{2.59}$$

En somme, toutes ces expressions théoriques donnent à peu près le même ordre de grandeur et dépendent en particulier de l'ouverture numérique des objectifs de microscope utilisés. Ceux avec une ouverture numérique limitée de l'ordre de 0,5 donnent déjà des résolutions latérales de l'ordre du micromètre à 700 nm, ce qui est suffisant pour notre application et permet en outre de conserver un grand champ latéral et de limiter les aberrations dans le système.

#### 2.4.3 Vitesse d'acquisition

Un point important lors de l'utilisation d'un système d'imagerie est le nombre d'images par secondes que l'utilisateur peut espérer voir défiler sur son écran, pour le confort et la fluidité d'utilisation. Cela



FIGURE 2.30 – Illustration du waist d'un faisceau laser gaussien après traversée d'une optique convergente.

fait partie des enjeux de l'« imagerie en direct », où la vitesse d'acquisition des images brutes agit directement. En effet, pour obtenir une image démodulée en TD-OCT, une image brute doit d'abord être acquise, puis démodulée, puis traitée, et on peut même accumuler plusieurs images du même endroit de l'échantillon pour augmenter artificiellement la qualité de l'image. Dans tous les cas, la vitesse d'affichage à l'écran est proportionnelle à la vitesse d'acquisition du système. Il est donc toujours avantageux que cette dernière soit la plus grande possible.

Un autre objectif à atteindre est l'imagerie in vivo, c'est-à-dire l'imagerie d'un échantillon vivant. Dans notre cas, il revêt beaucoup d'importance car la finalité du système de LC-OCT est de donner aux dermatologues les outils nécessaires au diagnostic instantané de régions de peau suspectes chez leurs patients sans avoir recours à l'excision. La difficulté de l'imagerie in vivo réside dans les petits mouvements difficilement suppressibles de l'échantillon, qui augmentent drastiquement les risques de flou de bougé, ce qui est dramatique dans le cas de la TD-OCT à cause du brouillage des franges engendré par une variation de chemin optique aussi faible que quelques fractions de longueur d'onde. La vitesse d'acquisition prend alors son importance car un faible temps d'exposition est, comme en photographie, l'astuce utilisée pour prendre un cliché net d'un sujet en plein mouvement. Et, comme en photographie, on peut se confronter au problème du manque de lumière, ou, autrement dit, à un rapport signal à bruit faible dans l'image, auquel il faut remédier par un moyen ou un autre. Ce phénomène est particulièrement visible en FF-OCM où le capteur collecte énormément de photons incohérents non utiles au signal, du fait du manque de filtrage confocal. On utilise alors souvent la méthode d'accumulation, qui est l'acquisition puis le moyennage de plusieurs images de la même région pour augmenter le nombre de photons utiles effectif et donc le rapport signal à bruit dans l'image finale. Cette méthode revient à augmenter artificiellement le temps d'exposition sur un seul plan de l'échantillon, ce qui n'est donc pas praticable pour de l'imagerie in vivo. La FD-OCT, à l'opposé, ne souffre pas de ces limitations grâce à son fonctionnement : comme beaucoup de photons rétrodiffusés par l'échantillon contribuent au signal utile pour la formation de l'image, le rapport signal à bruit est donc bon, et comme tout un A-scan est pris en une acquisition, la vitesse d'acquisition est importante. Accumuler ou augmenter le temps d'exposition permettra tout de même d'augmenter le rapport signal à bruit, bien que ce ne soit pas toujours nécessaire. Ces exemples montrent donc qu'il existe toujours un compromis entre vitesse d'acquisition et rapport signal à bruit, plus ou moins contraignant selon le système d'imagerie. Par rapport à la FF-OCM, la LC-OCT est aussi limitée en termes de collecte de photons utiles car elle est également basée sur la TD-OCT : seul le signal inclus dans l'enveloppe de cohérence contribue au signal utile, contrairement à la FD-OCT. En revanche, la LC-OCT permet de réduire significativement le bruit grâce à son filtrage confocal. A temps d'exposition égal, le rapport signal à bruit de la LC-OCT est donc supérieure à celui de la FF-OCM. Il est donc possible de réduire le temps d'exposition en LC-OCT pour un rapport signal à bruit convenable et rendre l'imagerie in vivo possible en « figeant » l'échantillon, ainsi que les franges d'interférence.

L'imagerie *in vivo* reste néanmoins un défi technique d'autant plus difficile à relever du fait de l'utilisation de la mise au point dynamique en TD-OCT, à cause de l'inertie de l'objectif de microscope objet. En effet, les méthodes d'imagerie basées sur la TD-OCT ont besoin, mise à part la FF-OCM, de balayer la lumière incidente sur l'échantillon pour au moins construire des images en 2D. La LC-OCT ne fait pas exception en utilisant une platine de translation piézoélectrique qui permet le balayage de la ligne de lumière le long de l'axe optique pour obtenir un B-scan. Même si la caméra est capable d'acquérir des lignes images à très grande vitesse, il faut que la platine atteigne une vitesse adéquate, ce qui entraîne des problèmes de non-linéarité de la trajectoire. De même, avec un temps d'exposition très faible, il faut que la quantité de photons détectés par le capteur soit suffisant et donc que la source soit assez puissante. Ainsi, le terme « vitesse d'acquisition » regroupe ces trois paramètres principaux que sont le temps d'exposition de la caméra, la vitesse de balayage de la platine et la puissance du laser, en termes d'images par seconde.

Nous n'avons pas pris en considération la vitesse des traitements d'image qui interviennent dans un second temps seulement, et qui, dans le cas de ce système optique, n'améliorent pas l'information physique dans les images mais rendent leur visualisation plus agréable à l'utilisateur. Elle serait à prendre en compte pour la vitesse d'affichage des images, qu'on laisse de côté dans le cadre de cette thèse car les traitements d'image complets ont été faits en post-traitement.

# 2.4.4 Sensibilité

Dans les appareils d'OCT, on appelle sensibilité le plus petit signal mesurable. Pour être plus précis, on devrait plutôt appeler cette propriété la « limite de détection ». Comme le contraste des images OCT repose sur le taux de réflexion des différentes couches de l'échantillon, la sensibilité en a les dimensions et sera notée  $R_{min}$ . Or, les échantillons de peau étant des milieux complexes et diffusants, la quantité de lumière rétrodiffusée par les couches réfléchissantes s'amoindrit à mesure que l'on sonde l'échantillon en profondeur. La sensibilité est donc un paramètre donnant une idée de la profondeur de pénétration du système d'OCT, ainsi que de la qualité image via le rapport signal à bruit. Réussir à la quantifier nécessite cependant de chercher les sources de bruit du système d'imagerie.

Pour reconstruire des B-scans des échantillons, les systèmes d'OCT tirent profit des modulations des franges d'interférence en utilisant des algorithmes à décalage de phase. Le premier paramètre influant sur le contraste des images finales est donc le contraste des franges, c'est-à-dire le contraste de l'information physique. Cette dernière est ensuite collectée et numérisée par la caméra, qui doit être capable de distinguer les variations d'intensité des franges. Pour ce faire, à un pixel donné, une portion des photons incidents est convertie en électrons qui sont stockés pendant le temps d'exposition de la caméra. Une fois écoulé, ces électrons sont échantillonnés par la conversion analogique-numérique et transmis sous forme d'une série de bits, qui déterminera le nombre de niveaux de gris représentables par chaque pixel : avec un nombre de bits plus grand, le nombre de niveaux de gris différents atteignables par le pixel augmente, mais l'espace mémoire et le flux de données nécessaires augmentent également. Une faible variation d'intensité est alors plus facilement détectable par la caméra.

Parmi toutes ces étapes, le bruit présent dans les images peut avoir deux origines : la première est le bruit de photons engendré par le signal lumineux ; et la seconde est le bruit lié à la caméra. Dans cette dernière, on peut raisonnablement supposer que l'échantillonnage est assez fin et que le bruit est essentiellement dû au bruit électronique qui peut gêner la détection de petites variations du signal utile. Ce bruit sera d'ailleurs d'autant moins visible si beaucoup d'électrons sont présents dans chaque pixel et donc que la majeure partie de la dynamique du capteur est utilisée : chaque pixel possède une « capacité de charge » e<sub>sat</sub> qui est le nombre d'électrons qu'il peut retenir au maximum dans son puits d'électrons avant l'étape d'échantillonnage et au-delà duquel le pixel est saturé ; il est donc optimal de travailler avec les pixels proches de la saturation pour maximiser le rapport signal à bruit. Cette condition peut être plus ou moins respectée selon la puissance de la source et de la vitesse d'acquisition du système. On fera donc une séparation au cours du calcul pour traiter le cas du capteur constamment proche de la saturation, et le cas inverse, qui ont des comportements très différents. Dans tous les cas, on va supposer que la quantité de photons atteignant le capteur est suffisante pour que le bruit de photons soit prédominant par rapport aux bruits électroniques de la caméra. En effet, le bruit de photons est modélisable par un bruit de Poisson : en notant le nombre de photons détecté N, l'écart-type de ce bruit est égal à  $\sqrt{N}$ , ce qui en fait le bruit prédominant s'il y a assez de photons. On ne considèrera donc que le bruit de photons pour exprimer la sensibilité.

L'image finale est obtenue après démodulation, étape qu'il convient de prendre en compte dans le calcul de la sensibilité. On prend comme algorithme de démodulation celui de Larkin [48] qui avait été décrit dans la sous-section 2.3.3 :

$$I_{Larkin}^2(p) = a_p^2 - b_p \times c_p \tag{2.60}$$

Avec

$$a_{p} = I_{p+3} - I_{p+1}$$

$$b_{p} = I_{p} - I_{p+2}$$

$$c_{p} = I_{p+2} - I_{p+4}$$
(2.61)

Et, pour rappel, dans l'hypothèse d'une variation linéaire de la phase, c'est-à-dire avec un balayage continu de la platine piézoélectrique plutôt que pas à pas, le signal acquis provenant de la ligne (p + q) s'écrit :

$$I_{p+q} = \frac{I_t T}{16} \left[ R_{inc} + R_r + \frac{4}{\pi} \sqrt{R_{coh}(z)R_r} \left( \cos\left(\varphi_p + \frac{q\pi}{2}\right) - \sin\left(\varphi_p + \frac{q\pi}{2}\right) \right) \right]$$
(2.62)

Une formule analytique en sortie de l'algorithme et calculée à la sous-section 2.3.3 est :

$$I_{Larkin}^{2}(z) = \left(\frac{I_{t}T}{\sqrt{2}\pi}\right)^{2} R_{r}R_{coh}(z)$$
(2.63)

Avec T la période temporelle des oscillations du signal lors du scan et  $I_t$  l'intensité de la lumière incidente, variable ou non selon les hypothèses. Il est possible de voir ces formules en nombre de photons en exprimant  $I_t$  en photons par secondes, en supposant, pour simplifier, que l'efficacité quantique de la caméra est égale à 1. Quantifier le bruit de photons nécessite de compter le nombre de photons collectés en moyenne dans l'image : si l'on considère seulement la partie constante de l'équation (2.62) sans les oscillations, elle représente le nombre de photons détectés par la caméra dans une zone de l'échantillon qui ne produit pas d'interférences. On en déduit alors une estimation du nombre de photons détectés en fonction des coefficients de réflexion :

$$N = \frac{I_t T}{16} (R_{inc} + R_r)$$
(2.64)

Il devient ainsi possible d'exprimer le bruit au cours du temps dans nos images démodulées. En effet, nous avons supposé que seul le bruit de photons est à prendre en compte. Comme il est modélisé par un bruit de Poisson, sa variance s'exprime de la manière suivante :

$$\sigma_{phot}^2 = N \tag{2.65}$$

De plus, en supposant que les images lignes sont acquises dans une zone sans franges d'interférences, les 5 images lignes utilisées pour la démodulation ont une moyenne I, chacune perturbée par un bruit additif  $b_{p+q}$  suivant une loi de Poisson et décorrélé entre chaque ligne. Après démodulation, on obtient :

$$I_{Larkin,b}^{2} = \left[ \left( I + b_{p+3} \right) - \left( I + b_{p+1} \right) \right]^{2} - \left[ \left( I + b_{p} \right) - \left( I + b_{p+2} \right) \right] \left[ \left( I + b_{p+2} \right) - \left( I + b_{p+4} \right) \right]$$
  
=  $b_{p+3}^{2} + b_{p+1}^{2} - 2b_{p+3}b_{p+1} - b_{p}b_{p+2} + b_{p}b_{p+4} + b_{p+2}^{2} - b_{p+2}b_{p+4}$  (2.66)

Après moyennage temporel, seuls les termes au carré restent, et on en connaît la variance. Le bruit du signal après démodulation est donc :

$$B = 3\sigma_{phot}^2 = 3N \tag{2.67}$$

C'est à partir d'ici que le comportement du rapport signal à bruit et de la sensibilité va changer drastiquement selon les hypothèses qu'on va faire sur  $I_t$ , et donc sur le nombre de photons atteignant le capteur. En effet, même si nous savons qu'il est toujours favorable d'avoir le plus de photons possible, la puissance du laser est limitée et l'imagerie à haute vitesse ne nous permettra pas de toujours utiliser l'entièreté de la capacité de charge du capteur. A l'inverse, en ralentissant suffisamment la cadence, et donc en augmentant le temps d'exposition de la caméra, on peut supposer que la source n'est pas constamment utilisée à pleine puissance et qu'il est possible de régler le flux émis dynamiquement, de manière à toujours garder le capteur à la limite de saturation.

## Sensibilité avec le capteur non saturé

On suppose dans ce paragraphe qu'on est dans le cas de l'imagerie à haute vitesse, et donc qu'on a atteint la limite de puissance du laser.  $I_t$  est donc constant, de sorte que les puits d'électrons des pixels ne soient que partiellement remplis, et que le bruit de photons varie en même temps que  $R_r$ . On suppose que le nombre de photons détectés reste suffisamment grand pour que le bruit de photons soit la seule source de bruit à prendre en compte. On peut maintenant calculer le rapport signal à bruit :

$$RSB = \frac{I_{Larkin}^{2}(z)}{B} = \frac{8I_{t}T}{3\pi^{2}} \frac{R_{r}R_{coh}(z)}{R_{inc} + R_{r}}$$
(2.68)

et on en déduit la sensibilité en remplaçant  $R_{coh}$  par  $R_{min}$ , en considérant par exemple qu'un signal est détectable si RSB = 1:

$$R_{min} = \frac{3\pi^2}{8I_t T} \frac{R_{inc} + R_r}{R_r}$$
(2.69)

Qu'on exprime aussi sous forme logarithmique, en décibels :

$$S = 10 \log R_{min} \tag{2.70}$$

On peut voir dans l'équation (2.69) le rôle des différentes variables sur la sensibilité. Par exemple, l'intensité de la source  $I_t$  se situe au dénominateur : si jamais il restait de la réserve de puissance et qu'on l'augmentait, plus le nombre de photons augmenterait pour réduire le bruit et plus la sensibilité s'améliorerait, comme on pouvait s'y attendre. De plus, le rapport des coefficients de réflexion incohérent et de la référence est strictement décroissant par rapport à  $R_r$  dans les valeurs positives. La sensibilité atteint donc son minimum quand  $R_r = 1$ , c'est-à-dire avec un miroir de référence parfait. Cependant, il faut bien voir dans cette expression que le choix de  $R_r$  repose sur un compromis entre deux caractéristiques importantes du système optique qui, comme on peut le penser intuitivement, influent sur la qualité d'image : l'équilibre des bras de l'interféromètre – et, par conséquent, le contraste des franges du signal lumineux -, et la quantité de lumière sur le capteur. Augmenter  $R_r$  permet d'augmenter la quantité de lumière et donc de réduire le bruit de photons dans le sens où  $\sigma_{phot}/N =$  $1/\sqrt{N}$ , mais déséquilibre les bras de l'interféromètre en augmentant l'écart entre  $R_r$  et  $R_{inc}$ , ce qui entraîne une baisse du contraste des franges ; tandis que rapprocher sa valeur de Rinc améliore le contraste des franges mais augmente le bruit de photons... Quel aspect prévaut sur l'autre ? L'expression (2.69) permet de statuer et pointe vers la quantité de lumière, mais seulement de peu, puisque la sensibilité reste quasiment constante quand  $R_r \in [1\%, 100\%]$ . Les deux aspects physiques se compensent donc presque, avec un léger avantage pour la quantité de lumière. Pour optimiser la sensibilité, il faut donc collecter le plus de photons possible, quitte à déséquilibrer les bras de l'interféromètre. En ayant  $R_r \in [1\%, 100\%]$ , on aurait donc l'expression simplifiée de la sensibilité :

$$R_{min} \approx \frac{3\pi^2}{8I_t T} \tag{2.71}$$

Bien entendu, même si on disposait d'une puissance infinie de la part de la source, on resterait limité par la capacité de l'échantillon à supporter la lumière reçue sans s'abîmer, mais avant cela par la capacité de charge du capteur, qui est le cas qu'on va étudier dans le prochain paragraphe.

#### Sensibilité avec le capteur proche de la saturation

On suppose maintenant qu'on dispose d'énormément de puissance lumineuse ou bien qu'on a ralenti l'acquisition pour augmenter le temps d'exposition de la caméra, de sorte à pouvoir modifier la puissance du laser tout en modifiant  $R_r$  afin de garder le capteur saturé.  $I_t$  devient donc une fonction de  $R_r$ , de sorte à garder le nombre de photons constant et donc le bruit de photons constant et minimisé.

Avec le capteur saturé, il convient de faire le rapprochement entre le nombre de photons détectés et la capacité de charge, indépendante des autres paramètres :

$$e_{sat} \approx N_{sat} = \frac{I_t(R_r)T}{16}(R_{inc} + R_r)$$
 (2.72)

De sorte que, en faisant apparaître la constante  $e_{sat}$  plutôt que la variable  $I_t(R_r)$ , on obtienne :

$$RSB_{sat} = \frac{128e_{sat}}{3\pi^2} \frac{R_r R_{coh}(z)}{(R_{inc} + R_r)^2}$$
(2.73)

Et

$$R_{min,sat} = \frac{3\pi^2}{128e_{sat}} \frac{(R_{inc} + R_r)^2}{R_r}$$
(2.74)

Encore une fois,  $e_{sat}$  se situe au dénominateur, ce qui signifie que plus on peut collecter de photons, plus la sensibilité s'améliore. L'effet de la variabilité de la puissance se traduit par l'apparition d'un carré dans le rapport des coefficients de réflexion : cette fois-ci, le rapport des coefficients de réflexion possède un minimum, qui est l'effet de l'équilibre des bras seul. Le paramètre de la quantité de lumière a, en effet, été éliminé du fait de notre hypothèse qui a fait disparaître la variabilité du bruit de photons et donc le phénomène de compensation observé dans le paragraphe précédent. On peut voir la variation de la sensibilité en fonction de  $R_r$  dans la Figure 2.31 : sa dégradation est beaucoup plus rapide lorsque  $R_r$  passe en-dessous de sa valeur optimale. Par conséquent, si on travaille avec le capteur saturé, on fera en sorte de basculer vers les trop hauts taux de réflexion de la référence plutôt que l'inverse. La dérivation de l'équation (2.74) par rapport à  $R_r$  montre que le minimum est atteint lorsque  $R_r = R_{inc} \approx$  $R_o$ , c'est-à-dire lorsqu'on respecte l'équilibre des bras de l'interféromètre, sans faire la distinction entre lumière cohérente ou incohérente. Il est à noter que le rapport des coefficients de réflexion du rapport



FIGURE 2.31 – Sensibilité en fonction du coefficient de réflexion du miroir de référence dans le cas de l'interféromètre de Linnik en supposant le capteur presque à saturation. Cette courbe a été tracée avec  $e_{sat} = 200000$  et  $R_{inc} = 0.1$  %. Le minimum est atteint lorsque  $R_r = R_{inc}$ , c'est-à-dire à l'équilibre des bras de l'interféromètre, où le contraste des franges est maximisé. La dégradation de la sensibilité est plus douce quand  $R_r > R_{inc}$ .

signal à bruit n'est autre que le contraste des franges du signal lumineux. L'optimisation de la sensibilité peut donc être résumée ainsi : à capteur saturé, il faut maximiser le contraste des franges de l'interféromètre.

# Sensibilité en pratique

Le capteur saturé est une hypothèse forte qui s'applique facilement avec la FF-OCM où on retrouve une expression de la sensibilité très proche de l'équation (2.74) [60], mais cela est plus difficile avec la LC-OCT où on collecte beaucoup moins de lumière. En effet, si l'on cherchait à prioriser l'équilibre des bras en LC-OCT, sachant que le taux de réflexion de la peau a été mesuré à environ 0,1% (cf. soussection 3.2.1), cela impliquerait l'égalité des taux de réflexion de la référence et de la peau, et donc la collection de seulement un millième de la puissance incidente sur le capteur. On sera donc la plupart du temps dans le régime du capteur non saturé, qui ne donne pas d'indication précise de la valeur de  $R_r$ pour optimiser la sensibilité, mais seulement une tendance à adopter qui est l'augmentation du nombre de photons collectés. En toute rigueur, ces calculs laissent penser qu'il faudrait donc prioriser dans un premier temps la quantité de lumière en augmentant  $R_r$  quitte à détériorer le contraste des franges, et qu'une fois la quantité de lumière collectée jugée suffisante, baisser  $R_r$  en maintenant la quantité de photons constante et en prenant soin de rester au-dessus de  $R_{inc}$ .

Dans la pratique, on utilise le plus souvent une simple interface air-verre comme surface de référence dans le bras de référence des systèmes de LC-OCT avec un interféromètre de Linnik, qui a un coefficient de réflexion de l'ordre de 3,4%, beaucoup plus grand que celui de la peau d'environ 0,1%, et qui permet d'obtenir de belles images. Les calculs ont en effet montré que la sensibilité était quasiment optimisée pour une très grande plage de  $R_r$  lorsque le capteur n'est pas saturé !

A noter que grâce à la cohérence spatiale de la source, il reste possible d'atténuer artificiellement le coefficient de réflexion de la référence en défocalisant la surface de référence devant l'objectif de référence sans perdre les franges d'interférence. En effet, comme les rayons lumineux proviennent d'une même source ponctuelle, deux d'entre eux restent capables d'interférer même s'ils n'empruntent pas exactement le même trajet dans les deux bras de l'interféromètre. La symétrie du trajet optique dans l'interféromètre de Linnik, et donc la présence de l'objectif de référence, reste tout de même importante pour ne pas déformer le plan de cohérence. Fondamentalement, en plus de l'atténuation de la lumière de référence, la défocalisation de la référence ferait varier la différence de marche entre les deux rayons. Ceci décalerait la position du plan de cohérence, qui peut néanmoins être compensée par le réglage du trajet optique dans l'air, comme illustré dans la Figure 2.22. Il est donc possible de vérifier expérimentalement le comportement de la sensibilité et la prévalence entre la quantité de lumière et le contraste des franges dans un interféromètre de Linnik.

# 2.4.5 Comparaison avec l'état de l'art

Le Tableau 2.1 [49] montre un comparatif des appareils optiques commercialisés dans le but de faire des images de peau *in vivo*, comme les appareils de LC-OCT. Ce tableau comprend les méthodes d'imagerie mentionnées dans la section 1.2 mais aussi les méthodes basées sur l'OCT explicitées dans ce Chapitre 2. La dernière ligne concerne les meilleures performances atteintes par la LC-OCT, ici basée sur l'interféromètre de Linnik.

L'appareil basé sur la RCM possède des caractéristiques similaires à la LC-OCT au niveau de la résolution latérale et du champ imagé. En revanche, on voit les limites de l'effet confocal dans la direction axiale et la pénétration. La RCM ne bénéficie pas du filtrage de cohérence temporelle de la LC-OCT qui permet de sélectionner uniquement les photons provenant du plan de cohérence et donc de supprimer des photons multidiffusés. Par conséquent, le sectionnement optique de la RCM, et donc sa résolution axiale, est moins bonne qu'en LC-OCT. De plus, la quantité de photons incohérents détectés augmente en RCM, ce qui amoindrit la sensibilité du système et donc sa pénétration.

| Technology   | View                 | Axial<br>resolution<br>(µm) | Lateral<br>resolution<br>(µm) | Lateral<br>field<br>(mm) | Penetration<br>(mm) |
|--|----------------------|-----------------------------|-------------------------------|--------------------------|---------------------|
| Reflectance Confocal Microscopy—<br>Vivascope <sup>®</sup> | En face              | 5                           | 1                             | 1.0 <sup>a</sup>         | 0.2                 |
| OCT (multibeam FD-OCT)—Vivosight®                          | En face, B-scan, 3-D | 5                           | 7.5                           | 6                        | 1                   |
| OCM (FF-OCM) <sup>b</sup> -SkinTell <sup>®</sup>           | En face, B-scan, 3-D | 3                           | 3                             | 1.5                      | 0.3                 |
| Nonlinear microscopy—DermaInspect®                         | En face              | 2                           | 1                             | 0.35                     | 0.2                 |
| LC-OCT°  | B-scan               | 1                           | 1                             | 1.2                      | 0.5                 |

TABLEAU 2.1 – Comparaison de la LC-OCT basée sur l'interféromètre de Linnik avec les autres dispositifs du commerce utilisés pour l'imagerie de la peau en 2018 [49]. La différence aujourd'hui est la capacité de la LC-OCT à faire de l'imagerie en face et 3D en plus des B-scans.

L'appareil basé sur l'OCT repose plus précisément sur la méthode de « multibeam FD-OCT » : plusieurs A-scans sont acquis en même temps grâce à la parallélisation de plusieurs faisceaux lumineux, en utilisant la FD-OCT pour chacun d'entre eux. La pénétration et le champ sont très grands, mais la contrepartie est la faible résolution du système dans les trois directions de l'espace. En effet, on rappelle que la FD-OCT ne déplace pas ses optiques dans la direction axiale et qu'il y a donc besoin d'une grande profondeur de champ. En conséquence, les optiques qui éclairent l'échantillon ne peuvent être que faiblement ouverts, ce qui détériore la résolution. La quantité de signal collectée est cependant très grande et donc la vitesse d'acquisition aussi. Malheureusement, la faible résolution de ce système ne permet pas de détecter efficacement les cancers cutanés de manière précoce.

L'appareil basé sur la FF-OCM possède une profondeur de pénétration correcte grâce à l'utilisation d'un spectre aux alentours de 1300 nm. Cependant, la résolution latérale est moins bonne que la LC-OCT. Cette technologie permet de faire de l'imagerie *in vivo*, mais le besoin d'un long temps d'exposition ou d'accumulation propres à cette méthode rendent l'affichage lent et augmentent le risque de flou de bougé.

L'appareil qui utilise la microscopie non linéaire possède une bonne résolution latérale et axiale, mais la profondeur de pénétration reste similaire à la microscopie confocale. En effet, ces deux méthodes bénéficient d'un filtrage confocal sans éliminer les photons multidiffusés. Le défaut principal de l'appareil est son champ très restreint à cause de son objectif de microscope de grandissement 40x et ouvert à 1,3.

Globalement, en comparaison des autres méthodes d'imagerie de la peau, la LC-OCT brille par sa capacité à imager profondément dans l'échantillon tout en conservant une résolution cellulaire. Elle profite en effet à la fois d'un effet confocal et du filtrage lié à la cohérence temporelle propre à l'OCT, qui, comme on le voit dans le Tableau 2.1, sont plus efficaces une fois combinés que séparément. Cette association est restée viable dans le domaine clinique grâce à la géométrie de l'éclairage et de la détection qui a permis un bon compromis entre vitesse d'acquisition et effet confocal, avec un objectif de microscope d'ouverture raisonnable.

# Chapitre 3 LC-OCT basée sur l'interféromètre de Mirau

Les systèmes de LC-OCT sont habituellement équipés d'un interféromètre de Linnik, qui a l'avantage de permettre un contrôle potentiel sur les deux bras de l'interféromètre de manière relativement aisée, notamment sur le bras de référence. On peut y régler indépendamment la mise au point, le matériau, l'épaisseur et l'inclinaison de la surface réflective de référence. En particulier, on peut jouer sur le trajet optique dans le bras de référence et donc avoir un contrôle fin sur la position du plan de cohérence. Ce dernier peut même être dynamiquement repositionné avec une platine piézoélectrique pour assurer la superposition de ce plan avec le plan focal de l'objectif de microscope du bras objet [41].

L'éclatement entre les différents éléments optiques et cette multiplication des degrés de liberté peuvent cependant présenter certains désavantages. Selon la méthode de scan dans la direction de l'axe optique, plusieurs éléments optiques doivent être déplacés, allant jusqu'aux deux objectifs de microscopes et un cube séparateur : le poids total participe alors au ralentissement global de l'acquisition des images. Il existe en outre une asymétrie entre les deux bras de l'interféromètre : bien que les interféromètres de Linnik soient équipés de deux objectifs de même modèle, une différence dans le trajet optique peut se faire ressentir, notamment en utilisant une grande ouverture numérique. Cette asymétrie est d'autant plus flagrante pendant l'acquisition de volumes 3D, lorsqu'un miroir galvanométrique dans le bras objet balaye la ligne de lumière dans l'échantillon mais pas sur la référence, causant ainsi la séparation des plans de cohérence et de focalisation en bord de champ.

L'axe de travail principal de cette thèse, c'est-à-dire son apport de nouveauté dans les systèmes de LC-OCT, a porté sur la réduction de ces problèmes, en conjonction avec la volonté d'un premier pas vers la miniaturisation du système optique de la LC-OCT. Notre regard s'est ainsi tourné vers l'étude d'un interféromètre différent, à savoir l'interféromètre de Mirau.

Ce chapitre est consacré à l'intégration de l'interféromètre de Mirau dans un système de LC-OCT. Le montage expérimental sera tout d'abord décrit de manière globale pour donner au lecteur une vue d'ensemble. On entrera ensuite dans les détails en commençant par exposer les choix qui ont défini le design de l'interféromètre de Mirau en lui-même, puis les méthodes utilisées pour l'amélioration de la vitesse d'acquisition. La section suivante sera consacrée à l'imagerie en trois dimensions. On terminera finalement par les performances du système optique.

# 3.1 Montage expérimental

Cette section présente une vision schématique et globale du montage expérimental qui a été monté dans le but d'étudier l'intégration de l'interféromètre de Mirau dans un système d'imagerie de LC-OCT. Elle montre le système en surface et le lecteur pourra s'y référer pour se repérer lors des explications plus approfondies des prochaines sections de ce chapitre.

# 3.1.1 Description de l'interféromètre de Mirau

Nous avons vu dans la sous-section 2.3.4 que la superposition rigoureuse des plans de cohérence et de focalisation nécessite un contrôle sur le bras objet et le bras de référence de l'interféromètre, indépendamment l'un de l'autre. Cependant, l'espace exigu disponible au sein de l'interféromètre de Mirau rend le mouvement du bras de référence difficile. Heureusement, bien que la translation du bras objet reste indispensable dans le cadre de la TD-OCT pour scanner l'échantillon en profondeur, celle du

bras de référence peut être remplacée par l'utilisation d'un milieu d'immersion dont l'indice se rapproche des échantillons que nous voulons scanner, à savoir la peau.

Les interféromètres de Mirau à immersion dans l'huile étant commercialement indisponibles, nous avons eu besoin d'en fabriquer un par nous-mêmes pour répondre à nos besoins spécifiques à partir de composants à disposition. Grâce aux systèmes de LC-OCT basés sur l'interféromètre de Linnik, nous avions déjà établi que les objectifs de microscope de grandissement 20x fournissaient une résolution et un champ suffisants pour notre application. Mais l'immersion dans de l'huile est généralement réservée aux objectifs de microscope à plus grands grandissement et ouverture numérique, et donc aux objectifs à faible distance de travail. Nous avons donc basé l'interféromètre sur l'objectif qui se rapprochait le plus de ce que nous cherchions : UMPLFLN20XW d'Olympus, de grandissement 20x, d'ouverture numérique 0,5, de distance de travail 3,5 mm, et à immersion dans l'eau.

Un schéma détaillé de l'interféromètre de Mirau fait sur-mesure est représenté sur la Figure 3.1. Il est composé de l'objectif de microscope, d'un miroir de référence et d'une séparatrice. Le miroir de référence est une couche d'or de 200 nm d'épaisseur de forme rectangulaire (1100  $\mu$ m × 620  $\mu$ m,  $x \times y$ ) sur une lame de verre de 170  $\mu$ m d'épaisseur collée sur le dernier dioptre de l'objectif de microscope avec de la colle UV (Vitralit VBB-1). Le coefficient de réflexion du miroir de référence à la longueur d'onde 700 nm est  $R_r = 96\%$ . La séparatrice est constituée d'une couche de silicium amorphe hydrogénée (a-SiH) déposée sur une lame de silice fondue de 500  $\mu$ m d'épaisseur accrochée à l'objectif via une petite cuve. L'épaisseur de la couche de a-SiH a été ajustée à 9 nm pendant le dépôt. Le taux de réflexion de la séparatrice, mesuré à  $R_{bs} = 11\%$  à la longueur d'onde 700 nm, est proche de l'optimum pour maximiser le rapport signal à bruit pour l'imagerie de la peau (cf. les calculs et la discussion dans la sous-section 3.2.1). La position axiale de la séparatrice est ajustée de manière à focaliser la ligne de



FIGURE 3.1 – Schéma détaillé de l'interféromètre de Mirau sur-mesure. Les axes x, y et z sont représentés pour une meilleure visualisation spatiale. Les lignes rouges représentent le trajet emprunté par la lumière incidente dans le plan non affecté par la lentille cylindrique. La ligne de lumière est parallèle à l'axe x. Le système interférométrique est constitué du miroir de référence et de la séparatrice. Le premier est une couche d'or déposée sur une fine lame de verre collée à l'objectif, et la seconde est collée à une petite cuve, elle-même vissée sur l'objectif. La hauteur de la petite cuve peut donc être ajustée afin de faire la mise au point de la ligne incidente sur le miroir de référence. L'objectif, le miroir de référence et la séparatrice sont dans une plus grande cuve et translatés verticalement par le PZT (platine de translation piézoélectrique) pour balayer l'échantillon dans la profondeur. Les cuves sont remplies d'huile d'immersion, qui est de l'huile de silicone. L'échantillon est séparé de l'interféromètre par une lame de verre en silice fondue.

lumière sur le miroir de référence. L'échantillon est séparé de l'interféromètre par une lame de silice fondue de 500  $\mu$ m d'épaisseur collée à une plus grande cuve fixée, afin que les mouvements de l'échantillon, imagé *in vivo*, soient réduits en le plaquant contre la lame de verre. La platine de translation linéaire piézoélectrique assure le balayage de l'échantillon dans la profondeur en translatant à la fois l'objectif de microscope, le miroir de référence et la séparatrice. L'interféromètre est immergé dans de l'huile de silicone (378321, Aldrich Chemistry) dont l'indice de réfraction n = 1,4 est proche de celui des tissus de la peau. Cela permet de limiter la différence de dispersion chromatique entre les deux bras de l'interféromètre et de maintenir la superposition des plans de cohérence et de focalisation pendant le scan dans la profondeur de l'échantillon.

Le fait que le substrat de la séparatrice et la lame de verre de la grande cuve soient toutes les deux en silice fondue et de la même épaisseur assure la symétrie des deux bras de l'interféromètre en termes de trajet optique. En effet, si l'on considère un rayon incident qui entre dans l'interféromètre, il se sépare en un rayon dans le bras objet et en un autre dans le bras de référence au niveau du bas de la séparatrice, où se trouve le dépôt. Si l'on suit le rayon dans le bras objet, il traverse une fois la lame de verre, se réfléchit sur l'échantillon, retraverse la lame de verre, puis le substrat de la séparatrice : il a traversé trois fois la même distance dans de la silice fondue. De même, le rayon dans le bras de référence traverse le substrat de la séparatrice, puis se réfléchit sur le miroir de référence, et traverse deux fois de suite le substrat de la séparatrice. Par construction de l'interféromètre, les plans de cohérence et de focalisation sont donc bien superposés lorsque le haut de l'échantillon est éclairé, mais cela ne sera plus forcément vrai en éclairant à l'intérieur de l'échantillon, à cause des potentielles différences d'indice optique entre le milieu d'immersion et l'échantillon.

# 3.1.2 Description du montage optique

Le montage optique global du montage de LC-OCT équipé de l'interféromètre de Mirau est inspiré de ceux préexistants et basés sur l'interféromètre de Linnik. Il est représenté schématiquement dans la Figure 3.2. Un laser supercontinuum (SMHP-80.2, Leukos) émet de la lumière à large spectre et spatialement cohérente puis est injectée dans le montage à travers une fibre optique monomode et un



FIGURE 3.2 – Schéma du système LC-OCT basé sur l'interféromètre de Mirau. CSP : cube séparateur polarisant,  $\lambda/4$  : lame quart d'onde achromatique, PZT : platine de translation linéaire piézoélectrique, IM : interféromètre de Mirau. Les traits pleins rouges représentent le faisceau laser dans le plan de la figure, tandis que les traits en pointillé le représentent dans un plan orthogonal. La lentille cylindrique focalise le faisceau laser dans une direction pour éclairer l'échantillon selon une ligne. Le miroir galvanométrique dévie le faisceau dans l'interféromètre de Mirau pour balayer la ligne de lumière dans le plan focal de l'objectif de microscope. L'interféromètre de Mirau est fixé sur la platine piézoélectrique afin de balayer la ligne de lumière dans la direction axiale. La ligne de lumière dans le plan focal de l'objectif est conjuguée au capteur de la caméra linéaire à travers une lentille de tube.

collimateur achromatique. A sa suite, un miroir dichroïque passe-bas (DMSP1000R, Thorlabs) permet de rejeter les longueurs d'onde supérieures à 1000 nm dans le but de supprimer le pic à 1064 nm de la pompe utilisée pour générer le continuum. Le faisceau laser collimaté traverse une lentille cylindrique de 100 mm de focale (LJ1567RM-B, Thorlabs) pour générer une ligne de lumière dans le plan focal de l'objectif. L'échantillon est alors éclairé avec une puissance de 55 mW. Passer à travers un cube séparateur large bande et polarisant (CCM1-PBS252/M, Thorlabs) linéarise la polarisation du faisceau laser, qui devient ensuite circulaire grâce à une lame quart d'onde achromatique (AOWP10M-980, Thorlabs). Un scanner galvanométrique (6220H, Cambridge Technology) redirige le faisceau laser dans un interféromètre de Mirau sur-mesure dans le but de balayer la ligne de lumière dans le plan focal de l'objectif de microscope. L'interféromètre de Mirau est fixé à une platine de translation linéaire piézoélectrique (P-628.1CD, Physik Instrumente) pour balayer la ligne de lumière dans l'échantillon dans la direction axiale, c'est-à-dire dans la profondeur de l'échantillon. La lumière réfléchie par l'échantillon et collectée par l'objectif se repolarise linéairement grâce à la lame quart d'onde mais orthogonalement par rapport à la polarisation incidente de façon à être totalement réfléchie par le cube séparateur polarisant. L'utilisation de ce cube en conjonction avec la lame quart d'onde augmente la quantité de lumière collectée par un facteur deux par rapport à l'utilisation d'un cube séparateur 50 : 50 seul. La ligne de lumière dans le plan focal de l'objectif est conjuguée au capteur d'une caméra CMOS linéaire de 2048 pixels (Octoplus, Teledyne e2v) à travers une lentille de tube de 200 mm de focale (TTL200-B, Thorlabs), résultant en un champ latéral de 940 µm.

# 3.1.3 Description de l'électronique pour l'acquisition d'image

Le montage optique est entouré d'appareils électroniques permettant l'acquisition, le calcul et l'affichage des images de manière précise et rapide, en centralisant le contrôle de la plupart d'entre eux vers l'ordinateur.

La Figure 3.3 représente un schéma fonctionnel du montage LC-OCT basé sur l'interféromètre de Mirau où sont mises en lumière les interactions entre les appareils électroniques et l'interféromètre. Les appareils ayant un lien direct avec l'ordinateur, qui sont donc contrôlés par l'utilisateur à travers un programme associé, sont :

- Le laser, qui sert à illuminer l'échantillon et dont on contrôle la puissance ;
- Le contrôleur du PZT, qui permet de contrôler le mouvement du PZT afin de scanner l'échantillon dans la direction de l'axe optique ;
- L'appareil multifonction Analog Discovery 2 (AD), qui génère les signaux TTL à envoyer à la caméra pour enregistrer les images lignes aux bons moments et corriger la non-linéarité du mouvement du PZT ;
- La carte « field-programmable gate arrays » (microEnable 5 marathon VCL, SiliconSoftware, notée FPGA) qui collecte les données de la caméra, les traite en partie et les affiche à l'écran de l'ordinateur ;
- La caméra linéaire, qui numérise l'information physique provenant de la réflexion de la ligne de lumière sur l'échantillon et dont on peut régler les paramètres.

La plupart des appareils communiquent entre eux pour se synchroniser et collecter l'information physique aux bons moments : au début de l'acquisition de chaque B-scan, le contrôleur du PZT envoie un TTL à l'AD pour lui indiquer que l'acquisition débute ; l'AD, en réponse, envoie une série de signaux TTL à la caméra en passant par la carte FPGA pour lui indiquer les dates auxquelles les images en ligne doivent être acquises ; la carte FPGA collecte ces images lignes, les concatène pour former une image 2D brute, qu'elle traite et affiche à l'écran. S'il y a besoin d'acquérir un volume 3D de l'échantillon, la carte FPGA envoie un signal à un générateur basse fréquence (33220A, Agilent Technologies, noté GBF) qui contrôle le mouvement du miroir galvanométrique afin de scanner latéralement la ligne de lumière dans l'échantillon, dans la direction y. Des traitements à effectuer à cette série d'images 2D interférométriques après leur acquisition, à savoir la démodulation, les traitements d'image et la



FIGURE 3.3 – Schéma fonctionnel du montage LC-OCT basé sur l'interféromètre de Mirau. AD : appareil multifonction Analog Discovery 2, FPGA : carte « field-programmable gate arrays », GBF : générateur basse fréquence, TTL : signal Transistor-Transistor Logic équivalent à une réponse logique positive servant à déclencher des événements comme l'acquisition d'une ligne. Le contrôleur du PZT envoie un TTL à l'AD lors du début du balayage axial, puis l'AD envoie plusieurs TTL à la caméra via la carte FPGA aux bons moments pour acquérir une succession de lignes, qui, concaténées, forment une image 2D interférométrique. Plusieurs images 2D interférométriques adjacentes sont acquises à l'aide du miroir galvanométrique. Une fois traitées, elles forment une image 3D.

concaténation, résultent l'obtention d'une image 3D de l'échantillon. Il est reste possible de ne pas utiliser le miroir galvanométrique pour n'acquérir que des images 2D en coupe.

# 3.2 Design de l'interféromètre de Mirau

Avant de me plonger dans l'étude de l'intégration de l'interféromètre de Mirau dans un système de LC-OCT, un premier design avait déjà été mis au point et fabriqué. Il a servi de référence et de point d'ancrage dans la recherche des points clés à optimiser durant le déroulement de ce projet. Cette section retrace les observations et choix qui ont été faits pour améliorer l'ergonomie et la qualité d'image fournie par un interféromètre de Mirau.

# 3.2.1 Choix de la séparatrice

L'une des difficultés principales lors du passage de l'interféromètre de Linnik à celui de Mirau est la miniaturisation de la séparatrice. L'interféromètre de Linnik permet en effet d'utiliser un cube séparateur optimisé pour avoir des taux de réflexion et de transmission plats et personnalisables dans une large gamme de longueur d'onde, mais il est difficile d'utiliser le même matériel dans les 3,5 mm de distance de travail devant l'objectif. La caractéristique principalement recherchée était la compacité, et c'est la méthode de dépôt de couche fine qui nous a permis d'y parvenir, avec l'aide de Pavel Bulkin du LPICM à l'Ecole Polytechnique.

# Les séparatrices

Dans les faits, nous avons d'abord reçu une série de séparatrices avec des coefficients de réflexion différents constituées de verre de silice fondue avec une couche de silicium amorphe hydrogénée (a-SiH) d'une dizaine de nanomètres d'épaisseur fabriquées par Pavel Bulkin, dont les coefficients de réflexion et de transmission ont été simulés au préalables (cf. Figure 3.4). Celle qui nous intéresse a une



FIGURE 3.4 – Simulation des coefficients de réflexion et de transmission de la séparatrice avec une couche de a-SiH de 9 nm d'épaisseur. La courbe bleue du bas est le coefficient de réflexion en utilisant l'huile de silicone comme milieu d'immersion, celle plus haut en étant dans l'air. De même, la courbe rouge du haut est la transmission dans l'huile de silicone, et celle du bas dans l'air. Globalement, on a R + T = 1 de 600 à 1000 nm qui est la gamme de longueurs d'onde de la source. Les coefficients ne sont pas constants sur toute la gamme, mais cela n'a pour effet qu'un décalage de quelques nanomètres du barycentre du spectre détecté. La simulation prévoit un taux de réflexion d'environ 13% à 700 nm.

couche de 9 nm d'épaisseur dont le coefficient de réflexion simulé est de l'ordre de 13%, ce qui entrainerait un équilibre des bras comparable à l'interféromètre de Linnik avec une lame de silice fondue en référence. Le coefficient a été mesuré à 11% à 700 nm en mettant la séparatrice sur l'emplacement des échantillons et en appliquant de l'huile de silicone dessus, puis en comparant la quantité de lumière réfléchie avec celle d'une interface silice fondue-air. L'interféromètre de Mirau avait été démonté pour l'occasion, et le système optique avait simplement été utilisé comme microscope avec un éclairage et une détection en ligne.

La séparatrice en question permet-elle de d'optimiser les images rendues par l'interféromètre de Mirau ? Un calcul de sensibilité permettrait de le vérifier. Cependant, nous avons déjà vu dans la soussection 2.4.4, qui traite la sensibilité dans l'interféromètre de Linnik, que nous avons besoin de la valeur numérique des différents coefficients de réflexion en jeu dans le système pour calculer la sensibilité, que nous allons expliciter dans le prochain paragraphe.

### Valeurs numériques des coefficients de réflexion

Avant de pouvoir mettre des nombres par rapport à la sensibilité, nous avons besoin de connaître les coefficients de réflexion de la peau  $R_{inc}$  et du miroir de référence  $R_r$  de l'interféromètre de Mirau. La référence est la couche d'or épaisse de 200 nm et qui joue le rôle de miroir métallique. A la longueur d'onde centrale de la source de 700 nm, la connaissance de l'indice optique complexe de l'or [61] et des équations de Fresnel permettent de calculer le coefficient de réflexion à l'interface or-huile de silicone :

$$R_r = 96\%$$
 (3.1)

 $R_{inc} \approx R_o$  est le taux de réflexion incohérent de l'échantillon dans le bras objet. Il a été mesuré par comparaison avec la réflexion sur l'interface air-silice fondue, jonction entre le système optique et l'échantillon. Cette étude a été menée à l'aide d'un interféromètre de Linnik dont le bras de référence a été coupé, à la longueur d'onde centrale 800 nm. En connaissant l'indice optique de la silice fondue à cette longueur d'onde [62] et en utilisant les coefficients de Fresnel en incidence normale, on en déduit

le coefficient de réflexion de l'interface qui vaut 3,4%. Cette valeur a servi à convertir les niveaux de gris des images brutes prises avec le microscope pour obtenir le coefficient de réflexion de la peau au niveau du dos de ma main et du côté de mon index jusqu'à une profondeur d'environ 300  $\mu$ m. La Figure 3.5 représente les courbes obtenues, avec la mise en évidence de la position initiale de l'interface airsilice fondue. Les pics sont des interfaces réfléchissantes, par exemple l'interface silice fondue-couche cornée, ou encore épiderme-derme. Les courbes montrent des signes de bruit dus à la faible quantité de photons, mais on distingue facilement un coefficient de réflexion de l'ordre de 0,07% en moyenne à l'intérieur de la peau, qu'on se permet d'arrondir à 0,1% pour des facilités de lecture et aussi du fait de la non-représentativité des différences chez chaque individu et des autres régions du corps. Ces mesures donnent seulement un ordre de grandeur de  $R_{inc}$  utilisé pour observer les tendances de la sensibilité des systèmes de LC-OCT. Quand bien même, Chen et al. ont mesuré des valeurs de  $R_{inc}$  concordantes dans une situation similaire, inférieures à 0,1% [63]. On gardera donc la valeur suivante :

$$R_{inc} = 0,10\% \tag{3.2}$$

Ces valeurs permettront de faire les applications numériques des calculs de sensibilité.

# Calcul d'optimisation

Le taux de réflexion de la séparatrice de l'interféromètre de Mirau est un paramètre qu'il est possible d'optimiser dans le but de maximiser le rapport signal à bruit des images de LC-OCT, dans la même idée que le calcul de sensibilité avec l'interféromètre de Linnik de la sous-section 2.4.4. Plaçons-nous dans une situation similaire à la Figure 3.1, à la longueur d'onde centrale de la source, et considérons un rayon incident dont l'intensité lumineuse, dans le sens du module carré d'une amplitude complexe, est *I*. En négligeant les faibles réflexions verre-huile et l'absorption de la lumière par les matériaux, on peut écrire respectivement les intensités des rayons du bras objet et du bras de référence de la manière suivante :

$$I_o = I(1 - R_s)^2 R_o (3.3)$$

Et

$$I_r = I R_s^2 R_r \tag{3.4}$$

Avec  $R_s$  le taux de réflexion de la séparatrice et  $R_r$  celui du miroir de référence. Comme nous l'avons fait auparavant en traitant des échantillons diffusants, le taux de réflexion de l'objet  $R_o$  peut être



FIGURE 3.5 – Mesure de réflectivité de la peau au niveau du dos de la main et du côté d'un doigt, en trait plein rouge. La position initiale de l'interface silice fondue-air est indiquée en traits pointillés noirs. Le pic rouge correspondant à l'interface a légèrement varié à cause de la pression de la peau dessus. Les mesures de taux de réflexion sont de l'ordre de 0.07%.

considéré comme la somme de  $R_{coh}$  et  $R_{inc}$ , correspondant respectivement aux taux de réflexion de la lumière réfléchie dans le bras objet cohérente et incohérente avec la lumière réfléchie par le miroir de référence. On réécrit donc l'intensité provenant du bras objet :

$$I_o = I_{coh} + I_{inc} = I(1 - R_s)^2 (R_{coh} + R_{inc})$$
(3.5)

On cherche maintenant à calculer l'expression du rapport signal à bruit *RSB* afin de tenter de le maximiser en choisissant une valeur judicieuse de  $R_r$ . Nous l'avons déjà fait dans la sous-section 2.4.4 avec le calcul de sensibilité dans l'interféromètre de Linnik, qui sera notre nouveau point de départ. Nous allons aussi séparer le calcul en deux en fonction de la saturation du capteur ou non durant l'acquisition d'image.

# Sensibilité avec le capteur non saturé

Pour rappel, on suppose que la quantité de lumière est insuffisante pour saturer le capteur, mais assez grande pour que seul le bruit de photon soit pertinent. Il s'agit de la situation la plus vraisemblable en LC-OCT puisqu'on a tendance à manquer de lumière, contrairement à la FF-OCM. Nous avions, dans le cadre de l'interféromètre de Linnik (cf. équation (2.68)) :

$$RSB_{L} = \frac{8I_{t}T}{3\pi^{2}} \frac{R_{r,L}R_{coh,L}(z)}{R_{inc,L} + R_{r,L}}$$

$$\propto \frac{I_{r,L}I_{coh,L}}{I_{inc,L} + I_{r,L}}$$
(3.6)

Avec l'indice L pour indiquer qu'on se place dans l'interféromètre de Linnik, T la période temporelle des oscillations du signal au cours du scan, et  $I_t$  l'intensité lumineuse incidente, supposée constante dans ce paragraphe. Comme on utilise aussi l'algorithme de Larkin, on peut conserver les mêmes constantes devant le rapport des coefficients de réflexion. On réécrit le rapport signal à bruit obtenu avec l'interféromètre de Linnik en termes d'intensité lumineuse, où il suffit de remplacer les intensités par celles propres à l'interféromètre de Mirau afin d'obtenir le rapport signal à bruit et la sensibilité associés :

$$RSB = \frac{8I_t T}{3\pi^2} \frac{R_s^2 (1 - R_s)^2}{(1 - R_s)^2 R_{inc} + R_s^2 R_r} R_r R_{coh}(z)$$
(3.7)

Et

$$R_{min} = \frac{3\pi^2}{8I_t T} \frac{(1 - R_s)^2 R_{inc} + R_s^2 R_r}{R_r R_s^2 (1 - R_s)^2}$$
(3.8)

Contrairement à l'interféromètre de Linnik, il s'avère qu'avec l'interféromètre de Mirau, le contraste des franges et le bruit de photons ne se compensent plus et que la sensibilité puisse atteindre une valeur minimale en faisant varier  $R_s$ . En notant  $x = R_s$ , l'annulation de la dérivée de  $R_{min}$  par rapport à  $R_s$  se traduit par la résolution d'une équation du  $3^{\text{ème}}$  degré :

$$(1 + R_r/R_{inc})x^3 - 3x^2 + 3x - 1 = 0$$
(3.9)

Cette équation se résout analytiquement en utilisant des changements de variables judicieux puis la méthode de Cardan. Après quelques calculs fastidieux, on obtient l'unique racine réelle de cette équation :

$$R_{s,opt} = (1 + R_{inc}/R_r)^{-1} ((R_{inc}/R_r)^{1/3} - (R_{inc}/R_r)^{2/3} + R_{inc}/R_r)$$
(3.10)

Qui donne, après application numérique :

$$R_{s,opt} = 9,2\%$$
 (3.11)

La courbe de la sensibilité en fonction de  $R_s$  est tracée dans la Figure 3.6 où le minimum est atteint en  $R_{s,opt}$ , l'application numérique ayant été faite avec  $R_{inc} = 0,1\%$ ,  $R_r = 96\%$ , et  $I_tT = 4 \times 10^7$  photons, équivalent à des puits d'électrons remplis à moitié. Rappelons que la variation des coefficients de réflexion affecte deux phénomènes antagonistes qui jouent sur la valeur de la sensibilité : le contraste des franges et le bruit de photons. Contrairement à l'interféromètre de Linnik, l'effet du contraste des franges a des conséquences plus importantes que l'effet du bruit de photons et on retrouve donc une courbe qui rejoint celle de la Figure 2.31 où seul l'effet du contraste des franges était visible, au lieu d'une quasi-compensation entre les deux effets. On voit également que la dégradation de la sensibilité est forte quand  $R_s < R_{s,opt}$  et moins prononcée quand  $R_s > R_{s,opt}$ , ce qui est arrangeant puisque la séparatrice dont on dispose a un coefficient de réflexion mesuré à 11% à 700 nm ! Bien que son coefficient ne soit pas rigoureusement égal à  $R_{s,opt}$ , la sensibilité reste très proche du cas optimal : le RSB ne varie que de 1% par rapport à l'optimum. On considère donc le choix de la séparatrice optimisé pour l'interféromètre de Mirau !

#### Sensibilité avec le capteur saturé

Ici, l'hypothèse sur la source est une puissance suffisante en réserve pour qu'il soit possible de régler l'intensité lumineuse émise pendant l'acquisition-même des images de sorte à toujours avoir le capteur proche de la saturation. On atteindrait difficilement ce régime avec la LC-OCT, et d'autant plus avec l'interféromètre de Mirau dont le miroir de référence coupe de la lumière par rapport à celui de Linnik, mais on fait le calcul par souci d'exhaustivité. Dans le cadre de l'interféromètre de Linnik, nous avions l'expression suivante (cf. équation (2.73)) :

$$RSB_{sat,L} = \frac{128e_{sat}}{\pi^2} \frac{R_{r,L}R_{coh,L}(z)}{\left(R_{inc,L} + R_{r,L}\right)^2} \\ \propto \frac{I_{r,L}I_{coh,L}}{\left(I_{inc,L} + I_{r,L}\right)^2}$$
(3.12)



FIGURE 3.6 - Sensibilité en fonction du coefficient de réflexion de la séparatrice dans le cas de l'interféromètre de Mirau en supposant le capteur non saturé. Cette courbe a été tracée avec  $I_tT = 4 \times 10^7$  photons,  $R_{inc} = 0.1\%$  et  $R_r = 96\%$ . Le minimum est atteint lorsque  $R_{s,opt} = 9,2\%$ . La dégradation de la sensibilité est un peu plus douce quand  $R_r > R_{s,opt}$ .

Avec l'indice L pour indiquer qu'on se place dans l'interféromètre de Linnik et  $e_{sat}$  la capacité de charge du capteur, supposée ici constante. En injectant les intensités propres à l'interféromètre de Mirau, on obtient :

$$RSB_{sat} = \frac{128e_{sat}}{3\pi^2} \frac{R_s^2 (1-R_s)^2}{((1-R_s)^2 R_{inc} + R_s^2 R_r)^2} R_r R_{coh}(z)$$
(3.13)

Et

$$R_{min,sat} = \frac{3\pi^2}{128e_{sat}} \frac{((1-R_s)^2 R_{inc} + R_s^2 R_r)^2}{R_r R_s^2 (1-R_s)^2}$$
(3.14)

En notant  $x = R_s$ , l'annulation de la dérivée de  $\sqrt{RSB}$  par rapport à  $R_s$  se traduit par la résolution d'une équation du second degré :

$$(1 - R_r/R_{inc})x^2 - 2x + 1 = 0 ag{3.15}$$

Dont la racine comprise entre 0 et 1 est :

$$R_{s,sat,opt} = \frac{1 - \sqrt{R_r / R_{inc}}}{1 - R_r / R_{inc}}$$
(3.16)

Il est maintenant possible de faire l'application numérique de R<sub>s,sat,opt</sub> :

$$R_{s,sat,opt} = 3,1\%$$
 (3.17)

La Figure 3.7 représente la sensibilité dans l'interféromètre de Mirau, qui a une forme similaire à la sensibilité dans le cas de l'interféromètre de Linnik (cf. Figure 2.31), ce qui est normal puisqu'on fait varier l'équilibre des deux bras de l'interféromètre dans les deux cas, sous les mêmes hypothèses par rapport à la source. Il existe donc un minimum atteint en  $R_{s,sat,opt}$  mais la dégradation de la sensibilité est encore une fois moins prononcée lorsque  $R_s$  est supérieure à la valeur optimale. Les applications numériques montrent que  $R_{s,opt} \approx 3R_{s,sat,opt}$ , et donc que le choix de la séparatrice varie énormément en fonction des hypothèses faites sur la source. En LC-OCT, on suivra plutôt les résultats établis en régime non saturé pour que la variation du bruit de photons soit aussi prise en compte, mais si d'aventure il arrive que nous ayons un surplus de lumière, il deviendra intéressant de baisser la valeur de  $R_s$  pour suivre les résultats du régime saturé.

# 3.2.2 Miroir de référence et obturation

Le principe de fonctionnement de l'interféromètre de Mirau fait que le bras de référence est replié sur l'axe optique et non pas à 90°, comme dans l'interféromètre de Michelson. Le faisceau lumineux passant par le bras de référence interagit donc trois fois avec le miroir de référence : juste en sortant de l'objectif, en se focalisant sur le miroir, puis en retournant dans l'objectif. Le miroir de référence se trouve au milieu du trajet de la lumière et en gênera la propagation au sein de l'interféromètre. On parle d'obturation, qui est la principale faiblesse de l'interféromètre de Mirau, puisqu'elle diminue la quantité de lumière qui traverse le système optique tout en dégradant sa réponse impulsionnelle du fait de la diffraction par un obstacle – le miroir - dans le trajet de la lumière. On se concentre dans cette soussection à la perte de lumière engendrée par l'obturation et aux conséquences par rapport au choix des dimensions du miroir de référence.



FIGURE 3.7 – Sensibilité en fonction du coefficient de réflexion de la séparatrice dans le cas de l'interféromètre de Mirau en supposant le capteur presque à saturation. Cette courbe a été tracée avec  $e_{sat} = 200000$ ,  $R_{inc} = 0.1\%$  et  $R_r = 96\%$ . Le minimum est atteint lorsque  $R_{s,sat,opt} = 3,1\%$ , c'està-dire à l'équilibre des bras de l'interféromètre, où le contraste des franges est maximisé. La dégradation de la sensibilité est plus douce quand  $R_r > R_{s,opt}$ . Le comportement de la sensibilité est très similaire au cas de l'interféromètre de Linnik puisqu'on change fondamentalement le même paramètre : l'équilibre des bras, ou autrement dit le contraste des interférences.

# Mirau 1.0 : première mécanique et premier miroir $2 \text{ mm} \times 100 \text{ }\mu\text{m}$ pour de l'imagerie 2D

On disposait dans un premier temps d'une structure mécanique différente de celle exposée dans la Figure 3.1 pour maintenir l'interféromètre de Mirau en place. Elle est illustrée dans la Figure 3.8 [64] : la séparatrice et le miroir de référence étaient collés à une même pièce mécanique, de sorte à fixer la distance entre les deux éléments optiques et éviter d'altérer l'objectif. Il était ainsi possible de faire la mise au point sur le miroir de référence en vissant cette pièce mécanique. On décidera seulement plus tard de coller la référence sur l'objectif principalement pour minimiser la lumière perdue à cause de l'obturation. En effet, au départ, nous utilisions un miroir de référence en forme de rectangle très fin de dimensions 1800  $\mu m \times 100 \mu m$  pour faire de l'imagerie en 2D : les pertes de lumière étaient donc faibles.

Ce premier interféromètre de Mirau a permis d'acquérir des B-scans de qualité équivalente à ceux obtenus avec l'interféromètre de Linnik, en termes de résolution et de sensibilité [64], mais avec une vitesse d'acquisition améliorée. Les caractéristiques de l'imagerie avec ce miroir de référence seront exposées plus tard en comparaison avec d'autres miroirs de plus grandes tailles.

# Imagerie 3D : choix de l'objectif

Une amélioration très recherchée du montage est la possibilité de faire de l'imagerie 3D, ce qui nécessite de scanner la surface réfléchissante imagée dans la direction latérale y. L'interféromètre de Mirau étant symétrique, le miroir de référence doit lui aussi être scanné latéralement, et doit donc avoir la forme et la taille adéquates en fonction du champ latéral qu'on souhaite obtenir. En l'occurrence, étant donné que l'éclairage est en forme de ligne, le miroir de référence peut simplement être en forme de rectangle, plus ou moins large selon l'amplitude du scan latéral. Par conséquent, plus on veut avoir un grand champ latéral, plus le miroir de référence a besoin d'être grand, et l'obturation n'en sera que plus



FIGURE 3.8 – Schéma de la première version de l'interféromètre de Mirau. (a) Interféromètre de Mirau uniquement avec les pièces optiques participant aux interférences : la première cuve tient à la fois le miroir de référence et la séparatrice pour éviter un contact direct avec l'objectif. (b) Interféromètre de Mirau immergé dans une seconde cuve dont la fenêtre fait la séparation entre le système optique et l'échantillon. [64]

importante, jusqu'à entièrement bloquer la lumière incidente dans le cas extrême. Il faut cependant garder à l'esprit que l'obturation est fonction de la taille du miroir, mais aussi de la distribution de lumière dans le même plan : plus la distribution sera spatialement large, plus il sera facile pour la lumière incidente de traverser l'interféromètre sans être bloquée par le miroir. Cette distribution de lumière est directement liée à l'ouverture numérique de l'objectif qu'on utilise, car elle détermine la taille du cône de lumière qui illumine un point de l'échantillon, comme illustré sur la Figure 3.9. En effet, théoriquement, et en ne prenant pas en compte l'effet de la lentille cylindrique, le diamètre D de cette tache de lumière peut être déterminée simplement en connaissant l'ouverture numérique ON et la distance de travaille  $D_T$  de l'objectif dans un milieu d'indice  $n_{im}$ :

$$D = 2D_T(n_{im}) \tan a \sin(ON/n_{im})$$
(3.18)

Pour nos objectifs en particulier, les informations inscrites sur la datasheet sont vérifiées quand on utilise de l'eau comme milieu d'immersion, de sorte à avoir  $n_{im} = 1,33$  et  $D_T = 3,5$  mm, pour des objectifs 10x ( $ON_{10x} = 0,3$ ) ou 20x ( $ON_{20x} = 0,5$ ). Après application numérique, on a  $D_{10x} = 1,62$  mm et  $D_{20x} = 2,84$  mm. Pour un champ latéral donné, la quantité de lumière perdue est donc plus importante en utilisant un objectif 10x que 20x. De plus, le diamètre du champ latéral maximal vaut respectivement 2,65 mm et 1,33 mm pour le 10x et le 20x. Il est donc impossible d'utiliser tout le champ de l'objectif 10x avec un interféromètre de Mirau, car la lumière ne passerait plus. En suivant un raisonnement similaire, on pourrait se dire qu'utiliser un objectif de plus grands grandissement et ouverture numérique serait bénéfique : certes, l'obturation serait minimisée, cependant, le champ latéral serait aussi réduit et la meilleure capacité de résolution inutile. En outre, le dernier dioptre des objectifs 40x de la même gamme (LUMPLFLN40XW, Olympus) n'est plus plan, ce qui augmente la complexité du montage pour positionner le miroir de référence. Toutes ces raisons ont confirmé l'utilisation d'un objectif 20x pour l'interféromètre de Mirau.



FIGURE 3.9 – Influence de l'ouverture numérique sur la taille du cône de lumière provenant d'un point sur l'axe optique. La distance de travail est influencée par l'indice du milieu d'immersion.

## Choix de la taille du miroir de référence

Les réflexions du paragraphe précédent permettaient un dimensionnement grossier du système qui a permis de voir que la construction du Mirau était possible. Il faut à présent affiner la réflexion afin de trouver un compromis satisfaisant entre le champ latéral et la quantité de lumière transmise. Pour cela, un banc optique a été monté dans le but d'imager et de quantifier la distribution de lumière sortant de l'embout de l'objectif (cf. Figure 3.10). Il consiste en l'utilisation d'un microscope en face de l'objectif étudié pour en agrandir l'image et la former sur une caméra 2D. Du film plastique utilisé comme diffuseur a été plaqué contre l'embout de l'objectif pour homogénéiser la diffusion de la lumière dans toutes les directions. Un des objectifs de microscope 10x a été utilisé pour fabriquer le microscope imageur. Bien qu'il travaille en conjugaison infini-foyer, nous l'avons utilisé pour faire des conjugaisons à distance finie et l'avons translaté le long de l'axe optique pour modifier le grandissement de l'image. Le but de l'expérience étant des mesures photométriques et non la formation précise d'images, nous avons jugé cette méthode acceptable. Ce montage a d'ailleurs été utilisé avec un objectif 5x pour imager tout le diamètre du dernier dioptre de l'objectif étudié, connu précisément grâce à sa datasheet, afin de confirmer le diamètre de tache donné par l'équation (3.18) et calibrer les dimensions des images : les mesures expérimentales correspondaient à la théorie à  $\pm 0.05 \ mm$  (cf. Figure 3.11). Des images de la distribution lumineuse sur l'embout de l'objectif ont donc été acquises, avec et sans lentille cylindrique, pour être traitées sur MATLAB et déterminer en particulier la quantité de lumière perdue (cf. Figure 3.12). On peut y observer l'effet de la lentille cylindrique, de 100 mm de focale et placée de la même manière que pendant l'acquisition des images, qui ne fait qu'étaler la distribution de lumière dans une seule direction : elle défocalise le faisceau lumineux dans une direction et facilite la transmission de la lumière dans l'interféromètre. Quant à l'étude photométrique, des masques numériques ont été appliqués au milieu des taches lumineuses des images pour annuler la valeur des pixels associés aux rayons lumineux bloqués par le miroir de référence simulé, a priori dans le cas où le moins de lumière serait transmise. Pour faire les mesures photométriques les plus proches de la réalité, chaque image utilisée sur MATLAB était la moyenne de 20 images, le « courant d'obscurité » a été soustrait, et un banc optique annexe avait été monté pour calibrer la réponse photométrique de la caméra 2D à l'aide de polariseurs linéaires de bonne qualité, c'est-à-dire avec un coefficient d'extinction de 100 000 : 1. Il était alors possible d'obtenir le taux d'obturation en termes d'énergie, défini comme le rapport du flux lumineux avec application du masque sur le flux sans masque :

$$t_{obt} = \Phi_{avec \ masque} / \Phi_{sans \ masque} \tag{3.19}$$



FIGURE 3.10 – Schéma de principe du banc optique utilisé pour l'observation de l'embout de l'objectif étudié. L'objectif imageur agrandit le plan du diffuseur et en forme une image sur le capteur. Le diffuseur est un morceau de film plastique diffusant plaqué contre l'objectif.



FIGURE 3.11 – Observation de l'embout de l'objectif étudié grâce au montage décrit à la Figure 3.10 avec un éclairage sans lentille cylindrique. Cette image a été acquise avec un objectif 5x afin d'avoir un plus grand champ et pouvoir observer les bords du dernier dioptre de l'objectif. L'image a été intentionnellement saturée pour faire des mesures de diamètres. Une claire délimitation est en effet observable au bord de la tache de lumière.



FIGURE 3.12 – Images de l'embout de l'objectif 20x obtenues avec le montage de la Figure 3.10. La luminosité a été augmentée et le contraste abaissé pour mieux voir la forme des taches lumineuses. (a) Eclairage sans lentille cylindrique. (b) Eclairage avec la lentille cylindrique de 100 mm de focale. (c) Application du masque numérique de taille 1100  $\mu m \times 620 \mu m$  sur l'image (b). Le taux d'obturation pour ce masque est égal à 31%.

Ce paramètre a été une aide pour choisir la taille des miroirs de référence potentiels, dont les résultats ont été regroupés dans le Tableau 3.1. La longueur des miroirs potentiels a été choisie en fonction du champ du système optique dans la direction x, qui est de 940 µm, en laissant un peu de marge sur les bords. Les miroirs de plus grandes dimensions ont été étudiés pour potentiellement modifier la lentille de tube et donc le champ latéral. En se basant sur les images obtenues avec le miroir en forme de ligne et des conditions expérimentales pour les obtenir, nous avons jugé de manière subjective que le laser avait assez de réserve de puissance pour se permettre une perte de puissance de 31% avec un miroir de taille 1100 µm × 620 µm, voire plus.

# Processus de fabrication des miroirs

Pour rappel, les miroirs de référence sont constitués d'un dépôt d'or de 200 nm d'épaisseur sur des lames couvre-objet de microscope de 170  $\mu$ m d'épaisseur. Les motifs sont dans un premier temps dessinés par lithographie UV, puis l'or est déposé par évaporation par canon à électrons. Ces dépôts ont été faits par Anne-Lise Coutrot, ingénieure du Laboratoire Charles Fabry.Un masque est nécessaire pour le dessin des motifs, et du fait de la petite taille des miroirs, peut contenir 36 motifs différents au maximum. Nous avons donc fait faire un masque avec des motifs rectangulaires de différentes tailles comprises dans le Tableau 3.1.

J'avais travaillé sur quelques miroirs pour l'interféromètre de Mirau, je savais donc que le centrage du miroir de référence lors de la fabrication et surtout du collage sur l'embout des objectifs n'allait pas être aisé. J'ai donc profité de la commande de ce nouveau masque pour incorporer un simple marquage autour de chaque rectangle : un cercle de quelques micromètres d'épaisseur qui ne devait pas gêner le passage de la lumière. Dans ce but, il suffisait que le diamètre de ce cercle soit supérieur à la somme du diamètre de tache  $D_{20x} = 2,84 mm$  en sortie de l'objectif et du champ latéral de l'objectif de 1,33 mm, un cercle de 5 mm de diamètre était donc suffisant.

L'étape de la lithographie se passe de la manière suivante : tout d'abord, une couche de « résine positive de type AZ » est déposée par enduction sur le substrat, c'est-à-dire la lame couvre-objet. Elle est ensuite recuite à l'aide d'une plaque chauffante dans le but de la compacter par évaporation d'une certaine quantité de solvant. Le rayonnement UV permet de modifier chimiquement cette résine pour qu'elle devienne soluble dans un développeur, ce qui explique le terme « positif ». Une résine négative serait soluble de base et se réticulerait une fois éclairée par le rayonnement UV. Le masque, quant à lui,

| Taille du miroir ( $\mu$ m $	imes$ $\mu$ m) | Taux d'obturation |
|---|-------------------|
| 1800 	imes 100                              | 8%                |
| 1800 × 200                                  | 14%               |
| 1100 × 620                                  | 31%               |
| 1100 × 820                                  | 40%               |
| <b>1100 × 1100</b>                          | 70%               |
| 1300 	imes 100                              | 6%                |
| $1300\times730$                             | 41%               |
| $1300\times970$                             | 52%               |
| $1300\times1300$                            | 62%               |

TABLEAU 3.1 - Taux d'obturation pour différentes tailles de miroir de référence. Les motifs à 1100  $\mu$ m sont destinés à être utilisés par le système LC-OCT décrit en début de chapitre. Ceux à 1300  $\mu$ m seraient éventuellement utilisés en prenant une lentille de tube de focale plus courte pour réduire le grandissement et grandir le champ latéral. Ceux à 1800  $\mu$ m ont été utilisés pour l'imagerie 2D.

est constitué d'une plaque de verre entièrement recouverte d'une couche de chrome, sauf à certains endroits, de sorte que nos motifs soient définis par les surfaces sans chrome. Par conséquent, le verre laissant passer les UV à l'inverse du chrome, la lumière ne parvient à traverser le masque qu'à travers nos motifs. L'étape suivante est donc d'aligner le masque sur le substrat recouvert de résine, puis d'insoler le tout avec de la lumière UV dans le but de rendre la résine soluble seulement aux endroits constituant les motifs. A l'aide d'une immersion dans une solution basique de développement, la résine ainsi modifiée est dissoute, ce qui révèle les motifs.

Vient ensuite l'étape du dépôt métallique. On utilise pour cela la méthode d'évaporation sous vide par canon à électrons. Une illustration du procédé est montrée à la Figure 3.13 [65]. Dans une chambre sous vide, le substrat avec les motifs dans la résine est placé en face du métal sous forme solide, sur lequel on envoie un faisceau d'électrons pour l'évaporer dans la direction du substrat. L'évaporation est conduite orthogonalement au substrat en rotation pour assurer l'homogénéité en épaisseur sur l'ensemble de la surface. Une très fine couche de titane est d'abord déposée pour assurer l'adhésion entre le verre et l'or, ce dernier étant déposé seulement ensuite. Une fois l'évaporation terminée, on procède au « lift-off » : le substrat recouvert de métal est plongé dans l'acétone afin de dissoudre la résine et ne laisser que les motifs en métal sur le substrat.

Le dépôt d'or se fait en superposant le masque sur le substrat, qui, pour être incorporé dans l'interféromètre de Mirau, doit avoir un diamètre de 6 mm. Le centrage de petits motifs sur de petits substrats fragiles est difficile à réaliser avec précision par l'opérateur. C'est pourquoi nous avons décidé de faire le dépôt de 4 motifs similaires sur les lames couvre-objet entières, à découper ensuite en disques avec le motif au centre. Ce découpage se fait dans l'atelier d'optique de l'Institut d'Optique, et porte le nom de « débordage ». Il consiste à utiliser une tige de stub, c'est-à-dire une tige d'acier de diamètre calibré qui sera du même diamètre que le disque de verre final. Le verre à déborder est collé dessus et les bords sont usés à l'aide d'un tour et de grains abrasifs plus ou moins fins déposés sur une surface



FIGURE 3.13 – Processus de dépôt métallique par évaporation en utilisant un faisceau d'électrons. Le métal est vaporisé dans la direction du substrat dans un cône resserré de sorte à déposer la même épaisseur de métal sur toute la surface du substrat. [65]

plane en rotation. Finalement, le morceau de verre est décollé et nettoyé. L'or étant un métal ductile et le débordage une opération violente pour le verre, du doigté et de la patience sont absolument nécessaires pour mener chacune des sous-opérations qui constituent le débordage à bien.

# 3.2.3 Etude des aberrations après avoir détaché la fenêtre de l'objectif

Notre système de LC-OCT utilise de l'huile de silicone comme milieu d'immersion, capable de s'infiltrer dans la moindre interstice mécanique et difficile à nettoyer. Nous avons eu la mauvaise surprise de voir de l'huile à l'intérieur de certains de nos objectifs de microscope, ce qui les a rendus inutilisables. Cela a pourtant mené à une observation heureuse : le morceau de verre qui constitue l'embout des objectifs, qu'on va appeler « fenêtre des objectifs », est en fait décollable. Il s'agit d'une simple lame à faces parallèles de 1 mm d'épaisseur, avec un traitement anti-reflets uniquement sur la face à l'intérieur de l'objectif, car une interface air-verre réfléchit plus fortement qu'une interface verre-eau, qui est bien la dernière interface entre l'objectif et l'extérieur en cas d'utilisation nominale. Cette petite découverte a fait émerger un horizon de nouvelles idées : il devenait possible de remplacer la fenêtre de l'objectif avec ce qu'on voulait, notamment par une lame similaire sur laquelle le dépôt d'or aurait déjà été fait pour simplifier considérablement la mécanique ; il devenait aussi possible d'utiliser ce degré de liberté supplémentaire pour éventuellement corriger les aberrations qu'entrainaient l'utilisation du mauvais milieu d'immersion et l'introduction de lames de verre dans le trajet optique.

J'ai donc mené une étude théorique des aberrations au 3<sup>ème</sup> ordre sur l'objectif de microscope en cherchant à quantifier les aberrations introduites par l'huile de silicone et par l'ajout des lames, ainsi que les effets d'un mouvement de la fenêtre de l'objectif, que je vais retranscrire dans cette sous-section. Pour le confort du lecteur, seule la partie de la théorie nécessaire à la compréhension des résultats sera dans le corps du manuscrit. Les détails seront inclus en Annexe B.

#### Formalisme utilisé

La première étape est la description du formalisme choisi pour mener le raisonnement (cf. Figure 3.14). On considère le front d'onde à la sortie du système optique. Les coordonnées ont pour origine la position de la pupille de sortie du système. Le front d'onde de référence  $\Sigma'_0$ , « parfait » ou paraxial, est de forme circulaire de sorte que tous les rayons lumineux associés se recoupent au même point A'. Le front d'onde réel  $\Sigma'$  est déformé par rapport à  $\Sigma'_0$ , et tous les rayons sortant de la pupille de sortie en étant orthogonaux au front d'onde traversent le plan où se situe A' en des points différents. Dans le cas du rayon noir dessiné, il traverse le plan de A' au point A''. Ce qui nous intéresse est l'écart du trajet optique entre un rayon issu de  $\Sigma'_0$  et un rayon issu de  $\Sigma'$ . Cet écart est noté  $\overline{IJ}$ , qui est une valeur algébrique représentant la distance entre le front d'onde réel et la référence. Dans la direction z, on aura par exemple  $\overline{IJ}_Z = J_Z - I_Z$ , avec  $I_Z$  et  $J_Z$  les coordonnées des points correspondants selon la direction z.

On définit alors la fonction d'aberration  $W = n' \times \overline{IJ}$  avec n' l'indice optique de l'espace image, qui représente l'écart entre le front d'onde réel et celui de la référence en termes de chemin optique. Cette fonction d'aberration peut être développée en fonction des coordonnées de la position d'où émerge le rayon considéré depuis la pupille de sortie (coordonnées cartésiennes  $X_p$  et  $Y_p$  ou coordonnées polaires  $\rho$  le rayon et  $\varphi$  l'angle avec l'axe des  $X_p$  pour origine) et le champ image y' (hauteur de A'' dans le plan où se situe A'), ce qui donne le développement à l'ordre 4 suivant :

$$W = W_{000} + W_{200} y'^{2} + W_{400} y'^{4} + W_{020} \rho^{2} + W_{111} y' \rho \sin \varphi + W_{111} y' \rho \sin \varphi + W_{222} y' \rho^{2} \sin^{2} \varphi + W_{220} y'^{2} \rho^{2} + W_{311} y'^{3} \rho \sin \varphi$$
(3.20)



FIGURE 3.14–Illustration des paramètres utilisés dans le formalisme adopté pour l'étude des aberrations. On y a représenté le front d'onde réel  $\Sigma'$  et un front d'onde sphérique de référence  $\Sigma'_0$  en sortie de la pupille de sortie du système sur laquelle on se repère grâce aux coordonnées  $X_p$  et  $Y_p$  spécifiques à la pupille. Les rayons lumineux émanant de la même position de la pupille ne prennent pas la même direction selon le front d'onde suivi. La distance entre les deux fronts d'onde en suivant un rayon réel permet de définir la fonction d'aberration, en prenant en compte l'indice optique de l'espace image :  $W = n'\overline{I}$ .

En utilisant la notation de Hopkins :  $W_{ijk}y'^i \rho^j \sin^k \varphi$ . Les 3 premières lignes sont appelées respectivement le piston, le défocus et le tilt. La 4<sup>ème</sup> ligne comporte les aberrations géométriques du 4<sup>ème</sup> ordre en termes de fonction d'aberration, et du 3<sup>ème</sup> ordre en termes de décalages transversaux en x, y ou z. Ces aberrations géométriques sont respectivement appelées aberration sphérique, coma, astigmatisme, courbure de champ et distorsion. Une question se pose alors : quelles sont les aberrations qui affectent la qualité image de notre système LC-OCT, lorsqu'on utilise le mauvais milieu d'immersion et qu'on y ajoute des lames de verre ?

## Expression des coefficients d'aberration avec les sommes de Seidel

Ce paragraphe va permettre d'exprimer les coefficients d'aberration  $W_{ijk}$  en fonction de tracés de rayons, qu'on va simplifier en y incorporant les caractéristiques de notre système. La Figure 3.15 présente les paramètres utiles qui sont utilisés dans les sommes de Seidel : il s'agit d'un tracé de rayons provenant d'un objet de taille y traversant un dioptre sphérique avec les limitations de la pupille P, dans un espace d'indice n. Les sommes de Seidel permettent de calculer les coefficients des aberrations géométriques  $W_{ijk}$  pour une ouverture et un champ maximaux, lors du passage par ce dioptre :

$$\begin{split} W_{040} &= \frac{1}{8} S_I \qquad = \frac{1}{8} \Big( -(ni)^2 h \Delta \Big( \frac{\alpha}{n} \Big) + \Delta n C^3 \varepsilon h^4 \Big) \\ W_{131} &= \frac{1}{2} S_{II} \qquad = \frac{1}{2} \Big( -(ni)(nj) h \Delta \Big( \frac{\alpha}{n} \Big) + \Delta n C^3 \varepsilon h^3 k \Big) \\ W_{222} &= \frac{1}{2} S_{III} \qquad = \frac{1}{2} \Big( -(nj)^2 h \Delta \Big( \frac{\alpha}{n} \Big) + \Delta n C^3 \varepsilon h^2 k^2 \Big) \\ W_{220} &= \frac{1}{4} \Big( S_{III} + S_{IV} \Big) = \frac{1}{4} \Big( -(nj)^2 h \Delta \Big( \frac{\alpha}{n} \Big) + \Delta n C^3 \varepsilon h^2 k^2 - H^2 C \Delta \Big( \frac{1}{n} \Big) \Big) \\ W_{311} &= \frac{1}{2} S_V \qquad = \frac{1}{2} \Big( \frac{j}{i} \Big( S_{III} + S_{IV} \Big) + \Delta n C^3 \varepsilon h k^3 \Big) \end{split}$$
(3.21)



FIGURE 3.15 – Paramétrage utile pour les sommes de Seidel. Il s'agit du tracé de rayons pertinents provenant d'un objet jusqu'à un dioptre sphérique tout en traversant la pupille du système. Le rayon vert passe par le sommet de l'objet et par le centre de la pupille : c'est le rayon principal, qui détermine le champ. Le rayon rouge passe par la base de l'objet et le bord de la pupille : c'est le rayon marginal, définissant l'ouverture du système optique.

Avec  $C = 1/R_d$  la courbure de la surface,  $H = ny\alpha = n(k\alpha - h\theta)$  l'invariant de Lagrange,  $P = -C\Delta(1/n)$  la courbure de Petzval et  $\varepsilon$  le coefficient d'asphérisation du dioptre. Les  $\Delta$  désignent des variations.

Ces formules sont complexes mais se simplifient de manière significative en décrivant notre système optique plus précisément. On étudie dans notre cas l'influence de lames à faces parallèles, qui n'ont nul besoin d'asphérisation ( $\varepsilon \rightarrow 0$ ) et dont le rayon de dioptre infini entraine une courbure nulle ( $C \rightarrow 0$ ). Enfin, l'objectif de microscope possède une propriété très puissante qui est la télécentricité objet : la pupille d'entrée de l'objectif est donc rejetée à l'infini, de sorte que le rayon principal devienne parallèle à l'axe optique ( $\theta \rightarrow 0$ ,  $j \rightarrow 0$ ). D'après les expressions ci-dessus, il ne reste finalement que le coefficient de l'aberration sphérique  $W_{040}$  parmi les aberrations géométriques qui est non nul. Il reste tout de même l'influence des aberrations chromatiques qui ne sont pas de nature géométrique et qu'on laisse de côté. Il reste maintenant à trouver l'expression du coefficient de l'aberration sphérique dans notre configuration en particulier.

# Variation de l'aberration sphérique en rajoutant des lames de verres, en décalant la fenêtre de l'objectif et en utilisant de l'huile de silicone

Le théorème de Gouy stipule que la variation totale de la fonction d'aberration en sortie d'un système optique est la somme des variations de la fonction d'aberration de chaque dioptre traversé, pour les aberrations de  $3^{\text{ème}}$  ordre. On peut donc séparer la contribution des différents éléments modifiés dans notre système optique par rapport à l'utilisation nominale de l'objectif, puis les sommer. En particulier, la traversée d'un dioptre plan d'un milieu d'indice  $n_i$  vers un autre d'indice  $n_j$  fait varier le coefficient des aberrations sphériques de la valeur suivante :

$$\Delta W_{040DP} = \frac{x}{n_i} C_{ij} \tag{3.22}$$

Avec x la distance algébrique entre l'objet et le dioptre traversé,  $C_{ij} = \frac{1}{8} \tan^4 \alpha_i n_i^4 \left(\frac{1}{n_j^2} - \frac{1}{n_i^2}\right)$  et  $\alpha_i = a \sin \frac{ON}{n_i}$ . On en déduit la variation du coefficient en passant de la configuration initiale à celle sur-mesure (cf. Figure 3.16). Initialement, l'objectif est utilisé de façon nominale avec sa fenêtre en place avec de l'eau comme milieu d'immersion. Dans la configuration sur-mesure, la fenêtre est modifiée et déplacée,



FIGURE 3.16 – Schéma pour le calcul de la variation du coefficient des aberrations sphériques entre l'utilisation nominale de l'objectif et la configuration sur-mesure où la fenêtre est modifiée, ainsi que le milieu d'immersion.

une lame à faces parallèles est ajoutée et on utilise de l'huile de silicone comme milieu d'immersion. On obtient :

$$\Delta W_{040tot} = \frac{\overline{OA}}{n_a} (\overline{C_{av}} - \overline{C_{av0}} + C_{vh} - C_{v0e}) + \frac{D}{n_a} (-C_{vh} - \overline{C_{av}}) + \frac{d + d_l}{n_v} (-C_{vh}) + \frac{d^0}{n_v^0} C_{v0e}$$
(3.23)

Avec  $\overline{OA} = n_a \left(\frac{d^0}{n_v^0} + \frac{DT^0}{n_e}\right)$ , les indices a, v, v0 et h désignant respectivement l'air, le verre de silice fondue, le verre de la fenêtre originelle et l'huile de silicone. En particulier,  $n_v$  est l'indice de la silice

fondue, le verre de la fenetre originelle et l'nulle de silicone. En particulier,  $n_v$  est l'indice de la silice fondue et  $n_v^0$  du verre de la fenêtre. Les constantes  $\overline{C_{ij}}$  avec une barre sont négatives. Tous ces calculs sont explicités en annexe. Dans la dernière expression, les degrés de libertés sont le décalage D de la fenêtre et son épaisseur d. Même en fixant  $d = d^0 = 1 mm$ , la variation de D permet effectivement d'annuler  $\Delta W_{040tot}$ ! Un simple décalage de la fenêtre du côté de l'échantillon permet donc de compenser les aberrations sphériques engendrées par la mauvaise utilisation de l'objectif. Intuitivement, on pouvait effectivement penser que le remplacement de l'eau par un milieu plus réfringent nécessiterait, pour compenser, le remplacement du milieu d'une partie du trajet optique par un milieu moins réfringent. Ici, on remplacerait du verre par de l'air. Pour procéder à l'application numérique, on rappelle les caractéristiques de l'objectif : ON = 0,5,  $DT^0 = 3,5 mm$  et  $d^0 = 1 mm$ . En prenant les indices optiques à  $\overline{\lambda} = 700 nm$ , en supposant que la fenêtre était initialement en BK7 puis remplacée par de la silice fondue et  $d = d_l = 1 mm$ , le coefficient d'aberration sphérique s'annule avec le décalage de la fenêtre :

$$D_{annulation} = 140 \ \mu m \tag{3.24}$$

Un très léger décalage serait donc suffisant pour compenser la perte de qualité d'image ! Mais mettre cela en place demanderait des réglages très fins qui complexifieraient encore la mécanique de l'interféromètre de Mirau. Les applications numériques de cette sous-section sont à interpréter avec précaution puisque nous ne connaissons pas exactement le verre qui est utilisé pour fenêtre d'objectif à l'origine. On peut néanmoins être sûr qu'un décalage de quelques centaines de microns vers l'échantillon permettra d'atteindre le résultat voulu.

L'aberration sphérique fait en sorte que les rayons lumineux en sortie du système optique ne convergent plus tout à fait au même endroit. Cependant, il existe un point sur l'axe appelé « meilleur foyer » où le rapport de Strehl, c'est-à-dire le rapport du maximum de l'éclairement de la PSF réelle et celui de la tache d'Airy théorique, est maximisé, et qu'on trouve naturellement pendant les expériences en faisant la mise au point. En se plaçant au meilleur foyer, le coefficient d'aberration sphérique se trouve modifié :

$$\Delta W_{040totMF} = -\frac{\Delta W_{040tot}}{4} \tag{3.25}$$

C'est le coefficient à calculer pour quantifier nos aberrations et à comparer par exemple au critère de Rayleigh : si  $\Delta W < \overline{\lambda}/4$ , alors la qualité d'image reste bonne. On peut en particulier quantifier l'aberration sphérique dans le cas où l'objectif n'a pas été modifié contrairement à son environnement avec l'ajout de l'huile de silicone et des lames de verre devant :

$$\Delta W_{040env} = \frac{\overline{OA}}{n_a} (C_{v0h} - C_{v0e}) + \frac{d_l}{n_v} (-C_{vh}) + \frac{d^0}{n_v^0} (C_{v0e} - C_{v0h})$$
(3.26)

A  $\bar{\lambda} = 700 nm$ , on obtient  $\Delta W_{040envMF} = 0,60 \bar{\lambda}$ , ce qui ne respecte pas le critère de Rayleigh et rend donc la correction de l'aberration d'autant plus intéressante. Enfin, comme l'interféromètre de Mirau est compacté dans la distance de travail de l'objectif, il est important de connaître l'effet de l'environnement de la configuration sur-mesure sur cette caractéristique clé, notamment à cause du décalage du meilleur foyer. La variation de la position du plan focal initial vers le plan contenant le meilleur foyer est :

$$\Delta B = D + d - d^0 + DT - DT^0$$
(3.27)

Avec

$$DT = n_h \left( \frac{\overline{OA} - D}{n_a} - \frac{d}{n_v} \right) - \frac{2}{n_h} \frac{1}{\tan^2 \alpha_h} \Delta W_{040tot}$$
(3.28)

Après application numérique, on obtient une variation de position du meilleure foyer positive et inférieure à 200 µm, ce qui permet de relâcher les contraintes sur la mécanique du Mirau sans avoir à modifier drastiquement les plans basés sur la distance de travail nominale.

# 3.2.4 Mesure expérimentale du contraste en fonction de la position de la fenêtre

Afin de donner suite aux calculs de la sous-section précédente, des vérifications expérimentales ont été faites dans le but de confirmer la théorie. Avant de découvrir que la fenêtre des objectifs était décollable, nous avions remarqué qu'il était possible de dévisser une pièce en plastique autour de la fenêtre. Après avoir décollé la fenêtre de la partie métallique d'un objectif abîmé par de l'huile, je l'ai donc nettoyée et recollée sur la pièce en plastique, de sorte à régler la hauteur de la fenêtre pendant mes observations en vissant ou dévissant le tout.

L'idée de l'expérience était la suivante : dans un premier temps, nous voulions caractériser la dégradation de l'image en passant de la configuration nominale à la configuration {huile + lames}. Dans un deuxième temps, il fallait vérifier si le décalage de la fenêtre de l'objectif permettait de rattraper cette perte de qualité. Pour éviter les problèmes dus au montage de LC-OCT, notamment le manque d'imagerie en face à l'époque, nous avons utilisé un statif de microscope commercial BX51 de marque Olympus, comme les objectifs, équipé d'une caméra 2D pour l'acquisition des images. Le microscope a été utilisé en épiscopie, c'est-à-dire en imagerie par réflexion, en observant une mire de résolution métallique formé de motifs de différentes fréquences spatiales, chacun constitué de 5 barres verticales et 5 barres horizontales. La cohérence spatiale de la source modifie grandement ce qui est observé au

microscope. C'est pourquoi des images ont été prises en éclairage cohérent – avec le diaphragme d'ouverture fermé au maximum– et en éclairage incohérent – avec le diaphragme d'ouverture ouvert au maximum – (cf. Figure 3.17 [29]) en adaptant la quantité de lumière prodiguée par la source de lumière blanche. En outre, la résolution étant une notion subjective, nous avons décidé de mesurer le contraste en fonction de la fréquence spatiale. Nous soulignons le fait que ce n'était pas une mesure de FTM (fonction de transfert de modulation) qui détermine la réponse fréquentielle du système optique, mais seulement une mesure de contraste car la mire utilisée n'était pas sinusoïdale mais carrée. En termes mathématiques, on a calculé le contraste de la manière suivante :

$$C = \frac{I_{max} - I_{min}}{I_{max} + I_{min}}$$
(3.29)

Avec  $I_{max}$  l'intensité maximale et  $I_{min}$  l'intensité minimale dans une coupe de l'image 2D qui traverse le motif à la fréquence étudiée, dans la zone du motif. Le courant d'obscurité a été soustrait des images 2D avant leur utilisation. La réponse photométrique de la caméra n'a pas pu être calibrée, mais ce n'est pas gênant pour une étude comparative. Avant chaque série de prise d'images, le temps d'exposition de la caméra a été réglé puis fixé de sorte à être proche de la saturation pour éviter le besoin de moyennage, tout en rendant les images comparables entre elles. Pour être plus précis, une fois la cohérence spatiale de la source choisie, le temps d'exposition est réglé puis fixé le temps de faire les observations sur tous les motifs intéressants pour tout l'éventail de milieux d'immersion avec ou sans lame de verre. Le protocole est ensuite réitéré en changeant l'éclairage.

# Dégradation de la qualité d'image en changeant le milieu d'immersion

Pour cette expérience, nous avons utilisé un objectif de microscope neuf, qui ne pouvait donc pas avoir été souillé à l'intérieur par de l'huile. Nous avons acquis des images avec les « environnements » suivants devant l'objectif : simplement de l'eau pour la situation nominale, de l'eau avec une lame de silice fondue de 1 mm d'épaisseur pour visualiser l'effet de la lame seule, de l'air, et de l'huile avec la lame de silice fondue de 1 mm.

On s'attend, avec ces configurations, à des courbes proches des FTM théoriques dans le cas incohérent, notamment avec l'eau : une courbe décroissante en « toile de tente » jusqu'à une certaine fréquence de coupure et des courbes globalement plus basses en s'éloignant du cas nominal. Dans le cas cohérent, on s'attend à un contraste beaucoup plus stable proche de 1 en fonction de la fréquence spatiale, jusqu'à une chute brutale à une certaine fréquence de coupure.



FIGURE 3.17 – Fonction de transfert de modulation (FTM) d'un objectif, ou, autrement dit, courbe de contraste d'une mire sinusoïdale en fonction de sa fréquence spatiale pour différentes cohérences d'éclairage. La courbe 1 représente le cas de l'éclairage cohérent, la courbe 2 de l'éclairage incohérent, et la courbe 3 de l'éclairage partiellement cohérent. a est ici l'ouverture numérique. Pour la courbe 3, l'ouverture numérique de l'éclairage vaut a/3. [29]



FIGURE 3.19 – Exemples d'images de motif à 850 lp/mm de la mire de résolution acquises en éclairage cohérent et incohérent pour différents environnements devant l'objectif de microscope. La baisse de contraste est clairement visible en éclairage incohérent, tandis que la déformation des bords du motif est plus visible en éclairage cohérent.

La Figure 3.19 montre des exemples d'images acquises dans cette expérience, et la Figure 3.18 la synthèse des résultats en termes de contraste en fonction de la fréquence spatiale. Dans les images de la mire avec un éclairage incohérent, la perte de contraste est évidente en s'éloignant de la configuration nominale, bien que les barres des motifs dans l'huile arrivent à être séparées à peu près aux mêmes fréquences que dans l'eau. Avec un éclairage cohérent, le contraste semble équivalent en modifiant l'environnement de l'objectif, mais les bords des motifs deviennent beaucoup moins discernables en s'éloignant du cas nominal du fait des artefacts qui s'apparentent à des rebonds, propres à l'éclairage cohérent. Les courbes de contraste dans le cas incohérent suivent la théorie, et montrent que la lame de silice fondue seule a un impact faible sur le contraste, contrairement à l'huile et la lame qui font baisser le contraste au moins d'un facteur 2. Dans le cas cohérent, les courbes n'ont pas la forme d'une marche comme on pourrait s'y attendre, mais de courbe de FTM en éclairage partiellement cohérent, ce qui peut être causé par le diaphragme d'ouverture qui ne se ferme pas totalement, ou bien le fait que la courbe calculée ne soit pas une FTM à proprement parler et qu'elle ait donc une tendance qui s'en éloigne



FIGURE 3.18 – Courbes de contraste en fonction de la fréquence spatiale en observant les motifs d'une mire carrée pour un éclairage cohérent et un éclairage incohérent. La baisse du contraste dans le cas incohérent est très visible dès que l'environnement devant l'objectif n'est pas optimal. Dans le cas de l'éclairage cohérent, le contraste reste relativement stable en fonction de l'environnement.

beaucoup. Toutefois, les courbes de contraste restent très similaires quel que soit l'environnement de l'objectif.

Finalement, en éclairage incohérent, c'est surtout la perte de contraste qui dégrade l'image, tandis qu'en éclairage cohérent, ce serait plutôt à cause de la déformation des bords des motifs qui viennent des artefacts propres à l'éclairage cohérent. Dans les deux cas, une correction du système optique serait bienvenue.

# *Compensation de la qualité d'image en dévissant la fenêtre de l'objectif*

Pour cette expérience, nous avons utilisé l'objectif de microscope dont la fenêtre a été décollée de la monture métallique mais recollée sur la pièce mécanique en plastique, de sorte qu'une fois complètement revissée sur le filetage en métal, le fenêtre de l'objectif soit complètement enfoncée dans le creux prévu à cet effet. Nous avons utilisé les mêmes environnements que dans le paragraphe précédent, et nous avons cette fois pris des images avec la fenêtre complètement vissée, puis légèrement dévissée pour compenser les aberrations sphériques.

Avec la fenêtre complètement vissée sur l'objectif, on s'attend à retrouver les courbes de la Figure 3.18 puisque la fenêtre est accolée contre sa mécanique d'origine. Avec la fenêtre dévissée, on s'attend et on espère réussir à remonter la courbe de contraste dans le cas incohérent, ainsi que de réduire les bavures dans le cas cohérent. Dans le cas particulier de l'air en tant que milieu d'immersion, son indice étant plus faible que celui de l'eau, la compensation par le décalage de la fenêtre aurait théoriquement dû se faire en l'enfonçant dans la mécanique, ce qui était techniquement impossible.

Des exemples d'images de mire sont montrés à la Figure 3.20, et les courbes de contraste à la Figure 3.21. La première observation frappante est le fait qu'on ne retrouve en aucun cas les performances d'un objectif neuf même en vissant correctement et en s'étant appliqué lors du collage de la fenêtre sur la pièce en plastique. En réalité, même en revissant la fenêtre dans l'eau, il était difficile d'obtenir à nouveau d'aussi belles images qu'avec un objectif neuf. Pire que cela : les images étaient meilleures en présence de la lame de silice fondue dans l'eau. Quand bien même, la courbe de contraste dans le cas incohérent dans l'huile avec la fenêtre vissée est meilleure que dans la Figure 3.21, donc on a malgré tout réussi à aller dans le même sens que la théorie.

Il faut savoir que, pendant les manipulations, j'ai eu de grandes difficultés à garder des images « stables » en dévissant la fenêtre : à cause du filetage – qui était fin ! - sur lequel tenait la pièce en plastique. Il existait un jeu qui faisait pivoter très légèrement la fenêtre, ce qui avait pour conséquence de rendre l'image complètement floue au moindre basculement, comme si la mise au point n'avait pas été faite. Le meilleur moyen de stabiliser cela était de tirer très légèrement sur la pièce en plastique vers le bas, ce qui était bien sûr imparfait, au vu des filetages qui ne sont pas orthogonaux par rapport à l'axe optique et du collage qui ne devait pas être assez précis. La fenêtre était donc toujours légèrement penchée. On peut voir l'effet sur les images en observant les motifs en éclairage cohérent : les rebonds sur les bords ne se déploient plus de manière isotrope, mais ont tendance à toujours aller dans la même direction, probablement à cause de la direction imposée par le filetage et le collage. En effet, ces bavures étaient d'autant plus importantes lors du vissage/dévissage et, en modifiant la mise au point sur le statif, les motifs ne restaient pas au même endroit dans le plan imagé. Il me semble que le contraste et les images étaient meilleures dans l'eau avec la lame car cette dernière a dû compenser en partie le fâcheux tilt de la fenêtre. De même, il a été possible, avec l'huile et la lame, d'améliorer les images par rapport à un objectif neuf.



FIGURE 3.20 – Exemples d'images du motif 850 lp/mm de la mire de résolution en éclairage cohérent et incohérent dans différents environnements, avec la fenêtre complètement vissée puis dévissée pour tenter de corriger l'aberration sphérique. Avec la fenêtre vissée, on ne retrouve pas du tout la qualité d'image d'origine. On remarque que les artefacts sont dirigés vers une direction en particulier, ce qui est probablement dû au tilt de la fenêtre par rapport à l'axe optique. Pour corriger les aberrations sphériques dans l'air, il faudrait théoriquement visser la fenêtre plus loin dans la mécanique de l'objectif.



FIGURE 3.21 - Courbes de contraste en fonction de la fréquence spatiale en observant les motifs d'une mire carrée pour un éclairage cohérent et un éclairage incohérent, avec la fenêtre de l'objectif complètement vissée ou bien dévissée pour corriger l'aberration sphérique au mieux. En éclairage incohérent, on parvient effectivement à remonter la valeur du contraste en éloignant la fenêtre de l'objectif. Ces améliorations sont moins visibles en éclairage cohérent en termes de contraste.

Ces manipulations ont finalement montré que la théorie semble vérifiée et qu'il est possible de compenser les aberrations sphériques en décalant la fenêtre de l'objectif. Un second résultat est la démonstration de la faible tolérance d'un objectif par rapport au pivot de la fenêtre : tant que ce tilt n'est pas contrôlé avec grande précision, décoller la fenêtre risque de causer plus de mal que de bien pour la qualité des images. En effet, même en décollant une fenêtre, puis en la recollant directement sur le support qui le porte à l'origine, l'image est dégradée, notamment à cause d'un tilt. Les objectifs infiltrés par de l'huile ne peuvent donc même pas être récupérés... C'est pourquoi nous n'avons pas essayé d'appliquer ces corrections sur l'interféromètre de Mirau durant la thèse.

Tout espoir n'est cependant pas perdu : au lieu d'introduire une couche d'air supplémentaire en décollant la fenêtre des objectifs, il pourrait être possible de la placer entre la fenêtre et le plan focal de l'objectif, ce qui permettrait la correction des aberrations, ainsi que d'éviter le contact de l'huile sur l'objectif ! L'idée est récente et sa faisabilité n'a pas encore été étudiée.

# 3.2.5 Choix du collage de la référence sur l'objectif et nouvelle mécanique.

Malgré l'impossibilité de corriger les aberrations sphériques dans l'immédiat, la première mécanique de l'interféromètre de Mirau demandait déjà des changements, ne serait-ce que pour l'ergonomie pendant l'utilisation, notamment la mise au point sur le miroir de référence. En outre, on a déjà mentionné le fait que de l'huile pouvait s'infiltrer dans les objectifs de microscope, les rendant inutilisables. C'est pourquoi nous avons, en parallèle de l'étude des aberrations, réfléchi à une autre mécanique avec l'aide du mécanicien Jean-René Rullier de l'atelier mécanique de l'Institut d'Optique pour limiter ces problèmes.

# Utilisation de l'interféromètre de Mirau dans le montage de LC-OCT

Pour comprendre l'intérêt de la mécanique la plus récente, il convient de décrire l'utilisation de l'interféromètre de Mirau. On rappelle le schéma du premier interféromètre dans la Figure 3.8, qui montre la proximité entre la lame sur laquelle est déposé le miroir de référence et l'objectif. On rappelle également que la distance entre le miroir de référence et la séparatrice était fixe, car ces deux éléments optiques étaient attachés à une même pièce mécanique que nous appellerons « écrou », dont la hauteur était réglée en le vissant dans une pièce solidaire à l'objectif (cf. Figure 3.22). Le vissage de cet écrou permettait donc de faire la mise au point sur le miroir de référence, mais encore fallait-il voir si la mise au point était faite ou non. La solution était d'utiliser une caméra 2D pour surveiller cette mise au point, et visser l'écrou en espérant observer quelque chose. Mais pour cela, il fallait que la réflexion de la lumière ait lieu, donc centrer la lumière sur le miroir de référence. On rappelle que ce dernier était dans un premier temps une ligne d'or étroite vraisemblablement non centrée à cause de mon inexpérience du débordage et de l'absence d'un cercle en or sur le motif, et en train de tourner en même temps que l'écrou pendant la mise au point. Une fois celle-ci faite, le miroir avait une orientation aléatoire qu'il fallait corriger en tournant tout l'objectif puis en verrouillant sa position... On souligne aussi le fait que, contrairement à ce qui est dessiné sur la Figure 3.8, les optiques de l'interféromètre avaient un diamètre supérieur à l'embout de l'objectif. Ainsi, la frustration grandissante pendant la mise au point à force de ne rien voir, j'eus le malheur de visser l'écrou de quelques degrés de trop et d'autoriser une caresse entre l'objectif et le miroir de référence, qui, fort de ses 170 µm d'épaisseur, craqua de manière presque imperceptible mais fit résonner de manière assourdissante le glas de mon sang-froid. Car les miroirs de référence se faisaient très rares.

Pour augmenter la difficulté de la chose, rien de mieux que le milieu d'immersion que nous avions choisi : de l'huile de silicone qui coulait à travers le filetage de l'écrou pendant toute la procédure. En réalité, même après avoir trouvé la mise au point sur le miroir de référence, cela était insuffisant : nous utilisons l'interférométrie, et la position du plan de cohérence doit être plus précise que la tolérance de la mise au point, autrement dit la profondeur de champ. Il fallait donc créer des interférences en replaçant la plus grande cuve en dessous qui permettait de simuler une onde provenant d'un objet, voir comme le



FIGURE 3.22 – Mécanique du premier Mirau démontée, sans miroir de référence ni séparatrice. (a) De gauche à droite, on a l'objectif de microscope, l'écrou en laiton, et la structure en aluminium pour associer l'ensemble. Dans la photo, le miroir de référence est collé sur l'objectif, mais ce n'était pas le cas quand on utilisait cette mécanique. La pièce en laiton est l'écrou où le miroir de référence et la séparatrice sont censés être collés : la pièce a été retournée de sorte à voir le côté où devrait être le miroir de référence. La pièce en aluminium remplace la partie la plus extérieure de l'objectif, absente dans l'image, où sont marquées les références. (b) Première mécanique de Mirau montée sur l'objectif de microscope.

plan de cohérence n'était pas au bon endroit dans une image brute, retirer la grande cuve et retravailler sur l'écrou, à l'aveugle puisqu'on doit retirer l'« objet ». Mais ce n'était pas terminé ! L'objectif de microscope, et donc la mécanique du Mirau, étaient vissés sur la platine piézoélectrique pour permettre le scan du plan de cohérence dans l'échantillon. A faible vitesse de scan, tout allait pour le mieux, mais l'augmentation de vitesse de la platine motivée par une acquisition plus rapide nous joua des tours : imaginez l'écrou secoué périodiquement 17 fois par secondes, sans le support d'un contre-écrou puisque la mécanique ne le permettait pas. Devant cette brutalité, l'écrou ne tenait plus en place et vibrait dans l'espace alloué par le jeu qui se trouvait entre le filetage mâle et femelle, largement suffisant pour jeter le plan de cohérence en dehors de la profondeur de champ de l'objectif, et faire tourner globalement l'écrou dans un sens ou dans l'autre. Dans un premier temps, une solution temporaire avait été d'utiliser des joints toriques entre l'écrou et l'objectif qui exerceraient une force sur l'écrou une fois comprimés, quand la mise au point serait faite. Mais c'était sans avoir prévu qu'une fois comprimés, les joints empêchaient l'huile de s'échapper autour de l'objectif lors du vissage de l'écrou, ce qui augmentait la pression de l'huile prisonnière sur toutes les surfaces aux alentours, et en particulier sur la fenêtre de l'objectif. Au moins un des objectifs en ma possession a subi ce traitement, qui, au cours du temps, a mené à l'infiltration d'huile dans l'objectif. Catastrophés, nous avons cherché une autre manière de bloquer l'écrou, et notre choix s'est tourné vers un ruban de téflon utilisé habituellement comme joint en plomberie, qu'on utiliserait surtout en tant que frein-filet. Il s'est avéré que cette méthode a fonctionné sans détériorer l'état des objectifs suivants, mais seulement à titre temporaire car le téflon a tendance à s'échapper des filetages dès qu'on dévisse les deux pièces emboîtées.

Cette aventure pleine de rebondissements résumée en une page, vécue dans les larmes, la sueur et l'huile de silicone, a motivé et rendu possible l'élaboration d'une nouvelle mécanique plus ergonomique.

### Nouvelle mécanique

Une nouvelle mécanique a été développée au bureau d'étude mécanique de l'Institut d'Optique, dont des images sont montrées dans la Figure 3.23. Pour rappel, les optiques placées devant l'objectif de microscope sont la lame avec le miroir de référence, la séparatrice, et une lame de silice fondue qui fait l'interface entre l'interféromètre et l'échantillon. Cette nouvelle mécanique prévoit le collage du miroir de référence sur la fenêtre de l'objectif, pour des raisons clarifiées dans le prochain paragraphe. La


FIGURE 3.23 – Nouvelle mécanique de l'interféromètre de Mirau. (a) Mécanique démontée. On voit de gauche à droite : l'objectif de microscope avec le miroir de référence collé sur la fenêtre, un adaptateur en plastique sur lequel se visse un contre-écrou pour bloquer la position de la séparatrice, la petite cuve sur laquelle est collée la séparatrice, et la grande cuve qui est immobile pendant le scan de l'échantillon. Les deux cuves ont été schématisées dans la Figure 3.1. (b) Adaptateur monté sur l'objectif à l'aide d'un filetage proche de la fenêtre de l'objectif. (c) Petite cuve vissée sur l'adaptateur, dont la position axiale est bloquée à l'aide du contre-écrou. Le tout peut entrer dans la grande cuve et osciller dans la direction axiale.

séparatrice est collée au fond d'une petite cuve remplie d'huile d'immersion et rattachée à l'objectif grâce à un filetage sous le capuchon blanc en plastique de l'objectif. L'interface interféromètreéchantillon est collée sur une plus grande cuve, elle aussi remplie d'huile d'immersion et indépendante du mouvement de la platine piézoélectrique. Cette grande cuve a été conservée de l'ancienne mécanique. La nouvelle mécanique suit le cahier des charges suivant :

- La mise au point sur le miroir de référence est faite seulement en modifiant la hauteur de la séparatrice, pour éviter la rotation intempestive du miroir de référence pendant la procédure ;
- Le filetage de la plus petite cuve est ramené en hauteur pour éviter les écoulements de l'huile et pour utiliser un contre-écrou qui sécurise le réglage de la hauteur de la séparatrice ;
- L'intérieur de la petite cuve est creusé de sorte qu'elle soit en contact avec la partie mécanique de l'objectif si on visse trop la cuve en cherchant à faire la mise au point sur le miroir de référence, et ainsi éviter le contact entre les optiques ;
- La petite cuve doit pouvoir se mouvoir dans la grande sans qu'elles entrent en contact ;
- Une pièce supplémentaire a été fabriquée pour tenir le haut de l'objectif et pouvoir choisir sa rotation et donc celle du miroir de référence tout en ayant vissé le haut de l'objectif jusqu'en butée.

Ces modifications ont grandement facilité les manipulations de l'interféromètre et aidé à assurer le parallélisme entre le miroir de référence et de la séparatrice en augmentant les surfaces de collage. En outre, aucun signe d'infiltration d'huile dans les objectifs n'a été observé jusqu'à aujourd'hui. Quelques soucis mineurs ont cependant été repérés à l'utilisation : l'axe de l'objectif et celui de la grande cuve ne

sont pas tout à fait parallèles, et les deux cuves peuvent entrer en contact pendant les scans des échantillons si on ne fait pas attention. De plus, la petite cuve est attachée à l'objectif via un adaptateur, lui-même attaché à l'objectif grâce à un filetage sous son capuchon blanc. Cependant, cette partie filetée de l'objectif n'est pas tout à fait solidaire de sa partie plus volumineuse, plus en hauteur, qui peuvent tourner l'un par rapport à l'autre. Des modifications à suggérer, s'il y avait une mise à jour sur la mécanique du Mirau, serait donc d'attacher l'adaptateur sur l'objectif grâce à un autre filetage, plus en haut de l'objectif, et de réduire le volume de la petite cuve ou agrandir celui de la grande cuve, pour plus de confort.

#### Collage de la référence

Le collage de la référence sur l'objectif a été décidé pour un certain nombre de raisons. La première d'entre elles est l'optimisation du taux d'obturation : en effet, la lumière est plus facilement bloquée lorsque le miroir se rapproche du plan focal de l'objectif. De plus, on a vu dans l'annexe B.5 que la contribution d'une lame à face parallèles en aberration sphérique est indépendante de sa position, ce qui nous permet de la placer où bon nous semble. Ensuite, fixer la position de la référence permet de faciliter la mise au point dessus, en évitant de la faire tourner pendant la procédure. Enfin, cela permet de mieux contrôler le parallélisme des optiques de l'interféromètre, et de réduire le risque de briser la lame sur laquelle est déposé le miroir. Cela a bien sûr un coût : celui d'un objectif, car le collage est difficilement réversible. Il a donc fallu tout mettre en œuvre pour obtenir un miroir de référence dans le meilleur état possible avant de procéder au collage. De même, la maîtrise de la procédure du collage était nécessaire.

Pour mémoire, le miroir de référence en or est déposé sur une lame de verre par lithographie UV et par évaporation de l'or grâce à des canons à électrons. Une couche de résine soluble dans l'acétone est déposée par-dessus en tant que protection pendant le processus du débordage : pour protéger davantage le dépôt d'or, la surface de l'extrémité de la tige de stub utilisée est adoucie pour éviter toute protubérance du métal. Du papier de soie est aussi ajouté entre la tige de stub et le dépôt d'or. Le motif est ensuite centré sur la tige de stub pendant que la colle, l'arcanson, est encore chaude. Un morceau de verre quelconque d'épaisseur d'un millimètre ou deux est collé par-dessus le tout pour éviter que la lame de référence ne se brise par morceaux quand on ne souhaite que l'user par abrasion à l'aide d'un tour mécanique. Une fois le débordage terminé, il faut décoller la lame de référence de tout ce qui l'entoure puis la nettoyer de la colle restante sans endommager le dépôt. Il s'agit d'une étape qui demande autant, voire plus de doigté que le débordage même car le dépôt d'or s'abîme facilement. La méthode avec le plus grand taux de succès est le nettoyage par bains de solvants : l'arcanson se dissout dans du tétrachloroéthylène, et la résine sur le dépôt d'or dans de l'acétone. Des particules peuvent cependant très facilement se déposer et s'accrocher à la surface d'or, et des bains à l'éthanol pur et à l'eau oxygénée chauffée peuvent aider à s'en débarrasser sans toutefois garantir la propreté intégrale. Un nettoyage au papier optique trempé dans de l'éthanol absolu peut être nécessaire, sachant qu'il existe un risque non négligeable de rayer le dépôt si jamais une seule particule abrasive est emportée par le papier. Ces étapes doivent donc être faites sous hotte, voire en salle blanche pour éviter poussières et autres impuretés.

Le collage de la référence sur la fenêtre de l'objectif s'effectue avec de la colle UV. Encore une fois, les surfaces à coller doivent être le plus propre possible. Une des difficultés est le centrage de la référence sur la fenêtre, qui a pu se faire à l'aide d'un montage de système en cage Thorlabs et en particulier une monture de translation X-Y (cf. Figure 3.24). Un bouchon en plastique a été usiné pour être déposé sur la lame de référence et répartir la colle de manière uniforme en dessous pour assurer le parallélisme entre la fenêtre et la référence. Le tout a été insolé à l'aide d'une lampe UV pour polymériser la colle qui était auparavant liquide.

Durant cette thèse, ces étapes ont été élaborées et suivies sous une hotte de chimie, qui empêche les petites particules de se déposer sur les différentes surfaces, mais seulement jusqu'à une certaine limite. Il serait judicieux qu'une personne future gagne accès à une salle blanche pour reproduire ces processus beaucoup plus facilement en allégeant les phases de nettoyage.



FIGURE 3.24 – Montage mécanique utilisé pour centrer la référence lors de la phase de collage sur l'embout de l'objectif. Il utilise essentiellement des éléments de système en cage Thorlabs, avec notamment une monture de translation x-y qui permet le centrage. On y a ajouté des pièces modifiées pour nos besoins : une pièce SM1CP2M dans lequel on a creusé un puits pour guider la trajectoire de la référence. Un bouchon en plastique a été usiné de sorte à pouvoir entrer dans le puits, afin d'appuyer sur les bords de la référence une fois centrée et assurer l'étalement homogène de la colle UV. (a) Montage entier. (b) Montage vu du dessus, sans le bouchon en plastique. (c) Le bouchon en plastique vu du dessous.

#### 3.3 Amélioration de la vitesse d'acquisition des images 2D

L'un des objectifs majeurs du montage de LC-OCT est de pouvoir faire de l'imagerie en direct et *in vivo*, dans le but de limiter la phase d'excision de la peau d'un patient et son long traitement dans un laboratoire pour en obtenir une image histologique en cas de suspicion de cancer de la peau. On souhaitait initialement atteindre une vitesse d'acquisition de l'ordre de 10 images par secondes. Cette section retrace les méthodes employées pour tenter de repousser ces limites.

#### 3.3.1 Les facteurs limitants de la vitesse d'acquisition

La réflexion sera plus aisée en décomposant les paramètres qui affectent la vitesse d'acquisition. La caractéristique la plus importante et qui permet de poser les limites par rapport à la vitesse d'acquisition est le rapport signal à bruit, ou, indirectement, la sensibilité du système, dans les conditions d'utilisation nominale avec un échantillon de peau. Nous avons vu que cette caractéristique dépend du nombre de photons qui parviennent à atteindre le capteur, et donc de la puissance du laser et du temps d'exposition de la caméra. Ce dernier paramètre est, quant à lui, dépendant de la vitesse de balayage du plan de cohérence et de la longueur d'onde centrale de la source, et ne peut être réduit que jusqu'aux limites propres de la caméra. A la fin de la chaîne, c'est la partie électronique et software qui récupère les données et doit les traiter assez rapidement. Et si tous ces éléments ont été optimisés et que le nombre de photons récupérés est très grand, c'est le puits d'électrons de la caméra qui impose sa limite. En somme, tous les éléments du montage ont des effets qui s'influencent les uns les autres, et, à la fin, influencent la vitesse d'acquisition globale. On peut décomposer le problème en fonction des éléments du montage et de leurs limitations propres :

- La source laser, dont la limitation est principalement la puissance. Sa longueur d'onde centrale n'a que peu d'effet sur la vitesse d'acquisition ;
- La platine piézoélectrique qui détermine la vitesse de balayage du plan de cohérence dans l'échantillon, limitée par l'inertie des éléments qui doivent être translatés pendant l'acquisition et par la non-linéarité de sa trajectoire à haute vitesse ;
- La caméra, qui détermine la vitesse à laquelle on peut enregistrer une ligne dans chaque image brute, notamment à cause de son temps d'obturation ;
- Le programme qui enregistre les données numérisées et doit procéder à la démodulation en temps réel.

Nous avons la chance d'utiliser un laser qui peut envoyer une importante quantité d'énergie (jusqu'à 6 Watts en sortie de fibre) et qui ne sera pas l'élément limitant, contrairement à la plupart des systèmes de LC-OCT. L'utilisation du cube séparateur polarisant et de la lame quart d'onde (cf. Figure 3.2) permet, en outre, d'augmenter la quantité de lumière atteignant la caméra au mieux d'un facteur 2 : avec seulement un cube séparateur 50:50, la lumière incidente se réfléchit une fois sur le cube, passe dans l'interféromètre puis traverse une seconde fois le cube, pour une perte de lumière de 75%. Avec le cube polarisant et la lame quart d'onde, la lumière incidente se réfléchit et se polarise linéairement sur le cube, puis circulairement en traversant la lame quart d'onde, conserve a priori sa polarisation circulaire à la réflexion sur l'échantillon, se polarise linéairement en retraversant la lame quart d'onde dans la direction orthogonale, ce qui lui permet de traverser le cube sans pertes jusqu'à la caméra, pour une perte de lumière de seulement 50% dans le meilleur cas. On travaillera donc sur la platine piézoélectrique, la caméra, et la programmation pour optimiser la vitesse d'acquisition du système.

#### 3.3.2 Platine piézoélectrique : réduction de poids

Lors de l'acquisition d'images brutes pour produire des B-scans, la vitesse d'acquisition, ou autrement dit la fréquence d'acquisition des images, est directement égale à la fréquence du mouvement de la platine piézoélectrique, en supposant une trajectoire triangulaire asymétrique où la caméra n'est active que durant sa pente positive. La vitesse de la platine est donc le premier paramètre à augmenter pour accélérer l'acquisition, quitte à engendrer des artefacts dans les images. Son mouvement possède une inertie plus ou moins grande en fonction des optiques et pièces mécaniques que la platine transporte, qu'il convient de réduire pour faciliter la translation.

On rappelle que la configuration adoptée habituellement en utilisant l'interféromètre de Linnik est illustrée dans la Figure 2.22 (a), où l'entièreté de l'interféromètre est portée par la platine piézoélectrique, à savoir le cube séparateur et les deux objectifs de microscope. La Figure 2.22 (b) et (c) schématisent d'autres configurations qui utilisent le déplacement du cube séparateur ou d'un miroir de renvoi pour conserver la différence de marche dans l'air pendant le scan tout en réduisant les éléments portés par la platine. C'est de ce type de réduction de poids porté dont on veut profiter avec l'interféromètre de Mirau, où il n'y aurait besoin de porter que l'objectif de microscope, la séparatrice et le miroir de référence : en prenant en compte la mécanique en aluminium faisant le lien entre l'objectif et la platine, cette dernière porte un poids total de 124 g quand on utilise l'interféromètre de Mirau développé durant cette thèse. A titre de comparaison, le poids porté par la platine dans la configuration où l'interféromètre de Linnik entier oscille est estimé à 240 g. On réduit donc le poids porté d'un facteur deux, ce qui facilitera la linéarité de la trajectoire de la platine.

#### 3.3.3 Gestion fine des signaux TTL envoyés à la caméra

On rappelle que, jusqu'à aujourd'hui, avec les interféromètres de Linnik, l'acquisition des lignes d'une images brute par la caméra était faite linéairement dans le temps pour une question de simplicité d'implémentation. La trajectoire de la platine se devait donc d'être linéaire dans le temps également, afin que le contraste de l'image en sortie de l'algorithme de démodulation soit optimal (cf. sous-section 2.3.3). Si jamais la pente de la trajectoire devenait momentanément deux fois trop élevée par rapport à ce qui était prévu, alors les lignes acquises successivement seraient déphasées de  $\pi$  au lieu de  $\pi/2$ , et par



FIGURE 3.25 – Trois périodes de la commande triangulaire envoyée à la platine piézoélectrique et sa réponse réelle, à 17 Hz. Pour une meilleure lisibilité, l'origine temporelle de la réponse a été placée au minimum de la trajectoire. A cette vitesse, la réponse est déformée et se rapproche d'une trajectoire sinusoïdale dont l'amplitude a diminué par rapport à la commande.

conséquent la portion de l'image brute concernée ne montrerait aucune trace de l'enveloppe des interférences une fois démodulée, et le signal serait donc perdu à l'étape de la démodulation (cf. Figure 2.19). En pratique, il est possible de jouer sur le gain de la platine pour modifier sa réponse par rapport à la commande, voire de modifier la commande par itération afin que la réponse se rapproche le plus possible de la commande initiale, mais ces méthodes possèdent leurs limites dès qu'on souhaite pousser l'amplitude de la trajectoire et la vitesse. Plus on cherchera à augmenter ces paramètres, plus la réponse de la platine tendra vers une trajectoire sinusoïdale avec une amplitude amoindrie. La pente au niveau des points d'inflexion de la trajectoire subira le plus de variations, comme observé dans la Figure 3.25, où les paramètres de la platine ont été ajustés manuellement pour obtenir une trajectoire montante la plus droite possible. La linéarité de la trajectoire dans le temps devient donc un enjeu majeur facilement perdu à haute vitesse, et qui est largement handicapant.

Cette non-linéarité de la trajectoire peut être quantifiée en traçant la courbe de sa dérivée sur une période, qui n'est clairement pas constante (cf. Figure 3.26). On a choisi d'utiliser la partie de la trajectoire où la pente est montante dont les distances entre borne haute (respectivement basse) et le maximum (respectivement minimum) de la trajectoire sont égales. La vitesse de la platine pour cette portion de trajectoire, normalisée par sa valeur centrale et traduite en termes de déphasage pour la



FIGURE 3.26 – Vitesse de la commande envoyée à la platine piézoélectrique, et vitesse de la réponse sur une période, à 17 Hz. La non-linéarité de la réponse est mieux révélée par rapport aux courbes des trajectoires.

démodulation, est montrée dans la Figure 3.27. Elle est à mettre en regard avec la Figure 2.19 pour se rendre compte de la détérioration de l'image en sortie de l'algorithme de démodulation, sans compter les distorsions dans les images. La plus grande variation de déphasage par rapport à  $\pi/2$  amènerait à une perte de contraste de l'ordre de 40% dans les zones de l'images brute concernées.

C'est pourquoi nous avons cherché à nous affranchir de cette contrainte de linéarité en jouant sur la fréquence d'acquisition de la caméra. En contrôlant précisément le moment où la caméra capture chacune des lignes composant une image brute, il devient possible de faire disparaître la distorsion dans l'image et d'augmenter la qualité finale de l'image en optimisant l'utilisation de l'algorithme de démodulation. Et, finalement, la vitesse de la platine peut être augmentée sans avoir à faire attention à la linéarité de la trajectoire.

Pour ce faire, nous avons utilisé un appareil électronique multifonction Analog Discovery 2 qui a en particulier des sorties électroniques analogiques. La longueur d'un tableau de valeurs injectable dans l'appareil étant limitée, il n'était pas possible de simplement entrer les instants auxquelles on voulait envoyer un TTL à la caméra : la résolution temporelle était trop faible, et certains triggers n'étaient tout simplement pas produits. A la place, on a utilisé un signal créneau modulé en fréquence. Le plus gros du travail a été fait au niveau du script informatique pour calculer les fréquences instantanées de la phase de la fonction créneau définie de la manière suivante :

$$C(\varphi) = \begin{cases} 1 \text{ si } \varphi \in [0, \pi[ \text{ modulo } 2\pi] \\ 0 \text{ si } \varphi \in [\pi, 2\pi[ \text{ modulo } 2\pi] \end{cases}$$
(3.30)

En utilisant la modulation en fréquence, le signal en sortie de l'Analog Discovery s'écrit :

$$\operatorname{Trig}_{rampe}(t) = C\left(2\pi \int_{0}^{t} f_{i}(\tau) \, d\tau\right)$$
(3.31)

Avec  $f_i$  la fréquence instantanée, de sorte que, en notant  $\varphi$  la phase dans la fonction créneau, on ait :

$$f_i(t) = \frac{1}{2\pi} \frac{d\varphi}{dt}(t) \tag{3.32}$$

La notion de fréquence instantanée se comprend mieux avec des exemples : dans le cas simple d'une fréquence unique qui ne varie pas au cours du temps, on retrouve une phase temporelle habituelle  $\varphi$  =



FIGURE 3.27 – Partie de la trajectoire de la platine piézoélectrique utilisée pour acquérir les images. La trajectoire a été choisie en pente montante de sorte que les distances entre sa borne haute (respectivement basse) et le maximum (respectivement minimum) de la trajectoire globale soient égales. Les ordonnées ont été converties en termes de phase en supposant une acquisition des lignes images linéaire dans le temps de sorte à avoir un déphasage de  $\pi/2$  à la vitesse centrale de la trajectoire.

 $2\pi ft$  et on retrouve bien  $f_i(t) = f$  en calculant la dérivée de la phase. Un deuxième exemple pertinent est le cas d'une fonction fréquences instantanées constante par morceaux, qui est exactement ce qu'on va chercher à reproduire. La Figure 3.28 représente une fonction  $f_i$  constante par morceaux et la phase  $\varphi = 2\pi \int_0^t f_i(\tau) d\tau$  qui en découle. L'intégrale dans la phase représente simplement l'accumulation de la phase au cours du temps, avec une fréquence qui change quelque fois de valeurs. On peut passer du domaine fréquentiel au domaine temporel :

$$T_i(t) = 1/f_i(t)$$
 (3.33)

Avec  $T_i$  la période temporelle instantanée du signal créneau. Ce sont en effet les différentes périodes instantanées au cours du temps que l'on cherche à calculer, puisque ce sont les durées entre chaque TTL envoyé à la caméra pour acquérir une image ligne. Après avoir capturé la réponse de la platine piézoélectrique, il suffit de suréchantillonner ce signal, déterminer les instants des TTL pour que le pas spatial entre deux images lignes soit constant, en déduire les périodes instantanées, et enfin traduire cela en termes fréquentiel pour que le signal modulé en fréquence corresponde à nos TTL pour la caméra. La porteuse du signal est, par exemple, choisie comme le milieu des fréquences instantanées, et le signal de modulation est exprimé en pourcentage de déviation par rapport à la porteuse :

$$\begin{cases} f_p = (f_{i,max} + f_{i,min})/2 \\ m(t) = (f_i(t) - f_p)/f_p \end{cases}$$
(3.34)

Ainsi, la non-linéarité de la trajectoire n'est plus un problème et on peut augmenter sa vitesse jusqu'à atteindre une prochaine limite, qui est la fréquence de la caméra. En effet, pour la trajectoire à 17 Hz, la valeur maximale des fréquences instantanées est  $f_{i,max} = 235 \ kHz$ , très proche de la fréquence maximale de la caméra qui vaut 250 kHz. Cette marge a été conservée pour éviter des pertes d'informations au niveau de la caméra et parce que le gain en vitesse d'acquisition aurait été négligeable. Pour que la quantité de lumière soit globalement la même dans toute l'image brute, on fixe le temps d'exposition de la caméra à  $1/f_{i,max}$ , ce qui peut poser problème si la source n'est pas assez puissante.

#### 3.3.4 Trajectoire sinusoïdale

La trajectoire triangulaire asymétrique de la sous-section 3.3.3 a été choisie par habitude, mais aussi par simplicité des acquisitions : en effet, en une période de la platine piézoélectrique, on effectue une seule série d'acquisitions d'images lignes pour obtenir une image brute en 2D. On utilise donc la trajectoire seulement pendant sa pente positive sans action supplémentaire le reste du temps : pendant une période de la platine, la caméra est activée moins de la moitié du temps. Par conséquent, bien que



FIGURE 3.28 – Illustration de la progression de la phase au cours du temps en fonction de fréquences instantanées constantes par morceaux. En faisant en sorte qu'une fréquence instantanée soit active pendant une durée égale à la période instantanée associée, il est possible d'accumuler un déphasage de  $\pi/2$  à chaque fois qu'on change la valeur de la fréquence instantanée.

la limite en fréquence de la caméra ait été atteinte, il est possible de pousser la vitesse d'acquisition encore d'un cran en augmentant la durée pendant laquelle elle est activement utilisée. Dans la limite extrême, il faudrait que la caméra soit active quasiment constamment pendant le mouvement de la platine.

Une piste prometteuse dans cette direction est l'utilisation d'une trajectoire sinusoïdale, qui est la plus efficace à haute vitesse. L'idée serait alors d'acquérir une image brute quand la trajectoire a une pente positive, puis une autre quand elle a une pente négative, de sorte à acquérir deux images brutes en une seule période de la platine. De cette manière, il est possible d'obtenir une trajectoire à 14 Hz en étant limité par la caméra et avec une amplitude d'environ 400 μm (cf. Figure 3.29), suffisante pour sonder l'échantillon jusqu'à 350 µm, et donc avoir une vitesse d'acquisition de 28 Hz ! Cependant, certains problèmes persistent et rendent son implémentation hasardeuse : bien que la commande de la trajectoire soit symétrique, ce n'est pas le cas de la réponse : il existe un effet d'hystérésis, de sorte que la trajectoire en montée et en descente sont différentes, à cause de la gravité. De plus, une image sur deux est à l'envers et doit être démodulée et retournée en temps réel pour savoir quelle partie de l'échantillon est scannée. Mais le plus embêtant reste la superposition d'une première image puis de la suivante retournée, qui demande donc une synchronisation des triggers envoyés à la caméra à la montée et la descente de la platine. C'est essentiellement cette difficulté, solvable mais chronophage, qui m'a poussé à privilégier la trajectoire triangulaire. Je suis certain que les personnes intéressées par cette problématique parviendront à profiter de la trajectoire sinusoïdale en mettant au point un modèle et un protocole plus raffinés.

#### 3.3.5 Acquisition des images brutes avec la carte FPGA

La caméra est reliée à la carte FPGA pour pouvoir lui transmettre les images lignes. Il s'agit plus précisément d'un modèle microEnable 5 marathon VCL. Le principal avantage de la carte FPGA est sa rapidité : un tour d'horloge, c'est-à-dire la durée nécessaire pour une action simple, ou sa résolution temporelle, est de 8 ns. La position temporelle d'un TTL envoyé à la caméra est donc repérée par la carte FPGA à 8 ns près, ce qui correspond à une erreur relative d'environ 0,1% par rapport à l'ordre de grandeur des périodes instantanées. De plus, cette carte FPGA permet d'utiliser la caméra à son plein potentiel grâce à deux câbles CameraLink. A titre de comparaison, la caméra peut être utilisée à une fréquence maximale de 250 000 lignes par seconde avec des pixels de 10 bits en passant par les câbles CameraLink, et à « seulement » 130 000 lignes par secondes avec des pixels de 10, 11 ou 12 bits en USB3. En sachant que la caméra envoie des lignes images à 250 kHz sur des pixels codés sur 10 bits, et



FIGURE 3.29 – Une période de la commande sinusoïdale et la réponse de la platine piézoélectrique à 14 Hz. L'origine des temps est placée au minimum des courbes. La montée et la descente de la réponse ne sont pas tout à fait symétriques à cause d'un effet d'hystérésis dû à la l'action de la gravité. En profitant de la montée et de la descente de la trajectoire, il est théoriquement possible d'acquérir 2 images brutes par période de la platine, pour une vitesse d'acquisition de 28 Hz en atteignant la limite de vitesse de la caméra.

avec 2048 pixels par lignes, on en déduit un flux de données maximum en sortie de caméra de 640 Mo/s, quand la bande-passante maximale en réception de la carte vaut 850 Mo/s. Atteindre la limite de la caméra signifie donc avoir une électronique performante derrière pour collecter tout le flux de données, ce qui est le cas avec cette carte FPGA.

Initialement, la carte FPGA avait été choisie pour procéder à l'acquisition et aussi au traitement des images, grâce à sa puissance de calcul et sa flexibilité, sans forcément avoir à utiliser les ressources de l'ordinateur. Seulement, la carte FPGA n'utilise que ses propres ressources, comme la mémoire et la bande-passante, qui sont limitées. La démodulation, par exemple, ne nécessite que 5 lignes images à garder en mémoire à une certaine date, ce qui est peu coûteux en bande-passante et en mémoire. Mais dès que l'on veut traiter les colonnes d'une image brute, il devient nécessaire de la stocker entièrement. Dans l'hypothèse d'une source centrée autour de 800 nm, une image brute est la concaténation d'au moins 4800 images lignes déphasées de  $\pi/2$ , et son stockage nuit grandement à la bande-passante globale de la carte : dans la programmation, un tel opérateur est vu comme un goulot d'étranglement non négligeable qui risque de nous faire perdre des données.

En effet, la manière de coder sur une carte FPGA diffère des langages comme MATLAB ou le C, où le script est lu séquentiellement, une ligne après l'autre. Sur une carte FPGA, le code est exécuté en parallèle, et le flux de données (les pixels codés sur 10 bits) peut être vu comme un cours d'eau. Dans notre cas en particulier, le logiciel VisualApplet a été utilisé pour programmer la carte. En supposant que le code se divise en deux branches parallèles en un certain point, le flux de données circulant dedans sera dépendant du flux de données en amont de l'intersection. De plus, en supposant qu'un opérateur soit placé après les deux branches et en utilise les résultats comme entrées pour faire un calcul, il est souvent nécessaire que les pixels des deux branches arrivent en même temps. Si jamais des pixels circulent plus rapidement dans une branche que dans l'autre, il faudra les stocker dans un « buffer » puis les envoyer en même temps que ceux de l'autre branche. Et si le différentiel de vitesse de flux est trop important, le buffer stockera plus de pixels qu'il en fera sortir, ce qui finira par le faire « déborder » : les pixels en trop seront supprimés. La branche la moins rapide est donc à l'origine d'un goulot d'étranglement dans le flux de données, ce qui fait perdre des pixels et affecte en plus le flux en sortie de l'opérateur. C'est pourquoi il est absolument nécessaire d'éviter ces goulots d'étranglement, qui sont fonction de la mémoire à disposition – les buffers -, et de la bande-passante, elle-même influencée par chaque opérateur. C'est ici qu'intervient la possibilité de n'acquérir qu'une ligne sur trois pour économiser de la mémoire (cf. sous-section 2.3.3). Une carte FPGA est finalement un outil puissant, mais qui impose des difficultés supplémentaires dans son utilisation. La programmation pour du traitement d'image demande donc d'être astucieux, sans oublier que la compilation d'un programme complexe peut prendre quelques heures.

Malgré les quelques contraintes à respecter pour l'utilisation de la carte FPGA, le système de LC-OCT a tout de même besoin de démoduler les images brutes en direct pour connaître la zone de la peau qui est visée. Pour le traitement d'images sur la carte, je me suis donc cantonné à un nombre limité d'opérations, comme la démodulation, le redimensionnement et l'ajustement automatique du contraste. Ce traitement est incomplet mais donne des images de qualité suffisante pour viser. La carte FPGA sert donc à acquérir les images brutes en 16 bits pour des raisons de compatibilité, les traiter partiellement, et sert comme relais de signaux TTL envoyés à la caméra. Le traitement d'image complet est effectué sous MATLAB à partir des images brutes en post-traitement.

#### 3.4 Imagerie 3D

Nous avons explicité les méthodes développées pour obtenir des images en coupe verticales en deux dimensions à haute vitesse d'acquisition. L'imagerie 2D possède tout de même ses limites, notamment pour viser la zone d'intérêt ou encore pour visualiser une portion plus large de l'échantillon. L'imagerie 3D peut y remédier, et donne la possibilité de visualiser le volume acquis selon n'importe quel angle

grâce aux logiciels appropriés. C'est pourquoi on s'intéresse à son développement dans cette section avec le montage de LC-OCT basé sur l'interféromètre de Mirau.

## 3.4.1 Linnik dans le champ : vignettage et courbure du plan de cohérence

L'imagerie 3D et l'acquisition de coupes horizontales ne sont pas nouvelles : elles ont déjà été implémentées dans des systèmes de LC-OCT basés cette fois sur un interféromètre de Linnik en balayant la ligne de lumière sur l'échantillon avec un miroir galvanométrique en amont [53], [66], [67]. On se rapporte à la Figure 2.12 pour le schéma associé à l'interféromètre de Linnik. L'avantage principal de cet interféromètre, qui est la séparation des deux bras de l'interféromètre, peut ici poser un problème.

La conservation de la symétrie des bras de l'interféromètre en scannant le champ latéral demande des concessions : une première configuration consisterait à placer le miroir galvanométrique avant le cube séparateur et donc à scanner latéralement les deux bras en même temps (cf. Figure 3.30 (a)). Cependant, la lumière a besoin de se réfléchir sur le miroir à l'éclairage mais aussi à la détection pour que le signal atteigne toujours le capteur de la caméra. Un cube séparateur supplémentaire est donc nécessaire pour détecter le signal, ce qui engendre une perte supplémentaire de lumière de 75% par rapport au système sans balayage latéral. La perte de lumière étant beaucoup trop importante, on ne développera pas plus cette configuration.

Une deuxième configuration (cf. Figure 3.30 (b)) consiste à placer le miroir galvanométrique audessus de l'objectif du bras objet. Il serait possible de placer un deuxième miroir galvanométrique dans le bras de référence pour gagner en symétrie, mais pour des raisons de coût et de simplification du montage, on élimine cette possibilité. De même, l'expérience du balayage latéral vue en OCM (cf. Figure 2.9) nous a montré comme il était possible de rajouter deux lentilles entre le miroir galvanométrique et l'objectif pour obtenir un système de balayage télécentrique. Cependant, cela demanderait des optiques supplémentaires de bonne qualité afin d'éviter d'introduire des aberrations, ce



FIGURE 3.30 – Configurations envisagées pour le balayage latéral avec l'interféromètre de Linnik. Les directions de la lumière incidente et détectée sont désignées par des flèches rouges. Les lentilles cylindriques sont représentées en pointillé. Les lentilles en orange représentent les optiques utilisées pour un système de balayage télécentrique dont l'intégration est facultative. Les rayons incidents et détectés doivent nécessairement se réfléchir sur le miroir galvanométrique pour que l'image se forme constamment sur le capteur pendant le balayage. (a) Configuration avec le miroir galvanométrique hors de l'interféromètre. Le balayage se fait de manière symétrique dans les deux bras de l'interféromètre, mais la configuration nécessite un second cube séparateur qui entraine de la perte de lumière supplémentaire. (b) Configuration avec le miroir galvanométrique uniquement dans le bras objet de l'interféromètre. Le balayage se fait de manière asymétrique.

qui augmenterait considérablement l'encombrement de l'interféromètre sans engendrer d'amélioration significatives. De plus, il y aurait peut-être besoin de faire osciller les lentilles additionnelles en même temps que le miroir galvanométrique et l'objectif pendant le scan axial. Encore une fois, pour des raisons de coût et de simplicité, on laisse le balayage télécentrique de côté. La configuration la plus viable est donc celle avec un unique miroir galvanométrique dans le bras objet. Cette configuration éloigne cependant l'axe de rotation des rayons incidents de la pupille de sortie des objectifs. Par conséquent, cette dernière joue le rôle de lucarne qui coupe les rayons incidents trop inclinés : on observe alors du vignettage, qui rend les images plus sombres quand la ligne de lumière a été déviée. On se convainc aisément que ce phénomène s'accentue dès que la distance entre le miroir galvanométrique et la pupille de sortie de l'objectif s'agrandit. Il convient donc de rapprocher le plus possible miroir et objectif pour réduire cette perte de lumière.

Etant donné l'asymétrie entre les deux bras de l'interféromètre avec un miroir galvanométrique seulement dans un bras, la différence de marche subit une variation durant le balavage latéral. La Figure 3.31 représente la variation du trajet optique du bras objet en fonction de la déviation de la lumière incidente. Ce résultat est développé dans l'Annexe C. Elle montre que le trajet optique dans le bras objet se raccourcit par rapport à celui du bras de référence à mesure que l'on scanne l'échantillon loin dans le champ latéral. Le plan de cohérence aura donc tendance à se courber avec les bords qui se rapprochent de l'échantillon. Ainsi, plus on regarderait loin dans le champ, plus les plans de cohérence et de focalisation se sépareraient, ce qui entrainerait une dégradation de l'image. Les ordonnées du graphe sont à multiplier par un facteur deux si l'on prend en compte la différence de marche dans tout le système optique, donc en prenant en compte l'aller-retour de la lumière jusqu'au capteur. En bord de champ, on aurait alors une différence de marche de l'ordre de 100 µm, qui est bien plus grande que la largeur de l'enveloppe de l'ouverture numérique établie théoriquement à la Figure 2.27 et du même ordre de grandeur que sa largeur mesurée dans la Figure 2.29. En somme, en supposant que les plans sont bien superposés à une profondeur donnée en incidence normale, alors le signal deviendrait quasiment nul en bord de champ. Cette séparation pourrait être utilisée à bon escient comme un moyen de moduler la phase du signal interférométrique qu'il serait possible de démoduler pour obtenir une image OCT, mais elle dégrade tout de même l'image sur les bords et limite donc le champ latéral qu'il est possible de scanner, à moins de corriger ces variations de trajets optiques intempestives en complexifiant le système avec un second miroir galvanométrique ou une seconde platine piézoélectrique.

La symétrie inhérente de l'interféromètre de Mirau évite cette séparation des plans en fonction du champ, mais la limite du champ qu'on peut imager est plus directement liée à la présence du miroir de



FIGURE 3.31 - Variation du trajet optique en fonction de l'angle d'incidence de la lumière éclairant l'objectif de microscope objet. L'angle de déviation  $\theta$  est un rayon angulaire et atteint à peu près 2° lorsqu'on cherche à avoir un champ latéral de 600 µm. Les ordonnées sont à multiplier par deux si on considère l'aller-retour de la lumière dans l'interféromètre.

référence. De plus, le risque de vignettage reste le même qu'avec l'interféromètre de Linnik, bien qu'il y ait des moyens d'y remédier (cf. Figure 2.9).

#### 3.4.2 Méthodes de construction d'un volume 3D

L'objectif est maintenant d'obtenir des images 3D avec le système de LC-OCT muni de l'interféromètre de Mirau. Le premier élément clé pour y parvenir est le miroir de référence qui doit avoir la même surface que le champ latéral qu'on souhaite obtenir (cf. sous-section 3.2.2). Le second est, comme avec l'interféromètre de Linnik, le balayage latéral assuré par le miroir galvanométrique placé juste au-dessus de l'objectif objet. Tout comme avec les méthodes de balayage en OCM (cf. sous-section 2.2.1), on peut donner la priorité à différentes directions de l'espace pour acquérir le volume 3D. On peut par exemple prioriser le scan axial, de sorte à acquérir une série de coupes verticales voisines à concaténer en post-traitement. Le second choix possible est la priorisation du scan latéral, en prenant une série de coupes horizontales à différentes profondeurs de l'échantillon et à concaténer ensuite.

En OCM, la méthode de balayage avait été choisie de sorte à collecter les données le plus rapidement possible. L'introduction d'un objectif de microscope par rapport à l'OCT rendait le mouvement de la sonde très lent, et était donc proscrit. On avait préféré compter sur la rapidité de balayage du point sans bouger l'objectif, grâce à des miroirs galvanométriques en amont, pour finalement faire des images en face. Dans le cas de la LC-OCT, les contraintes en termes de matériel sont similaires : le miroir galvanométrique reste l'outil standard pour le balayage et possède donc une rapidité fulgurante à côté de la platine piézoélectrique qui peine à porter l'objectif et ce qui l'entoure. Il paraît donc très pertinent de prioriser le balayage latéral pour que chacun des instruments de balayage soient utilisés à des vitesses qui leur sont appropriées. Mais cela est sans compter les optimisations faites avec l'imagerie 2D au niveau de la caméra utilisée à des fréquences variables et qui est donc devenue l'élément limitant la vitesse d'acquisition. Les réticences à donner la priorité au scan axial en OCM disparaissent donc en LC-OCT, notamment grâce à la parallélisation de l'acquisition des pixels. Les deux voies décrites plus haut paraissaient donc viables pour l'imagerie 3D sur le principe.

#### Priorité aux coupes horizontales

Faire de l'imagerie en face demande tout de même une variation de la phase du signal, à démoduler par la suite pour faire apparaître l'image. En OCM, cette modulation était assurée par l'oscillation du miroir de référence, tout comme en FF-OCM [37], [38], et aussi en LC-OCT [67]. Cette solution est cependant imparfaite puisque, pour travailler en temps réel, il faut que l'oscillation soit extrêmement rapide, de l'ordre de 10 kHz, ce qui rend son mouvement sinusoïdal et favorise l'apparition d'artefacts. De plus, cela demande l'intégration d'un actuateur piézoélectrique au sein même de l'interféromètre, dans de l'huile de silicone, et dans l'espace réduit autorisé par l'interféromètre de Mirau. Cette complexification n'est néanmoins pas une nécessité : pour l'acquisition des coupes verticales en LC-OCT, on utilise la modulation naturellement présente lors des scans axiaux. L'idée était donc de profiter de cette propriété afin de faire de l'imagerie en face, sans actuateur piézoélectrique supplémentaire.

La méthode suggérée est illustrée dans la Figure 3.32, et consiste à activer le mouvement de la platine piézoélectrique pour une translation axiale linéaire et lente, tout en acquérant des lignes voisines dans la direction latérale beaucoup plus rapidement grâce au miroir galvanométrique à qui on envoie une commande triangulaire asymétrique. Les lignes sont acquises pendant la pente positive de la rampe et le temps de retour au point de départ est réglé pour avoir un déphasage de  $\pi/2$  entre la première image brute horizontale et la suivante. On acquiert de cette manière une série d'images brutes horizontales 2D légèrement obliques, chacune déphasée de  $\pi/2$  par rapport à la précédente. Une fois les données acquises, il reste à les démoduler en post-traitement.

Cette méthode est extrêmement simple en théorie, mais a posé des difficultés à mettre en place : acquérir toute une série d'images brutes demande à l'opérateur de viser une zone intéressante dans l'échantillon, il est donc important d'avoir une image démodulée en temps réel, même dégradée. Or, la



FIGURE 3.32 – Méthode de balayage pour de l'imagerie en face ou 3D en priorisant le scan latéral sans actuateur piézoélectrique supplémentaire. (a) Disposition des éléments du montage qui permettent les balayages : la platine piézoélectrique (PZT) assure le scan axial en z et la miroir galvanométrique le scan latéral en y. La ligne de lumière est parallèle à la direction x. (b) Schématisation du cheminement de la ligne de lumière au cours du temps, en suivant les pointillés. Chaque ligne acquise par la caméra est illustrée par un cercle barré rouge. 5 lignes modulées alignées verticalement et déphasées de  $\pi/2$ les unes par rapport aux autres sont utilisées par l'algorithme de Larkin pour obtenir une ligne démodulée.

méthode d'acquisition exposée ne permet de démoduler que des lignes qui sont les unes au-dessus des autres, ce qui demande de stocker au moins 5 images brutes dans la mémoire de la carte FPGA avant d'avoir une chance d'obtenir une image démodulée. Les programmes ont donc eu besoin d'être repris et optimisés. Des tests ont eu lieu pour essayer d'acquérir 5 images brutes horizontales selon cette méthode, puis les démoduler, ce qui n'a malheureusement pas abouti : rien n'apparaissait dans les images. À la suite de cet échec, nous nous sommes tournés vers l'autre méthode d'imagerie 3D tout à fait prometteuse, qui priorise le balayage axial.

Il y avait cependant une faille majeure dans le déroulement des événements : tenter de faire de l'imagerie en face n'avait pas beaucoup de sens puisque chacune des images, pour être déphasée de  $\pi/2$  par rapport à la suivante, devait en être séparée d'une distance d'environ  $\overline{\lambda}/8n \approx 70 nm$  en supposant une longueur d'onde centrale à 800 nm. L'amplitude totale du mouvement de la platine piézoélectrique était donc égale à 280 nm, pour une platine qui peut potentiellement parcourir 800 µm. La platine n'était donc pas faite pour ce type de trajectoire, qui devait être fortement perturbée par le bruit engendré par la boucle de rétroaction. Il y aurait donc beaucoup plus de chances que cette méthode fonctionne en donnant une trajectoire lente mais beaucoup plus grande à la platine, par exemple pour acquérir tout le volume 3D en une seule fois. La démodulation en directe ne serait plus absolument nécessaire dans ce cas puisqu'un grand volume serait balayé.

#### Priorité aux coupes verticales

La méthode retenue et sur laquelle on a pu projeter tous les travaux précédents est la concaténation de coupes verticales. Nous possédions déjà tout le savoir-faire de l'imagerie en coupe verticale rapide et il suffisait de synchroniser la rotation du miroir galvanométrique avec le reste du montage pour prendre une série d'images brutes verticales (cf Figure 3.3). Comme on s'attendait à une résolution latérale de l'ordre de 1  $\mu$ m, on a réglé le pas entre chaque image brute verticale à 0,5  $\mu$ m afin de respecter le critère de Shannon-Nyquist, de sorte à acquérir 1200 images brutes pour un champ latéral de 600  $\mu$ m. Mais une fois encore, la carte FPGA nous a joué des tours : le programme associé pour l'acquisition d'image avait besoin de stocker la totalité des 1200 images dans la mémoire vive de l'ordinateur avant de pouvoir les enregistrer dans le disque dur. L'achat de mémoire vive supplémentaire était donc

nécessaire, en ces temps troublés chez les commerçants de composants électroniques. C'est pourquoi l'économie de données mentionnée à la sous-section 2.3.3 prend de l'importance.

#### 3.4.3 Optimisation de l'éclairage pour l'imagerie 3D

#### Système de balayage latéral

Nous avons mentionné dans la sous-section 3.4.1 la présence de vignettage due à l'action du miroir galvanométrique dans l'interféromètre de Linnik. Comme le miroir est utilisé de la même manière dans le montage avec l'interféromètre de Mirau, le vignettage reste présent. Ce désagrément s'atténue dès qu'on rapproche le miroir galvanométrique de la pupille de sortie de l'objectif. Or, la pupille de sortie est virtuelle et se trouve à l'intérieur de l'objectif, il n'est donc pas possible de les superposer physiquement. Le plus simple est de rapprocher le miroir juste à l'entrée de l'objectif. La datasheet de l'objectif indique que la pupille de sortie se situe à 19,1 mm à l'intérieur de l'objectif en partant de son extrémité dotée du filetage RMS pour l'accrocher sur un statif de microscope. De plus, afin de pouvoir faire tourner le miroir, ce dernier a été placé environ 10 mm au-dessus de l'objectif. Sachant que pour scanner latéralement l'échantillon jusqu'à 600  $\mu$ m, le rayon angulaire maximum de la lumière incidente est  $\theta_{max} = 2^\circ$ , on en déduit que la position latérale du faisceau laser se déplace sur un diamètre de 2,6 mm dans la pupille de sortie dont le diamètre est de 11 mm. Cependant, la perte de lumière reste difficilement discernable dans nos images.

Contrairement à l'interféromètre de Linnik, il est plus simple d'intégrer les optiques nécessaires à un système de balayage latéral télécentrique (cf. Figure 2.9) avec un interféromètre de Mirau. En effet, il suffirait d'introduire les deux lentilles supplémentaires entre le miroir galvanométrique et l'objectif, ce qui n'aurait aucun impact sur l'interféromètre qui se situe en aval de l'objectif. Néanmoins, nous n'avons pas cherché à ajouter cela dans le montage de cette thèse car cela aurait demandé des modifications majeures. Nous nous sommes donc contentés de notre système de balayage constitué seulement du miroir galvanométrique qui engendre du vignettage raisonnable malgré sa non télécentricité grâce aux faibles inclinaisons utilisées pour imager le champ.

#### Réduction de la puissance lumineuse sur l'échantillon

Dans les conditions d'illumination utilisées pour obtenir les images montrées dans la sous-section 3.4.5, la puissance lumineuse mesurée est égale à 55 mW. C'est une valeur relativement grande par rapport aux systèmes commercialisés et utilisés pour l'imagerie de la peau, par exemple le système de LC-OCT commercialisé par DAMAE Medical où la puissance a été mesurée à 10 mW, ou encore le VivaScope 1500 basé sur la RCM qui utilise une puissance lumineuse maximale de 22 mW. Cependant, la longueur d'onde centrale étant dans le proche infrarouge, le premier effet indésirable en cas de surexposition sur la peau devrait être une sensation de brûlure, qui n'a jamais été observée durant les sessions d'acquisition d'images. Nous n'avons donc pas été inquiétés par cette « haute » puissance. Mais il est vrai que l'appareil a été utilisé dans un environnement contrôlé au sein d'un laboratoire. Dans un contexte industriel et commercial, des sécurités supplémentaires peuvent être demandées, c'est pourquoi nous allons voir comment il est possible de ramener la puissance lumineuse incidente à un niveau comparable aux autres appareils sans détériorer la qualité des images.

La hausse de puissance incidente vient du fait que certains paramètres d'optimisation de l'éclairage et de la collecte de la lumière ont été laissés de côté, car la puissance de la source nous le permettait et que ce qui nous intéresse davantage en laboratoire est la preuve de concept. Dans un contexte industriel, les ingénieurs porteurs du projet feraient en sorte d'optimiser toutes les variables pertinentes et tout particulièrement la puissance incidente qui dicte l'autorisation de vendre le produit ou non. Le premier des paramètres à optimiser est le choix de la lentille de tube : en effet, nous avons monté le banc optique en nous attendant à une résolution latérale de l'ordre de 1  $\mu$ m, ce qui s'est révélé inexacte d'après les résultats de la sous-section 3.5.2 : la meilleure résolution latérale mesurée est en fait de 1,3  $\mu$ m. Il devient alors possible de remplacer la lentille de tube utilisée de focale  $f_{t1} = 200 \text{ mm}$  par une autre de focale  $f_{t2} = 150 \text{ mm}$ , tout en respectant le critère de Shannon-Nyquist : le champ latéral suivant la direction

x parallèle à la ligne de lumière passerait de 940  $\mu$ m à 1250  $\mu$ m pour un capteur ligne de 2048 pixels, ce qui revient à un pixel tous les 0,6 µm. Ce changement permettrait donc toujours un échantillonnage convenable selon x, tout en augmentant le champ de l'image. En outre, la réduction du grandissement de l'image sur le capteur entraîne une plus grande concentration de la lumière sur la surface du capteur. L'éclairement sur le capteur est ainsi inversement proportionnel au carré de la variation du grandissement du système optique. Raisonnons sur les surfaces : la variation de grandissement serait  $f_{t2}/f_{t1} = 75\%$  (cf. Figure 2.13 pour la relation de grandissement), donc la surface sur le capteur subirait une réduction de  $75\%^2 = 56\%$ , ce qui veut dire qu'on pourrait réduire au mieux la puissance du laser de 56% par rapport à la situation initiale mais toujours obtenir la même quantité de photons. Ce changement seul permettrait donc de baisser la puissance incidente de 55 mW jusqu'à 25 mW, ce qui devient comparable au Vivascope 1500, tout en augmentant le champ latéral. Ce changement peut se faire sans accroc à condition d'avoir une seconde lentille de tube de qualité équivalente à l'initiale. Ici, la lentille de tube de 200 mm de focale est une TTL200-B de Thorlabs, optimisée pour être limitée par la diffraction. Thorlabs ne possède malheureusement pas de lentille de tube similaire de 150 mm de focale qu'on devrait donc remplacer, par exemple, par un doublet, mais qui risquerait d'ajouter des aberrations à l'image. C'est pourquoi nous avons gardé la lentille de tube de 200 mm de focale dans ce montage.

De même, un second paramètre qui permettrait aussi de réduire la puissance de la lumière incidente est l'optimisation de la zone éclairée. En effet, nous avons vu que la focale et la position de la lentille cylindrique déterminait le champ éclairé sur l'échantillon, ainsi que la distribution énergétique de l'éclairage (cf. Figure 2.15). Dans notre cas, l'échantillon est éclairé sur une ligne de 1170  $\mu$ m de longueur (cf. Figure 3.33), bien que la caméra n'en détecte que 940  $\mu$ m. La partie de la ligne non imagée par la caméra est donc de l'énergie inutile qu'il est possible de couper pour ne pas atteindre l'échantillon grâce à un choix judicieux de la lentille cylindrique ou l'utilisation d'un diaphragme. Ainsi, on pourrait potentiellement réduire la puissance incidente totale de 20% pour passer de 55 mW à 44 mW détectés par le puissance-mètre, bien que la puissance par unité de surface reste la même.

On effleure ici un problème majeur dans la caractérisation et la comparaison d'appareils d'imagerie médicale, qui est la pertinence de la puissance incidente envoyée sur l'échantillon, dans notre cas la peau. La mesure de la puissance totale est simple à réaliser puisqu'il suffit de placer un puissance-mètre à la place de l'échantillon. Elle permet d'avoir une vague idée de la dangerosité de l'appareil, mais n'est pas assez précise : une meilleure estimation est l'éclairement, qui est la puissance par unités de surface, envoyée sur l'échantillon. Concentrer la lumière en un point aura un effet plus néfaste que de l'étaler sur une surface. On pourrait alors croire que la microscopie confocale serait plus dangereuse que la LC-OCT à puissance incidente égale. Cependant, il faut aussi prendre en compte le balayage de l'échantillon n'est éclairé que pendant un court laps de temps, la puissance absorbée par l'échantillon en un point donné pourra se disperser plus aisément dans les zones aux alentours, ce qui laisse penser que la LC-OCT pourrait être plus dangereuse que la microscopie confocale à puissance égale. Pour comparer rigoureusement deux systèmes d'imagerie, il faudrait mesurer pour chaque point imagé l'énergie emmagasinée puis dissipée au cours du temps lors d'un scan. Ces considérations rendent difficiles la comparaison pertinente entre systèmes d'imagerie.

#### 3.4.4 Obturation et déformation de la ligne dans le champ

On étudie les conséquences de l'inclinaison du miroir galvanométrique avec l'interféromètre de Mirau pour imager le champ latéral. Peut-être un œil plus avisé que le nôtre l'aura prévu avant nous, mais la situation illustrée à la Figure 3.12 où l'on vise le milieu du champ latéral avec l'interféromètre de Mirau n'est pas celle où l'on perd le plus de lumière à cause de l'obturation. Au contraire, il s'agit en fait de celle où l'on collecte le plus de lumière. Les tracés de rayons lorsque le champ est imagé sont illustrés dans la Figure 3.34 : il faut d'abord se rappeler que l'objectif est télécentrique objet, donc en imageant le champ de l'échantillon, le cône de lumière dans l'espace objet ne fait que se translater.



FIGURE 3.33 – Forme de la ligne de lumière éclairant l'échantillon à travers l'interféromètre de Mirau dans le plan *x*-*y*. Ces images ont été acquises avec une lentille de tube de 60 mm de focale. Les deux lignes courbées sont celles qui éclairent l'échantillon. La ligne horizontale très intense est la lumière parasite réfléchie directement sur le cube séparateur. Le fond lumineux en forme de disque provient de l'interféromètre : il s'agit vraisemblablement de la réflexion parasite sur l'arrière du miroir de référence et défocalisée sur le capteur. (a) Le signal du bras objet et de la référence sont superposés, avec les interférences visibles au milieu de la ligne. (b) Le bras objet est défocalisé, et seul le signal revenant du bras de référence est visible. Conjuguer le capteur avec la position exacte de la ligne est imprécis, mais on sait que la ligne de lumière revenant de la référence. En la comparant avec la ligne provenant du bras objet, on en déduit la taille globale de la ligne de lumière : 1170 µm.

Ensuite, quand un rayon arrive à se focaliser sur le miroir de référence, il faut qu'il parvienne aussi à retourner dans l'objectif pour être détecté. Le rayon lumineux peut donc être obturé par le miroir de référence à deux endroits : en sortant de l'objectif, et en y retournant. La surface d'obturation n'est pas égale à la surface du miroir, mais à celle de l'union du miroir de référence et de son symétrique par rapport au plan de symétrie du « cône », qui, en 3D, s'étire selon la direction de la ligne de lumière. Finalement, la surface d'obturation augmente avec le champ, et seuls les rayons les plus inclinés permettent de former l'image interférométrique. La perte de lumière et la déformation de la ligne dans le champ est montrée dans la Figure 3.35.

On y observe aussi l'origine de lumière parasite, qui est la réflexion sur l'arrière du miroir de référence. Ces phénomènes affectent grandement le choix de la taille du miroir de référence. Par conséquent, parmi tous les motifs dessinés sur le masque pour les dépôts d'or, seul celui de plus petite taille a été retenu. Heureusement, la puissance lumineuse en réserve était suffisante pour que la qualité des images ne soit pas dégradée significativement.



FIGURE 3.34 – Augmentation de la surface d'obturation en imageant le champ latéral. Les rayons rouges délimitent le cône de lumière sortant de l'objectif. Les rayons bleus et la zone hachurée délimitent la portion de cône de lumière dont les rayons ne peuvent pas retourner dans l'objectif. (a) Obturation au centre du champ. (b) Obturation en bord de champ. Comme l'objectif est télécentrique objet, le cône rouge est simplement translaté. En considérant le cône bleu : le miroir de référence empêche les rayons descendants sur la droite d'atteindre l'échantillon ; les rayons descendants à gauche atteignent l'échantillon, mais sont bloqués par le miroir en remontant vers l'objectif. En bord de champ, la surface obturée double par rapport au centre du champ.



FIGURE 3.35 – Perte de lumière dans le champ. Plus on avance dans l'ordre alphabétique, plus on se décale latéralement la ligne de lumière sur l'échantillon. En particulier, l'image (**a**) est au centre du champ. Plus on se décale dans le champ, plus le milieu de la ligne s'assombrit à cause de l'obturation plus importante. On y observe une déformation importante, surement due à la diffraction par la surface d'obturation qui varie. De (**a**) à (**f**), on distingue un halo de lumière parasite provenant de la réflexion sur l'arrière du miroir de référence qui se décale vers le haut. Dans l'image (**e**), on distingue l'apparition d'un second halo de lumière parasite moins lumineux que le premier : c'est le signe que la lumière du bras de référence ne se focalise plus sur le miroir car on est trop loin dans le champ, et qu'elle retourne vers le capteur de manière défocalisée après une seule réflexion sur la séparatrice. La ligne de lumière correspond donc seulement au signal du bras objet, toujours obturé en partie. Dans l'image (**f**), nous sommes assez loin dans le champ pour que le miroir de référence bloque moins de lumière : on observe un regain de lumionsité au milieu de la ligne.

#### 3.4.5 Exemples d'images 3D

La Figure 3.36 présente un exemple d'image 3D que l'on peut obtenir avec le montage de LC-OCT basé sur l'interféromètre de Mirau développé pendant cette thèse. Il s'agit de l'image du dos de ma main acquise *in vivo* en environ une minute, en concaténant 1200 B-scans séparés de 0,5 µm les uns des autres.

Dans un premier temps, les images brutes des coupes verticales sont acquises une à une à 17 Hz en utilisant la correction de la non-linéarité de la trajectoire de la platine piézoélectrique. En parallèle, le miroir galvanométrique tourne lentement et détermine le pas de 0,5  $\mu$ m entre chaque image brute. Ces images brutes sont ensuite traitées une à une sur MATLAB : elles sont démodulées à l'aide de l'algorithme de Larkin, redimensionnées, et on applique à chaque pixel une puissance 0,25 afin d'étirer l'histogramme de l'image et augmenter le contraste. Puis elles sont redimensionnées toutes ensembles en tant que volume 3D. Enfin, un filtre gaussien 3D est appliqué pour lisser l'image et atténuer le bruit. Finalement, on obtient une image 3D de dimensions 940  $\mu m \times 600 \ \mu m \times 350 \ \mu m (x \times y \times z)$ .

Le volume 3D est affiché à l'aide du programme Slicer, qui permet de modifier le contraste et le fond constant des images pour une meilleure visualisation, si besoin. Ce programme permet également de découper le volume horizontalement ou verticalement et de mettre en évidence les structures de la peau, notamment de la couche superficielle à la plus profonde : le stratum corneum (couche cornée), le stratum spinosum (couche épineuse), le stratum basale (couche basale) et le derme papillaire. La jonction épiderme-derme est celle entre le stratum basale et le derme papillaire, qui est la région d'intérêt pour la détection des cancers cutanés de manière précoce.

#### **3.5** Performances

#### 3.5.1 Résolution axiale

On rappelle que la résolution axiale d'un système OCT est définie comme la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme engendré par la réflexion sur une interface plane. Pour la mesurer, il suffit donc de mesurer le signal dû à l'interface air-verre potentiellement en contact avec l'échantillon, ce qui donne un signal comme dans la Figure 2.29. Comme l'enveloppe de l'ouverture numérique est en réalité beaucoup plus large que celle de l'enveloppe de cohérence, c'est cette dernière qui détermine la résolution axiale. Il est possible d'extraire la partie non modulée du signal avec un filtre passe-bas, puis de le soustraire au signal initial pour ne garder que la partie modulée. On applique ensuite l'algorithme de Larkin pour en obtenir l'enveloppe et pour mesurer sa largeur à mi-hauteur (cf. Figure 3.37). Pour rester homogène à une intensité lumineuse, on applique une racine carrée à l'enveloppe. On obtient finalement la résolution axiale du système :

$$\Delta z = 1,1 \,\mu m \tag{3.35}$$

Cette résolution est suffisante pour notre application et permet de discerner les noyaux des cellules dans l'épiderme. Il est à noter que la largeur de l'enveloppe est même affinée dans les images finales de LC-OCT grâce à la mise au carré en fin de démodulation.

#### 3.5.2 Résolution latérale

Nous avons vu dans la sous-section 2.4.2 diverses formules théoriques par rapport à la résolution latérale. Dans notre montage, le faisceau laser servant comme éclairage a été agrandi latéralement 8 fois afin d'obtenir la distribution énergétique la plus large et uniforme possible. De plus, la source sort d'une fibre monomode et peut donc être considérée spatialement cohérente. La formule théorique la plus pertinente à utiliser est donc celle de l'équation (2.58) dans le cas cohérent. A 700 nm et avec une ouverture numérique égale à 0,5, on a donc :

$$\Delta r_{Fourier}^{coh} = \frac{\lambda}{ON} = 1,4 \ \mu m \tag{3.36}$$



FIGURE 3.36 – Image 3D du dos de la main obtenue avec le montage de LC-OCT basé sur l'interféromètre de Mirau. (**a-b**) Exemples d'images en coupe verticales extraites de l'image 3D. (**c-f**) Exemples d'images en coupe horizontale extraites de l'image 3D, avec, dans l'ordre : le stratum corneum (couche cornée), le stratum spinosum (couche épineuse), le stratum basale (couche basale) et le derme papillaire.



FIGURE 3.37 – Mesure de la résolution axiale du montage. Il s'agit de l'enveloppe de l'interférogramme d'une interface plane obtenue en appliquant l'algorithme de Larkin. Pour conserver l'homogénéité d'une intensité lumineuse, une racine carrée a été appliquée à l'enveloppe. Sa largeur à mi-hauteur (FWHM pour « full width half maximum ») définit la résolution axiale, mesurée à 1,1 µm dans les conditions d'acquisition des images de peau.

On s'attend donc à ce que la résolution latérale varie autour de cette valeur. Rappelons cependant que cette formule concerne un microscope conventionnel qui ne prend en compte ni l'effet confocal, ni l'obturation centrale.

La résolution latérale a été mesurée à l'aide d'une mire de résolution de microscopie (#37-539, Edmund Optics) contenant une série de motifs de fréquence spatiale allant de 7,5 à 3300 lp/mm. Chaque motif est constitué de 5 barres verticales et 5 barres horizontales gravées dans la couche métallique de la mire. Ils permettent donc de faire une mesure de résolution dans les deux directions du plan latéral (x et y), ce qui est particulièrement intéressant avec la forme géométrique asymétrique de notre éclairage. Ces mesures ont été faites en se mettant dans les conditions expérimentales utilisées lors de l'imagerie de la peau, à la différence d'une densité optique placée devant la source pour atténuer la réflexion spéculaire sur la couche de métal. On a acquis une image 3D comme décrit dans la sous-section 3.4.5 pour en extraire les coupes horizontales d'intérêt, c'est-à-dire ceux contenant les motifs de la mire. Ici, on a choisi le critère de résolution arbitraire suivant : dans une direction donnée, la résolution latérale est définie comme la plus haute fréquence spatiale dont on peut compter sans ambiguïté le bon nombre de barres noires. Les motifs qui respectent ce critère sont montrés dans la Figure 3.38. Avec ces images, on obtient donc les performances suivantes :

$$\begin{cases} \Delta x_{mire} = 1.9 \ \mu m \\ \Delta y_{mire} = 1.3 \ \mu m \end{cases}$$
(3.37)

Ces mesures se situent bien aux alentours de la valeur théorique calculée précédemment. Il existe une anisotropie plutôt forte entre les deux directions : la résolution dans la direction x, c'est-à-dire le long de la ligne de lumière, est moins bonne que dans la direction orthogonale. Cette différence s'explique par le filtrage confocal dont bénéficie la direction y grâce à l'éclairage et la détection en ligne. La résolution dans la direction x correspond à celle de la microscopie conventionnelle, sans effet confocal, qui peut donc être comparée à la valeur théorique : elle est ainsi sensiblement détériorée par rapport à la théorie, ce qui pourrait s'expliquer par la diffraction engendrée par le miroir de référence jouant le rôle d'obstacle pour les rayons lumineux.



FIGURE 3.38 – Mesure de la résolution latérale à l'aide d'une mire de résolution. On rappelle que la ligne de lumière est parallèle à la direction x et que le mouvement du miroir galvanométrique balaye la ligne dans la direction y. (a) Dernier motif dont on compte le bon nombre de barres sans ambiguïté pour caractériser la résolution dans la direction x. La fréquence spatiale associée est 270 lp/mm, soit 1,9  $\mu$ m. (b) Dernier motif dont on compte le bon nombre de barres ranctériser la résolution dans la direction x. La fréquence sans ambiguïté pour caractériser la résolution dans la direction x. La fréquence sons ambiguïté pour caractériser la résolution dans la direction y. La fréquence spatiale associée est 400 lp/mm, soit 1,3  $\mu$ m.

On remarque également sur les images comme la limite de résolution mesurée, notamment dans la direction x, est détériorée à cause de « rebonds » vers le bas de chaque motif. Ce sont des artefacts typiques de l'éclairage cohérent qu'il est intéressant de mettre en évidence en mesurant ce qui se rapproche d'une réponse impulsionnelle ou linéique du système : la forme de l'éclairage sur l'échantillon. Pour ce faire, on a monté un microscope imageur comme dans la Figure 3.10 en visant le plan où se trouvait le capteur de la caméra. L'objectif imageur est un objectif pour l'imagerie biologique de grandissement 20x sans milieu d'immersion et qui travaille en limite de diffraction pour ne pas introduire d'aberrations supplémentaires. La mise au point dans l'espace objet est faite sur une interface air-verre. Les images ont été acquises avec et sans la lentille cylindrique pour faire les mesures respectivement dans les directions y et x à l'aide d'une caméra 2D (cf. Figure 3.39). Sans lentille cylindrique, on obtient une tache lumineuse en forme de croix. Les rebonds dans les directions verticale et horizontale sont dus à la diffraction par le miroir de référence qui a les dimensions  $1100\mu m \times 620\mu m$  $(x \times y)$ : les rebonds sont donc plus écartés dans la direction y. Cette première image est utile pour évaluer les performances dans la direction x, le long de la ligne : en tracant une coupe verticale par le milieu de la tache de diffraction, on obtient une courbe dont la largeur à mi-hauteur est mesurée à 2,1 µm. La seconde image concerne le cas où on utilise la lentille cylindrique et donc où l'éclairage prend la forme d'une ligne. Elle est donc intéressante pour connaître les performances du système dans la direction y : en traçant une coupe horizontale, on obtient une courbe dont la largeur du pic central est mesuré à 1,3 µm. C'est en effet ce pic central qui compte puisqu'on observe la direction qui bénéficie du filtrage confocal : sans entrer dans les détails, on peut considérer que le profil du signal sera mis au carré, et que les pics décentrés seront largement amoindris par rapport à celui du centre.

Finalement, les informations se recoupent avec les deux méthodes de mesure, et on considère les résultats comme la résolution latérale du système.



FIGURE 3.39 – Mesure de la résolution latérale à l'aide de la forme de l'éclairage dans le système. (a) Mesure dans la direction x, le long de la ligne de lumière. La largeur à mi-hauteur du signal indique une valeur de 2,1 µm. (b) Mesure dans la direction y, où l'on mesure une largeur du pic central de 1,3 µm.

#### 3.5.3 Sensibilité

La sensibilité est le plus petit signal mesurable par le système, et a donc un lien direct avec le bruit présent dans les images. En utilisant la définition logarithmique, la sensibilité des systèmes LC-OCT avec un interféromètre de Linnik est de l'ordre de -86 dB [41]. Avec l'interféromètre de Mirau et un miroir de référence en forme de ligne de dimensions 1800  $\mu m \times 100 \mu m$  pour faire seulement de l'imagerie en coupe, la sensibilité avait été mesurée à -83 dB [64].

Pour faire la mesure de sensibilité avec l'interféromètre de Mirau et le miroir de référence de dimensions 1100  $\mu m \times 620 \mu m$ , on utilise une méthode similaire que pour les mesures antérieures, à savoir la prise d'une image brute en utilisant une surface très peu réfléchissante de réflectivité connue. De cette manière, il est possible de mesurer le bruit du fond de l'image en unités propres aux pixels, puis de les convertir en termes de taux de réflexion grâce à la surface connue. Dans notre cas, nous nous sommes placés dans les mêmes conditions d'éclairage que lors de l'acquisition d'images de peau, puis on a pris l'image d'une interface entre la silice fondue et l'huile de silicone dont les indices optiques sont respectivement égaux à 1,4553 [62] et 1,4 à 700 nm. L'indice de l'huile est mal connu, ce qui induit une certaine incertitude dans la mesure. Quand bien même, ces indices donnent un taux de réflexion d'environ 3,8  $\times 10^{-4}$ , de sorte à obtenir la Figure 3.40. La valeur moyenne du fond de l'image et qui constitue la mesure de sensibilité est situé à -75 dB.

On remarque qu'en augmentant la surface du miroir de référence, la sensibilité se dégrade. On attribue cette tendance à la réflexion de la lumière incidente sur la face arrière du miroir de référence : plus cette surface augmente, plus la quantité de photons réfléchis et incohérents détectés par le capteur augmente. On peut voir ce retour de lumière parasite dans la Figure 3.35 quand on étudiait le



FIGURE 3.40 – Mesure de la sensibilité du système de LC-OCT basé sur un interféromètre de Mirau avec un miroir de référence de taille  $1100\mu m \times 620\mu m$ . Le pic central a un coefficient de réflexion d'environ  $3.8 \times 10^{-4}$  et a servi à calibrer la valeur des ordonnées. Le bruit du fond de l'image a une moyenne de -75 dB, qui est la mesure de sensibilité.

comportement de l'éclairage dans le champ. Afin de limiter cet effet, il est possible d'empêcher cette réflexion à l'aide d'une couche absorbante placée sur la face opposée de la lame de verre sur laquelle le miroir de référence est déposé [68]. Seulement, dans notre système, la lame de référence est directement collée sur l'objectif de microscope, ce qui rend la face en question inaccessible.

La mesure illustrée par la Figure 3.40 semble montrer des performances fortement dégradées par rapport aux systèmes basés sur l'interféromètre de Linnik, ou bien sur l'interféromètre de Mirau avec un plus petit miroir de référence, bien que les images obtenues à la Figure 3.36 avec le montage de cette thèse rivalisent en qualité. Cela vient du fait que les mesures de sensibilité sont faites dans des conditions bien différentes de ce qu'on a en réalité : en effet, la diffusivité de la peau est une caractéristique complètement négligée dans ces mesures, bien que cela soit l'une des principales sources de photons incohérents, et donc de bruit. Pour preuve, nous avions expliqué dans la sous-section 2.4.4 comme la sensibilité était un indicateur de la profondeur de pénétration. Or, avec le miroir de référence en forme de ligne [64], ou le plus grand utilisé pour l'imagerie 3D, elle reste identique. Ainsi, en situation réelle, les images de notre système de LC-OCT restent similaires à celles des aux autres. La sensibilité est donc une caractéristique présentée seulement pour tenter de comparer différents systèmes d'imagerie entre eux, mais n'est pas forcément pertinente lorsqu'ils sont utilisés normalement. En outre, il vaut mieux garder un œil critique lors de son interprétation, notamment quand les conditions de mesure ne sont pas exposées clairement : par exemple, simplement envoyer plus de lumière permet d'améliorer la sensibilité.

#### 3.5.4 Spectre détecté

Le spectre de la source a été mesuré en utilisant les mêmes méthodes que la spectroscopie par transformée de Fourier, c'est-à-dire en calculant la transformée de Fourier d'un interférogramme (cf. Figure 3.41). Dans notre cas, on utilise l'interférogramme donné par la réflexion sur une interface plane en scannant très lentement en profondeur pour éviter tout risque de non-linéarité de la trajectoire, critique dans ces mesures. Une série d'images brutes ont été utilisées, et dans ces images, plusieurs profils verticaux, afin d'obtenir un certain nombre d'interférogrammes. Ceux-ci ont été utilisés avec un filtre

de Kalman afin d'estimer le spectre tout en en réduisant le bruit. Les paramètres du programme ont été déterminés empiriquement en cherchant le spectre de plusieurs sources monochromatiques, comme le pic de la pompe du laser à 1064 nm, le laser avec un filtre à 635 nm, un autre à 800 nm, et un laser monochromatique à 785 nm. Une fois les paramètres optimisés, les pics monochromatiques étaient retrouvés à quelques nanomètres près. Cette méthode, bien que numériquement complexe, a l'avantage de prendre en compte l'effet de toutes les optiques du montage et donc de calculer le spectre du faisceau en sortie du système. Pour remonter au spectre dans le bras objet, une correction peut être effectuée en prenant en compte le spectre de réflexion et de transmission de la séparatrice, mais qui résulte seulement en un décalage du spectre de quelques nanomètres, qui a été négligé. Le programme a été développé par Yijun Yang, à l'occasion de son stage dans le groupe de recherche Biophotonique du Laboratoire Charles Fabry. Il en résulte finalement un spectre centré autour de  $\overline{\lambda} = 700 nm$  et de largeur  $\Delta \lambda = 100 nm$ .



FIGURE 3.41 – Spectre détecté par la caméra. Il a été calculé par transformée de Fourier à partir de l'interférogramme obtenu avec la réflexion sur une interface plane. Il est centré autour de  $\overline{\lambda} = 700 nm$  et a une largeur à mi-hauteur de l'ordre de  $\Delta \lambda = 100 nm$ .

### Conclusion

Ce manuscrit de thèse a permis de coucher sur le papier le processus de développement d'un montage optique basé sur une méthode récente appelée la Tomographie par Cohérence Optique Confocale Linéaire, en utilisant un interféromètre de Mirau plutôt qu'un interféromètre de Linnik. Son but est d'optimiser la détection des cancers cutanés de manière précoce, en particulier des mélanomes qui sont associés à un fort taux de mortalité s'ils ont le temps de se développer chez un individu. En effet, la détection de ces cancers est basée sur un examen visuel de la surface de la peau dont le diagnostic ne peut être confirmé qu'à l'aide de biopsies suivies de traitements histopathologiques chronophages et onéreux. Le montage optique développé permettrait de faciliter grandement ce processus afin de multiplier les examens de routine des dermatologues pour un meilleur suivi et sans incidents néfastes pour le patient. Certains appareils d'imagerie médicale ont déjà été développés et mis sur le marché dans un but similaire au nôtre en utilisant des méthodes différentes : on dénote notamment la microscopie confocale en réflectance, la microscopie non linéaire et la tomographie par cohérence optique auxquels on compare le montage de cette thèse.

Nous avons retracé l'historique des méthodes et technologies qui ont mené à la LC-OCT. Elle débute par la tomographie par cohérence optique, socle sur lequel repose la théorie de base, dont l'idée est de détecter la position et le taux de réflexion de couches dans un échantillon en y envoyant une onde lumineuse et en détectant les ondes réfléchies en profitant du phénomène d'interférences lumineuses pour produire un A-scan. La microscopie par cohérence optique, qui comporte un objectif de microscope supplémentaire par rapport à l'OCT, a illustré la difficulté de balayer un objectif. De même, l'OCM plein champ a montré comme l'absence de filtre confocal dégrade la sensibilité du système optique. De ces deux constats vient naturellement la LC-OCT, qui, grâce à son éclairage et sa détection en ligne, parvient à conserver un effet confocal pour une meilleure sensibilité et à paralléliser l'acquisition de plusieurs A-scans pour balayer un objectif de microscope à une vitesse suffisante. Equipé d'un interféromètre de Linnik, un montage de LC-OCT est capable de produire des images en coupe verticale, horizontale et des images 3D d'un échantillon de peau humaine à  $\sim 10 Hz$  avec une résolution spatiale isotrope de ~1  $\mu m$ , un champ latéral de ~1,2 mm à une profondeur de l'ordre de ~500  $\mu m$ , suffisante pour observer la jonction épiderme-derme où les mélanomes ont tendance à commencer leur croissance. La LC-OCT est donc capable de fournir aux dermatologues des images analogues aux images histologiques à l'aide d'outils optiques non invasifs qui fournissent un diagnostic en direct. Comparée aux autres technologies commercialisées utilisées pour la détection des cancers cutanés et basées sur la RCM, l'OCT fréquentiel, la FF-OCM ou la microscopie non linéaire, la LC-OCT reste la plus adaptée pour cette application notamment en termes de résolution spatiale et de profondeur de pénétration.

La compacité et la vitesse d'acquisition restent des enjeux majeurs pour la LC-OCT afin d'inclure cette technologie dans des sondes facilement manipulables et utilisables par les médecins. C'est pourquoi nous nous sommes tournés vers l'interféromètre de Mirau qui n'utilise qu'un seul objectif de microscope, au lieu de deux dans le cas de l'interféromètre de Linnik. Le volume du montage peut ainsi être réduit, tout comme le poids à porter pour le balayage axial, ce qui entraîne un balayage plus efficace pour une acquisition plus rapide. L'interféromètre de Mirau est décrit dans le manuscrit : il s'agit d'un interféromètre miniature placé en aval de l'objectif de microscope et dont le bras de référence est replié le long de l'axe optique. Il pâtit donc d'une obturation centrale qui bloque une partie de la lumière incidente. Ainsi, nous avons explicité le raisonnement qui a mené au choix de la taille du miroir de référence, mais aussi à celui de la séparatrice. En parallèle de la réduction du poids porté par la platine piézoélectrique, nous avons mis au point une méthode d'acquisition basée sur l'acquisition des images lignes à une fréquence variable dans le but de pousser au maximum la vitesse d'acquisition en devenant limités par la vitesse de la caméra de 250 000 lignes par seconde, pour atteindre une vitesse d'acquisition

de 17 Hz, la plus rapide en LC-OCT à ce jour. Finalement, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des images 3D de qualité en évitant la séparation des plans de cohérence et de séparation en bord de champ latéral par rapport à l'interféromètre de Linnik, à condition de posséder une source avec une puissance suffisante. Le montage de LC-OCT basé sur un interféromètre de Mirau créé durant cette thèse est ainsi capable d'acquérir des B-scans de 940 µm de large (x) jusqu'à 350 µm de profondeur (z) à 17 Hz. L'utilisation d'un miroir de référence rectangulaire de taille 1100 µm × 620 µm (x × y) a permis l'acquisition d'images en 3D. En effet, concaténer une série de 1200 B-scans également espacés les uns des autres à l'aide d'un miroir galvanométrique forme un volume 3D de taille 940 µm × 600 µm × 350 µm (x × y × z). Le montage possède alors une résolution anisotrope de 1,9 µm × 1,3 µm × 1,1 µm (x × y × z) et une sensibilité qui lui permettent de produire des images finales de qualité équivalente à celles des systèmes de LC-OCT basés sur l'interféromètre de Linnik.

Les résultats très encourageants sur lesquels ont débouché cette thèse n'ont cependant pas inclus la totalité des travaux réalisés, mais qui mériteraient d'être développés dans le futur. Les premiers d'entre eux concernent l'optimisation de la vitesse d'acquisition :

- L'imagerie 3D en concaténant une série de coupes horizontales permettrait de profiter de la rapidité et de la linéarité de la rotation du miroir galvanométrique, qui ici n'ont pas été exploitées au maximum. L'acquisition des images lignes à fréquence variable appliquée à la trajectoire de la platine piézoélectrique a amélioré la vitesse d'acquisition globale, mais il faut garder en tête que sa trajectoire était particulièrement déformée à cause de l'inertie et donc que la fréquence de la caméra passait du simple ou double. Avec la linéarité du mouvement du miroir galvanométrique, la caméra pourrait être utilisée avec une fréquence d'acquisition constamment proche de son maximum. Il existe donc un potentiel gain de vitesse en utilisant la platine et le miroir galvanométrique à des vitesses qui leur correspondent mieux ;
- Le deuxième aspect concerne aussi l'augmentation de la vitesse d'acquisition, valable pour les systèmes de LC-OCT en général : il s'agit de l'implémentation de l'acquisition des images lignes avec une fréquence variable non pas avec une trajectoire triangulaire de la platine piézoélectrique, mais une trajectoire sinusoïdale. En acquérant les images lignes à la montée et à la descente de la trajectoire, on estime que l'acquisition pourrait se faire à 28 Hz en étant limités par la caméra. Avec un déphasage de  $3\pi/2$  entre les lignes images au lieu de  $\pi/2$  actuellement, cette estimation pourrait même être réhaussée. Cette méthode demande cependant une bonne synchronisation de l'acquisition des images à la montée et à la descente de la platine.

Le dernier point concerne la réduction des aberrations dans les systèmes de LC-OCT en général : une étude des aberrations a été menée au cours de cette thèse, sans pouvoir être directement utilisée avec l'interféromètre de Mirau actuel. Pourtant, sans avoir à toucher à la fenêtre de l'objectif, il pourrait être possible d'introduire une couche d'air entre la fenêtre et l'échantillon à l'aide d'une fine lame à faces parallèles qui ferait la transition entre l'air et l'huile. Cela compenserait les aberrations sphériques des systèmes de LC-OCT si le contrôle de l'inclinaison de la lame introduite est suffisant.

### Annexe A Microscopie

#### A.1 Eclairage Köhler

En microscopie conventionnelle, l'échantillon peut être imagé de deux manières différentes : on peut soit éclairer l'échantillon d'un côté et collecter le signal <u>transmis</u> en plaçant l'objectif de microscope à l'opposé, soit l'éclairer à travers l'objectif et collecter le signal <u>réfléchi</u>. Ces deux configurations sont appelées respectivement diascopie (cf. Figure Annexe A.1 [29]) et épiscopie (cf. Figure Annexe A.2 [29]). Dans nos applications, le signal détecté provient de la réflexion de l'échantillon, et nous faisons donc de l'épiscopie. L'éclairage Köhler est cependant plus simple à décrire en diascopie, même si les buts atteints sont exactement les mêmes dans les deux cas. On décrira donc l'éclairage Köhler en diascopie.

L'éclairage Köhler en diascopie est constitué d'une source lumineuse, d'un diaphragme « de champ » (DC), d'un diaphragme « d'ouverture » (DO), d'un condenseur, et d'une optique devant la source formant sa conjugaison avec le DO. L'idée de cette configuration d'éclairage est d'illuminer l'échantillon de la manière la plus uniforme possible, donc en rejetant l'image de la source dans l'espace de l'échantillon à l'infini, mais aussi d'avoir un contrôle sur le champ éclairé et le degré de cohérence spatiale de la source. Les conjugaisons source  $\leftrightarrow$  DO  $\leftrightarrow$  infini dans l'espace objet permettent de former l'image intermédiaire de la source dans le plan du DO qui en règle la taille du diamètre et donc la cohérence spatiale, et de rejeter cette image intermédiaire à l'infini dans l'espace de l'échantillon. La conjugaison DC  $\leftrightarrow$  échantillon permet de régler le champ éclairé ; la taille du DO permet aussi de régler la taille du cône de lumière qui arrive sur l'échantillon, et donc l'ouverture numérique de l'éclairage, d'où le nom de chacun des diaphragmes. Dans cette configuration, chacun des points de l'échantillon dans le champ est éclairé par le même cône de lumière simplement translaté, conduisant à une réponse photométrique similaire en chaque point. Cette propriété est notamment due à la réjection du DO, qui joue en fait le rôle de pupille du système d'éclairage, à l'infini en sortie : c'est la télécentricité image de l'éclairage Köhler.



FIGURE ANNEXE A.1 - Principe de l'éclairage Köhler en diascopie. dép : dépoli ; I : optique de l'illuminateur ; DC : diaphragme de champ ; DO : diaphragme d'ouverture ; C : optique du condenseur ; Pr : préparation (échantillon) ; Obj : objectif de microscope ; Pu : pupille ; Dc : diaphragme de champ de l'oculaire ; Oc : oculaire ; c.o. : cercle oculaire. L'éclairage Köhler permet d'illuminer la préparation de manière uniforme et de contrôler indépendamment le champ éclairé et le degré de cohérence spatial de la source grâce au DC et au DO, respectivement. Cette configuration repose sur les conjugaisons DC  $\leftrightarrow$  Pr, dép. $\leftrightarrow$  DO  $\leftrightarrow$  infini dans l'espace de la préparation. [29].



FIGURE ANNEXE A.2 - Principe de l'éclairage Köhler en épiscopie. dép : dépoli ; I : optique de l'illuminateur ; DO : diaphragme d'ouverture ; DC : diaphragme de champ ; C : optique du condenseur ; l.s. : lame semi-réfléchissante ; Pu : pupille de l'objectif (dans le plan focal de  $Obj_{\infty}$ ) ;  $Obj_{\infty}$  : objectif de microscope (corrigé à l' $\infty$ ); Éch : échantillon (opaque) observé par réflexion ; Lt : lentille de tube ; dc : diaphragme de champ de l'oculaire ; Oc : oculaire ; c.o. : cercle oculaire. Le montage est plus complexe que dans le cas de la diascopie, mais les rôles des diaphragmes restent les mêmes. [29]

#### A.2 Télécentricité

La télécentricité est, par définition, le renvoi de la pupille d'un système optique à l'infini en entrée ou sortie d'un système optique. Les objectifs de microscopes sont le plus souvent télécentriques du côté de l'objet à imager pour, entre autres, assurer une réponse photométrique homogène sur tout le champ latéral de l'image.

La télécentricité objet (cf. Figure Annexe A.3) est donc le renvoi de la pupille du système optique à l'infini dans l'espace objet, ou, autrement dit, la présence de la pupille dans le plan focal image de l'objectif. Pour un objectif de microscope, l'espace objet est celui de l'échantillon. La pupille d'entrée, dans l'espace objet, est donc angulaire avec un angle  $\alpha_M$ , lié à l'ouverture numérique de l'objectif par  $ON = n \sin \alpha_M$ , avec *n* l'indice du milieu dans lequel les rayons convergents se propagent. Ainsi, seuls les rayons lumineux contenus dans un cône tels que  $\alpha \in [-\alpha_M, +\alpha_M]$  dont le sommet est le point émetteur peuvent pénétrer dans l'objectif sans se faire couper par la pupille. Si la pupille d'entrée était à distance finie, la géométrie de ce cône de lumière varierait en fonction de la position du point considéré dans le plan de focalisation, mais l'avoir renvoyée à l'infini permet de rendre ce cône invariant. Dans le cas de la diascopie, il y a d'un côté l'éclairage Köhler qui est télécentrique image pour éclairer l'échantillon de manière homogène sur tout le champ, et, de l'autre, un objectif télécentrique objet qui collecte le même cône de lumière de la part de chaque point du champ. Associés ensemble, l'utilisateur du microscope bénéficie d'une image avec une luminosité homogène.



FIGURE ANNEXE A.3 - Illustration de la télécentricité objet d'un objectif de microscope, modélisé comme une lentille mince. On appelle l'espace où les rayons sont convergents l'espace objet, et celui où les rayons sont collimatés l'espace image. La pupille physique de l'objectif se situe dans son plan focal image, de façon à la renvoyer à l'infini dans l'espace objet. La pupille d'entrée est donc à l'infini et détermine, avec l'axe optique, l'angle d'ouverture objet  $\alpha_M$ . Pour tout point émetteur dans le plan focal objet, un objectif télécentrique collecte donc un même cône de lumière dont le rayon angulaire est  $\alpha_M$ .

### Annexe B Etude des aberrations

Cette annexe est un complément de la sous-section 3.2.3 sur l'étude des aberrations dans l'interféromètre de Mirau, qui n'en montre que les définitions et les résultats. Son but est d'exposer les calculs faits dans ce cadre en détails pour un lecteur désireux de les reprendre. Pour en faire une annexe suffisante à elle-même, on s'autorise à recopier des éléments déjà inclus dans le corps du manuscrit. De cette manière, le lecteur n'aura pas à faire des va-et-vient entre ces deux parties. Les calculs montrés ici reposent sur les cours de conception optique de Thierry Lépine enseignés à l'Institut d'Optique Graduate School.

#### **B.1** Notions d'optique géométrique utiles

Cette section regroupe des expressions mathématiques d'optique géométrique qui ne sont pas démontrées ici mais qui seront utiles plus tard. Attention, ces relations « simples » sont valables dans l'hypothèse de petits angles, donc en optique paraxiale. Autrement, des dépendances par rapport à un grand nombre de variables restent présentes. Il faut donc garder un œil critique sur ces calculs dès que le système étudié est très ouvert. La Figure Annexe B.1 illustre les paramètres utilisés pour le passage d'un rayon lumineux à travers un dioptre.

Relation de conjugaison à travers un dioptre :

$$\frac{n'}{x'} = \frac{n}{x} + \frac{n' - n}{R_d}$$
(B.1)

En particulier pour un dioptre plan, on a :

$$\frac{n'}{x'} = \frac{n}{x} \tag{B.2}$$

La première relation s'obtient avec un schéma beaucoup plus complexe que la Figure Annexe B.1 et en faisant l'hypothèse des petits angles pour enlever la dépendance avec h.

Termes utiles pour les sommes de Seidel :

En utilisant les formules de conjugaison à travers un dioptre, on obtient l'invariant longitudinal :



FIGURE ANNEXE B.1 – Paramètres utilisés pour décrire le passage d'un rayon lumineux à travers un dioptre sphérique, en passant d'un milieu d'indice n à un milieu d'indice n'. Les positions de l'objet et de l'image prennent S, le sommet du dioptre sur l'axe optique, comme origine.

$$Q_x = n' \left(\frac{1}{R_d} - \frac{1}{x'}\right) = n \left(\frac{1}{R_d} - \frac{1}{x}\right)$$
 (B.3)

En utilisant les (<u>petits</u>) angles dans le schéma et la relation précédente (surement possible en utilisant aussi la relation des sinus de Descartes) :

$$ni = hQ_x \tag{B.4}$$

Simplement en utilisant les angles et les tangentes dans le schéma ( $\Delta$  désigne une différence) :

$$\Delta\left(\frac{\alpha}{n}\right) = -h\left(\frac{1}{n'x'} - \frac{1}{nx}\right) \tag{B.5}$$

Ces trois dernières relations sont particulièrement utiles pour le calcul des sommes de Seidel.

#### **B.2** Formalisme utilisé

La première étape est la description du formalisme choisi pour mener le raisonnement (cf. Figure Annexe B.2). On considère le front d'onde à la sortie du système optique. Les coordonnées ont pour origine la position de la pupille de sortie du système. Le front d'onde de référence  $\Sigma'_0$ , « parfait » ou paraxial, est de forme circulaire de sorte que tous les rayons lumineux associés se recoupent au même point A'. Le front d'onde réel  $\Sigma'$  n'est pas un cercle, et tous les rayons sortant de la pupille de sortie en étant orthogonaux au front d'onde traversent le plan où se situe A' en des points différents. Dans le cas du rayon noir dessiné, il traverse le plan de A' au point A''. Ce qui nous intéresse est l'écart du trajet optique entre un rayon issu de  $\Sigma'_0$  et un rayon issu de  $\Sigma'$ . Cet écart est noté  $\overline{IJ}$ , qui est une valeur algébrique représentant la distance entre le front d'onde réel et la référence. Dans la direction z, on aura par exemple  $\overline{IJ}_z = J_z - I_z$ , avec  $I_z$  et  $J_z$  les coordonnées des points correspondants selon la direction z.

On définit alors la fonction d'aberration  $W = n' \times \overline{IJ}$  avec n' l'indice optique de l'espace image, qui représente l'écart entre le front d'onde réel et celui de la référence en termes de chemin optique. Cette



FIGURE ANNEXE B.2 - Illustration des paramètres utilisés dans le formalisme adopté pour l'étude des aberrations. On y a représenté le front d'onde réel  $\Sigma'$  et un front d'onde sphérique de référence  $\Sigma'_0$  en sortie de la pupille de sortie du système sur laquelle on se repère grâce aux coordonnées  $X_p$  et  $Y_p$  spécifiques à la pupille. Les rayons lumineux émanant de la même position de la pupille ne prennent pas la même direction selon le front d'onde suivi. La distance entre les deux fronts d'onde en suivant un rayon réel permet de définir la fonction d'aberration, en prenant en compte l'indice optique de l'espace image :  $W = n' \overline{I}$ .

fonction d'aberration peut être développée en fonction des coordonnées de la position d'où émerge le rayon considéré depuis la pupille de sortie (coordonnées cartésiennes  $X_p$  et  $Y_p$  ou coordonnées polaires  $\rho$  le rayon et  $\varphi$  l'angle avec l'axe des  $X_p$  pour origine) et le champ image y' (hauteur de A'' dans le plan où se situe A'), ce qui donne le développement à l'ordre 4 suivant :

$$W = W_{000} + W_{200}y'^{2} + W_{400}y'^{4} + W_{020}\rho^{2} + W_{111}y'\rho\sin\varphi + W_{111}y'\rho\sin\varphi + W_{222}y'\rho^{2}\sin^{2}\varphi + W_{220}y'^{2}\rho^{2} + W_{311}y'^{3}\rho\sin\varphi + W_{222}y'\rho^{2}\sin^{2}\varphi + W_{220}y'^{2}\rho^{2} + W_{311}y'^{3}\rho\sin\varphi$$
(B.6)

En utilisant la notation de Hopkins :  $W_{ijk}y'^i\rho^j \sin^k \varphi$ . Les 3 premières lignes sont appelées respectivement le piston, le défocus et le tilt. La 4<sup>ème</sup> ligne comporte les aberrations géométriques du 4<sup>ème</sup> ordre en termes de fonction d'aberration, et du 3<sup>ème</sup> ordre en termes de décalages transversaux en x, y ou z. Ces aberrations géométriques sont respectivement appelées aberration sphérique, coma, astigmatisme, courbure de champ et distorsion. Une question se pose alors : quelles sont les aberrations qui affectent la qualité image de notre système LC-OCT, lorsqu'on utilise le mauvais milieu d'immersion et qu'on y ajoute des lames de verre ?

## **B.3** Expression des coefficients d'aberration avec les sommes de Seidel

Ce paragraphe va permettre d'exprimer les coefficients d'aberration  $W_{ijk}$  en fonction de tracés de rayons, qu'on va simplifier en y incorporant les caractéristiques de notre système. La Figure Annexe B.3 présente les paramètres utiles qui sont utilisés dans les sommes de Seidel : il s'agit d'un tracé de rayons provenant d'un objet de taille y traversant un dioptre sphérique avec les limitations de la pupille P, dans un espace d'indice n. Les sommes de Seidel permettent de calculer les coefficients des aberrations géométriques  $W_{ijk}$  pour une ouverture et un champ maximaux, lors du passage par ce dioptre :



FIGURE ANNEXE B.3 - Paramétrage utile pour les sommes de Seidel. Il s'agit du tracé de rayons pertinents provenant d'un objet jusqu'à un dioptre sphérique tout en traversant la pupille du système. Le rayon vert passe par le sommet de l'objet et par le centre de la pupille (rayon principal, qui détermine le champ), tandis que le rayon rouge passe par la base de l'objet et le bord de la pupille (c'est le rayon marginal, définissant l'ouverture du système optique).

$$W_{040} = \frac{1}{8}S_{I} = \frac{1}{8}\left(-(ni)^{2}h\Delta\left(\frac{\alpha}{n}\right) + \Delta nC^{3}\varepsilon h^{4}\right)$$

$$W_{131} = \frac{1}{2}S_{II} = \frac{1}{2}\left(-(ni)(nj)h\Delta\left(\frac{\alpha}{n}\right) + \Delta nC^{3}\varepsilon h^{3}k\right)$$

$$W_{222} = \frac{1}{2}S_{III} = \frac{1}{2}\left(-(nj)^{2}h\Delta\left(\frac{\alpha}{n}\right) + \Delta nC^{3}\varepsilon h^{2}k^{2}\right)$$

$$W_{220} = \frac{1}{4}\left(S_{III} + S_{IV}\right) = \frac{1}{4}\left(-(nj)^{2}h\Delta\left(\frac{\alpha}{n}\right) + \Delta nC^{3}\varepsilon h^{2}k^{2} - H^{2}C\Delta\left(\frac{1}{n}\right)\right)$$

$$W_{311} = \frac{1}{2}S_{V} = \frac{1}{2}\left(\frac{j}{i}\left(S_{III} + S_{IV}\right) + \Delta nC^{3}\varepsilon hk^{3}\right)$$
(B.7)

Avec  $C = 1/R_d$  la courbure de la surface,  $H = ny\alpha = n(k\alpha - h\theta)$  l'invariant de Lagrange,  $P = -C\Delta(1/n)$  la courbure de Petzval et  $\varepsilon$  le coefficient d'asphérisation du dioptre. Les  $\Delta$  désignent des variations.

Ces formules sont complexes mais se simplifient de manière significative en décrivant notre système optique plus précisément. On étudie dans notre cas l'influence de lames à faces parallèles, qui n'ont nul besoin d'asphérisation ( $\varepsilon \rightarrow 0$ ) et dont le rayon de dioptre est infini, ce qui entraine une courbure nulle ( $C \rightarrow 0$ ). Enfin, l'objectif de microscope possède une propriété très puissante qui est la télécentricité objet : la pupille de sortie de l'objectif est donc rejetée à l'infini, de sorte que le rayon principal devienne parallèle à l'axe optique ( $\theta \rightarrow 0, j \rightarrow 0$ ). D'après les expressions au-dessus, il ne reste donc que le coefficient de l'aberration sphérique  $W_{040}$  parmi les aberrations géométriques qui est non nul. Il reste quand même l'influence des aberrations chromatiques qui ne sont pas de nature géométrique, et qu'on laisse de côté. De plus, si on utilise les formules d'optique géométrique de la section B.1, la contribution d'un dioptre plan pour l'aberration sphérique s'écrit :

$$W_{040DP} = \frac{1}{8} h^4 Q_x^2 \Delta\left(\frac{1}{nx}\right)$$
(B.8)

On remarque que l'aberration sphérique ne dépend pas du rayon principal ( $\theta$  ou j ou k), donc on peut, pour le calcul de l'aberration sphérique, décaler la pupille où l'on veut, du moment qu'on conserve l'ouverture ( $\alpha$  et h constants). En général, on place la pupille sur l'un des sommets des dioptres plans, mais il est toujours intéressant de réfléchir à sa position.

## **B.4** Contribution d'un dioptre plan dans le coefficient d'aberration sphérique

On s'aide de la Figure Annexe B.4 pour les calculs. On a :

$$W_{040DP} = \frac{1}{8}h^4 Q_x^2 \left(\frac{1}{n'x'} - \frac{1}{nx}\right)$$
  
=  $\frac{1}{8}(-\tan \alpha x)^4 \left(-\frac{n}{x}\right)^2 \left(\frac{n}{n'^2 x} - \frac{1}{nx}\right)$   
=  $\frac{1}{8}x \tan^4 \alpha n^3 \left(\frac{1}{n'^2} - \frac{1}{n^2}\right)$   
=  $\frac{1}{8}x \tan^4 \alpha n^3 \Delta \left(\frac{1}{n^2}\right)$  (B.9)

Donc :

$$W_{040DP} = \frac{1}{8} \frac{x}{n} \tan^4 \alpha \, n^4 \Delta \left(\frac{1}{n^2}\right) \tag{B.10}$$



FIGURE ANNEXE B.4 – Paramètre utiles pour le calcul du coefficient d'aberration sphérique lors de la traversée d'un dioptre plan.

Autrement dit, il faut connaître la position de l'objet (x), l'angle d'incidence sur le dioptre  $(\alpha, qui est associé au milieu d'indice n)$  et les indices des deux côtés du dioptre pour pouvoir faire le calcul. Cette expression va revenir assez souvent. Pour plus de lisibilité, on introduit de nouvelles notations pour les constantes devant les rapports de distance sur les indices du milieu, quand on passe du milieu i au milieu j:

$$C_{ij} = \frac{1}{8} \tan^4 \alpha_i \, n_i^4 \left( \frac{1}{n_j^2} - \frac{1}{n_i^2} \right) \tag{B.11}$$

Par exemple, pour passer du verre à l'huile, on aura  $C_{vh} = \frac{1}{8} \tan^4 \alpha_v n_v^4 \left(\frac{1}{n_h^2} - \frac{1}{n_v^2}\right)$ . Il faut remarquer que le signe de ces constantes est celui de la différence  $\Delta\left(\frac{1}{n}\right)$  qui est positif quand on passe d'un milieu plus réfringent à un milieu moins réfringent. Donc seuls les coefficients  $C_{av}$  et  $C_{av0}$  (passage de l'air vers le verre, notations explicitées plus tard) seront négatifs. Une barre leur est attribuée pour signifier qu'ils sont négatifs.

<u>Remarque</u> : les angles sont ceux des rayons marginaux en sortie de l'objectif de microscope. Ils sont simples à exprimer en fonction de l'ouverture numérique de l'objectif et de l'indice du milieu considéré, ils ne sont donc pas développés dans les formules. Les angles s'expriment de cette façon :

$$ON = n_a \sin \alpha_a = n_v \sin \alpha_v = n_h \sin \alpha_h \tag{B.12}$$

Par exemple dans le verre,  $\alpha_v = a \sin \frac{ON}{n_v}$ . On peut se demander s'il est pertinent d'utiliser les fonctions trigonométriques puisque toutes les formules utilisées supposaient déjà de petits angles. Mais l'ouverture de l'objectif n'étant pas négligeable, il est plus prudent de garder les fonctions. Pour le passage d'un dioptre plan du milieu *i* au milieu *j*, on a donc :

$$W_{040DP\,ij} = \frac{x}{n_i} C_{ij} \tag{B.13}$$

# **B.5** Contribution d'une lame à faces parallèles dans le coefficient d'aberration sphérique

La configuration étudiée est schématisée dans la Figure Annexe B.5. Un résultat intéressant est la constance de la distance entre l'objet et l'image à travers une lame à faces parallèles. En effet, en utilisant les relations de conjugaison dans le cas général, on obtient :


FIGURE ANNEXE B.5 – Paramètres utilisés pour l'étude d'une lames à faces parallèles sur le coefficient d'aberration sphérique.

$$\overline{S_2 A^{\prime\prime}} = \frac{n_h}{n_v} \overline{S_2 A^\prime} = \frac{n_h}{n_v} (-d_l + \overline{S_1 A^\prime}) = \frac{n_h}{n_v} \left( -d_l + \frac{n_v}{n_h} \overline{S_1 A} \right)$$
(B.14)

Donc :

$$\overline{AA^{\prime\prime}} = \overline{AS_1} + \overline{S_1S_2} + \overline{S_2A^{\prime\prime}} = d_l \left(1 - \frac{n_h}{n_v}\right)$$
(B.15)

Avec  $n_h = 1.4$  l'indice de l'huile,  $n_v = 1.45$  l'indice du verre utilisé i.e. silice fondue et  $d_l$ l'épaisseur de la lame à faces parallèles. La distance entre l'objet et l'image est constante, c'est-à-dire qu'elle est indépendante de la position de la lame. On peut donc translater tout le système comme on le souhaite pour pouvoir calculer l'aberration sphérique de ce système. J'ai donc choisi de le mettre comme dans l'illustration : l'objet A est sur le premier dioptre, de sorte que A = A', de sorte à annuler les aberrations dues au premier dioptre. Il suffit de calculer l'aberration due au second dioptre. On a donc, d'après les résultats de la section précédente ( $A = A' \rightarrow A''$ , silice fondue vers huile) :

$$W_{040l} = -\frac{d_l}{n_v} C_{vh}$$
(B.16)

La contribution en aberration sphérique d'une lame à faces parallèles plongée dans un certain milieu d'immersion ne dépend pas de la position de la lame, mais de son épaisseur et des indices optiques. La contribution d'une lame d'une certaine épaisseur est donc équivalente à la contribution de plusieurs lames dont les épaisseurs totales sont égales à l'épaisseur de la première lame.

Pour mener le calcul la variation du coefficient d'aberration sphérique, voyons les choses de la manière suivante : initialement, le milieu est homogène, puis on y ajoute une lame à faces parallèles. Or, le milieu homogène n'apporte pas d'aberrations. Puis l'introduction de la lame peut être vu comme le remplacement d'une tranche du milieu d'immersion par une tranche de silice fondue, dont on a calculé l'effet. On obtient la variation du coefficient avec la différence des contributions :

$$\Delta W_{040l} = W_{040l} - W_{040homogène} = W_{040l} \tag{B.17}$$

Donc :

$$\Delta W_{040l} = -\frac{d_l}{n_v} C_{vh} \tag{B.18}$$

### **B.6** Remplacement et décalage de la fenêtre de l'objectif

Le théorème de Gouy affirme que la variation de la fonction d'aberration en sortie d'un système optique est la somme de la variation de la fonction d'aberration après le passage de chaque dioptre. Il est donc possible de compenser les variations engendrées par un élément optique avec un autre. On voit en particulier avec l'équation (B. 18) qu'avoir  $n_i < n_j$  ou  $n_i > n_j$  permet de changer le signe de  $\Delta W_{040}$ . Comme on a remplacé le milieu d'immersion qui est initialement de l'eau par de l'huile avec des lames de verre, il suffirait de remplacer une partie du trajet optique dans les milieux plus réfringents par un trajet optique dans un milieu moins réfringent, comme l'air. Décaler la fenêtre de l'objectif permettrait cela, et on cherche à quantifier cette modification dans cette section. Cette variation de configuration est représentée dans la Figure Annexe B.6.

La fenêtre de l'objectif est cette fois entourée d'air d'un côté, et du milieu d'immersion de l'autre. Or, on peut voir dans l'expression de  $\overline{AA''}$  de la section précédente que le terme dépendant de A s'annulait grâce à l'égalité des indices des deux côtés de la lame. Il faut donc travailler avec une position de A en particulier. Dans le cas optimal, c'est-à-dire. avec la fenêtre d'origine et dans l'eau, on pourra considérer que les aberrations sphériques globales de l'objectif seront nulles. La fenêtre introduit tout de même des aberrations, mais qui ont été compensées en amont. Il faut quand même calculer la contribution du système {fenêtre d'origine + eau} pour la soustraire à la contribution du système {air + fenêtre sur-mesure + huile}.

Dans les schémas, tout ce qui est propre à la disposition initiale ou d'origine possède un exposant 0. En particulier, j'ai noté l'angle associé au point  $A'^0 \alpha_v^0$  car l'indice du verre de la fenêtre d'origine n'est pas forcément le même que celui du verre qu'on utiliserait en remplacement. On va noter  $W_{040}^0$  la contribution en aberration sphérique dans le cas optimal pour tout ce qui est à droite du point O. De même, on note  $W_{040}^{custom}$  la contribution en aberration sphérique dans le cas sur-mesure pour tous les éléments à droite du point O.



FIGURE ANNEXE B.6 - Schéma pour le calcul de la variation du coefficient des aberrations sphériques entre l'utilisation nominale de l'objectif et la configuration sur-mesure où la fenêtre est modifiée, ainsi que le milieu d'immersion.

### B.6.1 Distance $\overline{OA}$

La distance  $\overline{OA}$  est intrinsèque à notre système et apparaît dans tous les calculs suivants. On ne développera son expression entière qu'à la fin pour ne pas alourdir les calculs intermédiaires. En utilisant les relations de conjugaison et le schéma du cas optimal, on écrit cette distance en fonction des caractéristiques de l'objectif :

$$\overline{OA} = \overline{S_1^0 A} = \frac{n_a}{n_v^0} \overline{S_1^0 A'} = \frac{n_a}{n_v^0} \left( d^0 + \overline{S_2^0 A'} \right)$$

$$= \frac{n_a}{n_v^0} \left( d^0 + \frac{n_v^0}{n_e} \overline{S_2^0 A''} \right)$$

$$= \frac{n_a}{n_v^0} \left( d^0 + \frac{n_v^0}{n_e} DT^0 \right)$$
(B. 19)

Donc :

$$\overline{OA} = n_a \left( \frac{d^0}{n_v^0} + \frac{DT^0}{n_e} \right)$$
(B.20)

Avec l'épaisseur de la fenêtre  $d^0 = 1 mm$ ,  $n_v^0 = 1,5$  en supposant la fenêtre originale en BK7, la distance de travail  $DT^0 = 3.5 mm$  dans les conditions normales d'utilisation et l'indice de l'air  $n_a = 1$ .

### B.6.2 Contribution en aberration sphérique du cas optimal

On va calculer la contribution en aberration sphérique du système {fenêtre d'origine + eau}, donc des deux dioptres situés à  $S_1^0$  et  $S_2^0$ . Pour chaque dioptre, il suffit de connaître la position de l'objet par rapport au sommet du dioptre (x), l'angle d'incidence sur le dioptre ( $\alpha$ ) et les indices des deux côtés du dioptre (n et n'). Pour le premier dioptre, on a :

...

$$W_{040DP1}^{0} = \frac{x}{n_i} C_{ij}$$

$$= \frac{\overline{OA}}{n_a} C_{av0}$$
(B.21)

Et pour le second dioptre :

$$W_{040DP2}^{0} = \frac{x}{n_{i}} C_{ij}$$

$$= \frac{\overline{S_{2}^{0}A'}}{\overline{S_{2}^{0}A'}} C_{v0e}$$

$$= \frac{\overline{S_{1}^{0}A'} - d^{0}}{n_{v}^{0}} C_{v0e}$$

$$= \frac{\frac{n_{v}^{0}}{n_{a}} \overline{OA} - d^{0}}{n_{v}^{0}} C_{v0e}$$

$$= \left(\frac{\overline{OA}}{n_{a}} - \frac{d_{0}}{n_{v}^{0}}\right) C_{v0e}$$
(B.22)

La contribution en aberration sphérique est la somme des contributions de chaque dioptre :

$$W_{040}^{0} = \frac{\overline{OA}}{n_{a}}(\overline{C_{av0}} + C_{v0e}) + \frac{d^{0}}{n_{v}^{0}}(-C_{v0e})$$
(B.23)

#### B.6.3 Contribution en aberration sphérique du cas sur-mesure

On procède de la même manière que précédemment en ne donnant que les résultats. Pour le premier dioptre, on obtient :

$$W_{040DP1}^{custom} = \frac{\overline{OA} - D}{n_a} \overline{C_{av}}$$
(B.24)

Et pour le second dioptre :

$$W_{040DP2}^{custom} = \left(\frac{\overline{OA} - D}{n_a} - \frac{d}{n_v}\right) C_{vh}$$
(B.25)

La contribution totale est la somme des contributions :

$$W_{040}^{custom} = \frac{\overline{OA}}{n_a} (\overline{C_{av}} + C_{vh}) + \frac{D}{n_a} (-C_{vh} - \overline{C_{av}}) + \frac{d}{n_v} (-C_{vh})$$
(B.26)

## B.6.4 Variation du coefficient d'aberration sphérique entre la configuration sur-mesure et optimale

Ce qui nous intéresse est la variation d'aberration sphérique entre les deux configurations, et non la valeur absolue des coefficients. Il suffit de faire la différence entre la situation sur-mesure et la situation optimale :

$$\Delta W_{040fenêtre} = \frac{\overline{OA}}{n_a} (\overline{C_{av}} - \overline{C_{av0}} + C_{vh} - C_{v0e}) + \frac{D}{n_a} (-C_{vh} - \overline{C_{av}}) + \frac{d}{n_v} (-C_{vh}) + \frac{d^0}{n_v^0} C_{v0e}$$
(B.27)

### B.6.5 Variation du coefficient d'aberration sphérique total

La variation totale est la somme des variations (considérer le changement de la fenêtre de l'objectif, le changement du milieu d'immersion et l'ajout des lames à faces parallèles) :

$$\Delta W_{040tot} = \frac{\overline{OA}}{n_a} (\overline{C_{av}} - \overline{C_{av0}} + C_{vh} - C_{v0e}) + \frac{D}{n_a} (-C_{vh} - \overline{C_{av}}) + \frac{d + d_l}{n_v} (-C_{vh}) + \frac{d^0}{n_v^0} C_{v0e}$$
(B.28)

### B.6.6 Meilleur foyer et nouvelle distance de travail

Maintenant qu'on a l'expression des coefficients d'aberration sphérique, on peut quantifier le décalage du plan focal, important pour la mécanique de l'interféromètre de Mirau. Il ne suffit pas de considérer un rayon marginal et de calculer à quelle distance il coupe l'axe optique, car chaque rayon croise l'axe optique en des points différents, en fonction de l'angle d'incidence. Pour trouver le « meilleur endroit sur l'axe optique où se concentre la lumière », on peut utiliser le rapport de Strehl : quand il est maximisé, cela veut dire que l'écart type de la fonction d'aberration, en considérant tous les rayons qui peuvent passer, est minimale. Il faut donc trouver le point sur l'axe pour lequel le rapport de Strehl, qui est le rapport du maximum de l'éclairement de la PSF sur celui de l'éclairement de la tache d'Airy, est maximal. En se plaçant dans la situation sur-mesure, cette position sur l'axe se calcule dans le cas des aberrations sphériques. On montre que le décalage sur l'axe z par rapport à la position paraxiale est :

$$\varepsilon_z = LA/2 \tag{B.29}$$

Avec LA l'aberration sphérique longitudinale qui s'écrit :

$$LA = -\frac{4}{n_h} \left(\frac{R}{R_p}\right)^2 \Delta W_{040tot}$$
(B.30)

Avec *R* le rayon de la sphère de référence du point paraxial (distance pupille -A'') et  $R_p$  le rayon de la pupille. Ces résultats sont démontrés dans des cours de conception optique, par exemple ceux de Thierry Lépine dispensés à l'Institut d'Optique. Quelle est la valeur du rapport  $R/R_p$ ? Dans notre cas, on étudie l'aberration sphérique qui est invariante par translation de pupille à ouverture constante, qu'on peut donc placer dans le plan du dernier dioptre en  $S_2$ , par exemple. L'expression « à ouverture constante » signifie que l'ouverture en sortie du système reste la même. Donc la pupille doit être juste au niveau des rayons marginaux. On obtient donc :

$$\frac{R}{R_p} = \frac{1}{\tan \alpha_h} \tag{B.31}$$

La distance de travail s'écrit donc :

$$DT = \overline{S_2 A''} + \varepsilon_z$$
  

$$= \overline{S_2 A''} + \frac{LA}{2}$$
  

$$= \frac{n_h}{n_v} \overline{S_2 A'} + \frac{LA}{2}$$
  

$$= \frac{n_h}{n_v} (\overline{S_2 S_1} + \overline{S_1 A'}) + \frac{LA}{2}$$
  

$$= \frac{n_h}{n_v} \left( -d + \frac{n_v}{n_a} \overline{S_1 A} \right) + \frac{LA}{2}$$
  

$$= \frac{n_h}{n_v} \left( -d + \frac{n_v}{n_a} (-D + \overline{OA}) \right) + \frac{LA}{2}$$
  

$$= n_h \left( \frac{\overline{OA} - D}{n_a} - \frac{d}{n_v} \right) - \frac{2}{n_h} \left( \frac{R}{R_p} \right)^2 \Delta W_{040tot}$$
  

$$= n_h \left( \frac{\overline{OA} - D}{n_a} - \frac{d}{n_v} \right) - \frac{2}{n_h} \frac{1}{\tan^2 \alpha_h} \Delta W_{040tot}$$

Donc :

$$WD = n_h \left(\frac{\overline{OA} - D}{n_a} - \frac{d}{n_v}\right) - \frac{2}{n_h} \frac{1}{\tan^2 \alpha_h} \Delta W_{040tot}$$
(B.33)

La valeur maximale de la fonction d'aberration change lorsqu'on se place au meilleur foyer. La fonction d'aberration s'écrirait alors :

$$W = \Delta W_{040tot} (\rho^4 - \rho^2)$$
 (B.34)

Au lieu de  $W = \Delta W_{040tot} \rho^4$ . Pour  $\partial W / \partial \rho = 0$ , on aurait  $W = -\Delta W_{040tot} / 4$ . Cela veut dire que la valeur maximale de la fonction d'aberration en valeur absolue est divisée par 4 au meilleur foyer. C'est la valeur à calculer et à comparer au critère de Rayleigh, qui dit que la qualité d'image reste raisonnable tant que  $\Delta W_{max} < \overline{\lambda} / 4$ .

Pour la conception de la mécanique du Mirau, ce n'est pas exactement la WD qu'il nous faut, mais la distance entre les pièces mécaniques. On peut prendre comme repère le point 0 de la mécanique, et voir sa distance avec le meilleur foyer dans notre cas sur-mesure. Cette distance est à comparer à la

distance entre O et le meilleur foyer dans le cas optimal. En notant B et  $B^0$  les points sur l'axe des meilleurs foyers dans les deux configurations, on a :

$$\Delta B = \overline{OB} - \overline{OB^0} = D + d + DT - (d^0 + DT^0)$$
(B.35)

Après application numérique, il semble que la position du meilleur foyer dans le cas sur-mesure s'éloigne d'un maximum de quelques 0.1 mm de l'objectif par rapport au cas optimal. Elle aura tendance à se rapprocher si D a des valeurs assez hautes, ce qui augmenterait drastiquement l'effet de l'aberration sphérique. On peut donc conclure que passer du cas optimal au sur-mesure ne changera pas drastiquement la mécanique.

# Annexe C Balayage latéral dans un seul bras de l'interféromètre

L'imagerie 3D demande a priori un balayage dans les trois directions de l'espace. La première direction x est assurée par la forme linéaire de l'éclairage et de la détection, la deuxième direction y par le miroir galvanométrique en amont de l'objectif de microscope et la troisième direction z par la platine piézoélectrique qui porte l'objectif. On s'intéresse dans cette annexe à l'effet du balayage latéral pris en charge par le miroir galvanométrique, et en particulier son influence sur le trajet optique de la lumière dès qu'il y a une variation de l'angle d'incidence de la lumière entrant dans l'objectif. Cette étude a un intérêt dans le cas de l'interféromètre de Linnik où l'on aurait placé un miroir galvanométrique dans le bras objet, et aucun dans le bras de référence, ce qui amène à une asymétrie dans l'interféromètre censée dégrader les images en bord de champ.

La géométrie de la déviation est schématisée dans la Figure Annexe C.1 (a). Le but est de comparer le trajet optique du rayon lumineux qui se réfléchit sur l'axe de rotation du miroir, afin d'éviter une variation du point d'impact sur le miroir en cas de déviation. Le résultat de l'étude sur ce rayon pourra se répliquer sur tous les autres rayons qui se réfléchissent sur les autres points du miroir car ils se concentrent en théorie tous au même point dans le plan focal de l'objectif, et ont donc parcouru le même trajet optique, d'après le principe de Fermat. Pour formaliser le problème, on évite l'approximation grossière de l'objectif par une lentille mince. A la place, on va le décrire, toujours dans l'approximation paraxiale, avec ses deux plans principaux H et H' conjugués l'un à l'autre avec un grandissement +1 (cf. Figure Annexe C.1 (b)). On considère les rayons lumineux qui vont de la source vers l'objectif de microscope, et les notations suivront exceptionnellement la même convention, en annotant les éléments optiques après traversée de l'objectif avec un symbole ' (« prime »), même s'ils sont dans ce qu'on appelle « espace objet » dans le reste du manuscrit. Dans ce schéma, on prend en compte la différence d'indice optique en amont (n = 1, air) et en aval (n' = 1,4, huile de silicone) de l'objectif, ce qui a pour effet d'éloigner le plan focal F' de 200 µm au maximum (cf Annexe B.6) et de modifier l'angle de sortie d'un rayon lumineux passant par l'intersection axe optique – H par  $\theta' = \theta n'/n$ .



FIGURE ANNEXE C.1 – Schémas utilisés pour le calcul de la variation de trajet optique en fonction de la déviation de la lumière incidente par le miroir galvanométrique. (a) Schéma global avec le miroir et l'objectif. Le rayon sur lequel on travaille est le rayon réfléchi sur l'axe de rotation du miroir. (b) Tracé de rayons en modélisant l'objectif avec ses plans principaux plutôt que par une simple lentille mince.

Notre objectif est donc de calculer le trajet optique [BB'] = [BI] + [II'] + [I'B'] parcouru par le rayon lumineux réfléchi sur l'axe de rotation du miroir et qui entraine une déviation d'angle  $\theta$ , et de le comparer au trajet optique [BA'] = [BO] + [OO'] + [OA'] parcouru par le même rayon que précédemment dans le cas où  $\theta = 0$ . La difficulté principale est de déterminer le trajet optique dans l'objectif même, donc les trajets [II'] et [OO'], impossibles à calculer simplement sans une description exacte du système optique. Pour se défaire de ce problème, on va utiliser la propriété de conjugaison entre les plans H et H' : tout point sur le plan H est conjugué au point directement en face dans le plan H'. Par exemple, tout rayon passant par I ressort par I', quel que soit son angle d'incidence. Or, d'après le principe de Fermat, le trajet optique entre ces deux points est le même pour n'importe lequel de ces rayons. On ne peut cependant rien établir quand deux rayons traversent H en des points différents. On aura donc vraisemblablement  $[II'] \neq [OO']$ . Ainsi, pour atteindre le résultat recherché, au lieu de chercher à calculer [BA'], on va utiliser un rayon équivalent, qui se concentre au même point A' et qui a donc parcouru le même trajet optique, mais qui passe par le point I: c'est le rayon parallèle à l'axe optique simplement décalé sur le côté jusqu'à atteindre I. On va donc finalement chercher l'expression de [BB'] - [AA']. En utilisant des relations simples de trigonométrie et le théorème de Pythagore, on obtient les trajets optiques suivants :

$$[BB'] = \frac{nx}{\cos\theta} + [II'] + n'\sqrt{x'^2 + (x\tan\theta - x'\tan(\theta n'/n))^2}$$
(C.1)

Et

$$[AA'] = nx + [II'] + n'\sqrt{x'^2 + (x\tan\theta)^2}$$
(C.2)

De sorte que

$$[BB'] - [AA'] = nx\left(\frac{1}{\cos\theta} - 1\right) + n'\left(\sqrt{x'^2 + (x\tan\theta - x'\tan(\theta n'/n))^2} - \sqrt{x'^2 + (x\tan\theta)^2}\right)$$
(C.3)

Par définition, x' est la distance entre H' et F', soit la distance focale « image » f', égale à 9 mm dans les conditions nominales d'utilisation de l'objectif, c'est-à-dire dans l'eau, et étendue à environ 9,2 mm dans l'huile. x est, quant à elle, la distance entre H et le miroir galvanométrique. Sachant que F est appelé le « plan focal arrière », sa position est donnée dans la datasheet de l'objectif à 19,1 mm à partir de l'extrémité de l'objectif du côté où se trouve le filetage RMS pour le monter sur un statif. Le plan focal arrière est donc à l'intérieur de l'objectif, position qui a été vérifiée expérimentalement. Or, l'axe du miroir galvanométrique se trouve à environ 10 mm au-dessus de l'objectif. On a ainsi la distance BF. La distance FH est la « focale objet » f du système optique, qu'on détermine grâce la relation f = $f'n/n' \approx 7$  mm. Finalement, on a  $x \approx 36$  mm.  $\theta$  est l'angle de déviation dû à l'inclinaison du miroir galvanométrique, qui sera limité par le champ latéral qu'on veut balayer. Dans notre cas, on veut un champ latéral de 600 µm. On utilise la relation simplifiée  $y' = f'\theta_{max}$  pour déterminer l'inclinaison maximale de la lumière incidente :  $\theta_{max} \approx 2^{\circ}$ .

La Figure Annexe C.2 montre l'allure de la variation du chemin optique en fonction de l'angle de la lumière incidente. Si on ne symétrise pas l'interféromètre de Linnik en ajoutant un miroir galvanométrique dans le bras de référence ou en plaçant un seul miroir galvanométrique avant le cube séparateur, alors la différence de marche varie en fonction de  $\theta$ , en faveur du bras de référence : le plan de cohérence aura donc tendance à se recourber avec ses bords qui se rapprochent de l'échantillon. A  $\theta_{max} = 2^{\circ}$ , la différence de marche pour un aller atteint environ 50 µm, donc 100 µm pour un aller retour de la lumière, ce qui sépare les plans de cohérence et de focalisation. Ce résultat est à mettre en regard avec les largeurs des enveloppes établies dans la sous-section 2.4.1.



FIGURE ANNEXE C.2 – Variation du trajet optique en fonction de l'angle d'incidence de la lumière éclairant l'objectif de microscope objet. L'angle de déviation  $\theta$  est un rayon angulaire, et atteint à peu près 2° lorsqu'on chercher à avoir un champ latéral de 600 µm. Les ordonnées sont à multiplier par deux si on considère l'aller-retour de la lumière dans l'interféromètre.

### Bibliographie

- B. Ö. Cakir, P. Adamson, et C. Cingi, « Epidemiology and Economic Burden of Nonmelanoma Skin Cancer », *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, vol. 20, nº 4, p. 419-422, nov. 2012, doi: 10.1016/j.fsc.2012.07.004.
- [2] U. Leiter, T. Eigentler, et C. Garbe, « Epidemiology of Skin Cancer », in Sunlight, Vitamin D and Skin Cancer, New York, NY: Springer New York, 2014, p. 120-140. doi: 10.1007/978-1-4939-0437-2\_7.
- [3] Z. Apalla, A. Lallas, E. Sotiriou, E. Lazaridou, et D. Ioannides, « Epidemiological trends in skin cancer », *Dermatol Pract Concept*, vol. 7, nº 2, avr. 2017, doi: 10.5826/dpc.0702a01.
- [4] « Epidémiologie des cancers cutanés », *Institut National du Cancer*, 11 juin 2021. https://www.ecancer.fr/Professionnels-de-sante/Depistage-et-detection-precoce/Detection-precoce-des-cancersde-la-peau/Epidemiologie
- [5] J. Ogien, « Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique pour l'imagerie de la peau », Optique [physics.optics], Université Paris Saclay (COmUE), 2017. Français. NNT : 2017SACL011. tel-01683099. [En ligne]. Disponible sur: https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-01683099
- [6] M. Häggström, « Layers of the epidermis », *Wikimedia*, 29 juin 2010. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Epidermal\_layers.png
- [7] A. Vogel et V. Venugopalan, « Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues », *Chem. Rev.*, vol. 103, nº 2, p. 577-644, févr. 2003, doi: 10.1021/cr010379n.
- [8] M. Minsky, « Microscopy apparatus », US30013467A, 19 décembre 1961 [En ligne]. Disponible sur: https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/024791595/publication/US3013467A? q=pn%3DUS3013467
- T. Wilson et C. Sheppard, *Theory And Practice Of Scanning Optical Microscopy*. [En ligne]. Disponible sur: https://www.researchgate.net/publication/234419246\_Theory\_And\_Practice\_Of\_ Scanning\_Optical\_Microscopy
- [10]P. Calzavara-Pinton, C. Longo, M. Venturini, R. Sala, et G. Pellacani, « Reflectance Confocal Microscopy for In Vivo Skin Imaging », *Photochemistry and Photobiology*, vol. 84, n° 6, p. 1421-1430, nov. 2008, doi: 10.1111/j.1751-1097.2008.00443.x.
- [11]W. Denk, J. H. Strickler, et W. W. Webb, «Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy », *Science*, vol. 248, nº 4951, p. 73-76, avr. 1990, doi: 10.1126/science.2321027.
- [12] W. R. Zipfel, R. M. Williams, et W. W. Webb, « Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences », *Nat Biotechnol*, vol. 21, nº 11, p. 1369-1377, nov. 2003, doi: 10.1038/nbt899.
- [13]L. Mostaço-Guidolin, N. Rosin, et T.-L. Hackett, « Imaging Collagen in Scar Tissue: Developments in Second Harmonic Generation Microscopy for Biomedical Applications », *IJMS*, vol. 18, nº 8, p. 1772, août 2017, doi: 10.3390/ijms18081772.
- [14] D. Huang *et al.*, « Optical Coherence Tomography », *Science*, vol. 254, nº 5035, p. 1178-1181, nov. 1991, doi: 10.1126/science.1957169.
- [15]W. Drexler et J. G. Fujimoto, « Retinal Optical Coherence Tomography Imaging », in *Optical Coherence Tomography*, W. Drexler et J. G. Fujimoto, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 1685-1736. doi: 10.1007/978-3-319-06419-2.
- [16] H. G. Bezerra, M. A. Costa, G. Guagliumi, A. M. Rollins, et D. I. Simon, « Intracoronary Optical Coherence Tomography: A Comprehensive Review », *JACC: Cardiovascular Interventions*, vol. 2, nº 11, p. 1035-1046, nov. 2009, doi: 10.1016/j.jcin.2009.06.019.
- [17]Z. A. Ali et al., « Intracoronary Optical Coherence Tomography 2018 », JACC: Cardiovascular Interventions, vol. 10, nº 24, p. 2473-2487, déc. 2017, doi: 10.1016/j.jcin.2017.09.042.
- [18]E. Sattler, R. Kästle, et J. Welzel, « Optical coherence tomography in dermatology », *J. Biomed. Opt*, vol. 18, nº 6, p. 061224, janv. 2013, doi: 10.1117/1.JBO.18.6.061224.
- [19]J. Olsen, J. Holmes, et G. B. E. Jemec, « Advances in optical coherence tomography in dermatology—a review », J. Biomed. Opt., vol. 23, nº 04, p. 1, avr. 2018, doi: 10.1117/1.JBO.23.4.040901.

- [20] A. Davis, « Tomographie par cohérence optique confocale en ligne multimodale pour le diagnostic non invasif des cancers cutanés », Optique [physics.optics], Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT: 2019SACL004. tel-02134277. [En ligne]. Disponible sur: https://pastel.archives-ouvertes.fr/tel-02134277
- [21]J. A. Izatt, M. A. Choma, et A.-H. Dhalla, « Theory of Optical Coherence Tomography », in *Optical Coherence Tomography*, W. Drexler et J. G. Fujimoto, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 65-94. doi: 10.1007/978-3-319-06419-2.
- [22]M. Wojtkowski, « High-speed optical coherence tomography: basics and applications », *Appl. Opt.*, vol. 49, nº 16, p. D30, juin 2010, doi: 10.1364/AO.49.000D30.
- [23]S. Alam *et al.*, « Clinical Application of Rapid Serial Fourier-Domain Optical Coherence Tomography for Macular Imaging », *Ophthalmology*, vol. 113, n° 8, p. 1425-1431, août 2006, doi: 10.1016/j.ophtha.2006.03.020.
- [24]A. L. Clark, A. Gillenwater, R. Alizadeh-Naderi, A. K. El-Naggar, et R. Richards-Kortum, « Detection and diagnosis of oral neoplasia with an optical coherence microscope », J. Biomed. Opt., vol. 9, nº 6, p. 1271, 2004, doi: 10.1117/1.1805558.
- [25]J. A. Izatt, M. D. Kulkarni, Hsing-Wen Wang, K. Kobayashi, et M. V. Sivak, « Optical coherence tomography and microscopy in gastrointestinal tissues », *IEEE J. Select. Topics Quantum Electron.*, vol. 2, nº 4, p. 1017-1028, déc. 1996, doi: 10.1109/2944.577331.
- [26] A. Gh. Podoleanu, G. M. Dobre, et D. A. Jackson, « En-face coherence imaging using galvanometer scanner modulation », *Opt. Lett.*, vol. 23, nº 3, p. 147, févr. 1998, doi: 10.1364/OL.23.000147.
- [27]J. A. Izatt, E. A. Swanson, J. G. Fujimoto, M. R. Hee, et G. M. Owen, « Optical coherence microscopy in scattering media», *Opt. Lett.*, vol. 19, n° 8, p. 590, avr. 1994, doi: 10.1364/OL.19.000590.
- [28]A. D. Aguirre, C. Zhou, H.-C. Lee, O. O. Ahsen, et J. G. Fujimoto, « Optical Coherence Microscopy », in *Optical Coherence Tomography*, W. Drexler et J. G. Fujimoto, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 865-911. doi: 10.1007/978-3-319-06419-2.
- [29]H. Sauer et J. Surrel, « Microscopie optique Principes et utilisations de base du microscope ». Optique pour l'Ingénieur (OPI), 2007. [En ligne]. Disponible sur: http://www.optiqueingenieur.org/fr/cours/OPI\_fr\_M03\_C03/co/OPI\_fr\_M03\_C03\_web.html
- [30]B. Karamata, P. Lambelet, M. Laubscher, R. P. Salathé, et T. Lasser, « Spatially incoherent illumination as a mechanism for cross-talk suppression in wide-field optical coherence tomography », *Opt. Lett.*, vol. 29, n° 7, p. 736, avr. 2004, doi: 10.1364/OL.29.000736.
- [31]B. Karamata, P. Lambelet, M. Laubscher, M. Leutenegger, S. Bourquin, et T. Lasser, « Multiple scattering in optical coherence tomography I Investigation and modeling », *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 22, n° 7, p. 1369, juill. 2005, doi: 10.1364/JOSAA.22.001369.
- [32]B. Karamata, P. Lambelet, M. Leutenegger, M. Laubscher, S. Bourquin, et T. Lasser, « Multiple scattering in optical coherence tomography II Experimental and theoretical investigation of cross talk in wide-field optical coherence tomography », J. Opt. Soc. Am. A, vol. 22, n° 7, p. 1380, juill. 2005, doi: 10.1364/JOSAA.22.001380.
- [33] A.-H. Dhalla, J. V. Migacz, et J. A. Izatt, « Crosstalk rejection in parallel optical coherence tomography using spatially incoherent illumination with partially coherent sources », *Opt. Lett.*, vol. 35, nº 13, p. 2305, juill. 2010, doi: 10.1364/OL.35.002305.
- [34]A. Grebenyuk, A. Federici, V. Ryabukho, et A. Dubois, « Numerically focused full-field sweptsource optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination », *Appl. Opt.*, vol. 53, n° 8, p. 1697, mars 2014, doi: 10.1364/AO.53.001697.
- [35]B. Považay, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, H. Arthaber, et W. Drexler, « Full-field time-encoded frequency-domain optical coherence tomography », *Opt. Express*, vol. 14, nº 17, p. 7661, août 2006, doi: 10.1364/OE.14.007661.
- [36] A. Dubois, G. Moneron, et C. Boccara, « Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2μm wavelength region », *Optics Communications*, vol. 266, n° 2, p. 738-743, oct. 2006, doi: 10.1016/j.optcom.2006.05.016.
- [37]B. Laude, A. De Martino, B. Drévillon, L. Benattar, et L. Schwartz, « Full-field optical coherence tomography with thermal light », *Appl. Opt.*, vol. 41, nº 31, p. 6637, nov. 2002, doi: 10.1364/AO.41.006637.

- [38] A. Federici et A. Dubois, « Full-field optical coherence microscopy with optimized ultrahigh spatial resolution », *Opt. Lett.*, vol. 40, nº 22, p. 5347, nov. 2015, doi: 10.1364/OL.40.005347.
- [39]D. Sacchet, M. Brzezinski, J. Moreau, P. Georges, et A. Dubois, « Motion artifact suppression in full-field optical coherence tomography », *Appl. Opt.*, vol. 49, n° 9, p. 1480, mars 2010, doi: 10.1364/AO.49.001480.
- [40]G. J. Tearney, E. A. Swanson, J. G. Fujimoto, B. E. Bouma, S. A. Boppart, et B. Golubovic, « Rapid acquisition of in vivo biological images by use of optical coherence tomography », *Opt. Lett.*, vol. 21, nº 17, p. 1408, sept. 1996, doi: 10.1364/OL.21.001408.
- [41] A. Dubois *et al.*, « Line-field confocal time-domain optical coherence tomography with dynamic focusing », *Opt. Express*, vol. 26, nº 26, p. 33534, déc. 2018, doi: 10.1364/OE.26.033534.
- [42]H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, et X.-H. Hu, « Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm », *Phys. Med. Biol.*, vol. 51, n° 6, p. 1479-1489, mars 2006, doi: 10.1088/0031-9155/51/6/008.
- [43]R. R. Alfano et S. L. Shapiro, « Observation of Self-Phase Modulation and Small-Scale Filaments in Crystals and Glasses », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 24, nº 11, p. 592-594, mars 1970, doi: 10.1103/PhysRevLett.24.592.
- [44] R. R. Alfano et S. L. Shapiro, « Emission in the Region 4000 to 7000 Å Via Four-Photon Coupling in Glass », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 24, n° 11, p. 584-587, mars 1970, doi: 10.1103/PhysRevLett.24.584.
- [45]N. Granzow, « Supercontinuum white light lasers: a review on technology and applications », in *Photonics and Education in Measurement Science 2019*, Jena, Germany, sept. 2019, p. 49. doi: 10.1117/12.2533094.
- [46]T. Wilson, « Resolution and optical sectioning in the confocal microscope: PROPERTIES OF THE FLUORESCENT CONFOCAL MICROSCOPE », *Journal of Microscopy*, vol. 244, n° 2, p. 113-121, nov. 2011, doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03549.x.
- [47]J. Wyant, « Interferometric optical metrology : basic principles and new systems », Laser Focus, nº 18, p. 65-71, 1982.
- [48] K. G. Larkin, « Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry », *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 13, nº 4, p. 832, avr. 1996, doi: 10.1364/JOSAA.13.000832.
- [49] A. Dubois *et al.*, «Line-field confocal optical coherence tomography for high-resolution noninvasive imaging of skin tumors », *J. Biomed. Opt.*, vol. 23, n° 10, p. 1, oct. 2018, doi: 10.1117/1.JBO.23.10.106007.
- [50]M. Cazalas *et al.*, « Skin lesion imaging with line-field confocal optical coherence tomography », in *Photonics in Dermatology and Plastic Surgery*, févr. 2019, vol. 10851. doi: 10.1117/12.2508484.
- [51]A. Davis, O. Levecq, H. Azimani, D. Siret, et A. Dubois, « Simultaneous dual-band line-field confocal optical coherence tomography: application to skin imaging », *Biomed Opt Express*, vol. 10, n° 2, Art. n° 2, janv. 2019, doi: 10.1364/BOE.10.000694.
- [52]J. Ogien *et al.*, « Line-field confocal optical coherence tomography », présenté à SPIE BIOS, févr. 2019. doi: 10.1117/12.2507244.
- [53]J. Ogien, O. Levecq, H. Azimani, A. Dubois, et A. Dubois, « Dual-mode line-field confocal optical coherence tomography for ultrahigh-resolution vertical and horizontal section imaging of human skin in vivo », *Biomed. Opt. Express, BOE*, vol. 11, n° 3, Art. n° 3, févr. 2020, doi: 10.1364/BOE.385303.
- [54]E. Beaurepaire, A. C. Boccara, M. Lebec, L. Blanchot, et H. Saint-Jalmes, «Full-field optical coherence microscopy », *Opt. Lett.*, vol. 23, nº 4, p. 244, févr. 1998, doi: 10.1364/OL.23.000244.
- [55]A. Dubois, « Focus defect and dispersion mismatch in full-field optical coherence microscopy », *Appl. Opt.*, vol. 56, n° 9, p. D142, mars 2017, doi: 10.1364/AO.56.00D142.
- [56] Y. Coello, B. Xu, T. L. Miller, V. V. Lozovoy, et M. Dantus, « Group-velocity dispersion measurements of water, seawater, and ocular components using multiphoton intrapulse interference phase scan », *Appl. Opt.*, vol. 46, n° 35, p. 8394, déc. 2007, doi: 10.1364/AO.46.008394.
- [57] « N-BK7 (SCHOTT) », *RefractiveIndex.INFO*. https://refractiveindex.info/?shelf=glass&book= BK7&page=SCHOTT
- [58] T. Wilson et C. Sheppard, « Image Formation in Scanning Microscopes », in *Theory And Practice* Of Scanning Optical Microscopy, p. 37-78. [En ligne]. Disponible sur:

https://www.researchgate.net/publication/234419246\_Theory\_And\_Practice\_Of\_Scanning\_Optica 1\_Microscopy

- [59]O. Svelto, « Ray and Wave Propagation Through Optical Media », in *Principles of Lasers*, 5<sup>e</sup> éd., Boston, MA: Springer US, 2010, p. 131-162. doi: 10.1007/978-1-4419-1302-9.
- [60] A. Dubois, L. Vabre, A.-C. Boccara, et E. Beaurepaire, «High-resolution full-field optical coherence tomography with a Linnik microscope », *Appl. Opt.*, vol. 41, nº 4, p. 805, févr. 2002, doi: 10.1364/AO.41.000805.
- [61]Johnson et Christy, «Au (Gold): n,k 0.188-1.937 μm», *RefractiveIndex.INFO*, 1972. https://refractiveindex.info/?shelf=main&book=Au&page=Johnson
- [62] Malitson, «Fused silica (fused quartz): n 0.21-3.71 μm», *RefractiveIndex.INFO*, 1965. https://refractiveindex.info/?shelf=glass&book=fused\_silica&page=Malitson
- [63] Y. Chen, S.-W. Huang, A. D. Aguirre, et J. G. Fujimoto, « High-resolution line-scanning optical coherence microscopy », *Opt. Lett.*, vol. 32, nº 14, p. 1971, juill. 2007, doi: 10.1364/OL.32.001971.
- [64]A. Dubois, W. Xue, O. Levecq, P. Bulkin, A.-L. Coutrot, et J. Ogien, « Mirau-based line-field confocal optical coherence tomography », *Opt Express*, vol. 28, nº 6, Art. nº 6, mars 2020, doi: 10.1364/OE.389637.
- [65]C. Deshpandey et R. Bunshah, « Evaporation Processes », in *Thin film processes II*, United Kingdom Edition., J. L. Vossen et W. Kern, Éd. Academic Press, Inc, 1991, p. 79-132.
- [66] J. Ogien, O. Levecq, H. Azimani, et A. Dubois, « Switchable vertical/horizontal section imaging with line-field confocal optical coherence tomography », in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXIV*, févr. 2020, vol. 1228, p. 1122816. doi: 10.1117/12.2547454.
- [67]J. Ogien, A. Daures, M. Cazalas, A. Dubois, et J. L. Perrot, « Line-field confocal optical coherence tomography for three-dimensional skin imaging », *Front. Optoelectron.*, déc. 2020, doi: 10.1007/s12200-020-1096-x.
- [68]C.-C. Tsai *et al.*, «Full-depth epidermis tomography using a Mirau-based full-field optical coherence tomography », *Biomed. Opt. Express*, vol. 5, n° 9, p. 3001, sept. 2014, doi: 10.1364/BOE.5.003001.



**ÉCOLE DOCTORALE** Physique et ingénierie: Electrons, Photons, Sciences du vivant (EOBE)

**Titre :** Tomographie par cohérence optique confocale linéaire (LC-OCT) basée sur un interféromètre de Mirau pour le diagnostic des cancers de la peau

Mots clés : tomographie par cohérence optique, interféromètre de Mirau, instrumentation optique, imagerie médicale.

**Résumé :** Les cancers de la peau sont le type de cancer le plus commun, dont les conséquences peuvent cependant être facilement stoppées en cas de détection précoce. Seulement, les diagnostics sont aujourd'hui réalisés après un simple examen visuel, éventuellement suivi d'un prélèvement de peau suspecte. Des coupes histologiques sont alors extraites de cet échantillon en le découpant en fines tranches puis en le colorant. Malgré la complexité de la procédure, l'observation de ces coupes au microscope permet de confirmer ou non la présence d'une tumeur.

La tomographie par cohérence optique confocale linéaire (LC-OCT) est une méthode optique récente particulièrement adaptée à l'imagerie de la peau : elle en forme des images jusqu'à ~500  $\mu$ m de profondeur, ce qui est suffisant pour observer la jonction épiderme-derme où la prolifération des cellules cancéreuses devient dangereuse. La LC-OCT offre une résolution quasi-isotrope de 1  $\mu$ m qui permet l'observation des tissus cutanés à l'échelle cellulaire. Pour cela, elle met à profit les interférences d'ondes lumineuses qui rendent possible l'imagerie *in vivo* de manière non invasive, sans avoir recours aux biopsies. Cette facilité d'imager la peau entraine ainsi un meilleur suivi des patients.

Les systèmes de LC-OCT sont habituellement basés sur un interféromètre de Linnik utilisant deux objectifs de microscope. Cette thèse présente le développement d'un système de LC-OCT basé cette fois sur un interféromètre de Mirau qui n'a besoin que d'un seul objectif dans le but d'en faciliter l'intégration dans une sonde portative et d'augmenter la vitesse d'acquisition des images. Ce système d'imagerie parvient ainsi à acquérir des coupes verticales de taille 940 µm × 350 µm (latéral x × axial z) à 17 Hz, en plus d'images 3D de taille 940 µm × 600 µm × 350 µm (x × y × z) avec une résolution de 1,9 µm × 1,3 µm × 1,1 µm (x × y × z) de qualité similaire à celles des systèmes de LC-OCT conventionnels.

**Title :** Line-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) based on a Mirau interferometer for skin cancer diagnosis

Keywords : optical coherence tomography, Mirau interferometer, optical instrumentation, medical imaging.

**Abstract :** Skin cancers are the most common type of cancer, but if detected early, their consequences can be easily stopped. However, nowadays, diagnoses are made after a simple visual examination, possibly followed by the extraction of a sample of suspicious skin. Histological sections are then extracted from this sample by slicing it thinly then staining it. It is a time-consuming process that can, nevertheless, ascertain the presence of a tumor by observing the sections with a microscope.

Linear-field confocal optical coherence tomography (LC-OCT) is a recent optical imaging technique particularly adapted to skin imaging: it can penetrate in the skin up to  $\sim$ 500 µm deep, which is sufficient to observe the dermal-epidermal junction where the growth of tumors becomes dangerous. LC-OCT offers a quasi-isotropic resolution of 1 µm to resolve details at a cellular level. To do so, it takes

Maison du doctorat de l'Université Paris-Saclay 2<sup>ème</sup> étage aile ouest, Ecole normale supérieure Paris-Saclay 4 avenue des Sciences, 91190 Gif sur Yvette, France advantage of light wave interference that makes *in vivo* imaging possible in a non-invasive way, without needing biopsies. Making skin imaging easy thus results in better patient follow-up.

LC-OCT systems are usually based on a Linnik interferometer using two microscope objectives. This thesis presents the development of an LC-OCT system based on a Mirau interferometer that requires only one objective in order to facilitate its integration into a portable probe and to increase the image acquisition speed. This imaging system is able to acquire vertical sections of 940  $\mu m \times 350 \mu m$  (lateral  $x \times axial z$ ) at 17 Hz, in addition to 3D images of 940  $\mu m \times 600 \mu m \times 350 \mu m$ ( $x \times y \times z$ ) with an anisotropic resolution of  $1.9 \mu m \times$  $1.3 \mu m \times 1.1 \mu m$  ( $x \times y \times z$ ) and with an image quality similar to those of conventional LC-OCT systems.