



HAL
open science

Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique plein champ étendus spatialement et spectralement

Antoine Federici

► **To cite this version:**

Antoine Federici. Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique plein champ étendus spatialement et spectralement. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COMUE), 2015. Français. NNT : 2015SACLS024 . tel-01301378

HAL Id: tel-01301378

<https://theses.hal.science/tel-01301378>

Submitted on 12 Apr 2016

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.

NNT : 2015SACLS024

THESE DE DOCTORAT
DE
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY
PRÉPARÉE À
L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ECOLE DOCTORALE N°575
Electrical, optical, bio-physics and engineering

Spécialité de doctorat : Physique

Par

Antoine Federici

DEVELOPPEMENT DE SYSTEMES DE MICROSCOPIE PAR
COHERENCE OPTIQUE PLEIN CHAMP ETENDUS
SPATIALEMENT ET SPECTRALEMENT

Thèse présentée et soutenue à l'Institut d'Optique Graduate School, le 20 octobre 2015 :

Composition du Jury :

Mme, Sentenac, Anne	Directrice de Recherche, Faculté St Jérôme	Présidente
M., Gigan, Sylvain	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M., Tessier, Gilles	Professeur, Université Paris-Descartes	Rapporteur
M., Froehly, Luc	Chargé de Recherche, Laboratoire Femto-ST	Examineur
M., Latour, Gaël	Maître de conférence, Université Paris-Sud	Examineur
M., Dubois, Arnaud	Professeur, Institut d'Optique Graduate School	Directeur de thèse

“Je refuse de croire que l’être humain ne soit
qu’un fétu de paille ballotté par le courant de la vie,
sans avoir la possibilité d’influencer en quoi que ce soit le cours des événements.”

Martin Luther King

Table des matières

Introduction générale	1
1 Imagerie optique des tissus biologiques en profondeur et OCT	3
1.1 Introduction	3
1.2 Imagerie optique en milieu complexe	5
1.2.1 La diffusion de la lumière	6
1.2.2 L'absorption de la lumière	11
1.3 Principales techniques d'imagerie optique 3D appliquées aux milieux biologiques .	13
1.3.1 La microscopie confocale	13
1.3.2 La microscopie non linéaire	15
1.3.3 Techniques de microscopie associant optique et acoustique	17
1.4 La tomographie par cohérence optique (OCT) à balayage	18
1.4.1 L'OCT en domaine temporel (TD-OCT)	19
1.4.2 L'OCT en domaine fréquentiel (FD-OCT)	26
1.4.3 Comparaison des performances entre un système TD-OCT et FD-OCT . .	28
1.5 L'OCT plein champ	30
1.5.1 Principe général	30
1.5.2 Performances	39
1.5.3 Avantages et inconvénients de l'OCT plein champ	43
1.5.4 Applications principales de l'OCT plein champ	44
1.5.5 Exemples de systèmes d'OCT plein champ couplés à d'autres techniques de microscopie	46
1.6 Conclusion	47
2 L'OCT plein champ multispectral	49
2.1 Introduction	50
2.2 Montage expérimental	51
2.2.1 Source de lumière	51
2.2.2 Détecteur	52
2.2.3 Développement optique	54
2.2.4 Optimisation de la vitesse d'acquisition par décalage de phase à modula- tion sinusoïdale	57
2.3 Compensation dynamique de la dispersion	59
2.3.1 Calcul de la différence de chemin optique induite par la rotation d'une lame compensatrice de dispersion	60

2.3.2	Choix des propriétés propres aux lames compensatrices de dispersion . . .	62
2.3.3	Mise en application de la correction des différences de dispersion	65
2.4	Performances	66
2.4.1	Résolution axiale	66
2.4.2	Résolution latérale	68
2.4.3	Sensibilité	69
2.4.4	Ajustements pré et post-acquisition pour la superposition des images . . .	71
2.5	Applications de l'imagerie multispectrale	73
2.5.1	Amélioration du contraste des images	73
2.5.2	Différenciation d'échantillons	75
2.6	Conclusion	77
3	L'OCT plein champ à très haute résolution	78
3.1	Introduction	79
3.2	Théorie de la résolution axiale en OCT adaptée à un large spectre	81
3.2.1	Formulation exacte de la résolution axiale Δz	81
3.2.2	Influence de l'allure de la densité spectrale de puissance sur la réponse impulsionnelle axiale	83
3.2.3	Influence de l'ouverture numérique sur l'expression de la résolution axiale	84
3.3	Effet de la cohérence spatiale sur le contraste du signal interférométrique	88
3.4	La dispersion en OCT plein champ	93
3.4.1	Calcul de la résolution axiale en présence de différences de dispersion . . .	94
3.4.2	Mise en évidence d'une configuration spectrale optimale	101
3.4.3	L'OCT plein champ à sectionnement axial exclusivement angulaire	103
3.5	Dispositif expérimental	105
3.5.1	Mise en pratique d'une configuration spectrale optimale	107
3.5.2	Images d'échantillons biologiques épais	110
3.6	Application à l'imagerie cellulaire et illumination en fond noir	114
3.7	Conclusion	120
4	L'OCT plein champ à large champ de vision	122
4.1	Introduction	123
4.2	Montage expérimental	124
4.2.1	Système d'imagerie	124
4.2.2	Source et détecteur	128
4.3	Méthode d'acquisition	129
4.3.1	Déplacement des fenêtres de cohérence et de focalisation	129
4.3.2	Optimisation de la disposition des éléments de l'interféromètre	131
4.4	Performances	133
4.4.1	Résolution axiale	133
4.4.2	Résolution transverse	136
4.4.3	Sensibilité et vitesse d'acquisition	137
4.5	Applications à l'imagerie d'amplitude	139
4.5.1	Images d'échantillons <i>ex vivo</i>	139
4.5.2	Imagerie <i>in vivo</i> d'empreintes digitales et problématiques	142

4.6	Imagerie de phase tomographique	145
4.6.1	Imagerie de phase et profilométrie par interférométrie en lumière blanche .	146
4.6.2	Mesure du signal de phase en OCT plein champ	150
4.6.3	Application à l'imagerie d'échantillons multicouches	158
4.7	Conclusion	163
5	L'OCT plein champ en domaine fréquentiel focalisé numériquement	164
5.1	Introduction	165
5.2	Modèle théorique de la propagation du champ électromagnétique en microscopie optique	166
5.3	Fonction de transfert optique et cohérence spatiale	173
5.4	Correction numérique de la fonction de corrélation Γ	174
5.4.1	Prise en compte du degré de cohérence spatiale du champ	176
5.4.2	Algorithme de focalisation numérique	180
5.5	Démonstration expérimentale	185
5.5.1	Montage de l'expérience	185
5.5.2	Principe et méthode d'acquisition du système SS-OCT plein champ	189
5.5.3	Applications et correction numérique de la mise au point	193
5.6	Conclusion	199
	Conclusion et perspectives	201
	Remerciements	204
	Annexes	209
A	Calcul du signal détecté en considérant une modulation de phase sinusoïdale et un algorithme à 4 images adapté	209
B	Calcul de la fonction d'autocorrélation Γ en présence de différences de dis- persion	214
C	Degré de cohérence spatiale	217
D	Fonction de transfert optique	220
	Bibliographie	223
	Liste des publications	235
	Résumé	236

Introduction générale

Aux alentours du XVII^{ème} siècle, l'homme entreprend de se tourner vers l'observation des étoiles, avec notamment la lunette astronomique de Galilée (1609), ainsi que vers l'observation des tissus biologiques et cellulaires, après le développement d'un des premiers microscopes par Robert Hooke (1667). Depuis lors les systèmes d'imagerie destinés aux sciences du vivant se sont multipliés et il existe aujourd'hui une grande variété de dispositifs proposant diverses approches et performances.

Ces systèmes ne se réduisent pas au domaine de l'optique et à l'utilisation de la lumière, mais peuvent être basés sur la détection des ultrasons (échographie), des rayons X (radiologie), ou la résonance magnétique nucléaire (IRM), par exemple. Ces modalités sont parmi les plus employées de nos jours dans le domaine biomédical et permettent une observation en profondeur des tissus biologiques et du corps humain. Bien que l'imagerie optique possède une profondeur de pénétration relativement limitée par rapport à ces techniques, elle garantit néanmoins des résolutions micrométriques, voire submicrométriques, et concerne donc de nombreuses applications.

Depuis une dizaine d'années, la microscopie optique a connu un développement retentissant dans le domaine de l'imagerie avec l'essor des techniques dite de "super résolution". Deux d'entre elles, la microscopie STED (pour *Stimulated-Emission-Depletion* anglais ou dépletion par émission stimulée [Hel94] et la microscopie PALM (pour *Photo-Activated Localization Microscopy* ou microscopie par localisation photoactivée), ont d'ailleurs vu leurs inventeurs respectifs, Stephan Hell et Eric Betzig, récompensés du prix Nobel de Chimie en 2014. Ces systèmes, comme la microscopie par illumination structurée (ou SIM pour *Structured Illumination Microscopy*) [Gus05], permettent d'atteindre des résolutions spatiales de quelques dizaines de nanomètres, dépassant ainsi la limite a priori fixée par la diffraction. Bien qu'ils représentent des outils majeurs pour l'imagerie cellulaire notamment, la plupart de ces méthodes, à l'exception dans certains cas de la microscopie SIM, reposent sur l'utilisation d'un marquage fluorescent des échantillons qui remet souvent en cause la possibilité d'études *in vivo*, en particulier sur une période de temps allongée. D'autre part, l'information extraite reste assez superficielle et confinée à quelques dizaines de micromètres de profondeur.

Ce document se concentrera plutôt sur une technique d'imagerie optique non invasive et capable de réaliser des images à plusieurs centaines de micromètres de profondeur dans les tissus biologiques : la tomographie par cohérence optique (ou OCT pour *Optical Coherence Tomography* en anglais) plein champ, également nommée microscopie par cohérence optique plein champ.

L'OCT plein champ permet d'atteindre une résolution spatiale autour de $1\mu\text{m}$ tout en assu-

rant une profondeur d'imagerie accessible de l'ordre de $500\mu\text{m}$ selon les tissus. Reposant sur une détection de type interférométrique, elle se distingue également par une sensibilité de détection relativement importante.

Ce manuscrit s'articule autour de cinq chapitres : un premier chapitre établit un état de l'art des travaux antérieurs au début de mon doctorat, alors que les suivants présentent, chacun, un système d'OCT plein champ différent développé durant ces trois années de thèse.

Après une introduction aux enjeux liés à la détection d'un signal optique issu de milieux absorbants et diffusants (appelés aussi milieux complexes), le premier chapitre décrit quelques techniques de microscopie optique destinées à l'imagerie en profondeur et non intrusive d'échantillons biologiques. On s'attarde ensuite sur la description des principales modalités d'OCT, que sont l'OCT en domaine temporel, qui fut le premier système développé au début des années 1990, et l'OCT en domaine fréquentiel, développé quant à lui au début des années 2000. Enfin, on détaille la technique d'OCT plein champ et on compare ses performances à celles des deux autres techniques mentionnées.

Le deuxième chapitre porte sur l'augmentation du contraste des images acquises en OCT plein champ par ajout d'une information spectroscopique. Un système d'imagerie achromatique est mis en place afin de réaliser des images d'un même échantillon dans trois bandes spectrales différentes et réparties sur une plage de longueurs d'onde globale s'étendant de 530nm à 1700nm. Le développement d'un système de compensation dynamique de la dispersion y est décrit ainsi qu'une méthode à décalage de phase améliorée, afin d'extraire le signal utile.

Dans le troisième chapitre, on optimise la résolution spatiale d'un système OCT plein champ en associant l'utilisation d'objectifs de microscope à grande ouverture numérique à une densité spectrale de puissance étendue. Une étude théorique et expérimentale, concernant les effets de la dispersion et de l'ouverture numérique sur la réponse impulsionnelle, est menée et appliquée à l'imagerie de tissus biologiques afin de mettre en évidence une configuration optimale.

Ensuite un montage interférométrique, différant de celui habituellement considéré en OCT plein champ, est réalisé dans le but d'obtenir un champ de vision étendu à quelques centimètres. Un arrangement original du dispositif est alors développé afin d'assurer des performances adaptées à l'observation en trois dimensions d'échantillons épais. Dans ce chapitre, on propose également l'application de la mesure du signal de phase à l'imagerie topographique et tomographique d'échantillons multicouches épais. Une technique d'extraction du signal de phase adaptée à la largeur du spectre choisi, qui garantit un sectionnement axial performant, est également implémentée.

Le dernier chapitre démontre la possibilité de modifier numériquement la mise au point d'images acquises avec un système d'OCT plein champ en domaine fréquentiel et associé à un champ d'illumination faiblement cohérent spatialement. Une analyse théorique est conduite, puis des images d'échantillons structurés sont présentées afin d'illustrer la capacité d'extension de la profondeur d'imagerie émanant de cette focalisation numérique appliquée, sans qu'aucun déplacement mécanique ne soit employé.

Chapitre 1

Imagerie optique des tissus biologiques en profondeur et OCT

Sommaire

1.1	Introduction	3
1.2	Imagerie optique en milieu complexe	5
1.2.1	La diffusion de la lumière	6
1.2.2	L'absorption de la lumière	11
1.3	Principales techniques d'imagerie optique 3D appliquées aux milieux biologiques	13
1.3.1	La microscopie confocale	13
1.3.2	La microscopie non linéaire	15
1.3.3	Techniques de microscopie associant optique et acoustique	17
1.4	La tomographie par cohérence optique (OCT) à balayage	18
1.4.1	L'OCT en domaine temporel (TD-OCT)	19
1.4.2	L'OCT en domaine fréquentiel (FD-OCT)	26
1.4.3	Comparaison des performances entre un système TD-OCT et FD-OCT	28
1.5	L'OCT plein champ	30
1.5.1	Principe général	30
1.5.2	Performances	39
1.5.3	Avantages et inconvénients de l'OCT plein champ	43
1.5.4	Applications principales de l'OCT plein champ	44
1.5.5	Exemples de systèmes d'OCT plein champ couplés à d'autres techniques de microscopie	46
1.6	Conclusion	47

1.1 Introduction

La plus ancienne lentille de verre polie a été datée de près de 1200 ans avant notre ère et fut retrouvée à Ninive, ancienne Assyrie, au Kurdistan. Il faut attendre le XVII^{me} siècle

pour voir apparaître la première utilisation scientifique concrète des lentilles qui étaient jusqu'ici principalement utilisées pour corriger la vue.

Dans son traité *Micrographia* publié en 1667, Robert Hooke décrit l'un des premiers microscope optique composé, constitué de trois lentilles en verre coulé, une table pour porter l'objet, un système de mise au point ainsi qu'un condenseur pour l'éclairage. Il présenta des dessins issus de ses observations de poux, de cellules végétales et champignons et appliqua donc, tout comme l'avait fait Antoni van Leeuwenhoek un peu plus tôt en décrivant les bactéries pour la première fois, la microscopie à la biologie.

Ernst Abbe fut le premier à établir une théorie complète de la formation des images en microscopie. Il définit un critère de résolution spatiale reposant sur le fait que cette dernière est limitée par le phénomène de diffraction de la lumière. L'image d'un point n'est alors pas singulier mais à la forme d'une tache, communément appelée aujourd'hui tache d'Airy.

En 1896, Rayleigh redéfinit ce critère et proposa une convention afin de déterminer la résolution d'un système optique. Celle-ci repose sur la capacité à séparer l'image de deux points proches l'un de l'autre comme cela est décrit en figure 1.1. Il stipule que la limite de résolution est atteinte lorsque la distance entre les deux maxima des taches est égale à la distance entre le maximum de l'une de ces taches et le premier minimum de la seconde.

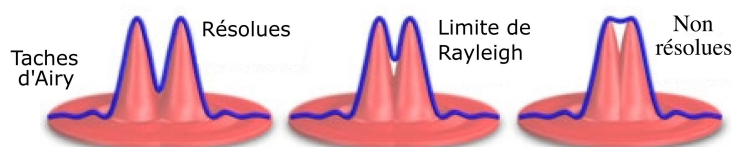


FIGURE 1.1 – Critère de résolution énoncé par Rayleigh, reposant sur la capacité à séparer les taches d'Airy correspondant à l'image de deux points différents.

Selon ce critère, l'expression de la résolution latérale d'un microscope optique classique est la suivante :

$$\Delta(x, y) = \frac{1,22\lambda}{2n\sin\alpha} = \frac{1,22\lambda}{2ON} \quad , \quad (1.1)$$

où λ est la longueur d'onde de la lumière et α le demi angle des rayons les plus inclinés par rapport à l'axe optique du microscope. $ON = n\sin(\alpha)$ est défini comme l'ouverture numérique du système, n étant l'indice du milieu considéré.

Après les études de van Leeuwenhoek et de Hooke s'est développée une nouvelle science : l'histologie, anciennement nommée "anatomie microscopique", définit comme l'étude des tissus biologiques. Elle a ainsi permis d'identifier de nombreuses structures cellulaires, membranaires ou tissulaires. L'imagerie histologique désigne aujourd'hui une technique particulière qui consiste à prélever un échantillon, à le traiter chimiquement, en l'immergeant dans un liquide tel que le Formol ou liquide de Bouin, afin qu'ils conservent le plus possible ses propriétés *in vivo*, puis à le sectionner physiquement afin de réduire ses dimensions et enfin à le colorer en utilisant des marqueurs spécifiques aux structures d'intérêts afin de l'observer avec un microscope optique (voire électronique) classique.

Bien que relativement efficace en termes de qualité d'image, c'est pourquoi elle est encore très utilisée de nos jours, l'imagerie histologique est un processus coûteux en temps qui nécessite

une longue préparation des échantillons et qui est particulièrement invasive et incompatible avec l'étude du vivant.

Le développement de techniques de microscopie optique atteignant des performances similaires à l'histologie, en ce qui concerne la résolution et le contraste du signal, mais compatible avec l'imagerie *in vivo* de tissus biologiques épais, a donc permis de proposer des alternatives à l'imagerie histologique, bien plus rapide à utiliser pour les professionnels de santé. C'est le cas de l'OCT qui, reposant sur le principe d'acquisitions d'images tomographiques sans qu'il ne soit nécessaire de marquer ou de sectionner l'échantillon, apparaît alors comme un système d'imagerie tout particulièrement disposé à se substituer ou du moins, à s'associer à l'imagerie histologique. En effet, la qualité des images histologiques en fait une technique toujours préférentielle pour les médecins dans le cas d'une analyse précise d'échantillons prélevés lors de biopsies. Cependant la possibilité de réaliser des coupes tomographiques sans qu'un prélèvement ne soit nécessaire est une caractéristique intéressante de l'OCT. Cela peut notamment permettre de réduire le nombre de biopsies en dermatologie, ou d'accéder à des tissus plus délicats à prélever comme en imagerie artérielle ou gastroentérologique. Le nombre important d'applications de l'OCT à l'ophtalmologie, pour laquelle le prélèvement de tissus vivants est exclus, s'explique notamment par son caractère non intrusif.

D'autres systèmes performants, dont nous introduirons le principe des plus notables dans ce chapitre, ont également été mis au point afin d'imager en profondeur des tissus biologiques épais.

L'imagerie tridimensionnelle en profondeur est caractérisée par un certain nombre de paramètres communs aux autres techniques d'imagerie superficielles, tels que la résolution, le rapport signal sur bruit ou encore la vitesse d'acquisition ; mais un critère déterminant les différencie de celles-ci : la profondeur de pénétration dans les tissus. Il est alors essentiel d'étudier et d'analyser les principaux phénomènes physiques mis en jeu qui contraignent la profondeur d'imagerie accessible

1.2 Imagerie optique en milieu complexe

Les milieux complexes, que sont la majorité des tissus biologiques, sont constitués d'une multitude de structures, ou particules, de tailles et de forme diverses qui affectent l'onde lumineuse au cours de sa propagation dans le milieu. L'extinction du signal en profondeur est déterminée par deux phénomènes majeurs : la diffusion et l'absorption de la lumière. On définit alors une section efficace d'extinction, σ_{ext} , telle que le produit $\sigma_{ext}I_{inc}$ soit égal à la puissance prélevée à l'onde incidente par diffusion ou par absorption, chacun caractérisé par leur propre section efficace notée respectivement σ_d et σ_a . En effectuant un bilan d'énergie sur la traversée par une onde plane d'un milieu diffusant et absorbant d'épaisseur L (voir figure 1.2), constitué de N particules de section efficaces σ_d et σ_a , on établit l'équation (1.2) :

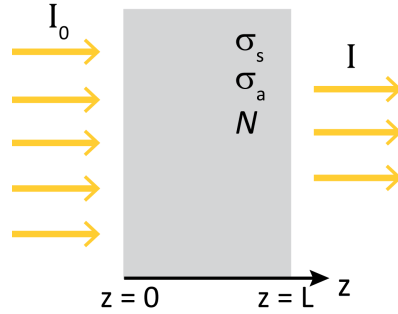


FIGURE 1.2 – Atténuation d’un faisceau collimaté par une couche d’épaisseur L de milieu diffusant et absorbant. Le milieu contient N particules par unité de volume, caractérisées par leurs sections efficaces de diffusion et d’absorption, notées respectivement σ_d et σ_a .

$$\begin{aligned}
 I(z + dz)S - I(z)S &= -(NSdz)(\sigma_a + \sigma_d)I(z) = -(NSdz)\sigma_{ext}I(z) \\
 \Rightarrow \frac{dI(z)}{dz} + N\sigma_{ext}I(z) &= 0 \\
 \Rightarrow I(z) &= I_0e^{-N\sigma_{ext}L}
 \end{aligned} \tag{1.2}$$

L’intensité décroît donc exponentiellement en fonction des grandeurs caractéristiques de diffusion, σ_d , et d’absorption σ_a . Les deux prochaines sous-sections ont pour objectif d’étudier les propriétés et lois d’évolution de ces deux paramètres pour des milieux complexes tels que les échantillons biologiques.

1.2.1 La diffusion de la lumière

Lorsqu’une onde électromagnétique se propage à travers un milieu complexe, son champ électrique génère un mouvement de charge au sein des atomes constituant les particules qui rayonnent alors un champ secondaire, diffusé, induit par ces courants de charges. La puissance du champ diffusé ainsi que sa redistribution angulaire, différente de l’onde incidente, dépendent alors fortement de la distribution spatiale des dipôles, de leur taille et de leur gradient d’indice par rapport au milieu environnant. On définit ainsi trois régimes principaux de diffusion caractérisés chacun par la dimension des particules, notée R , par rapport à la longueur d’onde, λ , de l’onde incidente : le régime de diffusion de Rayleigh ($R \ll \lambda$), le régime de diffusion de Mie ($L \sim \lambda$) et le régime de diffusion géométrique ($R \gg \lambda$) qu’on décrira dans le cas d’un champ incident monochromatique de longueur d’onde λ .

Régime de diffusion de Rayleigh. Sous l’hypothèse d’une particule de dimension faible devant la longueur d’onde, on peut considérer que le champ électromagnétique est uniforme au niveau de la particule. Ainsi, en se plaçant en champ lointain, l’approximation dipolaire électrique conduit à l’expression suivante de la puissance diffusée, P_d , par la particule :

$$P_d = \frac{\mu_0\omega^4}{12\pi c} |\mathbf{p}|^2 \quad , \tag{1.3}$$

où \mathbf{p} représente le moment dipolaire électrique de la particule induit par le champ incident \mathbf{E}_{inc} et s'exprime en fonction de la fonction de polarisabilité $\omega \rightarrow \alpha(\omega)$ de la particule comme suit :

$$\mathbf{p} = \alpha \epsilon_0 \mathbf{E}_{inc} \quad (1.4)$$

En considérant une plage de fréquence pour laquelle α varie peu, on en déduit donc que la puissance rayonnée P_d est inversement proportionnelle à la puissance quatrième de la longueur d'onde.

Le régime de Rayleigh caractérise donc des particules qui diffusent de façon beaucoup plus importante la lumière visible que la lumière infrarouge. On notera que ce régime particulier de diffusion est à l'origine de la couleur bleue du ciel résultant de la diffusion, par les particules de l'atmosphère, du champ lumineux émis par le soleil.

Régime de diffusion de Mie. Dans cette situation, les particules sont supposées de taille proche de la longueur d'onde du champ incident et il n'est plus pertinent de négliger les variations de phases au niveau de la particule et d'y considérer un champ uniforme. Une analyse numérique est alors généralement employée afin d'étudier les propriétés de diffusion d'une particule donnée. Une théorie analytique rigoureuse, dite théorie de *Mie*, du nom de son inventeur, existe cependant pour le cas particulier de particules sphériques et homogènes et permet d'illustrer le comportement de la section efficace de diffusion, σ_d selon les caractéristiques physiques de cette particule [Boh08].

Afin d'étudier une configuration proche de celle de l'OCT, on étudie l'évolution de l'efficacité de rétrodiffusion, dans le cadre de cette théorie, pour différentes tailles de particules, d'indice de réfraction égal à 1,4 et homogènes, immergées dans de l'eau, en fonction de la longueur d'onde centrale λ d'une source supposée monochromatique (voir Fig. 1.3). On a obtenu ces résultats à partir de simulations basées sur les études théoriques développées dans [Boh08, Gog10] :

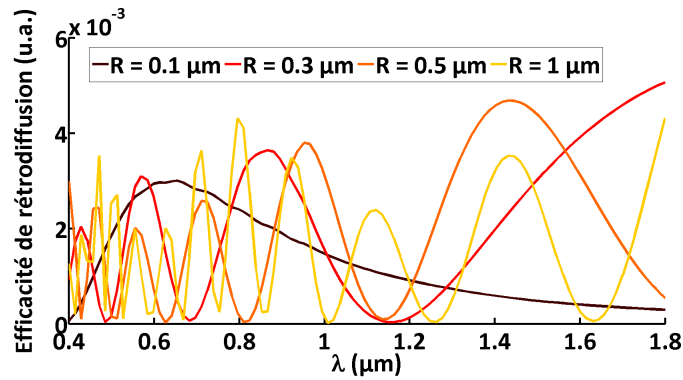


FIGURE 1.3 – Efficacités de rétrodiffusion, selon la théorie de Mie, en fonction de λ calculées numériquement pour différents rayons R de billes sphériques et homogènes d'indice constant 1,4, immergées dans de l'eau.

On observe la présence de résonances, caractéristiques du régime de diffusion de Mie. Leur fréquence varie significativement selon la taille de la particule considérée, et cela pourrait constituer un critère de mesure de dimension de certaines structures composant des échantillons via

une étude spectroscopique du signal rétrodiffusé. On abordera cette idée à l'issu du second chapitre de ce manuscrit.

On présente également en figure 1.4 (issue de [Mis02]), l'évolution de l'efficacité d'extinction Q_{ext} en fonction du paramètre réduit $x = 2\pi R/\lambda$ de la particule sphérique assimilée à une bille homogène.

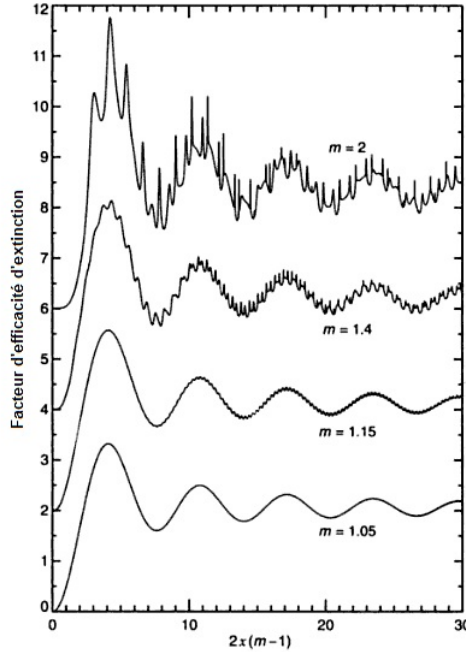


FIGURE 1.4 – Efficacité d'extinction $Q_{ext} = \sigma_{ext}/(\pi R^2)$ d'une particule sphérique homogène de rayon R , et d'indice optique m . Le paramètre x est le paramètre de taille $x = 2\pi R/\lambda$ où λ est la longueur d'onde incidente. L'axe vertical représenté correspond à la courbe du bas.

On peut, par ailleurs, montrer que le nombre de résonances observées dépend de l'indice de la particule considérée. On constate que l'amplitude de ces oscillations tend à diminuer à mesure que le rapport R/λ s'accroît, cette configuration limite correspondant au troisième régime de diffusion abordé ci-dessous.

Régime de diffusion géométrique. Ce dernier régime de diffusion, correspondant à des particules de rayon R très supérieur à λ , peut s'étudier en appliquant les lois de l'optique géométrique. L'onde plane incidente est alors interceptée par la particule de section géométrique πR^2 qui diffracte également la lumière incidente conduisant donc à une section efficace d'extinction $\sigma_{ext} = 2\pi R^2$. Cela est cohérent avec les résultats de la figure 1.4 pour lesquels l'efficacité d'extinction tend vers 2 pour $R \gg \lambda$.

On résume succinctement les principales caractéristiques des trois régimes de diffusion considérés :

- diffusion Rayleigh : $R \ll \lambda$. La puissance lumineuse diffusée est proportionnelle à $\frac{1}{\lambda^4}$.

- diffusion de Mie : $R \simeq \lambda$. La puissance lumineuse diffusée dépend de λ mais moins fortement et moins simplement que pour une diffusion Rayleigh.
- optique géométrique : $R \gg \lambda$. La diffusion suit les lois de l'optique géométrique.

Les échantillons biologiques étant constitués de structures de tailles microniques très variées, les régimes de diffusion de Rayleigh et de Mie s'appliquent essentiellement. Il est néanmoins difficile d'extraire une loi de diffusion générale mais on peut raisonnablement considérer que le phénomène de diffusion dépend de la longueur d'onde et que son influence décroît lorsque la longueur d'onde augmente.

Outre la puissance lumineuse, la direction d'émission du champ diffusé varie également selon la taille des particules. Lorsque ces dernières sont très petites devant la longueur d'onde, la puissance est diffusée de manière relativement isotrope, alors que pour des grosses particules, elle est davantage piquée vers l'avant comme illustré en figure 1.5.

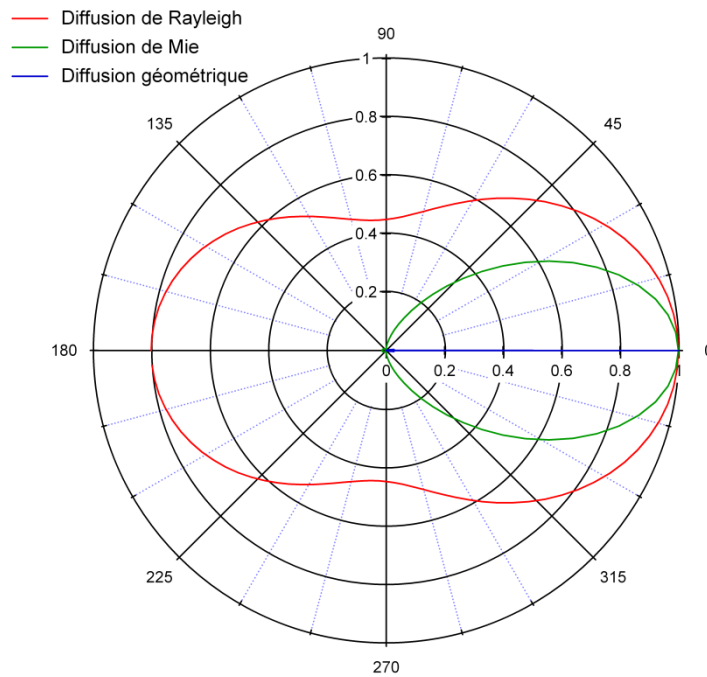


FIGURE 1.5 – Diagramme de la répartition directionnelle du champ diffusé par une particule sphérique, d'indice 1,5 immergée dans de l'eau, dans les trois cas de régime de diffusion considérés ($R = 0,05 \mu m$ (courbe rouge), $R = 0,25 \mu m$ (courbe verte), $R = 5 \mu m$ (courbe bleue)). Plus la particule est grande, plus la diffusion est dirigée vers l'avant. [Sac10]

Les échantillons biologiques ont un coefficient d'anisotropie assez élevés et diffusent la lumière majoritairement vers l'avant. Une partie de cette lumière est néanmoins diffusée vers l'arrière : c'est le signal rétrodiffusé qui est utilisé dans les systèmes de microscopie travaillant en réflexion.

Exceptés les systèmes d'imagerie adaptés à la détection et à l'étude du transport de l'énergie diffuse [Das93], la réalisation d'images tridimensionnelles d'échantillons épais est généralement

basée sur la détection des photons rétrodiffusés. Cependant, bien que jusqu'ici nous n'ayons considéré que le cas d'une particule isolée, un milieu complexe contient une multitude d'éléments susceptibles de diffuser successivement un même photon (voir Fig. 1.6). On précise que, afin de faciliter la représentation, on se place ici dans une configuration travaillant en transmission facilement transposable au cas de la mesure du champ rétrodiffusé.

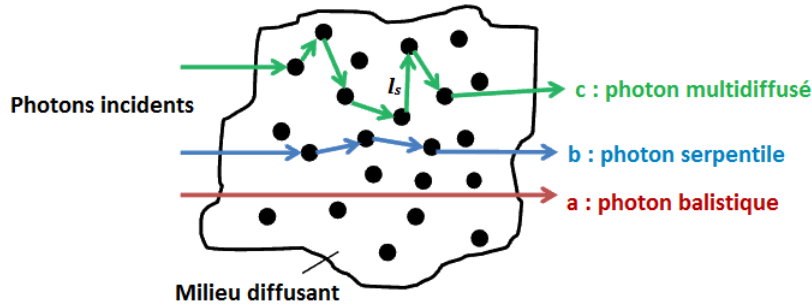


FIGURE 1.6 – Représentation schématique des trois différents types de trajectoires considérées pour un photon traversant un milieu diffusant. On définit une distance caractéristique du milieu : le libre parcours moyen de diffusion l_s , correspondant à la distance moyenne entre deux évènements successifs de diffusion.[Sac10]

On différencie ainsi trois catégories de photons détectables après la traversée d'un milieu diffusant :

- (a) photons balistiques : ce sont les photons qui traversent le milieu sans être déviés par les particules diffusantes. Leur direction de propagation est donc celle de la lumière incidente. Ce sont, dans la plupart des cas, à partir de ces photons qu'on cherche à reconstruire l'image.
- (b) photons serpentes : ce sont les photons qui sont faiblement déviés rencontrant très peu de diffuseurs sur leur chemin. Ce phénomène se présente dans le cas d'un milieu dilué et on néglige alors la part du champ diffusé par les particules dans le calcul du champ incident sur les autres particules.
- (c) photons multidiffusés : ce sont les photons qui sont déviés de leur trajectoire initiale de façon importante. Il est alors nécessaire de prendre en considération l'amplitude du champ diffusé lorsqu'on calcule le champ incident sur chaque particule. C'est le cas général lorsqu'on étudie la lumière diffusée par les milieux biologiques.

Les photons balistiques ont donc la particularité de conserver la trajectoire du photon incident et de satisfaire aux lois de l'optique géométrique : c'est pourquoi ce sont eux qui sont adaptés à l'imagerie optique à haute résolution. Concernant les systèmes de microscopie en réflexion, les photons balistiques correspondent aux photons rétrodiffusés une seule fois. Cette trajectoire directe est de première importance notamment pour les systèmes interférométriques comme l'OCT, qui sont sensibles à la distance parcourue par les photons dans l'échantillon, puisque ce sont les uniques photons possédant l'information de la position précise de la particule

rétroémettrice. En effet un photon, diffusé plusieurs fois aléatoirement voit, son chemin optique augmenté et la particule diffusante n'est alors plus localisable précisément. Ce signal multidiffusé constitue un bruit important qui limite la pénétration lorsqu'il devient supérieur au signal issu des photons balistiques.

Afin de caractériser l'aptitude d'un milieu à diffuser la lumière, on définit une longueur caractéristique, appelée longueur de libre parcours moyen de diffusion et notée l_s , qui correspond à la distance moyenne entre deux événements de diffusion (voir Fig. 1.6). Cette grandeur caractéristique peut se définir microscopiquement comme la distance moyenne entre deux événements de diffusion consécutifs, ou encore comme la distance moyenne qu'un photon, diffusé par une particule quelconque dans l'échantillon, parcourra avant la prochaine diffusion. De fait, plus la profondeur d'imagerie dans l'échantillon, notée L , sera importante par rapport à l_s , plus la probabilité de détecter un photon multidiffusé sera élevée. On en déduit alors trois régimes de diffusion :

- régime balistique : $L \ll l_s$. Aucun photon balistique n'est dévié. L'onde lumineuse est transmise sans être affectée.
- régime de simple diffusion : $L \simeq l_s$. Un photon est diffusé en moyenne une fois. Des photons balistiques demeurent présents, accompagnés de photons serpentiles.
- régime de diffusion multiple : $L \gg l_s$. Tous les photons ont tous affectés par les diffuseurs : il n'existe plus de photon balistique.

La distance de libre parcours moyen de diffusion l_s étant reliée à la section efficace de diffusion σ_s des N particules composant le milieu par la relation $l_s = (N\sigma_s)^{-1}$, on déduit de l'équation (1.2), l'expression suivante :

$$I = I_0 e^{-\frac{z}{l_s}} \quad (1.5)$$

On peut alors quantifier la diminution du nombre de photons balistiques, due à la diffusion uniquement, en fonction de la profondeur dans l'échantillon et de l'intensité du champ incident I_0 .

En ce qui concerne les milieux biologiques, l_s vaut typiquement $100\mu\text{m}$ en considérant une longueur d'onde dans le domaine visible ou proche infrarouge. Le nombre de photons balistiques est donc divisé par 400 pour une profondeur de pénétration de l'ordre de $300\mu\text{m}$ dans l'échantillon (ou une profondeur de $600\mu\text{m}$ si on considère un système d'imagerie travaillant en transmission). La limitation de la profondeur d'imagerie est ainsi fortement restreinte par le phénomène de diffusion de la lumière. Il est par conséquent nécessaire de développer un système d'imagerie très sensible à la détection et à la discrimination des photons balistiques afin d'imager des échantillons biologiques à plusieurs centaines de micromètres de profondeur.

1.2.2 L'absorption de la lumière

Le second facteur responsable de l'extinction du signal utile mesuré, lors de la traversée d'un milieu, est l'absorption. De façon similaire à l'étude de la diffusion, on peut mettre en évidence une longueur caractéristique des propriétés d'absorption du milieu, $l_a = (N\sigma_a)^{-1}$. Plus le milieu

est absorbant, plus cette longueur caractéristique est faible, comme l'exprime la relation de Beer-Lambert (1.6) qui découle de l'équation (1.2) en négligeant l'effet de la diffusion.

$$I = I_0 e^{-\frac{z}{l_a}}, \quad \text{où } I_0 \text{ est l'intensité initiale} \quad (1.6)$$

Les propriétés d'absorption d'un échantillon dépendent essentiellement de la partie imaginaire de son indice de réfraction $n = n' - in''$, comme l'explique l'expression développée du champ électrique de l'onde incidente d'intensité $I_0 = |U_0|^2$ à une profondeur z dans l'échantillon :

$$\mathbf{E} = \mathbf{E}_0 e^{i\omega t - n'' \frac{\omega}{c} z} = e^{-n'' \frac{\omega}{c} z} e^{i\omega t - n' \frac{\omega}{c} z} \quad (1.7)$$

On définit alors un coefficient d'absorption $\mu_a = (l_a)^{-1}$ qui s'identifie donc à $n'' \frac{\omega}{c}$. Ces grandeurs caractéristiques étant étroitement liées à l'indice du milieu concerné, il n'est pas possible d'isoler des lois générales comme pour la diffusion. On peut néanmoins étudier le spectre d'absorption d'éléments majoritairement présents dans les échantillons biologiques, qu'on étudiera, (voir figure 1.7) comme la mélanine, l'hémoglobine ou l'eau.

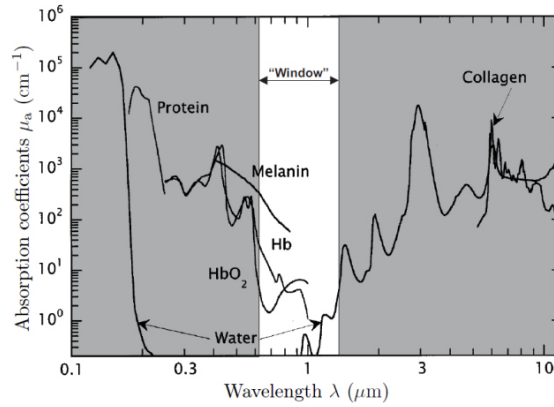


FIGURE 1.7 – Spectre d'absorption des principaux composants des tissus biologiques. La zone la plus transparente, dite fenêtr thérapeutique ou "window" (partie blanche) se situe entre $\sim 600\text{nm}$ et 1300nm . Issue de <http://www.fluomin.org/fr/wv-danger.php>.

L'eau étant le composant principal de la plupart des milieux biologiques, on s'attardera sur ses propriétés d'absorption en particulier. On observe que l'eau absorbe davantage la lumière infrarouge que la lumière visible pour laquelle son absorption est quasiment nulle. On remarque la présence de minima locaux dans le spectre d'absorption de l'eau pour $\lambda \sim 800\text{nm}$, $\lambda \simeq 1000\text{nm}$ et $\lambda \sim 1300\text{nm}$ qui se présentent donc comme des longueurs d'onde d'intérêt pour l'imagerie des milieux biologiques. On définit alors un intervalle spectral considéré comme optimal, du point de vue des propriétés d'absorption des principaux constituants des tissus biologiques, qui s'étend de $\sim 600\text{nm}$ à $\sim 1300\text{nm}$ et est communément nommé fenêtr thérapeutique. Dans cette fenêtr, le coefficient d'absorption μ_a est compris entre $0,1^{-1}$ et $1,0\text{mm}^{-1}$ correspondant à une longueur caractéristique d'absorption l_a de quelques millimètres dans les tissus biologiques ce qui est très supérieur à la longueur caractéristique de diffusion l_s qui est de l'ordre, comme on l'a vu, de $100\mu\text{m}$.

L'étude de la diffusion et de l'absorption de la lumière permet donc de rendre compte de l'extinction de la lumière en milieux complexes.

Compte tenu des longueurs caractéristiques propres aux deux phénomènes, la diffusion est généralement le facteur limitant la profondeur d'imagerie. Son effet diminuant lorsque la longueur d'onde augmente, l'emploi d'une source de lumière dans le domaine du proche infrarouge sera donc souvent favorisé.

Cependant, comme nous l'étudierons par la suite, d'autres enjeux guident le choix du spectre de la source lumineuse, comme la résolution spatiale ou le rapport signal sur bruit par exemple.

1.3 Principales techniques d'imagerie optique 3D appliquées aux milieux biologiques

Excepté l'OCT, qui est le sujet central de ce manuscrit, il existe d'autres systèmes de microscopie optique performants afin d'imager en profondeur les tissus biologiques. Bien que la liste ne soit pas exhaustive, on introduit, dans cette section, les principes et les montages des principales techniques développées jusqu'à présent. On choisit de se focaliser sur les techniques dédiées à l'imagerie en profondeur capable de sectionner axialement le signal détecté et on n'abordera donc pas, par exemple, les techniques de super-résolution dont le but essentiel n'est pas de pénétrer en profondeur dans les tissus mais d'améliorer la résolution spatiale.

1.3.1 La microscopie confocale

La première technique de microscopie à avoir permis de sélectionner les photons balistiques rétrodiffusés par un échantillon diffusant, fut la microscopie confocale, proposée par Minsky en 1957 [Min61]. Elle repose sur la discrimination géométrique des rayons lumineux, en fonction de la position du volume émetteur correspondant dans l'échantillon. En rejetant une partie de la lumière provenant des zones hors du plan d'imagerie elle garantit donc un sectionnement axial du signal.

Le montage, décrit en figure 1.8, est similaire à un celui d'un microscope à balayage classique dont la source laser est focalisée dans le plan focal de l'objectif de microscope. L'élément clef de ce dispositif est l'insertion de deux diaphragmes, un dans le système d'illumination (appelé diaphragme d'excitation), le second juste avant le détecteur (appelé diaphragme de détection). Tous deux sont conjugués avec le plan focal de l'objectif qui permettent ainsi de supprimer efficacement la lumière issue d'un plan différent du plan focal de l'objectif, dite lumière hors plan focal.

La capacité de sectionnement axiale est alors déterminée par l'ouverture numérique de l'objectif ainsi que par la dimension de l'ouverture du diaphragme. Afin de conserver un rapport signal sur bruit (RSB) convenable, l'ouverture du diaphragme est choisie au moins de largeur identique à la tache de diffraction déterminée par l'ouverture numérique de l'objectif.

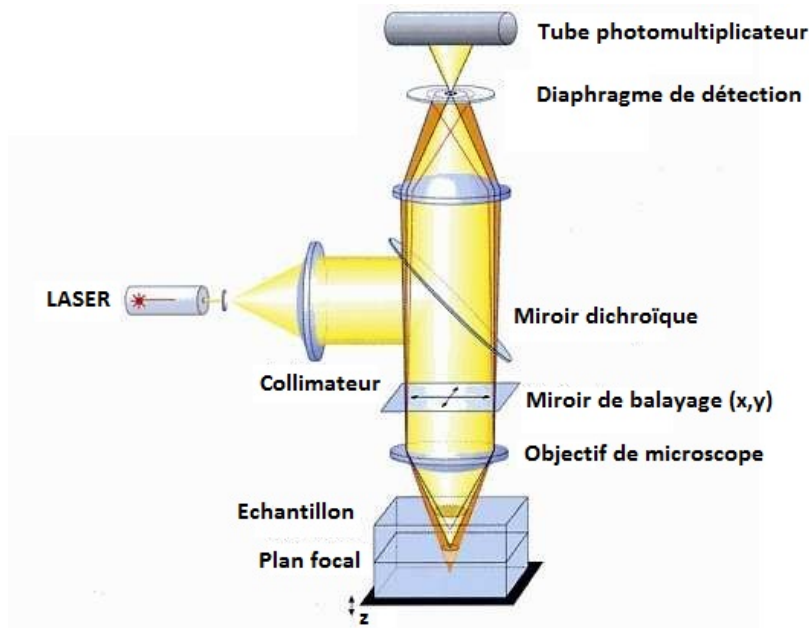


FIGURE 1.8 – Schéma de principe d'un microscope confocal en réflexion [Mon06a].

L'emploi de ces deux diaphragmes confèrent à la microscopie confocale une résolution spatiale légèrement supérieure à celle de la microscopie classique (voir l'introduction de ce chapitre). Cela est dû au fait que le diaphragme d'excitation sectionne dans un premier temps le faisceau d'illumination et que la lumière rétrodiffusée par l'échantillon est dans un second temps sélectionnée par le diaphragme de détection ce qui conduit à une expression de la réponse impulsionnelle du système (notée RI) qui peut être assimilée au carré de la RI de la microscopie classique. Cela augmente ainsi la résolution latérale et la résolution spatiale d'un facteur $\sqrt{2}$ [Mul06] et améliore la forme de la RI en diminuant considérablement l'amplitude des rebonds secondaires présents dans la RI axiale.

Cependant, bien que l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique permette d'atteindre une résolution latérale $\sim 0,3\mu\text{m}$ dans le domaine visible, la RI axiale est, malgré la présence des diaphragmes, entachée par la présence de rebonds secondaires qui dégrade la capacité de sectionnement axiale (cela sera abordé dans le chapitre 3 pour un cas équivalent en OCT plein champ). L'imagerie en profondeur d'un microscope confocal est ainsi essentiellement destinée à la production d'images en deux dimensions orientées perpendiculairement à l'axe optique (dite *en-face*).

Concernant l'observation de tissus biologiques, si la sélection géométrique assure la discrimination des photons balistiques venant ou non de la zone focale, elle ne permet pas en revanche l'élimination des photons multidiffusés dont la trajectoire est conjuguée avec la fente du diaphragme de détection. Le problème du fond parasite de diffusion reste donc présent pour l'imagerie d'échantillons diffusants et restreint la sensibilité de détection de la microscopie confocale. Cela reste une technique néanmoins relativement efficace pour la réalisation d'images *en-face* à haute résolution latérale comme le montre ces images de peau humaine [Raj95] :

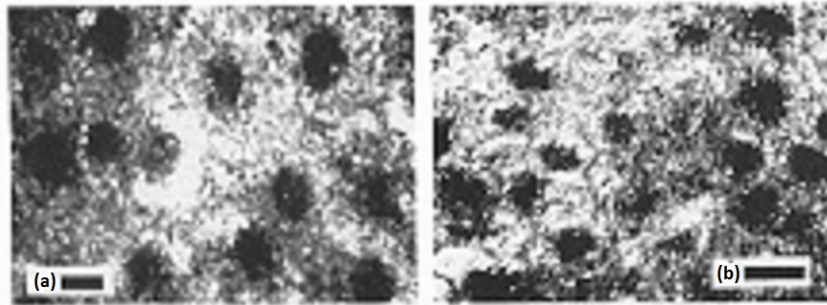


FIGURE 1.9 – Images en-face de la couche granuleuse (a) et la couche spinueuse (b) d'un échantillon de peau humaine *in vivo* acquises avec un microscope confocal conventionnel. On distingue facilement les noyaux (en noir) au sein du cytoplasme. Les barres d'échelles sont de $10\mu\text{m}$. Issues de [Raj95].

1.3.2 La microscopie non linéaire

La microscopie non linéaire s'est développée au début des années 1990, grâce au développement des sources lasers à impulsions ultracourtes, et a rapidement connu un succès en imagerie biomédicale, notamment la technique de microscopie de fluorescence à 2 photons. Notre choix étant de se consacrer à des techniques de microscopie non invasive et ne nécessitant donc pas de marquage spécifique, nous nous intéresserons plus particulièrement à deux modalités initiées plus tardivement : les microscopies par génération de second harmonique (notée SHG pour *second harmonic generation* en anglais) et par génération de troisième harmonique (notée THG pour *third harmonic generation* en anglais). On signale également l'existence de la microscopie d'autofluorescence à 2 photons qui repose sur l'émission spontanée d'un photon par une structure absorbante excitée.

Etant basées sur un phénomène d'interaction non linéaire lumière-tissu, ces trois techniques ont en commun la faculté de générer un signal en profondeur peu affecté par la diffusion de la lumière et relativement peu nocif pour l'échantillon biologique puisque la lumière incidente appartient généralement au domaine de l'infrarouge. Ce caractère non linéaire garantit donc la conservation de la résolution axiale en profondeur ainsi qu'un sectionnement axial efficace, sans nécessiter l'emploi de diaphragmes comme c'est le cas en microscopie confocale.

En effet, le signal n'est produit que dans un volume confiné, autour du plan focal de l'objectif, pour lequel le champ excitateur est très intense (voir Fig. 1.10a). Leurs performances en termes de profondeur de pénétration sont ainsi supérieures à la microscopie confocale et davantage similaires à celles de l'OCT.

Excepté le nombre de photons considérés à l'excitation, les microscopies SHG et THG reposent sur le même principe. Celui-ci peut être vu, ou bien comme la polarisation par un champ lumineux intense d'une molécule qui rayonne alors un champ "déformé" de fréquence double (SHG) ou triple (THG) ou comme un processus de diffusion linéaire combinant deux (SHG) ou trois (THG) photons incidents sans qu'il n'y ait de dépôt d'énergie dans l'échantillon [Déb06] (voir Fig. 1.10b).

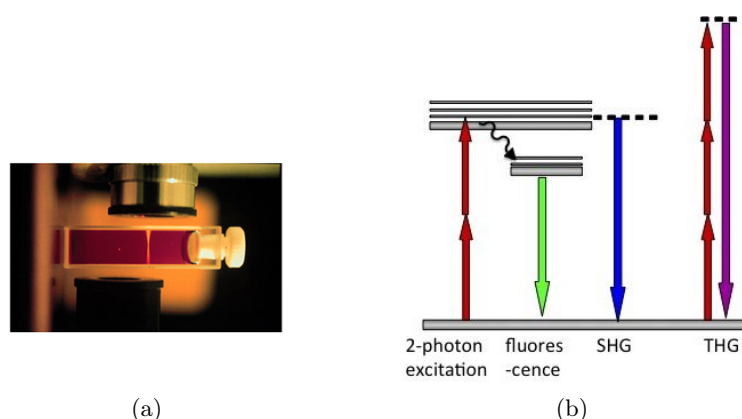


FIGURE 1.10 – (a) : illustration du confinement du signal non linéaire par rapport à un processus de type linéaire. (b) : diagramme d'énergie du mécanisme de la génération de second harmonique (SHG), de la génération de troisième harmonique (THG), et de l'autofluorescence à 2 photons.

La différence principale entre les deux modalités réside dans le type de structures détectables. Le signal SHG est par exemple détectable uniquement pour des éléments organisés de façon non centrosymétrique comme les fibres de collagène ou les microtubules. La microscopie THG est moins spécifique et s'applique à tout milieu polarisable tant qu'il n'est pas homogène ou isotrope. Dans les deux cas, l'information sera essentiellement structurale contrairement au cas de la microscopie de fluorescence classique dont le signal identifie uniquement les molécules marquées.

Il est par ailleurs relativement aisé de combiner ces différentes techniques, apportant ainsi une information diversifiée d'un même échantillon. On présente en figure 1.11 des images de cornées humaines intactes réalisées par microscopies SHG et THG au laboratoire d'Optique et Bioscience (LOB) de l'école Polytechnique.

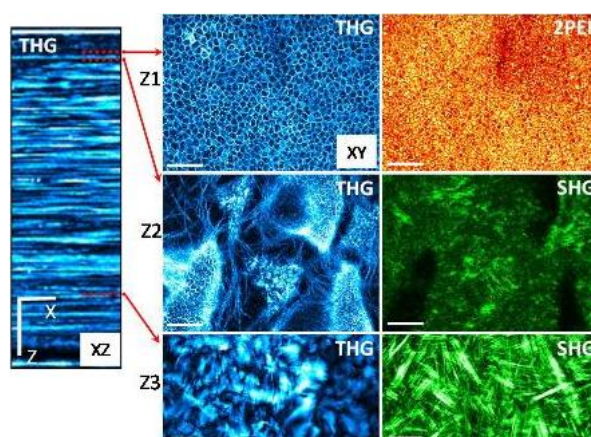


FIGURE 1.11 – Imagerie non linéaire multimodale de cornées humaines intactes excisées. Modifiée depuis [Oli10] et [Apt10]. L'information issue du signal SHG diffère de celle issue du signal THG. Les barres d'échelles valent $20\mu\text{m}$.

1.3.3 Techniques de microscopie associant optique et acoustique

Comme on l'a étudié précédemment, la diffusion de la lumière est la limite principale à la profondeur d'imagerie optique qui demeure alors inférieure au millimètre dans la grande majorité des tissus. Cependant, contrairement aux ondes électromagnétiques dans le domaine visible et proche-infrarouge, les ondes acoustiques sont faiblement diffusées dans les tissus biologiques. Cela explique d'ailleurs l'efficacité de l'échographie qui, en détectant le signal ultrasonore rétroémis par les tissus, permet de pénétrer à travers des tissus épais avec une résolution spatiale de l'ordre du millimètre. Le couplage des ondes acoustiques et optiques exploite donc de la capacité de pénétration des ultrasons tout en profitant d'un contraste optique provenant de l'interaction de la lumière avec le tissu. Actuellement, deux techniques principales sont développées : l'imagerie acousto-optique et la tomographie photo-acoustique (ou PAT pour *photo-acoustic tomography* en anglais).

L'imagerie acousto-optique

Le principe de l'imagerie acousto-optique consiste à illuminer le tissu par une onde optique cohérente produisant ainsi une figure d'interférence, dite de *speckle*, compte tenu du caractère aléatoire de la phase du champ électrique après la traversée de ce milieu diffusant. Afin de sectionner spatialement le signal et de ne sélectionner que les photons provenant d'un volume d'intérêt, une onde acoustique est focalisée dans le tissu (voir Fig. 1.12), de sorte à moduler la phase des photons concernés qui pourront être ensuite distingués par une détection de type homodyne. L'amplitude mesurée est alors proportionnelle à l'absorption optique du tissu dans le volume où les ultrasons sont focalisés.

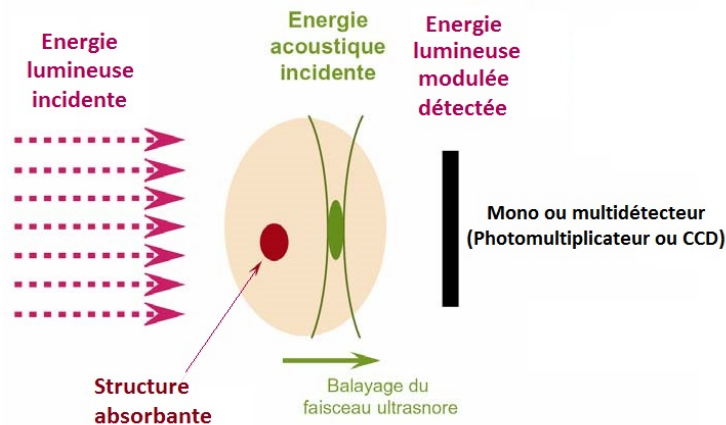


FIGURE 1.12 – Principe de l'imagerie acousto-optique : une onde acoustique focalisée dans le milieu module l'intensité lumineuse [Sel02].

L'imagerie acousto-optique permet donc de révéler avec la résolution de l'échographie (résolution millimétrique) un contraste optique dans les tissus biologiques jusqu'à plusieurs centimètres de profondeur [Res12].

La tomographie photo-acoustique

L'effet photo-acoustique, ou optoacoustique, a été observé pour la première fois en 1881 par A.G. Bell. En envoyant un faisceau lumineux (lumière solaire) d'intensité modulé et focalisé à l'intérieur d'une ampoule contenant un gaz, il a détecté un signal audible à la fréquence de la modulation lumineuse. Le même résultat peut être obtenu dans un matériau liquide ou solide ou dans les tissus biologiques comme l'exploite la tomographie photo-acoustique.

La tomographie photo-acoustique est donc basée sur la génération d'ondes acoustiques résultant de l'expansion thermoélastique des tissus ayant absorbés l'onde lumineuse. La position des structures absorbantes est détectée à l'aide de transducteurs ultrasonores (voir Fig. 1.13a).

La durée de l'impulsion lumineuse et la réponse du détecteur acoustique déterminant, entre autres, la résolution spatiale, celle-ci est typiquement d'une centaine de micromètres et atteint $50 \mu\text{m}$ avec la technique de microscopie photo-acoustique [Xia14]. La profondeur de pénétration, allant du millimètre au centimètre selon les tissus, est toujours importante comme le prouve l'image présentée en figure 1.13b.

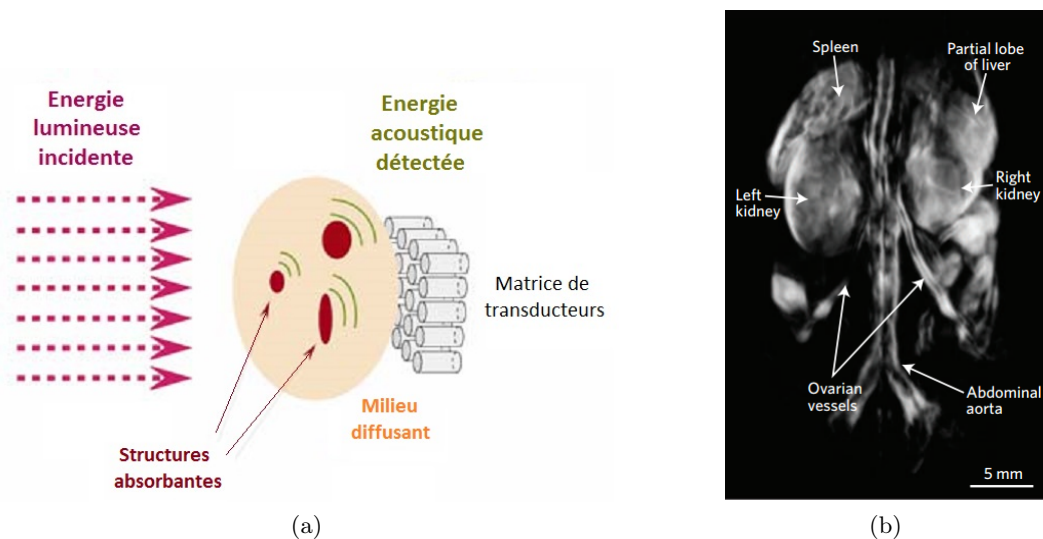


FIGURE 1.13 – (a) : principe de l'imagerie photo-acoustique. Une onde acoustique est produite par absorption d'une onde lumineuse [Sel02]. (b) : image tridimensionnelle de l'ensemble du corps d'une souris femelle épilée. Issue de [Wan03].

1.4 La tomographie par cohérence optique (OCT) à balayage

La tomographie par cohérence optique, communément désignée par l'acronyme anglais OCT (pour Optical Coherence Tomography), est une technique d'imagerie tridimensionnelle, développée depuis le début des années 1990 [Hua91] dont le but est de réaliser, de manière non invasive, des images tomographiques d'échantillons semi-transparents avec des résolutions spatiales de l'ordre de $1 - 15 \mu\text{m}$ et pour des profondeurs de pénétration de l'ordre du millimètre. Les premières applications biomédicales furent dédiées à l'imagerie artérielle [Hua91, Fuj95] ou des

constituants de l'oeil, tels que la rétine [Hua91, Hee98, Hee95]. La réalisation d'images tomographiques, avec une profondeur d'imagerie supérieure aux techniques optiques conventionnelles et une résolution micrométrique, ont permis un développement et un succès rapide de l'OCT, bien adapté à l'imagerie *in vivo*. Celui-ci constitue ainsi une approche capable de suppléer, dans une certaine mesure, l'imagerie histologique qui nécessite, quant à elle, une préparation longue et intrusive de l'échantillon prélevé, alors que l'OCT produit un résultat rapide après le prélèvement, lors d'une biopsie, d'un échantillon de tissu potentiellement cancéreux par exemple.

L'OCT est devenue une technique standard en ophtalmologie et disponible commercialement en se développant à partir de deux modalités principales : l'OCT en domaine temporel et l'OCT en domaine fréquentiel.

1.4.1 L'OCT en domaine temporel (TD-OCT)

L'OCT temporel (ou TD-OCT pour *time-domain* OCT en anglais) est historiquement le premier montage développé dans le groupe du professeur J. Fujimoto au *Massachusetts Institute of Technology* (Boston, Etats-Unis). Son principe, basé sur l'interférométrie en lumière faiblement cohérente [Hit92], et à partir duquel les autres modalités ont ensuite été réalisées, est bien adapté à une introduction générale et à une description des principaux enjeux propres à l'OCT.

Principe général de l'OCT

Par analogie avec l'échographie ultrasonore qui détecte les ultrasons en mesurant leur temps de parcours dans l'échantillon, l'OCT analyse le chemin des ondes lumineuses rétrodiffusées par l'échantillon. La vitesse des photons ne permettant pas de distinguer des différences de temps de parcours suffisamment faibles, comme dans le cas des ultrasons, on ne peut se contenter d'une mesure directe du temps de parcours des photons rétrodiffusés. L'OCT recourt alors à une détection indirecte, de type homodyne, basée sur une technique interférométrique.

Le montage repose sur le principe du phénomène d'interférences à deux ondes mis en œuvre dans un interféromètre de type Michelson. L'onde lumineuse émise par la source est séparée dans deux bras, nommés bras de référence et bras échantillon, possédant chacun un objet réfléchissant. L'onde réfléchi par la surface de référence, dont l'amplitude est notée U_{ref} , est recombinaée à celle réfléchi par l'échantillon, d'amplitude U_{ech} grâce au séparateur de faisceau disposé dans l'interféromètre (voir Fig. 1.14).

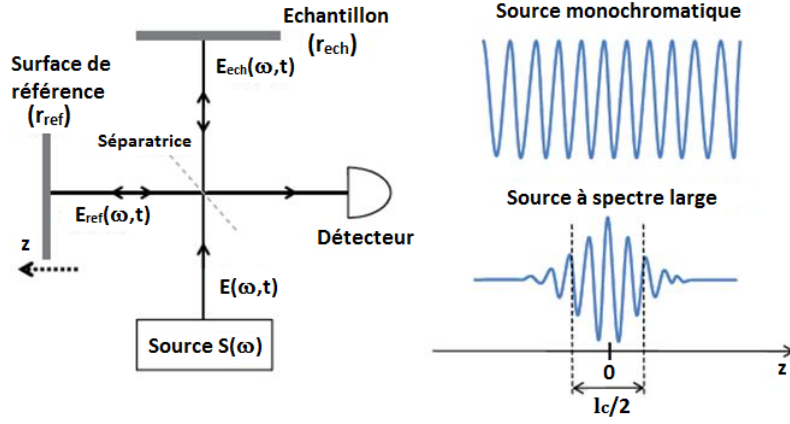


FIGURE 1.14 – Phénomène d’interférences à deux ondes avec un interféromètre de Michelson. L’onde lumineuse émise par la source est séparée, grâce à une séparatrice, dans deux bras puis recombinée avant d’être détectée. L’enveloppe de l’interférogramme mesurée dépend de la longueur de cohérence l_c de la source : dans le cas d’une source lumineuse monochromatique le signal est infiniment large ce qui n’est pas le cas d’une source à spectre étendu.

L’amplitude du signal en sortie de l’interféromètre est alors la somme cohérente des amplitudes des deux ondes lumineuses dont le détecteur intègre l’intensité moyennée sur une période t correspondante à son temps d’exposition. On peut formaliser théoriquement cela en supposant, dans un premier temps, la propagation d’une onde plane scalaire incidente d’intensité $I_0(\omega) = \langle |U(\omega, t)|^2 \rangle_t$ à travers l’interféromètre de Michelson, tel que $\mathbf{E}(\omega, t) = \mathbf{E}_0 e^{i(kz - \omega t)}$. En considérant une lame séparatrice 50:50, on écrit le signal d’interférences à deux ondes et l’intensité I qu’on mesure. On note r_e et r_r les coefficients de réflexions en amplitude respectivement de l’échantillon et de la surface de référence et $S(\omega) = \langle |s(\omega)|^2 \rangle_t$ la densité spectrale de puissance (DSP) du système principalement déterminée par le spectre d’émission de la source de lumière et sensibilité spectrale du détecteur.

$$\mathbf{E}_{\text{ref}}(\omega, t, z) = \frac{1}{2} r_{\text{ref}} \mathbf{E}(\omega, t) e^{i\phi_r(\omega, z, t)} \quad \mathbf{E}_{\text{ech}}(\omega, t, z) = \frac{1}{2} r_{\text{ech}} \mathbf{E}(\omega, t) e^{i\phi_{\text{ech}}(\omega, z, t)} \quad , \quad (1.8)$$

avec $r_{\text{ref}} = |r_{\text{ref}}| e^{i\varphi_{rr}}$ et $r_{\text{ech}}(\omega) = |r_{\text{ech}}(\omega)| e^{i\varphi_{re}}$

En considérant des champs scalaires, l’intensité de ce signal est la suivante :

$$I(\omega, z) = \left\langle |s(\omega) U_{\text{ref}} + s(\omega) U_{\text{ech}}|^2 \right\rangle_t \quad (1.9)$$

$$I(\omega, z) = \left\langle |s(\omega)|^2 U_{\text{ref}} U_{\text{ref}}^* \right\rangle_t + \left\langle |s(\omega)|^2 U_{\text{ech}} U_{\text{ech}}^* \right\rangle_t + 2\Re \left(\left\langle |s(\omega)|^2 U_{\text{ech}} U_{\text{ref}}^* \right\rangle_t \right) \quad , \quad (1.10)$$

où $\langle \rangle_t$ dénote l’intégration sur la période d’exposition du détecteur et \Re la fonction partie réelle.

Le signal utile est contenu dans le terme $2\Re\left(\left\langle |s(\omega)|^2 U_{ech} U_{ref}^* \right\rangle_t\right)$. On définit alors une fonction de corrélation Γ , telle que $\Gamma = \left\langle |s(\omega)|^2 U_{ech} U_{ref}^* \right\rangle_t$.

En notant et en considérant des coefficients de réflexions constants sur l'intervalle spectral considéré, cette intensité s'écrit alors :

$$I(\omega, z) = \frac{I_0 S(\omega)}{4} \left[|r_{ref}|^2 + |r_{ech}|^2 + 2\Re\left(r_{ref} r_{ech} e^{i\Delta\phi(\omega, z)}\right) \right] , \quad (1.11)$$

où $\Delta\phi(\omega, z) = \phi_r - \phi_{ech}$ est la différence de phase entre l'onde réfléchie par la surface de référence et celle par l'échantillon.

En définissant les coefficients de réflexion en intensité $R_e = |r_e|^2$, $R_{inc} = |r_{inc}|^2$ et $R_{ref} = |r_{ref}|^2$ ainsi que le déphasage à la réflexion $\varphi = \varphi_{rr} - \varphi_{re}$ qu'on suppose constante, l'expression de l'intensité s'exprime de la façon suivante :

$$I(\omega, z) = \frac{I_0 S(\omega)}{4} \left(R_{ref} + R_{ech} + 2\sqrt{R_{ech} R_{ref}} \cos[\Delta\phi(\omega, z) - \varphi] \right) \quad (1.12)$$

Dans le cas général d'une source de lumière polychromatique, on intègre cette expression selon la pulsation ω afin d'évaluer l'intensité détectée :

$$I(z) = \frac{I_0}{4} \int_{-\infty}^{+\infty} S(\omega) \left(R_{ref} + R_{ech} + 2\sqrt{R_{ech} R_{ref}} \cos[\Delta\phi(\omega, z) - \varphi] \right) d\omega \quad (1.13)$$

Si la source est monochromatique de pulsation ω_0 , la DSP du système est nulle $\forall \omega \neq \omega_0$ et l'intensité résultante vaut :

$$I_{\omega_0}(z) = \frac{I_0}{4} \left(R_{ref} + R_{ech} + 2\sqrt{R_{ech} R_{ref}} \cos[\Delta\phi(\omega_0, z) - \varphi] \right) \quad (1.14)$$

L'équation (1.14) permet de mettre clairement en évidence le caractère oscillant du signal d'interférences à deux ondes dont la fréquence dépend de la longueur d'onde du signal et de la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre, cette dernière étant étroitement liée à la différence de position axiale, *i.e.* selon l'axe Oz , des deux objets.

Comme mentionné précédemment, l'OCT est une technique interférométrique à faible cohérence temporelle utilisant donc une source de lumière polychromatique. Elle est définie par une pulsation centrale ω_0 et une largeur à mi-hauteur $\Delta\omega$. Afin de simplifier le propos, on considèrera, dans cette section, que la DSP du système s'identifie au spectre d'émission de la source et qu'elle est d'allure gaussienne. Comme l'exprime l'équation (1.13), la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe du signal est alors directement liée à l'étendue spectrale de la source, ou de façon équivalente à sa longueur de cohérence l_c qui est inversement proportionnelle à $\Delta\omega$ (voir Eq. (1.15))

$$l_c = \frac{8 \ln 2 c}{\Delta\omega} , \quad (1.15)$$

où c est la célérité de la lumière dans le vide

De fait, contrairement au cas monochromatique pour lequel le signal interférométrique est infiniment étendu, l'enveloppe de l'interférogramme possède une largeur à mi-hauteur limitée, égale à l_c (voir le schéma de principe en figure 1.14). En pratique, comme illustré sur le schéma ci-dessous, la différence de chemin optique est modifiée en tradant la position de la surface de référence lorsque l'échantillon reste, lui, immobile. L'interférogramme est alors centré à une position $z = 0$ correspondant à une différence de chemin optique nulle entre les deux bras.

Ce signal interférométrique mesuré entre deux surfaces correspond donc à la réponse impulsionnelle (notée RI) axiale du système et la résolution axiale est donc déterminée par la largeur à mi-hauteur de son enveloppe, c'est-à-dire la longueur de cohérence de la source. Cela est illustré en figure 1.15, où l'on représente le signal mesuré si l'on translate la position de la surface de référence lorsque l'échantillon est constitué de plusieurs structures. On constate donc que la faculté de distinguer les trois structures dépend de l_c qui fixe ainsi la valeur de la résolution axiale du système $\Delta z = l_c/2$.

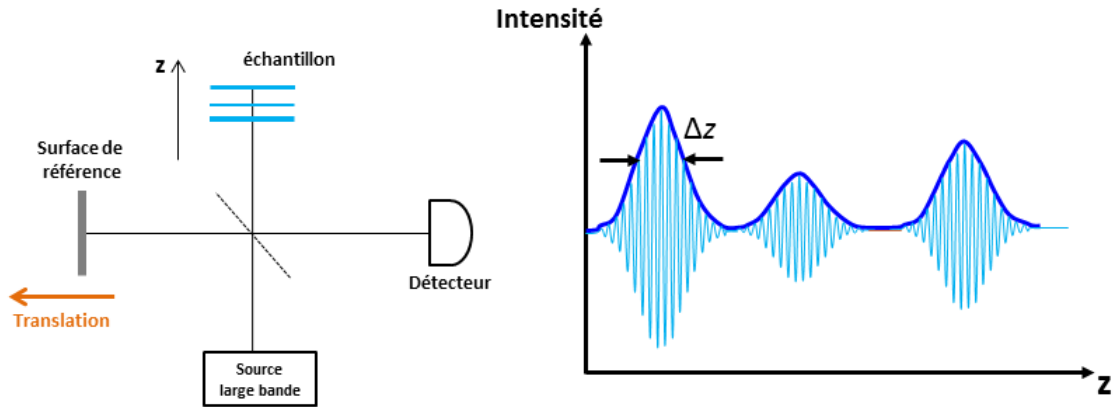


FIGURE 1.15 – Schéma représentant le signal interférométrique mesuré en OCT lorsque la surface de référence est tradée longitudinalement le long de l'axe optique. Chaque structure de l'échantillon induit un signal dont on extrait l'enveloppe et qui permet de localiser sa position. La résolution axiale est déterminée par la largeur à mi-hauteur de chaque enveloppe, Δz .

Une translation axiale de la surface de référence permet donc de réaliser une image en profondeur dans l'échantillon puisque la différence de marche est modifiée progressivement. Afin de produire une image en trois dimensions, le faisceau incident focalisé dans l'échantillon est balayé dans les deux directions transverses Ox et Oy (voir Fig. 1.16).

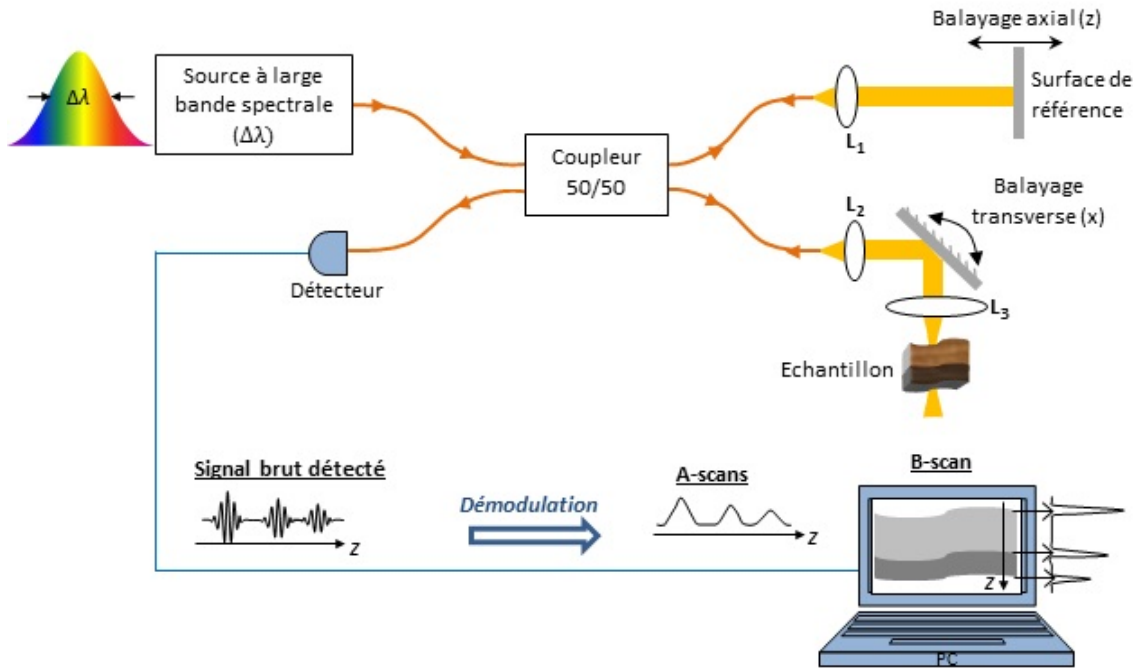


FIGURE 1.16 – Schéma de principe d'un montage de TD-OCT [Mor12]. Une onde lumineuse faiblement cohérente temporellement, de largeur spectrale $\Delta\lambda$, est transmise à l'aide de fibres optiques puis collimatée et conjuguée par des lentilles (L_1 , L_2 , L_3). Un balayage axial et deux balayages transverses (x, y) sont nécessaires pour obtenir une image en 3D (c'est-à-dire une série de B-scans).

Performances du TD-OCT

Résolution axiale. La longueur de cohérence de la source étant proportionnelle à $1/\Delta\omega$, une expression approximative de la résolution axiale en fonction de la longueur d'onde moyenne du spectre λ_0 et de sa largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda$ est généralement utilisée lorsque l'intervalle spectral considéré n'est pas trop étendu :

$$\Delta z = \frac{l_c}{2} = \frac{4c \ln 2}{\Delta\omega} \sim \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (1.16)$$

En utilisant des sources relativement larges spectralement, des résolutions axiales comprises entre 1 et $10\mu\text{m}$ sont généralement atteintes. On notera que cette résolution dépend également de la longueur d'onde moyenne du spectre et qu'une source émettant de la lumière infrarouge proche de $1,3\mu\text{m}$ engendrera une résolution plus faible qu'une lumière incidente visible pour une même largeur spectrale. Les premiers montage d'OCT employaient comme source de lumière des diodes superluminescentes (SLD) [Hua91] ne permettant pas d'atteindre des résolutions supérieures à $10\mu\text{m}$. Le développement de sources de lumière telles que la combinaison de SLD centrées à différentes longueurs d'ondes [Ko04], les lasers femto-seconde [Dre99], les lasers supercontinuum basés sur l'utilisation de fibres à cristal photonique [Agu06, Pov02] ont permis d'augmenter la résolution axiale des systèmes d'OCT.

C'est en combinant une source laser femto-seconde titane-saphir et une fibre à cristal photonique qu'une résolution axiale de $0,75\mu\text{m}$ (dans l'air) fut atteinte par l'équipe de W. Drexler avec un spectre centré à $\sim 700\text{nm}$ [Pov02]. Nous reviendrons par la suite sur l'emploi d'une source faiblement cohérente spatialement comme les lampes thermiques, dédiées aux montages à illumination plein champ, qui permettent d'atteindre des résolutions particulièrement élevées. On résume les différents types de sources usuelles en OCT ainsi que leurs caractéristiques spectrales dans le tableau suivant :

Source de lumière	λ_0 (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)	Δz (μm)
Diode électroluminescente (DEL) [Sch97]	800	50	5,7
Diode superluminescente (SLD) [Dre08]	820	50	6
Combinaison de SLD [Ko04]	890	150	2,2
Laser supercontinuum [Agu06]	1300	370	2,7
[Pov02]	725	370	0,75

FIGURE 1.17 – Sources de lumière utilisées dans des montages d'OCT en domaine temporel et performances associées atteintes.

Résolution latérale. En ce qui concerne l'OCT à balayage point par point (en domaine temporel ou fréquentiel), le faisceau lumineux incident est focalisé dans le plan focal de l'objectif et ensuite déplacé afin de couvrir un certain champ latéral. En supposant un faisceau de profil d'intensité gaussien, la résolution latérale, $\Delta(x, y)$, est donc égale à la largeur minimale du faisceau cohérent (appelée *waist* en anglais). En considérant l'emploi d'un objectif de microscope limité par diffraction, $\Delta(x, y)$ est donc inversement proportionnel à l'ouverture numérique ON effective (voir Fig. 1.18).

On ajoute que le caractère homodyne de la détection en OCT conduit, comme dans le cas de la microscopie confocale, à une expression améliorée de la résolution latérale par rapport au cas de la microscopie classique [Mul06, Agu08] :

$$\Delta(x, y) \sim \frac{0,46\lambda_0}{ON} \quad (1.17)$$

où ON est l'ouverture numérique effective des objectifs de microscope, et vaut ON_{bal} d'après les notations de la figure 1.18.

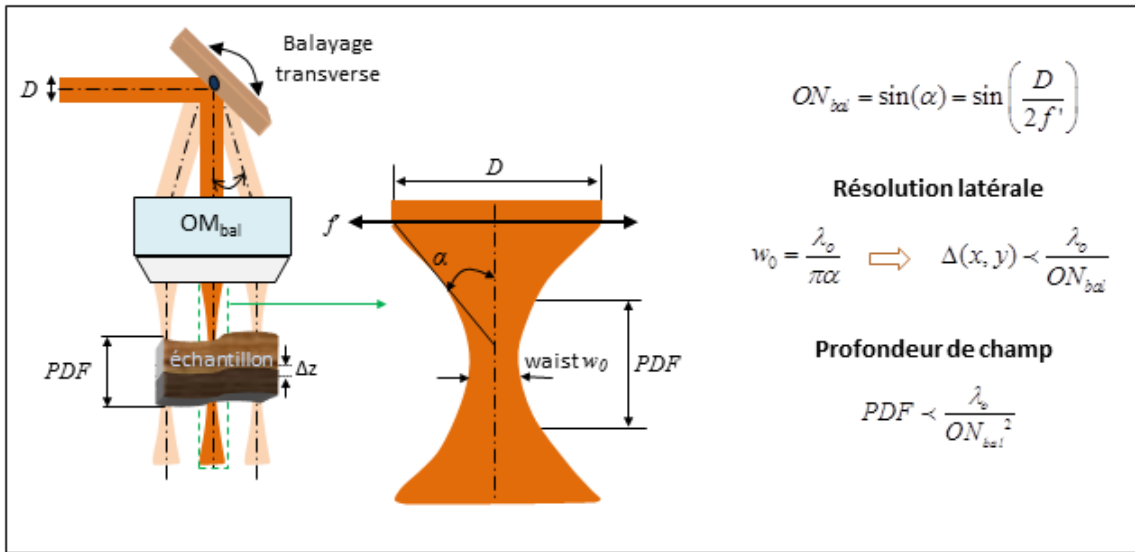


FIGURE 1.18 – Schéma représentant les caractéristiques d'un faisceau lumineux spatialement cohérent combiné à l'utilisation d'un objectif de microscope à balayage (OM_{bal}) tel qu'utilisé en TD-OCT et FD-OCT. La résolution latérale et la profondeur de champ dépendent toutes deux de l'ouverture numérique ON_{bal} . Cette dernière est, ici, reliée au diamètre du faisceau et non à la dimension totale de la pupille d'entrée de l'objectif de microscope à balayage.

Afin de favoriser la profondeur d'imagerie, puisque la mise au point n'est généralement pas ajustée au cours d'une acquisition, il est souhaitable d'accroître la profondeur de champ (notée PFD) équivalente, qui décroît également avec l'ouverture numérique (voir Fig. 1.18). Un compromis doit donc être trouvé selon qu'on choisit de favoriser la profondeur de pénétration ou la résolution latérale. Le premier cas étant généralement retenu, les résolutions latérales en OCT à balayage sont rarement meilleures que $10\mu\text{m}$.

On précise qu'il est possible d'outrepasser ce compromis en ajustant la mise au point dynamiquement au cours de l'acquisition d'une image 3D, ce qui ajoute néanmoins un nouveau balayage. Cela étant rarement implémenté, il est raisonnable de prendre en compte ce compromis s'agissant de l'OCT temporel à balayage. Comme on le verra dans la prochaine sous-section, la présence de ce compromis est par contre fondamentale en OCT fréquentiel, pour lequel toute l'information en profondeur est acquise d'un coup (voir la sous-section 1.4.2 ci-après).

Sensibilité de détection. La sensibilité de détection en OCT est définie comme le plus petit signal de rétrodiffusion détectable. Ce paramètre permet donc de déterminer le plus petit écart en indice de réfraction que l'on peut détecter au sein d'un échantillon.

La détection de nature homodyne utilisée en OCT permet de s'affranchir des bruits instrumentaux et d'atteindre la limite fondamentale du bruit de grenaille (ou *shot noise* en anglais) garantissant ainsi une sensibilité de détection relativement importante avoisinant les -100dB ce qui correspond à un coefficient de réflexion valant 10^{-10} . Pour une source lumineuse d'intensité I_0 et un échantillon dont le coefficient de réflexion vaut R_{ech} , la sensibilité de détection pour un montage de TD-OCT s'exprime de la façon suivante [Iza08] :

$$S = \frac{\rho I_0 R_{ech}}{4eB} \quad , \quad (1.18)$$

où ρ est la sensibilité spectrale du détecteur, e est la charge électronique ($1,6 \cdot 10^{-19} C$) et B la bande passante du système de détection.

Puisqu'un balayage axial est requis en TD-OCT, dont on note v_{ref} la vitesse de translation, le signal de référence est décalé en fréquence, du fait de l'effet Doppler, d'une valeur $f_D = 2\sigma_0 v_{ref} = 2\sigma_0 z_{max}/\Delta t$ en notant z_{max} la profondeur d'imagerie maximale et Δt le temps d'acquisition d'un A-scan complet [Iza08]. La bande passante de détection optimale est alors $B \sim 4\Delta\sigma z_{max}/\Delta t$ et la sensibilité s'écrit donc :

$$S_{TDOCT} = \frac{\rho I_0 R_{ech} \Delta t}{16e \Delta\sigma z_{max}} \quad (1.19)$$

Le principe de l'OCT en domaine temporel et à balayage est donc contraint à un compromis entre la sensibilité de détection, la résolution axiale, *i.e.* $\delta\sigma$, et la profondeur d'imagerie z_{max} , essentiellement dû au fait qu'il requiert un balayage axial de la surface de référence. Le deuxième type de montage développé en OCT, appelé OCT fréquentiel, s'affranchit de ce besoin en détectant le spectre du signal et en restituant l'information spatiale via une transformée de Fourier.

1.4.2 L'OCT en domaine fréquentiel (FD-OCT)

L'OCT fréquentiel, désigné communément par l'acronyme FD-OCT pour *Frequency-domain* OCT en anglais, et proposé par Fercher et al. [Fer95], utilise le fait que l'information en profondeur, réfléchiée par un échantillon, soit également codée selon la pulsation ω du champ électrique, comme le montre l'équation (1.14) puisque la différence de phase $\Delta\phi$ est fonction de z et ω . En enregistrant le profil axial, non plus en fonction de la coordonnée spatiale z , mais en fonction de ω , il est alors possible, après un calcul de transformée de Fourier, de reconstituer l'image de l'échantillon.

Cette technique ne requiert donc pas de déplacement axial de la surface de référence ce qui garantit un gain de temps considérable. De plus, le fait d'acquérir d'un seul coup toute l'information selon l'axe Oz réduit la présence de signaux parasites dus notamment à la lumière dite incohérente. Le rapport signal sur bruit lors de la détection est donc accru ce qui entraîne une sensibilité de détection généralement supérieure à celle des systèmes de TD-OCT. C'est pourquoi, l'OCT fréquentiel est particulièrement bien adapté à l'imagerie d'échantillons *in vivo* contrairement au TD-OCT à balayage.

Deux modalités basées sur ce principe ont été développées et possèdent des performances relativement similaires : l'OCT dans le domaine spectral (ou SD-OCT pour *spectral-domain* OCT) et l'OCT à balayage spectral (ou SS-OCT pour *swept-source* OCT). Après la présentation de ces deux techniques, nous comparerons leurs performances à celles du TD-OCT. On précise qu'une étude plus complète et détaillée du montage de SS-OCT sera entreprise dans l'ultime chapitre de ce manuscrit qui porte sur le développement d'un montage de SS-OCT combiné à une illumination plein champ.

L'OCT dans le domaine spectral (SD-OCT)

L'OCT dans le domaine spectral emploie une source lumineuse de grande largeur spectrale et acquiert le spectre du signal d'interférence à l'aide d'un spectromètre, constitué d'un réseau de diffraction et d'un détecteur linéaire comme illustré en figure 1.19.

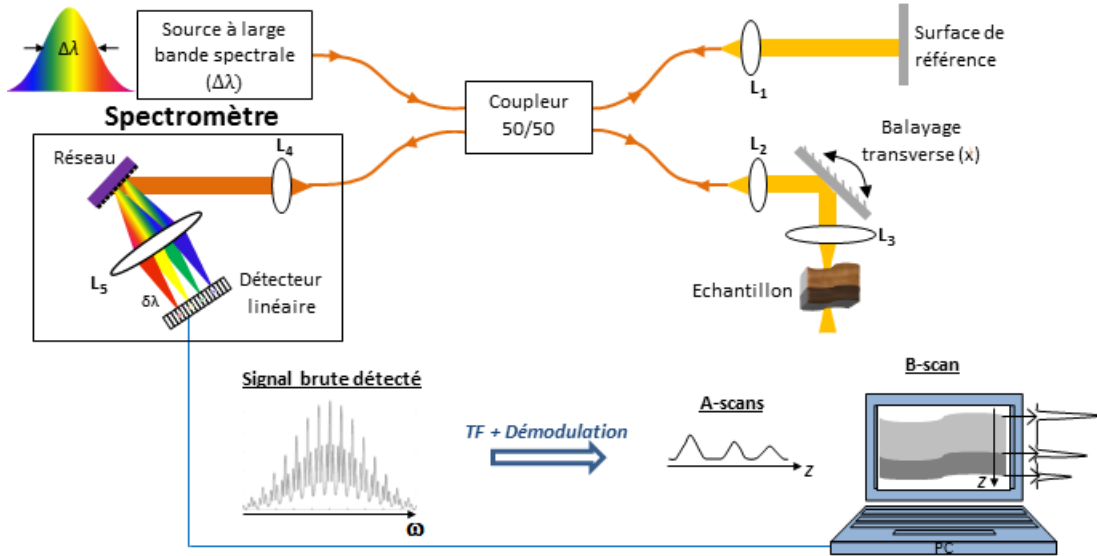


FIGURE 1.19 – Schéma de principe d'un montage de SD-OCT [Mor12]. Une lumière faiblement cohérente temporellement, de largeur spectrale $\Delta\lambda$, est transmise à l'aide de fibres optiques puis collimatée et conjuguée par des lentilles (L_1, L_2, L_3, L_4, L_5). Le signal est décomposé en fonction de sa pulsation ω par un réseau de diffraction puis mesuré par un détecteur linéaire constitué de N_{pix} pixels. Afin de produire une image en 3D, seulement deux balayages transverses (x, y) sont alors nécessaires.

Le signal interférométrique étant modulé par la différence de phase (ω, z) $\rightarrow \Delta\phi(\omega, z)$, pour une pulsation ω_0 donnée la fréquence de modulation du signal dépend de la profondeur z de la structure détectée. Afin de simplifier les notations on utilisera par la suite la norme du vecteur d'onde $k = \omega/c = 2\pi/\lambda$. En développant l'expression de $\Delta\phi$ dans l'équation (1.14), l'intensité mesurée par un pixel du détecteur correspondant à une bande spectrale étroite centrée en k_0 s'écrit de la façon suivante et illustre la dépendance de la modulation avec la profondeur z :

$$I_{\omega_0}(x, y, z) = \frac{I_0}{4} \left(R_{ref}(x, y) + R_{ech}(x, y) + 2\sqrt{R_{ech}(x, y)R_{ref}(x, y)} \cos [2k_0z - \varphi] \right) \quad (1.20)$$

Chaque pixel étant dédié à la détection d'une certaine fréquence k_0 , ou de façon équivalente d'une bande spectrale étroite centrée en k_0 , lorsqu'un détecteur linéaire est utilisé, deux balayages transverses sont nécessaire à l'acquisition d'une image 3D.

L'OCT à balayage spectral (SS-OCT)

Le principe de l'OCT à balayage spectral est très similaire à celui du SD-OCT si ce n'est qu'il emploie une source accordable en fréquence qui émet une lumière quasiment monochromatique de largeur δk , ou $\delta\lambda$, dont la fréquence centrale k_0 varie au cours du balayage. Un monodétecteur, tel qu'une photodiode, est généralement utilisé afin de mesurer l'intensité du signal pour chacune de ces bandes spectrales δk . L'équation (1.20) considérée pour le SD-OCT décrit donc également l'intensité détectée par le monodétecteur ici. Après avoir balayé l'ensemble du spectre de largeur $\Delta\lambda$ le signal est reconstruit par transformée de Fourier, comme illustré en figure 1.20 :

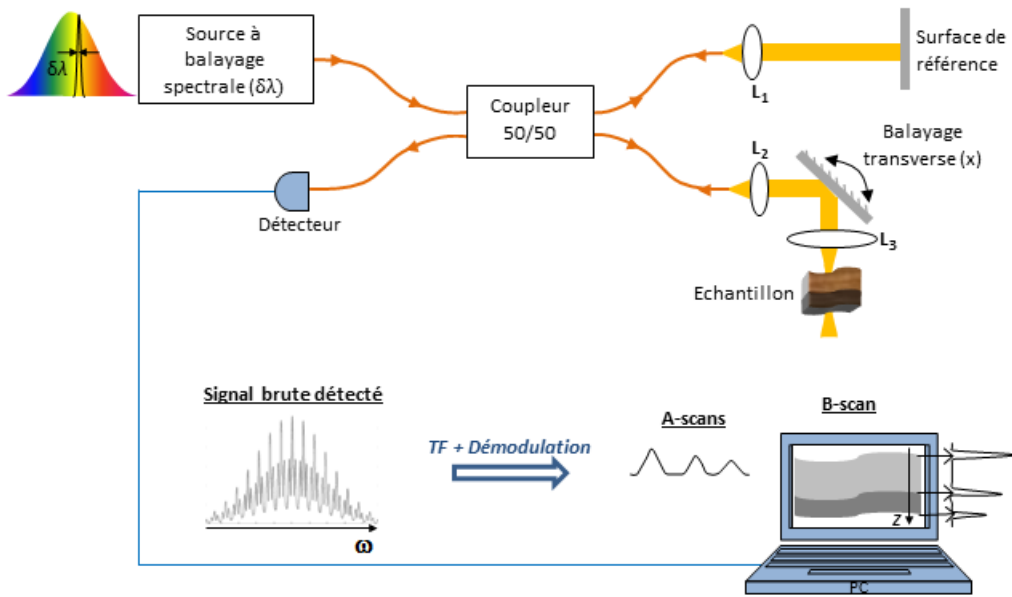


FIGURE 1.20 – Schéma de principe d'un montage de SS-OCT [Mor12]. Une source à balayage spectrale émet une lumière quasiment monochromatique ($\delta\lambda$), injectée dans une fibre puis collimatée et conjuguée par différentes lentilles (L_1 , L_2 , L_3). Le signal est mesuré par un monodétecteur. Afin de produire une image en 3D, seulement deux balayages transverse (x, y) sont alors nécessaires.

Puisque, contrairement au SD-OCT, une caméra linéaire est suffisante pour calculer une image à deux dimensions (ou B-scan), il est possible, avec un faisceau d'illumination approprié, de réduire le nombre de balayage transverse dans l'interféromètre. En utilisant un champ d'illumination plein champ, il est même possible de supprimer les balayages mécaniques présents dans l'interféromètre. Nous étudierons plus en détail cette alternative dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

1.4.3 Comparaison des performances entre un système TD-OCT et FD-OCT

La différence majeure entre les deux modalités réside dans l'expression et la valeur de la sensibilité de détection. Bien qu'il existe un compromis plus fondamental entre profondeur d'imagerie

et résolution latérale en FD-OCT (voir la sous-section 1.4.1), les autres caractéristiques principales comme la résolution axiale et la résolution transverse dépendent des mêmes paramètres.

Comme on l'a vu (voir Eq. (1.19)), en TD-OCT pour une résolution axiale Δz fixée, la sensibilité décroît lorsque la profondeur d'imagerie z_{max} augmente et si cette dernière est imposée alors la sensibilité est inversement proportionnelle à la valeur de Δz . Ce couplage n'existe pas en SD-OCT étant donné que la bande passante de détection est proportionnelle au temps d'acquisition d'un A-scan complet Δt [Cho03]. La sensibilité de détection est donc découplée de la résolution axiale et de z_{max} comme le montre la relation ci-dessous :

$$S_{SDOCT} = \frac{\rho I_0 R_{ech} \Delta t}{4e} \quad (1.21)$$

D'une façon générale, on peut exprimer la sensibilité de détection d'un montage FD-OCT, incluant les deux modalités, en fonction de celle d'un système TD-OCT de la manière suivante [Iza08] :

$$S_{FDOCT} = S_{TDOCT} \frac{M}{2} \quad , \quad (1.22)$$

où M correspond au nombre de pixels N_{pix} du détecteur linéaire d'un système SD-OCT.

Outre le fait que les performances mentionnées soient découplées en FD-OCT, la sensibilité est également supérieure à celle d'un montage de TD-OCT. Cela s'explique, comme on l'a dit, par le fait qu'en FD-OCT toute l'information selon l'axe Oz est intégrée en une seule fois améliorant ainsi le rapport signal à bruit d'un facteur M . La présence du facteur 2, dans l'équation 1.22, s'explique par l'existence d'une information redondante due au calcul de la TF d'une fonction réelle [Iza08]. Ce principe sera détaillé davantage lors du chapitre 5. Nous reviendrons également sur un phénomène limitant la sensibilité de détection des montages d'OCT en domaine fréquentiel : la chute de sensibilité en fonction de la profondeur z d'imagerie.

Malgré tout, les systèmes d'OCT fréquentiel restent plus sensibles et cela justifie en grande partie le développement, notamment industriel, bien plus important de ces deux modalités. Leur vitesse d'exécution très rapide les rend aujourd'hui bien adaptées à l'imagerie *in vivo*, notamment celle liée à l'imagerie oculaire.

On présente en figure 1.21 un diagramme de sensibilité et une image en profondeur d'un échantillon biologique mettant en évidence la supériorité du FD-OCT.

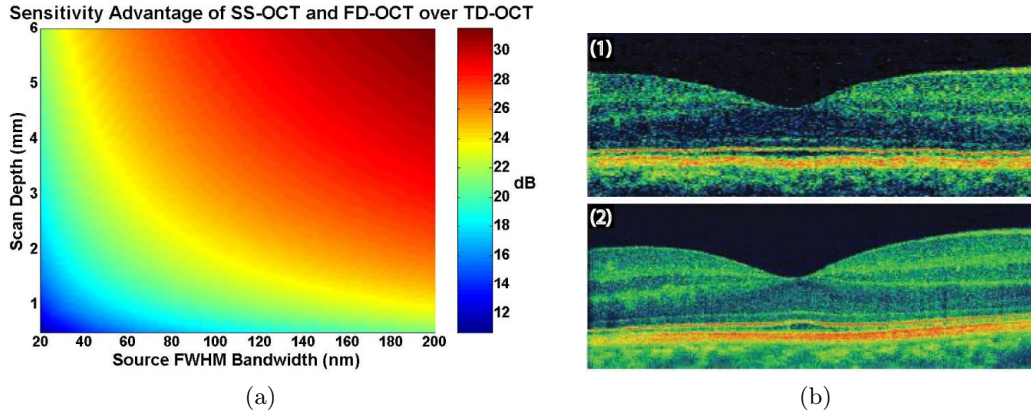


FIGURE 1.21 – (a) : Rapport de sensibilité entre un système TD-OCT et FD-OCT (S_{FD-OCT}/S_{TD-OCT}) en fonction de la largeur de la source (Source FWHM Bandwidth) et de la profondeur d'imagerie (Scan Depth) pour une source à distribution spectrale gaussienne centrée à $\lambda_0 = 1,3\mu\text{m}$ [Cho03]. (b) : images de rétine obtenues avec un dispositif de TD-OCT (1) et de FD-OCT (2) [Lei04]. La sensibilité est visiblement meilleure en FD-OCT. Le temps d'acquisition est également amélioré d'un facteur 100.

1.5 L'OCT plein champ

L'OCT plein champ (ou FF-OCT pour *full-field optical coherence tomography* en anglais) est une technique alternative à l'OCT à balayage, développée au début des années 2000 [Dub02], et qui utilise un détecteur à deux dimensions afin de réaliser l'acquisition d'images parallèles, dites *en-face*, grâce à l'utilisation d'une source faiblement cohérente spatialement. Aucun balayage transverse n'est alors nécessaire pour produire une image en trois dimensions et seule une translation axiale de certains éléments est employée.

Le terme d'OCT plein champ fait communément référence à un montage d'OCT dans le domaine temporel, c'est-à-dire déplaçant la surface de référence, utilisant une illumination plein champ, bien que des techniques d'OCT plein champ en domaine fréquentiel aient été développées également (voir chapitre 5). Comme il est usuel dans la communauté, le terme d'OCT plein champ désignera tout au long de ce manuscrit une technique en domaine temporel, et on s'attachera à préciser la modalité lorsqu'il s'agira d'OCT fréquentiel.

1.5.1 Principe général

Dispositif expérimental

Le dispositif expérimental de la technique d'OCT plein champ conventionnel est basé sur l'utilisation d'un interféromètre de type *Linnik* qui correspond à un interféromètre de *Michelson* dans lequel on vient positionner un objectif de microscope dans chacun des deux bras (voir schéma en figure 1.22 issu de [Dub01a]). D'après le principe du TD-OCT, une translation axiale est utilisée afin de modifier le chemin optique de la lumière et détecter les structures en profondeur de l'échantillon. Pour cela, l'échantillon peut être déplacé [Dub04]. D'autres implémentations plus récentes déplacent conjointement l'objectif et la surface de référence afin de

modifier la différence de marche [Mak12].

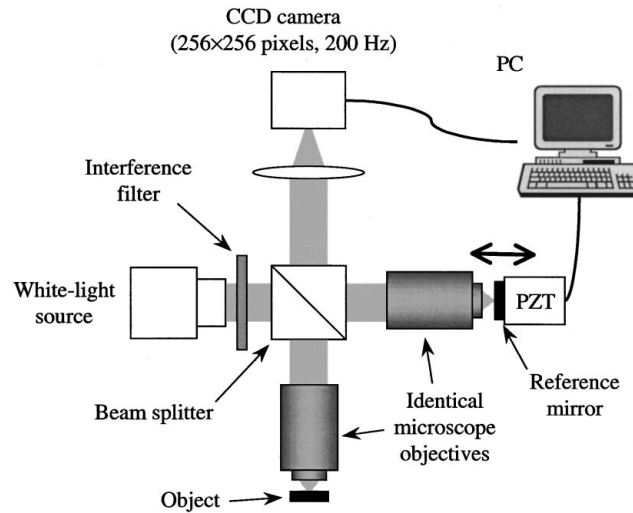


FIGURE 1.22 – Schéma de principe d'un montage d'OCT plein champ. Une source thermique (White-light source) associée à un système d'illumination Köhler émet une lumière à large bande spectrale qui est séparée dans les bras de l'interféromètre de Linnik grâce à un cube séparateur (Beam splitter). Un filtre optique (Interference filter) façonne la distribution spectrale du champ d'illumination. Deux objectifs de microscopes identiques collectent la lumière réfléchie par l'échantillon (Object), translaté mécaniquement (axial translation stage) et la surface de référence (Reference mirror). Cette dernière est fixée à une platine piézoélectrique (PZT) afin d'extraire le signal utile par une méthode à décalage de phase. Les images en-face sont projetées sur un détecteur matriciel.

La technique d'OCT plein champ associe donc les performances des montages OCT à celles de la microscopie classique plein champ produisant des images *en-face* à deux dimensions (coupe parallèle XY) sans qu'aucun balayage transverse ne soit nécessaire. Il se différencie ainsi des systèmes à balayage qui acquièrent une série d'images 2D en coupe transverse XZ (ou B-scan) afin de produire une image en trois dimensions. On montre en figure 1.23 une image d'un têtard de grenouille (*Xenopus Laevis*) réalisée avec un système d'OCT plein champ et présentée selon les trois coupes différentes : XY (ou *en-face*), YZ et XZ (ou B-scans).

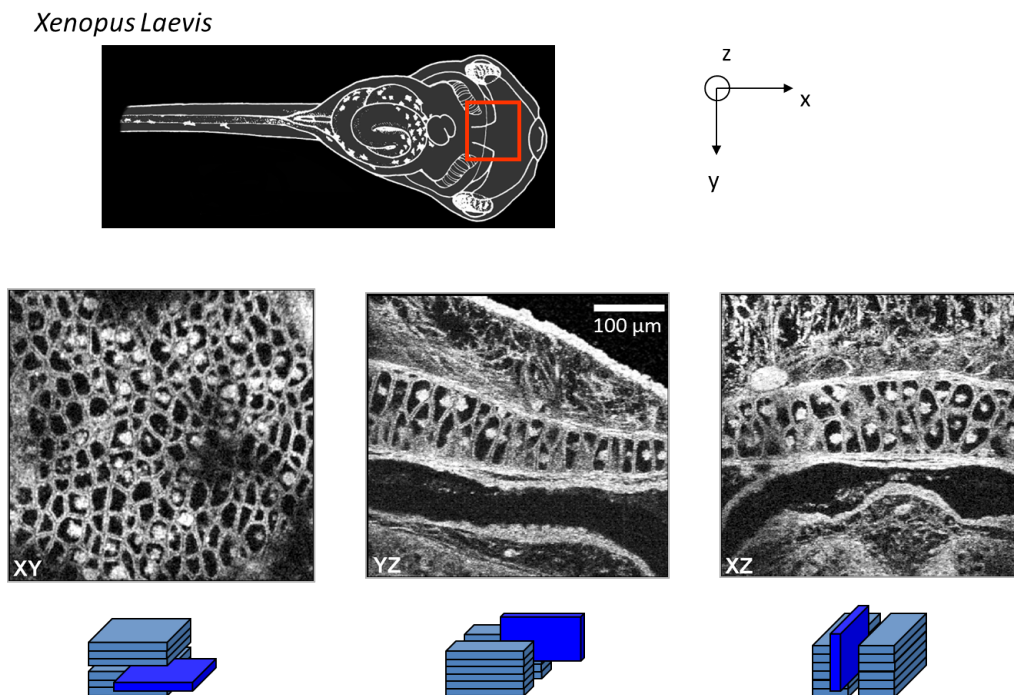


FIGURE 1.23 – Images par OCT plein champ d'un échantillon de têtard de grenouille (*XenopusLaevis*) représentées selon trois plans différents : coupe en XY, appelée aussi en-face, et coupes en YZ et XZ, appelées B-scan ou coupes transverses. Alors qu'en OCT plein champ une pile d'images en-face sont acquises pour reconstruire une image 3D, en OCT à balayage, ce sont des images en coupe transverse qui sont associées, chacune nécessitant un balayage transverse du faisceau.

Comme pour la microscopie classique, la source utilisée est faiblement cohérente spatialement, telle que les diodes électroluminescentes (DEL) [Dub02, Yu04] ou les sources thermiques (lampe halogène, lampe à arcs) [Lau02, Dub06] associées à un système d'illumination de type Köhler afin de garantir un champ d'illumination uniforme dans le plan focal de l'objectif de microscope au niveau de l'échantillon.

Le système d'illumination Köhler

La configuration Köhler, dont un schéma de principe est présenté en figure 1.24, permet d'éclairer de façon très uniforme l'objet étudié. L'emploi d'une source dont l'intensité émise est stable au cours du temps s'ajoute à cette uniformité spatiale de l'éclairage Köhler.

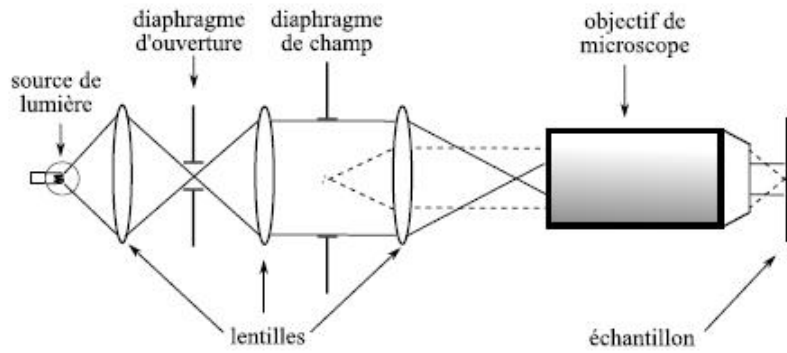


FIGURE 1.24 – Schéma de principe d'un éclairage de type Köhler. [Mon06a]

L'uniformité spatiale de ce type d'éclairage provient du fait qu'on rejette à l'infini l'image du filament dans l'espace objet du microscope (espace contenant l'échantillon). Un diaphragme, appelé diaphragme d'ouverture, dont le plan est conjugué à celui de la source permet de contrôler la cohérence spatiale de la source ainsi que son intensité. Un second diaphragme, dit de champ, conjugué avec le plan focal de l'objectif, *i.e.* le plan d'imagerie dans l'échantillon, influe lui sur la dimension du champ objet. En ajustant le diaphragme de champ à la dimension du champ imagé, on réduit ainsi la lumière parasite provenant des réflexions sur les éléments du montage ainsi que l'influence du fond diffus.

La lumière incidente est ensuite équitablement répartie dans les deux bras de l'interféromètre par l'intermédiaire d'un cube séparateur non polarisant adapté au spectre étendu de la source lumineuse. Les champs réfléchis par l'échantillon et la surface de référence sont ensuite recombinés et projetés sur un détecteur matriciel par une lentille de tube de distance focale judicieusement choisie selon le grandissement des objectifs et la taille des pixels de la caméra. L'expression de l'intensité détectée par chaque pixel de la caméra est donc identique au cas du TD-OCT (Eq. (1.13)), si on néglige l'ouverture numérique des objectifs de microscope. En développant l'expression de la différence de phase $\phi = \frac{4\pi}{\lambda}z$ entre les ondes réfléchies par les deux bras de l'interféromètre, l'intensité en fonction de la position spatiale $r = (x, y)$ d'un pixel s'exprime suivant la relation :

$$I(x, y, z) = \frac{I_0}{4} \int_{-\infty}^{+\infty} S(\lambda) \left(R_{ref}(x, y) + R_{ech}(x, y) + 2\sqrt{R_{ech}(x, y)R_{ref}(x, y)} \cos \left[\frac{4\pi}{\lambda}z - \varphi \right] \right) d\lambda \quad (1.23)$$

Le coefficient de réflexion de la surface de référence peut raisonnablement être supposé indépendant de la position du pixel (x, y) . Ce n'est pas le cas de l'échantillon dont le coefficient de réflexion contient l'information utile à extraire. L'utilisation d'une source à spectre large définissant une zone de cohérence de largeur l_c , appelée fenêtre de cohérence, dans l'échantillon, seule une partie du signal rétrodiffusé par l'échantillon sera considérée comme cohérent et on notera R_{coh} le coefficient de réflexion correspondant. On désignera par R_{inc} le coefficient attaché à la lumière rétrodiffusée par des zones de l'échantillons situées hors de la fenêtre de cohérence qui constitue donc un signal parasite. L'intensité totale détectée peut alors être mise sous la forme approximative suivante, facilitant ainsi la compréhension des enjeux :

$$I(x, y, z) = \frac{I_0}{4} \left(R_{ref} + R_{coh}(x, y) + R_{inc}(x, y) + 2\sqrt{R_{coh}(x, y)R_{ref}} \cos(\phi(x, y) - \varphi) \right) \quad (1.24)$$

La prédominance de la lumière dite incohérente par rapport à l'intensité rétrodiffusée par les structures contenues dans l'étroite fenêtre de cohérence permet de supposer $R_{coh} \ll R_{inc}$ et $R_{coh} \ll R_{ref}$, et d'établir la relation suivante :

$$I(x, y, z) \simeq \frac{I_0}{4} \left(R_{ref} + R_{inc}(x, y) + 2\sqrt{R_{coh}(x, y)R_{ref}} \cos(\phi(x, y) - \varphi) \right) \quad (1.25)$$

Extraction du signal par interférométrie à décalage de phase

L'enjeu consiste donc à extraire l'information utile contenue dans la valeur du coefficient R_{coh} . Pour cela, des méthodes interférométriques, dites à décalage de phase, peuvent être employées. Elles consistent à acquérir plusieurs images interférométriques d'intensité I dont les franges sont décalées entre elles de quelques fractions de l'interfrange. L'image finale est ensuite calculée par une combinaison de ces différentes images. Une technique classique repose sur un déplacement axial pas à pas de la surface de référence dont la position est contrôlée précisément par une platine piézoélectrique (voir Fig. 1.22). Une association de 4 images (voir Eq. (1.26)) décalées successivement d'une phase de $\pi/2$, c'est-à-dire une translation de $\lambda/4$ de la surface de référence, permet d'isoler le terme qui nous intéresse [Yu04]. On note $I_i = \frac{I_0}{4} (R_{ref} + R_{inc} + 2\sqrt{R_{coh}R_{ref}} \cos(\phi - \varphi + \phi_i))$ l'intensité de la i^{me} image déphasée de ϕ_i :

$$R_{coh}(x, y) \propto (I_1(x, y) - I_3(x, y))^2 + (I_2(x, y) - I_4(x, y))^2 \quad , \quad (1.26)$$

avec $\phi_1 = 0$, $\phi_2 = \pi/2$, $\phi_3 = \pi$ et $\phi_4 = 3\pi/2$

Il existe une multitude d'algorithmes utilisant de 2 à 5 images déphasées qui permettent d'extraire, plus ou moins efficacement le signal d'amplitude R_{coh} mesuré en OCT et dans d'autres techniques d'interférométrie en lumière faiblement cohérente [Lar96]. On précise qu'une combinaison judicieuse de ces 4 images donne accès également à la mesure de la phase $\phi(x, y)$ comme on le verra dans le chapitre 5 de ce manuscrit.

Outre un mouvement pas à pas de la surface de référence qui, bien qu'elle attribue une position précise, n'est pas optimale en termes de stabilité, il existe d'autres implémentations

utilisant un modulateur photoélastique [Dub02], une modulation linéaire [Yu04] ou sinusoïdale [Dub01a, Dub04] de la position de la surface de référence dont la continuité du signal assure une stabilité de la réponse de la platine y compris pour des fréquences de modulations importantes. Une oscillation sinusoïdale est la méthode la plus robuste du point de vue de la stabilité et est donc particulièrement pertinente dans le but de réaliser des images à vitesses élevées, adaptées aux échantillons *in vivo*.

L'intensité du signal mesuré est alors fonction d'une fonction sinus d'amplitude ψ et de pulsation ω dépendant du temps t :

$$I(r, z, t) = I_b(r) + A(r) \cos[\phi(r) - \varphi + \psi \sin(\omega t + \theta)] \quad , \quad (1.27)$$

où $I_b(r) = \frac{I_0}{4}(R_{ref} + R_{inc})$ et $A^2(r) = \frac{I_0^2}{4}R_{ref}R_{coh}(r)$.

En imposant une fréquence de modulation 4 fois inférieure à celle de la fréquence d'acquisition du détecteur, il a été démontré théoriquement que la valeur optimale des paramètres ϕ et θ est respectivement 2,45 et 0,96 [Dub01a]. Une extraction efficace du signal utile $A(r)$ peut alors être réalisée en intégrant et combinant 4 images acquises successivement comme suit [Dub01a] :

$$A^2(r) \propto [I_1(r) - I_2(r)]^2 + [I_3(r) - I_4(r)]^2 \quad (1.28)$$

Une analyse détaillée de l'extraction de l'amplitude du signal est donnée en *Annexe A*, pour une combinaison des images équivalentes sur laquelle on reviendra dans le chapitre 2 de ce document. On montre alors que le signal détecté, noté $\Upsilon(r)$, suit la relation suivante (voir Eq. (A.22)) :

$$\Upsilon^2(r) = \left(A(r) \times \frac{2\sqrt{2}T\Gamma}{\pi} \right)^2 = 2(\Gamma/\pi)^2 (I_0T)^2 R_{ref}R_{coh} \quad , \quad (1.29)$$

où Γ et T sont des constantes explicitées dans l'annexe.

Ce signal mesuré $\Upsilon(r)$ est donc bien proportionnel à $A(r)$ et donc au signal rétrodiffusé par une zone correspondant à la fenêtre de cohérence dont la position dans l'échantillon dépend du chemin optique dans le bras référence. Cependant, les objectifs de microscope ayant une ouverture numérique (ON) non nulle, leur profondeur de champ est limitée dans l'espace et on définit alors de façon équivalente, une fenêtre de focalisation centrée au niveau du plan focal arrière des objectifs et de largeur à mi-hauteur égale à leur profondeur de champ. Une condition nécessaire à la détection d'un signal OCT élevé est la superposition de ces deux fenêtres tout au long de l'acquisition.

Ajustement dynamique de la mise au point

L'une des caractéristiques de l'OCT plein champ, et du TD-OCT, est la possibilité d'adapter la position de l'objectif du bras échantillon en fonction de la profondeur du signal détecté. Cela est réalisable puisque l'information selon l'axe Oz n'est pas acquise en une seule fois, comme c'est le cas en FD-OCT. De fait, il est possible de conserver les deux fenêtres de cohérence (de largeur l_c) et de focalisation (de largeur la profondeur de champ des objectifs de microscope)

superposées quelle que soit la profondeur d'imagerie, contrairement au cas du FD-OCT conventionnel pour lequel cette dernière est alors limitée par la profondeur de champ des objectifs. L'absence de compromis entre la profondeur de pénétration et l'ouverture numérique des objectifs favorise largement l'utilisation d'objectifs dont l'ouverture numérique est relativement importante (typiquement $> 0,3$). Des résolutions latérales bien plus élevées qu'avec un système de FD-OCT, généralement contraint à des ouvertures numériques inférieures à 0,1, peuvent ainsi être atteintes.

Afin d'assurer le centrage des deux fenêtres tout au long de l'acquisition, il est nécessaire de modifier la position de la fenêtre de cohérence en déplaçant conjointement l'objectif et la surface de référence [Lab09]. La surface de référence demeurant dans le plan focal de son objectif, il suffit alors de mouvoir l'objectif du bras échantillon de sorte à positionner la fenêtre de focalisation en profondeur dans le tissu. En pratique, on fixe la surface et l'objectif du bras de référence à une même platine motorisée alors que l'objectif de bras échantillon est contrôlé par un moteur qui lui est propre.

Comme illustré en figure 1.25, à partir d'une position initiale des objectifs pour laquelle le plan d'imagerie, c'est-à-dire le plan médian commun au deux fenêtres, est au niveau de la surface de l'échantillon (situation représentée en couleur verte sur la figure), la translation du plan d'imagerie à une profondeur L dans l'échantillon, et donc des fenêtres de cohérence et de focalisation s'accompagne d'un certain déplacement d_r du bras référence et d'un déplacement d_{ech} de l'objectif échantillon (situation représentée en bleu).

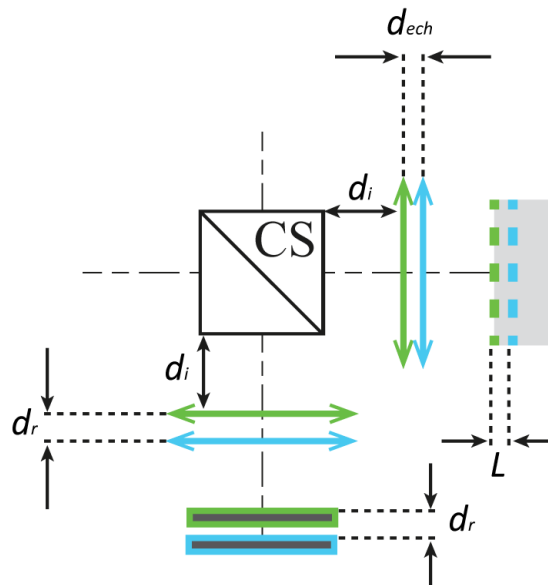


FIGURE 1.25 – Schéma représentant le déplacement des objectifs lors de l'acquisition d'une pile pour deux profondeurs d'imagerie différentes (représentées en bleu et vert respectivement). Le plan d'imagerie, correspondant au centre commun des fenêtres de cohérence et de focalisation est représenté en ligne pointillée. En considérant un milieu d'immersion (entre les objectifs et les objets) on peut calculer le chemin optique de la lumière dans chaque bras. Les objectifs de microscope sont schématisés par de simples lentilles.

Les valeurs de ces deux déplacements motorisées sont déterminées en fonction des indices de réfraction du milieu d'immersion des objectifs, notés n_{im} et de celui de l'échantillon, noté n . Pour cela, on calcule la différence de chemin optique dans le bras échantillon induite par le déplacement de l'objectif échantillon qui garantit le déplacement de la fenêtre de focalisation à une profondeur L . Ce déplacement vaut donc $d_{ech} = Ln_{im}/n$, et le chemin optique $d_{CO,ech}$ dans le bras échantillon, entre l'extrémité du cube et le centre de la fenêtre de focalisation vérifie alors la relation (voir Fig. 1.25) :

$$d_{CO,ech} = d_i + d_{ech} + n_{im}(WD - d_{ech}) + nL \quad , \quad (1.30)$$

où WD est la distance de travail de l'objectif.

Afin de superposer la fenêtre de cohérence à la fenêtre de focalisation, on déplace le bras référence d'une distance d_r de sorte que le chemin optique dans le bras référence $d_{CO,ref}$, entre l'extrémité du cube et la surface de référence, vienne évaluer $d_{CO,ech}$. La détermination de la valeur de d_r correspond donc à la résolution de l'équation suivante :

$$\begin{aligned} d_{CO,ech} &= d_{CO,ref} = d_i + d_r + n_{im}WD & (1.31) \\ \Leftrightarrow d_i + d_{ech} + n_{im}(WD - d_{ech}) + nL &= d_i + d_r + n_{im}WD & \text{d'après Eq. (1.30)} \end{aligned}$$

Puisque $d_{ech} = Ln_{im}/n$, on en déduit que le bras référence doit être translaté d'une distance d_r telle que :

$$d_r = d_{ech} \left(n_{im} - 1 - \frac{n^2}{n_{im}} \right) = \frac{L}{n} (n_{im}^2 - 1 - n^2) \quad (1.32)$$

Cette adaptation dynamique de la mise au point suppose donc connu l'indice de réfraction moyen de l'échantillon. Lorsque celui-ci n'est pas homogène, ou que la bande spectrale considérée est large, on doit donc l'approximer ce qui peut conduire à une imprécision du déplacement et donc une baisse du signal. Cependant, en pratique, cela ne perturbe généralement pas la qualité des images et cette technique est donc bien appropriée.

Configurations alternatives d'OCT plein champ

Il existe typiquement trois dispositifs d'OCT plein champ : la configuration de Linnik, que l'on vient d'étudier, la configuration de Michelson et la configuration de type Mirau du nom de l'objectif interférométrique utilisé. On présente un schéma de principe des trois dispositifs en figure 1.26 :

Configuration de Michelson. Ce dispositif est historiquement le premier montage d'OCT plein champ développé par Beaufreire et al. [Bea98]. Le faisceau incident est divisé par un cube séparateur puis directement dirigé vers la surface de référence et l'échantillon. Il est ensuite recombinaison avant d'être collecté par un objectif de microscope. Un tel système ne requiert donc l'emploi que d'un seul objectif de microscope et possède la propriété d'être relativement compact, minimisant ainsi les instabilités mécaniques.

Le positionnement du cube séparateur entre l'objectif et les objets requiert néanmoins l'emploi d'un objectif dont la distance de travail est relativement élevée, ce qui est en général accompagné d'une ouverture numérique faible et donc d'une résolution latérale réduite. Une faible ouverture numérique permet également de restreindre l'effet des aberrations géométriques potentiellement élevé en raison de la présence du cube de verre entre le plan focal de l'objectif et sa pupille d'entrée.

Configuration de type Mirau. A l'instar de la configuration de Michelson, ce montage n'utilise qu'un seul objectif de microscope, mais avec un bras de référence replié dans l'axe de l'objectif (voir Fig. 1.26). En effet, l'objectif employé, dit de Mirau, est constitué d'un miroir et d'une lame séparatrice inclus dans sa monture, qui se substituent à la surface de référence et au cube séparateur d'un interféromètre à deux bras classique. Un positionnement judicieux des deux éléments permet donc, en positionnant l'échantillon au niveau du plan focal de l'objectif, de reconstituer un interféromètre de Michelson.

Cependant ce montage de type Mirau, de par la finesse de la lame séparatrice, permet l'utilisation d'un objectif d'ouverture numérique plus importante, compte tenu des aberrations optique notamment, favorisant ainsi la résolution latérale du système d'imagerie. L'obstruction par la surface de référence d'une partie du champ rétrodiffusé n'affecte, en général, que faiblement la transmission des plus courtes fréquences spatiales et ne dégradent donc pas la qualité des images. L'utilisation d'un unique objectif, comme pour la configuration de Michelson, et d'une lame séparatrice peu épaisse sont par ailleurs un atout en ce qui concerne le phénomène de dispersion, dont les différences sont réduites puisque les trajectoires des deux ondes sont alors très semblables. Cependant, cela n'est vrai que lorsqu'on image la surface d'un échantillon. Les différences de dispersion qui apparaissent à mesure que la profondeur d'imagerie augmente ne peuvent être compensées efficacement quand immergeant le système dans un milieu d'indice adapté [Bea98].

Il est à noter que, contrairement aux deux autres configurations, une partie de la lumière incidente transmise par le cube séparateur est perdue ce qui ne favorise pas la fréquence d'acquisition du système.

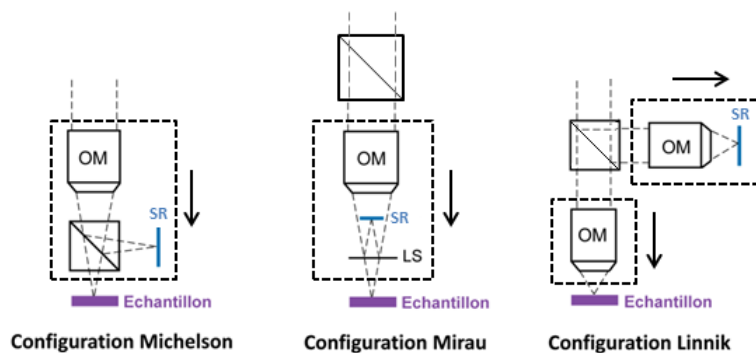


FIGURE 1.26 – Schéma de principe des trois configurations d'OCT plein champ (modifié depuis [Sac10]). Seule la configuration de Linnik permet un ajustement dynamique de la mise au point favorisant ainsi l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique. SR : surface de référence, LS : lame séparatrice, OM : objectif de microscope.

Un des défauts majeurs de ces deux types de configurations, de Michelson et de Mirau, est la difficulté d'ajuster dynamiquement la mise au point lors de l'acquisition d'une image 3D. Cela entraîne donc la présence d'un compromis entre profondeur de pénétration et résolution latérale qui sont toutes deux inversement proportionnelles à l'ouverture numérique ou à son carré.

1.5.2 Performances

Résolution axiale. Tout comme les autres techniques d'OCT, la résolution axiale Δz est étroitement liée à la longueur de cohérence temporelle de la source, l_c , et peut être formulée ainsi pour une distribution spectrale gaussienne :

$$\Delta z = \frac{l_c}{2} = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{1}{\Delta \sigma} \sim \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda}, \quad \text{avec} \quad \sigma = \frac{1}{\lambda} \quad (1.33)$$

Comme on l'étudiera par la suite, notamment lors du chapitre 3, l'expression approximative, généralement considérée, suppose non seulement une ouverture numérique des objectifs négligeables mais également une largeur spectrale de détection, $\Delta \lambda = \lambda_{max} - \lambda_{min}$, suffisamment faible pour admettre que $\lambda_{min} \lambda_{max} = \lambda_0^2$. Or, tout particulièrement en OCT plein champ, la largeur de la source est potentiellement très importante tout comme l'ouverture numérique des objectifs, qui peut conduire à un sectionnement angulaire à prendre en compte si la profondeur de champ correspondante est suffisamment faible par rapport à la longueur de cohérence temporelle l_c de la source. La formulation de la résolution axiale devra donc être judicieusement adaptée aux propriétés du montage utilisé.

Résolution latérale. La mise en place d'une illumination plein champ différencie l'OCT plein champ de l'OCT à balayage, et la résolution latérale, $\Delta(x, y)$ est donc similaire à celle de la microscopie plein champ conventionnelle. Cependant, contrairement à la microscopie classique pour laquelle la résolution latérale est donnée par la formule de Rayleigh :

$$\Delta_R(x, y) \sim \frac{1,22 \lambda_0}{2ON} = \frac{0,61 \lambda_0}{ON} \quad , \quad (1.34)$$

le caractère homodyne de la détection conduit, comme dans le cas de la microscopie confocale, à l'amélioration d'un facteur $\sqrt{2}$ de la résolution latérale qui s'exprime donc ainsi :

$$\Delta(x, y) \sim \frac{0,43 \lambda_0}{ON} \quad (1.35)$$

Pour des ouvertures numériques typiques de 0,3 ou 0,5, la résolution latérale est alors de l'ordre de $1 \mu\text{m}$ ce qui est 5 ou 10 fois supérieure à celle obtenue en FD-OCT conventionnel. Cela confirme donc la plus grande faculté de l'OCT plein champ à obtenir une résolution latérale élevée par rapport au FD-OCT due à l'implémentation d'un système de focalisation dynamique.

Lorsque des ouvertures numériques supérieures à 0,3 ou 0,5, on parle alors aussi de microscopie par cohérence optique plein champ, ou OCM plein champ, souvent désignée par l'acronyme FF-OCM. Dans ce manuscrit, on continuera d'utiliser le terme "OCT plein champ" quelle que soit l'ouverture numérique.

Sensibilité de détection. La sensibilité de détection est un paramètre majeur puisqu'elle détermine le contraste du signal dans les milieux peu diffusants ou bien la profondeur de pénétration lorsqu'il s'agit de milieux fortement diffusants comme c'est le cas de la majorité des échantillons biologiques. Afin de l'évaluer, on calcule le rapport signal sur bruit (RSB) du système d'imagerie, puis on définit un coefficient de réflexion R_{min} correspondant à un RSB égal à 1 et qui représente ainsi le coefficient de réflexion minimal détectable par le système.

Bruits de détection des détecteurs optroniques

Il existe typiquement trois types de bruits présents lors de la détection d'un signal par un détecteur optronique : le bruit de grenaille, le bruit thermique et le bruit électronique.

Bruit de grenaille (ou bruit de Shottky). Ce bruit est lié à la nature quantique de la lumière et dû au fait que le débit des photons incidents sur sa surface sensible n'est pas régulier. En effet, pour une source de lumière classique, comme une lampe halogène par exemple, les photons sont émis de manière aléatoire en suivant une statistique qui est décrite par la loi de Poisson. Cette loi ayant pour propriété d'induire une variance, de la variable aléatoire qu'est le nombre de photons, égale à sa valeur moyenne, on en conclut que l'amplitude des fluctuations du nombre de photons, c'est à dire son écart-type σ_{ph} est égal à la racine carrée du nombre moyen de photons émis noté N . La variance du bruit de grenaille σ_{ph}^2 s'exprime donc ainsi :

$$\sigma_{ph}^2 = N = 2eI\Delta f, \quad \text{avec} \quad \Delta f = 1/2\Delta t, \quad (1.36)$$

où I est le courant de détection moyen considéré sur une durée Δt et e la charge électronique.

Bruit thermique (ou bruit de Johnson). L'agitation thermique des électrons au sein d'une résistance électrique en équilibre thermique génère un bruit dont la variance, notée σ_j^2 proportionnelle à la température T de la résistance de charge R_c du détecteur et indépendant de la tension appliquée pour une valeur de résistance donnée :

$$\sigma_j^2 = \frac{4k_b T \Delta f}{R_c}, \quad (1.37)$$

où k_b est la constante de Boltzmann et Δf la bande passante de détection.

Bruit électronique. Ce bruit propre à l'électronique de détection provient d'un ensemble d'étapes comme celle de la préamplification du signal, ou de la conversion des photoélectrons en une tension électrique (bruit de lecture) ou encore lors de la numérisation du signal. Il contient également le bruit de basse fréquence du détecteur qui varie en $1/f$. On évalue sa variance aux bornes de la résistance de charge R_c du détecteur σ_e et on introduit un facteur F induit par ces bruits :

$$\sigma_e^2 = \frac{4k_b T (F - 1) \Delta f}{R_c} \quad (1.38)$$

Les sources de bruit étant décorréélées les unes des autres, la variance du bruit global σ_{br} est la somme des variances des bruits correspondants :

$$\sigma_{br}^2 = \sigma_{ph}^2 + \sigma_j^2 + \sigma_e^2 \quad (1.39)$$

Puisqu'en OCT le signal brut détecté par la caméra est tel que les pixels sont en limite de saturation, le bruit électronique est faible par rapport au bruit de grenaille qui est alors le bruit prédominant. On peut ainsi considérer que le système de d'imagerie est limité par le bruit de grenaille et donc que la variance de bruit, notée σ_{br}^2 , s'identifie à la profondeur des puits d'électrons ξ_{sat} (voir l'équation (1.39)). En supposant un bruit additif, chacune des 4 images interférométriques détectées $I_{i \in \{1,4\}}$ est entachée de ce bruit et le signal $\Upsilon = A^2(r)$ vérifie donc la relation (voir Eq. (1.28)) :

$$\begin{aligned} \Upsilon(r) &\propto [(I_1(r) + \nu_1) - (I_2(r) + \nu_2)]^2 \\ &\quad + [(I_3(r) + \nu_3) - (I_4(r) + \nu_4)]^2 \\ \text{tel que } \forall (p, q) \in \{1, 4\}^2 &\quad \begin{cases} \langle \nu_p \rangle_t = 0 \\ \langle \nu_p^2 \rangle_t = \sigma_{br}^2 \\ \langle \nu_p \nu_{q \neq p} \rangle_t = 0 \end{cases} \end{aligned} \quad (1.40)$$

La variance du bruit du signal tomographique, B , peut alors se calculer en supposant que les quatre intensités $I_{i \in \{1,4\}}$ sont identiques ce qui correspond à l'absence d'interférences constructives. En supposant que le bruit de grenaille prédomine, on en déduit que :

$$B = 4\sigma_{br}^2 = 4\xi_{sat} \quad (1.41)$$

L'évaluation du signal utile mesuré est, lui, donné par l'équation (1.29). En supposant que le signal issu de la fenêtre de cohérence, proportionnel à R_{coh} est faible devant le signal continu proportionnel à $R_{ref} + R_{inc}$, on en déduit que $\xi_{sat} = I_0 T (R_{ref} + R_{inc}) / 16$ où T est le temps d'intégration du détecteur. Le signal Υ s'écrit alors :

$$\Upsilon = 512(\Gamma/\pi)^2 \xi_{sat}^2 \frac{R_{ref}}{(R_{ref} + R_{inc})^2} R_{coh} \quad (1.42)$$

Il est usuel en OCT plein champ d'accumuler plusieurs images interférométriques I_i dans le but d'améliorer le RSB. En effet, la variance du bruit étant proportionnelle au nombre de photoélectrons détectés, l'accumulation de N images interférométriques multiplie cette variance par N , tout comme la valeur du signal utile Υ . Le RSB, en puissance, étant proportionnel à Υ/σ_{br}^2 , cela augmente d'un facteur N la valeur de ce dernier.

On définit la sensibilité de détection S comme le coefficient de réflexion R_{coh} équivalent à une valeur du RSB unitaire. Ainsi la sensibilité de détection correspond au coefficient de réflexion minimal identifiable par le système. Le calcul du RSB conduit donc à une sensibilité de détection S vérifiant l'équation suivante :

$$S = \left(\frac{\pi}{8\sqrt{2}\Gamma} \right)^2 \frac{(R_{ref} + R_{inc})^2}{N\xi_{sat}R_{ref}} \quad (1.43)$$

Outre le nombre d'accumulation N , la sensibilité est inversement proportionnelle à la profondeur des puits d'électrons ξ_{sat} qui détermine en grande partie la dynamique du détecteur. En effet, cette valeur définira le nombre de photons nécessaires à la saturation du signal et donc, l'intensité du signal maximal détectable. Le niveau du bruit de détection définira lui le signal minimal qui peut être détecté.

La dynamique du détecteur est tout particulièrement importante en OCT plein champ, puisque la majorité de la lumière directement détectée correspond à un signal parasite rétro-diffusé par des zones de l'échantillon hors de la fenêtre de cohérence tandis que le signal utile provient lui de cette étroite fenêtre. L'enjeu consiste donc à extraire un signal utile faible à partir d'un signal essentiellement stérile bien plus important. Il faut donc être sensible à un signal faible et dans le même temps s'assurer que la lumière parasite ne sature pas trop rapidement le niveau des pixels de la caméra : le rapport entre les deux signaux, c'est à dire la dynamique de détection, doit donc être importante. La méthode de détection homodyne utilisée est particulièrement bien adaptée à ce type de problématique ce qui garantit à l'OCT plein champ une sensibilité de détection relativement importante.

On note également que cette sensibilité dépend du coefficient de réflexion de la surface de référence R_{ref} . En dérivant l'équation (1.43), on montre que la valeur optimale est $R_{ref} = 2R_{inc}$. Il faut donc choisir judicieusement la surface de référence utilisée en fonction du signal de fond rétrodiffusé par l'échantillon étudié. Ce signal correspond en général à un coefficient R_{inc} entre 1% et 10% pour les échantillons biologiques. Une surface de référence dont le coefficient de réflexion, en tenant compte du milieu d'immersion des objectifs, est proche de 2 voire 4% est en pratique satisfaisant. On s'attache également à réduire au minimum les réflexions parasites de sorte à réduire la part de lumière incohérente. Cela est réalisé en choisissant des optiques antireflets, ou on orientant légèrement le cube séparateur afin de diriger les réflexions spéculaires hors du champ de détection.

On présente en figure 1.27, un graphe issu de [Sac10], comparant une mesure de sensibilité à son calcul théorique supposant un signal limité par le bruit de grenaille, et cela pour deux détecteurs dont les valeurs de ξ_{sat} diffèrent.

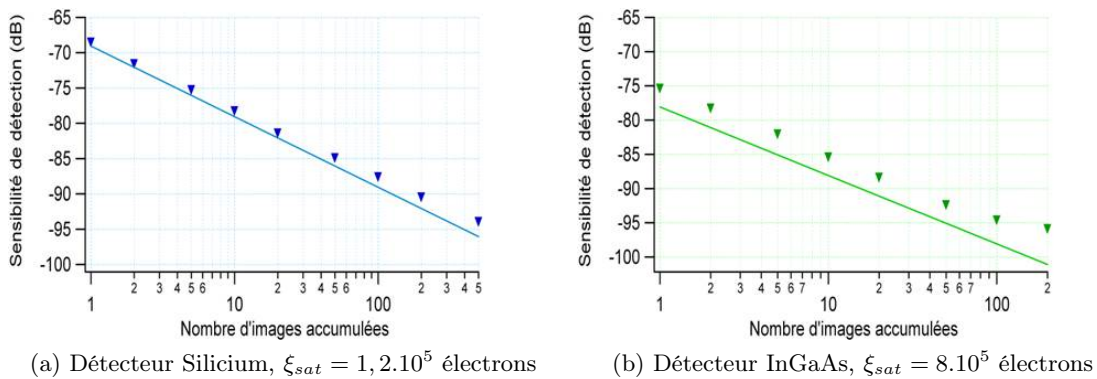


FIGURE 1.27 – Evolution de la sensibilité de détection en fonction du nombre d'images accumulées N , mesurée expérimentalement (points expérimentaux) et évaluée théoriquement dans le cas d'un bruit limité par le bruit de grenaille (traits pleins), pour deux détecteurs différents. La profondeur des puits d'électrons, ξ_{sat} , du détecteur InGaAs assure une sensibilité supérieure même si ce type de détecteur est généralement sujet à introduire un bruit électronique perturbant.

En considérant une représentation en échelle logarithmique de la sensibilité de détection, une évolution linéaire en fonction du nombre d'images accumulées N est en accord avec la supposition d'un signal en limite de bruit de grenaille pour lequel la sensibilité est proportionnelle à N^{-1} . Bien que pour des valeurs de N assez faibles, les courbes théoriques et expérimentales évoluent de façon similaire, on remarque toutefois que pour des temps d'acquisitions relativement longs, un bruit supplémentaire apparaît, probablement dû à des dérives thermiques ou mécaniques du système.

On constate donc qu'avec quelques dizaines d'images accumulées, la sensibilité de détection d'un système d'OCT plein champ peut atteindre une valeur comprise entre -80dB et -90dB. Même si cette dernière peut être accrue en augmentant N , cela réduit notablement la vitesse d'exécution du système et un compromis est donc à établir afin de satisfaire au mieux les attentes en termes de performance.

1.5.3 Avantages et inconvénients de l'OCT plein champ

Bien que des sensibilités de détection similaires puissent être obtenues en OCT plein champ par rapport au FD-OCT, la nécessité d'un nombre important d'images accumulées réduit considérablement la vitesse d'acquisition d'une image *en-face* et donc de l'image 3D. Cela est principalement dû au fait que, d'un point de vue technologique, les détecteurs matriciels, utilisés en OCT plein champ, possèdent en général une capacité de charge des puits d'électrons ou une vitesse d'acquisition moins importantes que les monodétecteurs ou les détecteurs linéaires.

Une fréquence de fonctionnement réduite du détecteur associée aux sources utilisées en OCT plein champ (lampe halogène, DEL), émettant un flux lumineux faible par rapport aux sources cohérentes spatialement des systèmes à balayage (SLD, Laser femtoseconde), allongent alors notablement le temps d'acquisition d'une image. A cela s'ajoute une capacité des puits d'électrons très inférieure à celle des monodétecteurs et des détecteurs linéaires, qui dégrade la sensibilité et impose donc un nombre d'accumulations plus élevé pour atteindre des valeurs similaires, au détriment de la vitesse donc.

La différence de sensibilité existe en fait principalement avec les systèmes FD-OCT, puisque le compromis présent entre résolution axiale et temps d'exposition en TD-OCT entraîne des performances, de vitesse et de sensibilité, similaires avec l'OCT plein champ. D'autre part, le principe fondamental du FD-OCT qui consiste à acquérir l'information selon l'axe Oz d'un coup permet de réduire l'influence du flux de lumière dit incohérente, qui représente à signal parasite à considérer en TD-OCT et OCT plein champ.

Même si l'acquisition d'images parallèles, ne nécessitant pas de balayage transverse, confère à l'OCT plein champ un fort potentiel de vitesse, jusqu'à présent, les instruments technologiques sont plutôt en faveur du FD-OCT qui est pour l'heure mieux adapté à la réalisation d'images d'échantillons *in vivo*. Le développement de sources spatialement incohérentes très intenses [Red11] et les progrès à venir en ce qui concerne les détecteurs matriciels représentent néanmoins des perspectives d'évolution prometteuses pour l'OCT plein champ.

Les atouts majeurs de l'OCT plein champ résident dans sa faculté d'atteindre des résolutions axiales et latérales submicrométriques. Cela n'est pas le cas en FD-OCT conventionnel puisque l'ouverture numérique limite la profondeur d'imagerie et les résolutions latérales sont généra-

lement 5 à 10 fois inférieures à celles de l'OCT plein champ. De plus, la possibilité d'utiliser des sources thermiques garantit un spectre d'émission très étendu favorisant ainsi des résolutions axiales importantes. Enfin, le coût réduit de la source de lumière et la réduction du nombre de balayage sont des paramètres significatifs, dans l'objectif d'un développement industriel par exemple.

1.5.4 Applications principales de l'OCT plein champ

L'OCT plein champ peut être appliqué aussi bien à l'embryologie (voir image d'un échantillon de têtard de grenouille en figure 1.23) qu'à l'imagerie de tissus tels que des échantillons mammaires (Fig. 1.29a) ou de colon humain (Fig. 1.29b), pour lesquels sa sensibilité de détection et surtout son importante résolution spatiale permettent d'obtenir des performances très similaires à celles de l'imagerie histologique, mais réalisée de façon non invasive et bien plus rapidement. L'imagerie de la cornée ou de la rétine à haute résolution peut également apporter des informations supplémentaires intéressantes.

On présente des images d'échantillons oculaires acquises avec un système d'OCT plein champ qu'on compare avec celles obtenues par imagerie histologique. Elles confirment les performances de l'OCT plein champ et valident sa capacité à constituer une alternative efficace et non invasive (voir figure 1.28). On précise que la plupart des images présentées sont issues des études menées par l'entreprise LLTech, créée en 2007, qui commercialise un système d'OCT plein champ depuis quelques années.

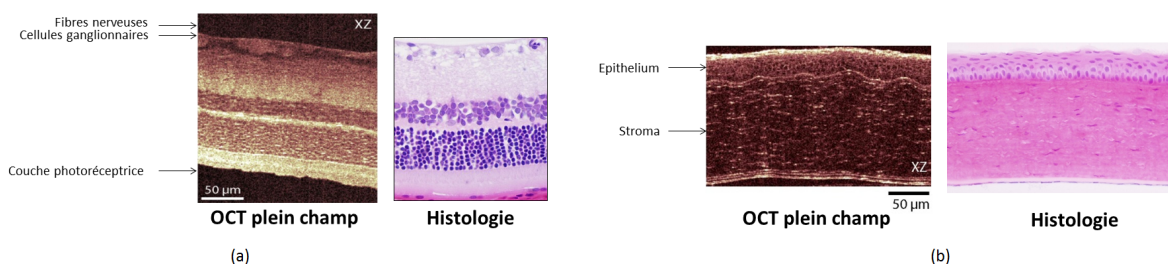
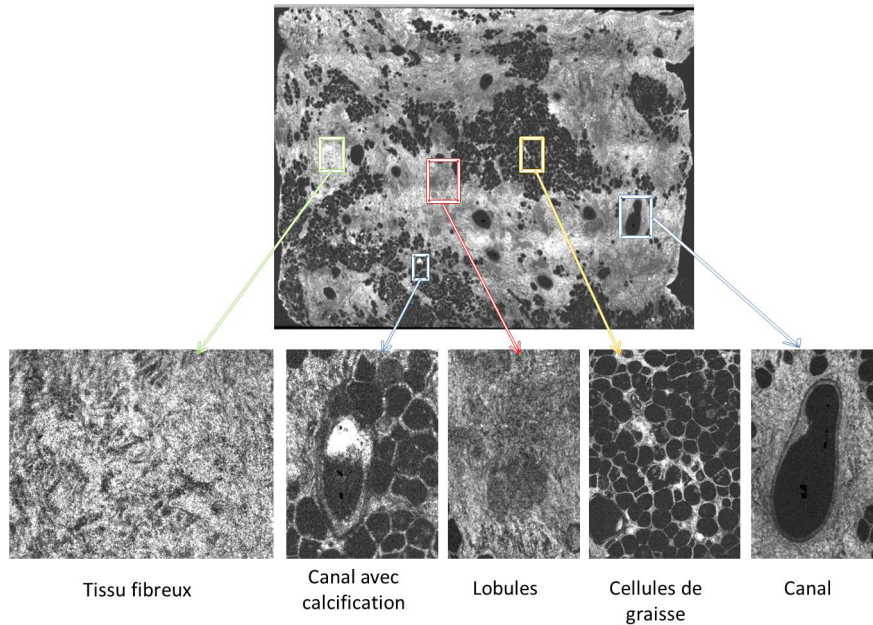
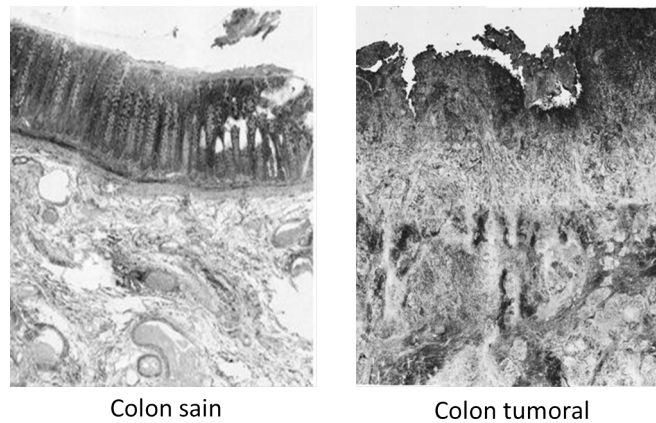


FIGURE 1.28 – Comparaison d'images, présentées en coupe transverse (ou B-scan), d'échantillons oculaires, *ex vivo*, obtenues par OCT plein champ et par imagerie histologique. (a) : images d'un échantillon de rétine de rat. (b) : images d'un échantillon de cornée. Issues de [Gri04].

La réalisation d'images tomographiques permet donc de mettre en évidence les couches successives réparties en profondeur dans des échantillons comme la rétine ou la cornée, la résolution axiale élevée de l'OCT garantissant la différenciation de couches très proches les unes des autres. La faculté de l'OCT plein champ d'atteindre, en plus de la résolution axiale, une résolution latérale élevée permet de détecter des structures et détails fins, particulièrement mis en valeur dans des images *en-face* (voir Fig. 1.29a), comme l'illustrent les images de tissus humains ci-dessous :



(a)



(b)

FIGURE 1.29 – (a) : images en-face d'un échantillon mammaire humain *ex vivo*. (b) : images d'échantillons, *ex vivo*, de colon humain sain et tumoral. Crédit : LLTech inc.

Comme le montre les images en coupe transverse d'un échantillon de colon (Fig. 1.29b), l'imagerie par OCT plein champ est capable de rendre compte précisément de la présence de zones tumorales dans les tissus.

Bien que l'information morphologique du signal OCT soit bien adaptée à l'étude des tissus biologiques, l'ajout d'un nouveau type de contraste dans les images peut exalter l'information et permettre la caractérisation de nouveaux éléments.

1.5.5 Exemples de systèmes d'OCT plein champ couplés à d'autres techniques de microscopie

Cette sous-section vise à introduire, simplement, des exemples de systèmes d'imagerie combinant l'OCT plein champ à une autre technique de microscopie ce qui permet d'associer les avantages des deux modalités ou de les renforcer selon le caractère complémentaire des deux techniques.

Microscopie de fluorescence par illumination structurée. L'information structurelle fournie par l'OCT plein champ ajoutée au signal spécifique de la microscopie de fluorescence qui utilise des marqueurs permettant de localiser précisément la présence d'ADN par exemple, associe deux types contrastes complémentaires offrant une caractérisation plus complète de l'échantillon. Afin de coupler efficacement les deux techniques, un montage d'illumination structurée a été également implémenté [Mak12] afin de sectionner axialement le signal de fluorescence :

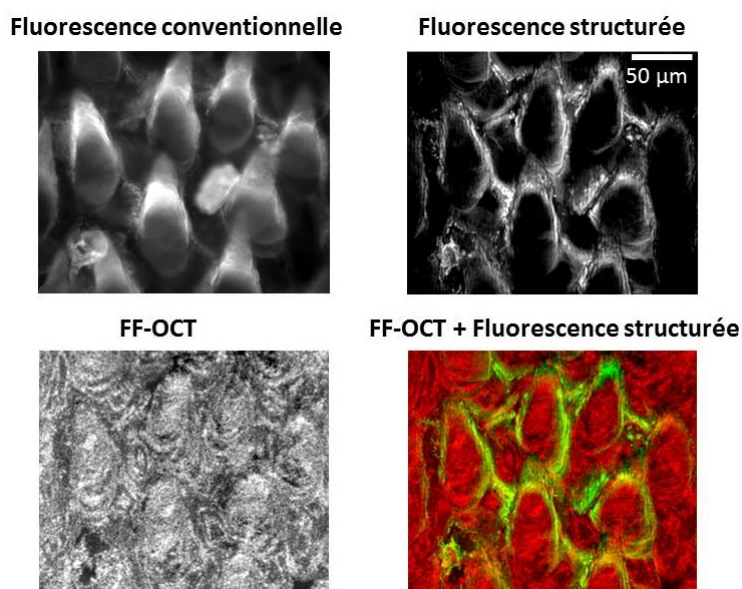


FIGURE 1.30 – Différentes images, d'un échantillon de langue de souris, acquises par des techniques différentes et combinées pour former l'image en fausse couleur (FF-OCT+Fluorescence structurée). Sur celle-ci, le signal de fluorescence localisé identifie la présence noyau alors que le signal d'OCT plein champ fournit une information morphologique de l'échantillon. Issues de [Mak12].

Mesure de biréfringence. La mesure des propriétés de polarisation d'un échantillon biréfringent apporte un contraste supplémentaire à l'image réalisée en OCT plein champ conventionnel qui ne détecte que l'amplitude. En insérant judicieusement des lames à retard de phase dans l'interféromètre [Mon07] des images à contraste augmenté sont ainsi réalisées :

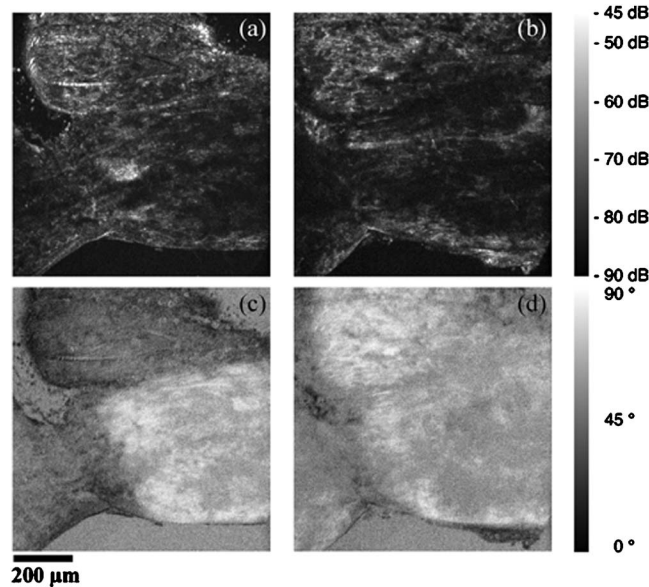


FIGURE 1.31 – Images d’un muscle de queue de crevette utilisant un système d’OCT plein champ sensible au contraste de polarisation. (a),(b) : images d’intensité en-face à $30\mu\text{m}$ et $100\mu\text{m}$ de profondeur, respectivement. (c),(d) : images correspondantes en contraste de polarisation. Les couples (a),(c) et (b),(d) illustrent les deux différents types de contrastes. Issues de [Mon07].

1.6 Conclusion

La mise au point d’un système d’imagerie optique, non invasif et capable de réaliser des images tridimensionnelles d’échantillons biologiques, est confrontée à l’extinction du signal rétrodiffusé à mesure que l’on pénètre en profondeur, celle-ci étant généralement dominée par la diffusion de la lumière dans les tissus. Ce phénomène, en plus de réduire l’intensité du signal, génère un fond lumineux provenant de l’ensemble des photons multidiffusés dans l’échantillon et qui dégrade fortement le rapport signal sur bruit.

Afin de s’affranchir de ce signal parasite, un dispositif de sectionnement axial est souvent utilisé, qu’il soit géométrique (microscopie confocale), basé sur la cohérence temporelle de la lumière (OCT) ou sur les propriétés non linéaires du champ électromagnétique (microscopies SHG et THG) ou bien reposant sur le couplage entre les ondes optiques et acoustiques (imagerie acousto-optique et photo-acoustique). Une longueur d’onde de la lumière adaptée combinée à un système de détection efficace garantira une sensibilité de détection importante et donc une profondeur de pénétration accrue. La plupart de ces techniques, n’utilisant pas de marquage spécifique et donc particulièrement bien adaptées à l’imagerie d’échantillons *in vivo*, lorsque leur vitesse d’exécution le permet, proposent le plus souvent une description structurale de l’échantillon dont la morphologie et l’organisation des différents composants sont mis à jour. Chacun de ces systèmes étant caractérisé par des performances de résolution spatiale et de profondeur de pénétration dépendant de principes différents, ces performances sont assez disparates puisque la résolution spatiale peut atteindre des valeurs de l’ordre de la longueur d’onde (microscopie confocale, microscopie non linéaire) ou seulement de plusieurs dizaines de micromètres (imagerie acousto-optique et photo-acoustique) alors que la profondeur de pénétration est comprise

entre quelques centaines de micromètres (microscopie confocale, non linéaire et OCT) et plusieurs centaines de millimètres (imagerie acousto-optique et photo-acoustique). On résume les performances de ces principales techniques de microscopie 3D non invasive avec le diagramme suivant :

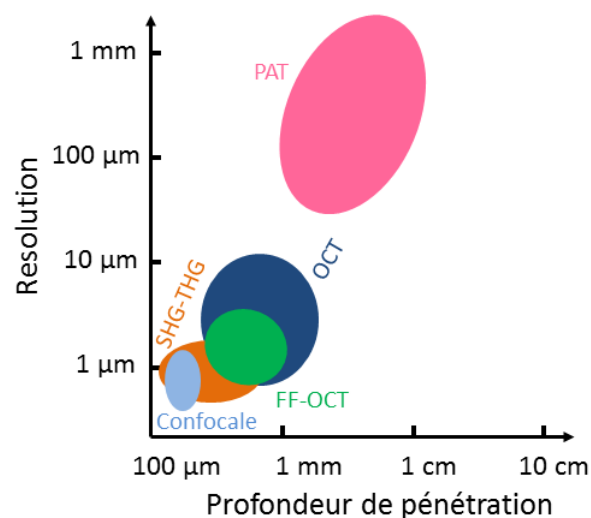


FIGURE 1.32 – Diagramme schématisant les performances de quelques techniques de microscopie optique non invasives adaptées à l'imagerie en profondeur : la microscopie confocale, la microscopie non linéaire par génération de second harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG), la tomographie photo-acoustique (PAT), l'OCT et l'OCT plein champ (FF-OCT).

Ce diagramme met donc en évidence le caractère intermédiaire de l'OCT, qui propose des performances entre la microscopie conventionnelle et l'imagerie basée sur l'utilisation d'ultrasons comme l'échographie traditionnelle par exemple. Ces capacités de vitesse et de pénétration en font aujourd'hui un outil très répandu pour l'imagerie tomographique des tissus vivants.

Bien que ces performances en termes de pénétration soit légèrement en deçà de celles de l'OCT fréquentiel, l'OCT plein champ se distingue par sa résolution spatiale très importante, presque similaire à la microscopie confocale et non linéaire. Sa méthode d'acquisition d'images *en-face* lui confère également un potentiel de vitesse important qu'il reste encore à exploiter pleinement. Ainsi qu'on l'a montré dans les figures 1.23, 1.28, 1.29a et 1.29b, l'OCT plein champ permet de produire une information morphologique adaptée aussi bien à l'embryologie, l'ophtalmologie, la cancérologie. Cela constitue donc un champ d'applications vaste et pertinent qui justifie le développement de systèmes d'OCT plein champ afin de satisfaire au mieux les besoins des professionnels de santé et des biologistes.

Chapitre 2

L'OCT plein champ multispectral

“Attraper un chat noir dans l’obscurité de la nuit
est la chose la plus difficile qui soit,
surtout s’il n’y a pas de chat.”

attribuée à Confucius

Sommaire

2.1	Introduction	50
2.2	Montage expérimental	51
2.2.1	Source de lumière	51
2.2.2	Détecteur	52
2.2.3	Développement optique	54
2.2.4	Optimisation de la vitesse d’acquisition par décalage de phase à modulation sinusoïdale	57
2.3	Compensation dynamique de la dispersion	59
2.3.1	Calcul de la différence de chemin optique induite par la rotation d’une lame compensatrice de dispersion	60
2.3.2	Choix des propriétés propres aux lames compensatrices de dispersion	62
2.3.3	Mise en application de la correction des différences de dispersion	65
2.4	Performances	66
2.4.1	Résolution axiale	66
2.4.2	Résolution latérale	68
2.4.3	Sensibilité	69
2.4.4	Ajustements pré et post-acquisition pour la superposition des images	71
2.5	Applications de l’imagerie multispectrale	73
2.5.1	Amélioration du contraste des images	73
2.5.2	Différenciation d’échantillons	75
2.6	Conclusion	77

L'étude spectroscopique d'un échantillon consiste généralement à illuminer celui-ci avec une source à spectre étendu, puis de détecter la lumière transmise ou réfléchiée, en la décomposant selon la longueur d'onde. Certains éléments, tels que les molécules, possèdent une réponse spectrale propre qui dépend des modes de vibrations générés par l'excitation électromagnétique de l'onde lumineuse. Ces derniers étant liés à la composition et à l'organisation spatiale de la molécule, en mesurant les propriétés spectrales de transmittance ou de réflectivité d'un échantillon, on extrait des informations physico-chimiques et structurales.

Ce type de procédé est très répandu et utilisé dans des domaines divers comme la biophotonique, pour la caractérisation chimique d'échantillons biologiques [Xie02], l'imagerie hyperspectrale environnementale ou océanographique [Dav02], ou encore l'optique atomique [Sri07].

2.1 Introduction

Le contraste des images en OCT plein champ conventionnel provient des différences d'indices de réfraction, *i.e.* des coefficients de réflexion, au sein de l'échantillon et fournit donc une information morphologique, ou structurale. Comme on l'a vu, différentes expériences ont été menées afin de combiner l'OCT plein champ avec des techniques d'imagerie dans le but d'ajouter un nouveau type de contraste et de révéler certaines caractéristiques de l'échantillon : mise en évidence de l'ADN [Mak12], mesure des propriétés de biréfringence [Mon07].

L'association de l'OCT et de la spectroscopie peut également apparaître comme une méthode d'amélioration du contraste des images permettant de distinguer la présence de structures dans l'échantillon qui possède une réponse spectrale particulière [Mor00]. Plusieurs expériences d'OCT plein champ ont été réalisées afin d'étudier la réponse spectrale d'échantillons biologiques pour mettre en évidence les différences de pénétration de la lumière selon sa longueur d'onde [Sac08, Yu04], ou bien de détecter la présence de structures spécifiques au sein d'un échantillon [Dub08]. Bien qu'adapté aux mesures spectroscopiques, le calcul par transformée de Fourier du spectre du signal détecté, comme effectué dans [Dub08], est très contraignant en termes de vitesse d'exécution et de stabilité du montage. Un montage d'OCT plein champ à haute résolution spatiale, détectant simultanément deux bandes spectrales différentes, a également été développé [Sac08]. Cependant, la nécessité d'utiliser une caméra pour chaque bande considérée accroît le coût et l'encombrement du système, limitant dans le même temps la possibilité d'augmenter le nombre de bandes utilisées. Une expérience d'OCT plein champ dans trois bandes n'utilisant qu'une seule caméra a été réalisée en utilisant trois sources DEL différentes [Yu04]. Néanmoins le spectre global des trois sources ne s'étend que sur la partie visible du spectre et les performances atteintes dans chaque bande, en termes de résolution spatiale et de sensibilité, sont en deçà des valeurs usuelles de l'OCT plein champ.

On propose alors un système d'OCT plein champ, utilisant une lampe halogène et un détecteur basé sur une technologie InGaAs étendue dans le visible, capable de produire des images dans trois bandes spectrales différentes s'étendant sur une plage spectrale allant de 530nm à 1700nm. Un montage achromatique, utilisant des objectifs de microscope à miroirs, est développé afin d'atteindre une résolution axiale $\sim 1,9\mu\text{m}$ dans chacune des trois bandes. Afin de garantir des performances similaires à celles de l'OCT plein champ conventionnel, un système de compensation dynamique de la dispersion est également implémenté et préserve ainsi la résolution axiale et l'intensité du signal en profondeur. Des exemples d'images d'échantillons

diffusants, représentées en fausses couleurs RVB, sont réalisées afin d'illustrer les capacités du système à accroître le contraste des images.

2.2 Montage expérimental

Le dispositif expérimental est proche de celui de l'OCT plein champ conventionnel. Cependant la plage spectrale totale considérée (530nm - 1700nm), ainsi que la largeur de chacune des bandes spectrales ($\sim 200\text{nm}$), nécessitent d'adapter le montage d'OCT plein champ classique afin d'atteindre des performances satisfaisantes dans chacune des trois bandes.

2.2.1 Source de lumière

On utilise comme source de lumière une lampe à incandescence halogène, dont les propriétés d'émission sont proches de celles d'un corps noir. La théorie du corps noir détermine la loi d'émissivité d'un objet idéal qui absorberait toute l'énergie électromagnétique incidente. L'intensité rayonnée par un corps noir dépend alors uniquement de sa température T d'après la loi de Planck :

$$\frac{dL_\lambda}{d\lambda} = \frac{2hc^2}{\lambda^5} \times \frac{1}{e^{\frac{hc}{k_B T \lambda}} - 1}, \quad (2.1)$$

où h et k_b sont les constantes de Planck et de Boltzmann respectivement et c la célérité de la lumière dans le vide.

La lampe à filament de tungstène utilisée ne satisfaisant pas parfaitement au modèle théorique du corps noir (on parle alors de corps gris), on définit une température équivalente corps noir T_c correspondant à la température d'un corps noir qui aurait la même luminance spectrique que la lampe sur un intervalle spectral donné. On suppose alors que l'émission de cette dernière suit la loi de Planck (Eq. (2.1)) pour une température T_c . Dans le cas du filament de tungstène, qui est chauffé à une température T avoisinant les 3300K, la température équivalente corps noir T_c est approximée à 3400K. On suppose ainsi que le spectre d'émission de la lampe halogène est semblable à celle d'un corps noir dont l'allure de la luminance spectrique est présentée pour différentes températures T_c en figure 2.1.

La luminance spectrique est alors maximale autour de $\lambda = 850\text{nm}$ pour une température $T_c=3400\text{K}$. En estimant une incertitude de 100K sur la valeur T_c , compte tenu des tolérances du constructeur et des variations d'efficacité de la lampe halogène, on observe que la luminance spectrique reste semblable pour une telle plage de température (voir Fig. 2.1) et on peut montrer qu'une incertitude de 100K sur T_c n'a que peu d'influence sur la forme de l'interférogramme.

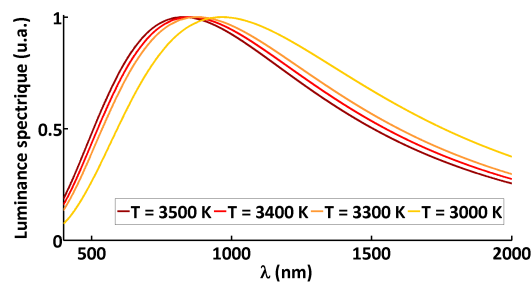


FIGURE 2.1 – Spectre d'émission d'un corps noir à plusieurs températures. Une incertitude de $\sim 100\text{K}$ sur la température du corps noir n'a que peu d'effet sur sa luminance spectrique.

L'emploi d'une lampe halogène comme source de lumière permet donc d'accéder à une distribution spectrale très étendue, du domaine visible au proche infrarouge, et dont l'allure douce et dépourvue de pics favorise l'absence de rebonds incongrus dans le signal de l'enveloppe de l'interférogramme. Ce type de lampe constitue également une source d'une grande stabilité temporelle, ce qui est essentiel en OCT, puisque des différences d'images successives sont réalisées afin d'obtenir l'image finale. En cas d'instabilité de l'intensité lumineuse incidente, la soustraction de deux images successives ferait apparaître des artefacts rédhibitoires.

2.2.2 Détecteur

En utilisant la source décrite dans la sous-section précédente, et en supposant que l'ensemble des composants optiques du montage transmette parfaitement la lumière sur l'intervalle de longueurs d'onde [400nm ; 2000nm], on convient que l'élément limitant l'intervalle spectral d'étude est généralement le détecteur. Ce dernier doit donc être adapté au domaine spectral qui nous intéresse à savoir, l'intervalle [530nm ; 1700nm]. Outre sa sensibilité spectrale, d'autres caractéristiques telles que la dynamique et la fréquence d'acquisition sont essentielles afin d'atteindre les performances attendues.

On choisit donc une caméra constituée d'une matrice de photodiodes PIN InGaAs étendue dans le domaine visible. Elle repose sur un capteur CMOS qui fonctionne jusqu'à une fréquence d'acquisition de 346Hz. Cette caméra *OWL SW 1.7 CLHS*, manufacturée par l'entreprise *Raptor Photonics*, contient 320×256 pixels carrés de $30\mu\text{m}$ de largeur et possède une profondeur de puits de 170 000 électrons ce qui est relativement classique en OCT plein champ. Outre sa vitesse de lecture importante, l'intérêt majeur de cette camera OWL réside dans sa très large zone de sensibilité spectrale qui s'étend de 400nm à 1800nm grâce à une technologie VisSWIR mise au point par *Alcatel-Thales III-V lab* [Rev11].

Technologie VisSWIR

La technologie VisSWIR [Mar05, Rev11] est une extension de la technologie SWIR (pour *Short Wave InfraRed* en anglais) permettant d'accéder à une réponse spectrale étendue dans le visible et non plus uniquement réduite au proche infrarouge. Comme on peut le voir sur la figure 2.2, la réponse spectrale de la caméra s'étend de 400nm à 1800nm et l'efficacité quantique de conversion est supérieure à 50% de 650nm à 1700nm, ce qui nous permet donc de disposer d'un spectre s'étendant du visible au proche infrarouge.

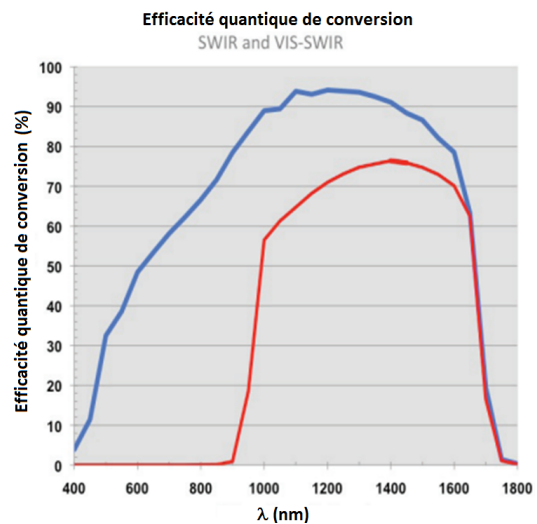


FIGURE 2.2 – Efficacité quantique (nombre d'électrons/nombre de photons) d'un détecteur en technologie SWIR (courbe rouge) et VisSWIR (courbe bleue).

La structure classique des photodiodes PIN InGaAs consiste en une couche d'indium phosphide (InP) dopée p , sous laquelle se trouve une zone intrinsèque d'absorption composée d'InGaAs (pour Indium Gallium Arsenide), puis d'une couche d'InP dopée n . Dans le cas d'un détecteur 2D, comme c'est le cas ici, il est nécessaire d'éclairer la photodiode par l'arrière (voir figure 2.3) afin de pouvoir lire le signal avec un détecteur de type CMOS et de connecter électriquement chacun des pixels, contrairement au cas 1D, pour lequel on peut se permettre d'éclairer par le dessus. Alors que l'épaisseur de la couche d'InP supérieure est de l'ordre du micromètre, celle de la couche du dessous est généralement d'une centaine de micromètres. L'efficacité quantique de conversion est ainsi meilleure pour des longueurs d'onde inférieures à 1100nm si on éclaire par devant. Néanmoins, celle-ci reste très inférieure à 50% pour $\lambda = 800nm$.

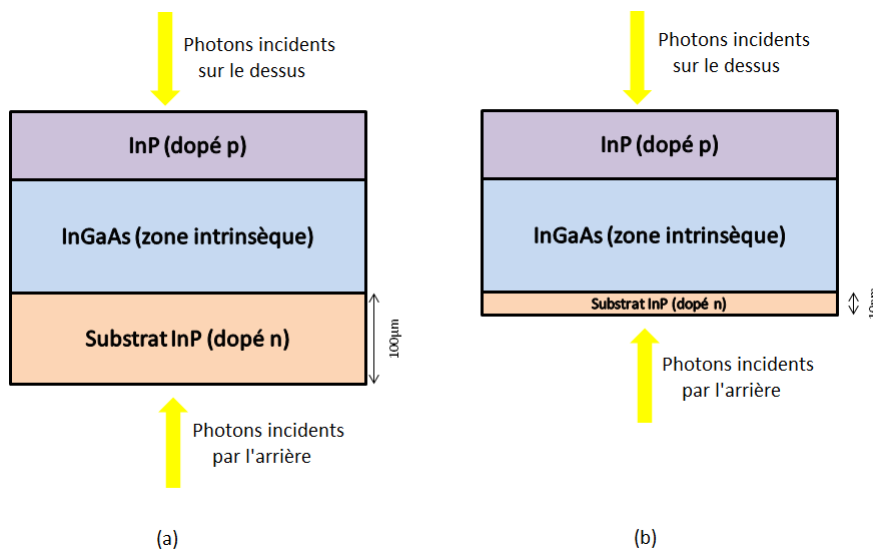


FIGURE 2.3 – Structure en couches d'une photodiode PIN InGaAs en technologie SWIR (a) et VisSWIR (b). La couche de substrat d'InP a été réduite afin que la zone intrinsèque détecte les photons appartenant au spectre visible.

Lorsqu'on éclaire par l'arrière, l'énergie de gap de l'InP étant de 1,35eV, ce qui correspond à une longueur d'onde de coupure de 920nm, la lumière est fortement absorbée dans cette zone avant même d'atteindre la zone intrinsèque d'absorption d'InGaAs. L'InGaAs, quant à lui, possède une énergie de bande de 0,75eV et donc une longueur d'onde de coupure de 1700nm, ce qui signifie que sa réponse est correcte dans le visible. C'est donc uniquement la couche d'InP dopée n qui contraint l'efficacité quantique de conversion de la photodiode à s'annuler lorsqu'on atteint le visible. En réduisant alors l'épaisseur de la couche de substrat InP, la lumière visible est moins absorbée par cette dernière et peut être détectée via la couche d'InGaAs.

Les articles [Rev11] et [Mar05] décrivent le processus par lequel on intercale une couche d'InGaAs, appelée "etch stop", dans le substrat afin d'effectuer une coupe régulière (voir figure 2.4). De façon mécanique puis chimique, on vient retirer les deux dernières couches en laissant une bande très fine d'InP de quelques nanomètres d'épaisseur, suffisamment épaisse néanmoins pour passiver le détecteur et assurer une zone de connexion électrique commune.

L'absorption de la couche résiduelle d'InP ainsi que les défauts des traitements antireflet qui sont présents étant donné la largeur du spectre en jeu, sont les dernières causes qui limitent l'efficacité quantique de conversion.

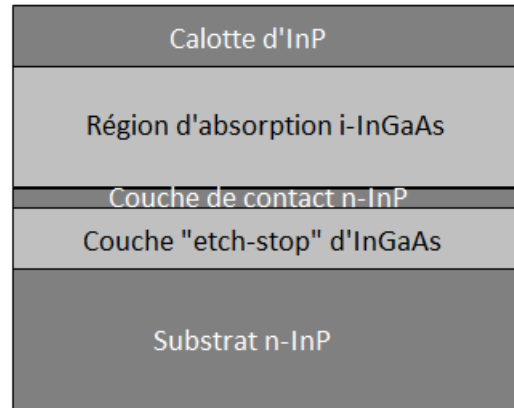


FIGURE 2.4 – *Processus de découpe de la couche de substrat afin d'élargir la réponse spectrale du détecteur. Modifiée depuis [Mar05].*

La technologie du détecteur utilisé nous offre une plage spectrale d'étude très étendue, dans laquelle on viendra sélectionner trois différentes bandes spectrales. De plus, cette plage de longueurs d'onde est relativement bien adaptée à l'imagerie des tissus biologiques, puisqu'elle contient la fenêtre thérapeutique et permet d'accéder à des zones du spectre pour lesquelles la diffusion est réduite et où se situent des minima d'absorption de l'eau (voir la sous-section 1.2) ($\lambda \sim 1,3\mu\text{m}$ ou $\lambda \sim 1,6\mu\text{m}$ notamment).

Un tel intervalle spectral requiert cependant le développement d'un système de microscopie optique adapté afin de garantir des performances convenables dans les trois bandes spectrales considérées.

2.2.3 Développement optique

Objectifs de microscope à miroirs. Etant donné les propriétés d'absorption de la lumière par l'eau (voir Fig. 1.7), il n'est pas concevable d'employer des objectifs de microscope à immersion, puisqu'au-delà d'une longueur d'onde de $1,4\mu\text{m}$, seule une faible partie de la lumière serait transmise. De plus, les objectifs de microscope à réfraction disponibles sur le marché sont pour la plupart destinés à une utilisation dans une bande spectrale relativement étroite ($< 400\text{ nm}$) et généralement dans le domaine visible. L'arrangement des différentes lentilles qui constituent ces objectifs et leur traitement antireflet ne sont donc pas optimisés pour travailler sur une si large bande spectrale. Cela engendrerait donc des aberrations importantes, ainsi qu'une transmissivité réduite pour une ou deux bandes spectrales.

Il convient donc de les substituer par des objectifs de microscope dit "à réflexion" ou "à miroirs" dont l'agencement, dit de Schwarzschild, de type Cassegrain renversé (voir Fig. 2.5), garantit une qualité d'image proche de la limite de diffraction sur tout le spectre considéré et des aberrations chromatiques réduites à zéro du fait de l'utilisation de miroirs. Une couche d'or étant déposée sur les deux miroirs, la réflectivité de ces objectifs est supérieure à 95% sur l'ensemble de la plage spectrale utilisée (530nm - 1700nm), ce qui minimise les pertes et favorise donc la vitesse d'acquisition des images.

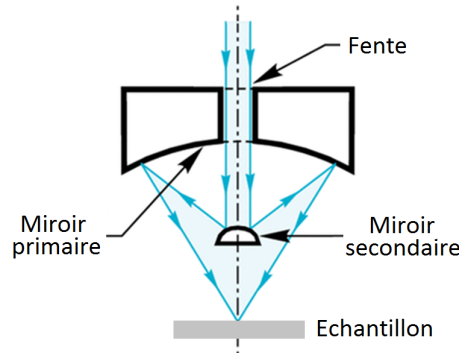


FIGURE 2.5 – Schéma d'un objectif de microscope à miroirs en configuration Schwarzschild. Le miroir primaire concave est percé de sorte que le faisceau puisse être réfléchi par le miroir secondaire qui est, quant à lui, convexe. Modifiée depuis www.newportfranklin.com.

L'ouverture numérique de ce type d'objectif est généralement limitée à 0,5 du fait de la présence d'aberrations géométriques conséquentes au-delà de cette valeur. De même, la dimension du miroir secondaire qui obstrue une partie de la lumière réfléchi par l'échantillon est susceptible de dégrader la qualité des images, en affectant principalement le contraste lié aux faibles et moyennes fréquences spatiales [Nad12, Gre51]. Un agencement judicieux des miroirs et un choix pertinent de leur rayon de courbure doivent être opérés afin de garantir un système dépourvu d'aberrations géométriques du troisième ordre. Il est considéré qu'une obstruction maximale de 20 % peut être tolérée pour garantir des performances satisfaisantes. Afin d'atteindre des ouvertures numériques supérieures, les dispositifs réfractifs restent alors préférables [Nad12].

Mise en place d'un système d'imagerie achromatique. Deux roues à filtres sont insérées dans le système d'illumination de Köhler, afin d'associer plusieurs filtres optiques et de sélectionner une bande spectrale. Compte tenu de la largeur de chacune des trois bandes spectrales, afin de maintenir les performances du système y compris lorsqu'on pénètre en profondeur dans l'échantillon, il est important de corriger les différences de dispersion entre les deux bras de l'interféromètre. Comme on l'a vu lors du chapitre précédent, une méthode consiste à disposer une lame de verre, à faces planes et parallèles, fixe dans un des bras [Dub06], pour corriger une différence donnée de dispersion.

Cependant cela ne permet pas d'adapter la correction à mesure que l'on pénètre dans l'échantillon, lorsque la différence de dispersion, elle, évolue. On met alors en place un système dynamique de compensation de la différence de dispersion afin de réduire au maximum cette dernière, y compris au cours de la pénétration dans l'échantillon. On dispose pour cela deux lames de verre, à faces planes et parallèles identiques, une dans chaque bras, orientées initialement d'un angle θ_0 par rapport à l'axe optique du montage (voir Fig. 2.6). Alors que la lame du bras échantillon reste fixe durant l'acquisition, celle du bras référence est pivotée d'un angle $\delta\theta$ afin d'accroître le chemin optique dans le bras référence, puisque l'épaisseur de verre augmente, et dans le même temps de modifier la dispersion de la lumière. L'augmentation du chemin optique déplace la position de la fenêtre de cohérence dans l'échantillon, entraînant une augmentation de la dispersion dans le bras échantillon, qu'on vient contrebalancer par la rotation de la lame du bras référence.

Nous reviendrons plus en détail sur ce dispositif de compensation dynamique de la dispersion dans la prochaine section.

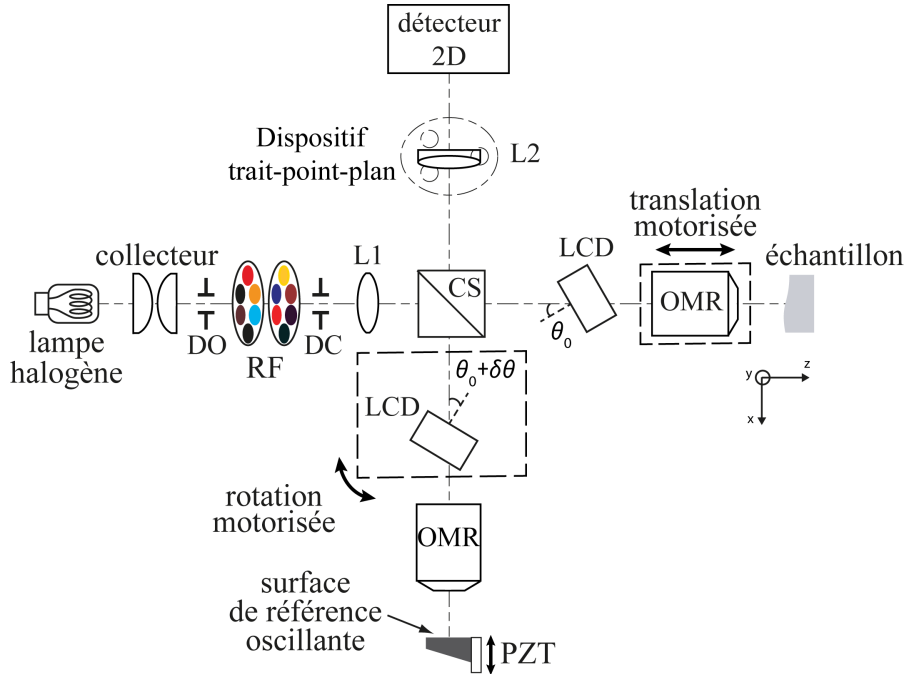


FIGURE 2.6 – Schéma du montage. *DO* : diaphragme d'ouverture, *DC* : diaphragme de champ, *CS* : cube séparateur, *LCD* : lame compensatrice de dispersion, *OMR* : objectif de microscope à réflexion, *PZT* : platine piézoélectrique, *L1* : lentille, *L2* : lentilles de tube (doublets), *RF* : roues à filtres.

L'autre élément optique essentiel à la formation de l'image est la lentille de tube, qui consiste dans notre cas en un doublet achromatique pour une certaine bande spectrale. Les doublets utilisés ne sont optimisés que pour un certain intervalle de longueurs d'onde qui ne couvre pas l'ensemble de notre spectre. Il est donc nécessaire de modifier la lentille de tube selon la bande spectrale considérée. Etant donné les caractéristiques des trois bandes, on utilise la même lentille de tube, optimisée entre 650nm et 1050nm, pour la bande 1 et la bande 2, alors que pour la bande 3 on remplace la lentille de tube par un doublet optimisé entre 1050nm et 1620nm. La substitution des lentilles de tube entre deux acquisitions doit être très précise, de sorte que le champ imagé soit identique quelle que soit la lentille de tube utilisée. On utilise par conséquent une base trait-point-plan comme support des lentilles de tubes. Ce dispositif trait-point-plan constituant un système mécanique isostatique, le remplacement des lentilles de tube est réalisé rapidement avec une très bonne répétabilité.

L'association d'objectifs de microscope à réflexion et d'un dispositif de lentilles de tube modulables rend donc le système d'imagerie achromatique, puisqu'il est optimisé et adapté à chaque bande spectrale utilisée.

2.2.4 Optimisation de la vitesse d'acquisition par décalage de phase à modulation sinusoïdale

Les paramètres principaux qui régulent la vitesse d'exécution sont l'intensité de la source lumineuse, la fréquence d'acquisition du détecteur et son efficacité de conversion photon-électron. D'un point de vue optique, les pertes de flux lumineux sont réduites en adaptant les traitements antireflet des optiques et en optimisant la collection de la lumière. On s'intéressera donc ici plus particulièrement à un enjeu de type électromécanique qu'est le mouvement à fréquence élevée de la platine piézoélectrique utilisée pour la modulation de phase du signal.

Deux procédés sont communément utilisés pour effectuer la modulation de phase du signal via une platine piézoélectrique : un déplacement pas à pas de la platine [Bor02, Dub06] ou bien un mouvement continu (sinusoïdal [Dub01a] ou linéaire [Yu04]). Le premier a pour avantage d'adresser des positions précises, alors que les mouvements continus sont généralement employés lorsque des commandes à fréquences élevées sont envoyées à la platine, afin de ne pas subir une instabilité de la position liée à son temps de réponse à un échelon de tension. Bien qu'une translation linéaire de la surface de référence permette d'extraire plus fidèlement le signal d'intérêt (voir la sous-section 4.6.2 du chapitre 4), une modulation sinusoïdale est davantage robuste aux fréquences élevées. On choisit donc de considérer ce type de modulation étant donné son efficacité pour l'imagerie à grande vitesse.

Le principe consiste alors à synchroniser le signal sinusoïdal contrôlant la platine piézoélectrique avec un signal TTL déclenchant les acquisitions successives de la caméra (voir Fig. 2.7).

Plusieurs travaux théoriques et expérimentaux [Dub01a] ont été menés afin d'établir un algorithme d'associations de 4 images décalées en phase, ainsi que les propriétés du signal sinusoïdal permettant une extraction efficace du signal OCT (voir la sous-section 1.5.1 du premier chapitre). Cependant, certains algorithmes nécessitent de ne considérer qu'un nombre réduit d'images tomographiques acquises, comme nous l'expliquerons plus en détail par la suite. Ce temps d'attente nécessaire ralentit la vitesse d'exécution du système. On propose donc un nouvel algorithme, aussi efficace du point de vue de l'extraction du signal, mais n'imposant, lui, aucun temps de pause entre les différentes acquisitions. Il s'avère donc mieux adapté à la réalisation d'images à grande vitesse ou d'échantillons *in vivo*.

L'intensité, selon la position r d'un pixel, d'une image tomographique, dont la phase est modulée par un signal sinusoïdal d'amplitude ψ et de pulsation ω , s'exprime en fonction du temps t de la façon suivante (voir 1.14) :

$$I(r, t) = I_b(r) + A(r)\cos(\phi(r) + \psi\sin(\omega t + \theta)) \quad , \quad (2.2)$$

où $I_b = \frac{I_0}{4}(R_{ref} + R_{ech})$, $\phi(r)$ est une phase incluant la différence de marche, θ la phase du signal modulant et $A(r)$ l'amplitude contenant le signal utile.

L'acquisition de quatre images tomographiques successives, indexées par l'entier p , conduit à l'expression :

$$I_p(r) = \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} I(r, t) dt, \quad p \in \llbracket 1; 4 \rrbracket \quad , \quad (2.3)$$

où $T = \frac{2\pi}{\omega}$ est la période du signal sinusoïdal.

En faisant intervenir les fonctions de Bessel de première espèce, notées $J_{n \in \mathbb{N}}$, on montre que (voir les détails du calcul en *Annexe A*) :

Soit $\theta \in [0; 2\pi[$, soit $\psi \in \mathbb{R}, \forall p \in \llbracket 1; 4 \rrbracket$,

$$\begin{aligned}
 I_p(r) &= \frac{T}{4} (I_b(r) + A(r)J_0(r) [\cos(\phi(r)) - \sin(\phi(r))]) \\
 &+ \frac{A(r)T \cos(\phi(r))}{\pi} \times (-1)^p \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{4n-2}(\psi)}{2n-1} \sin(2\theta(2n-1)) \\
 &+ \frac{A(r)T \sin(\phi(r))}{\pi} \times (-1)^{\lfloor \frac{p}{2} \rfloor + 1} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} [(-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) + (-1)^{p+1} \cos((2n-1)\theta)],
 \end{aligned} \tag{2.4}$$

où la fonction $x \rightarrow \lfloor x \rfloor$ désigne la partie entière du réel x .

La fréquence de fonctionnement de la caméra étant égale, exactement, à quatre fois celle de la modulation sinusoïdale, le temps de calcul de l'ordinateur nécessaire à l'obtention d'une image OCT peut conduire à un décalage de l'ordre des images relativement à la phase de la sinusoïde, comme illustré en figure 2.7. Cela signifie donc que la première image enregistrée n'est pas toujours intégrée sur le même intervalle de temps $[0; T/4]$, mais sur un intervalle $[(p-1)T/4; pT/4]$, pour lequel p est potentiellement variable. Il est donc important d'utiliser un algorithme de construction du signal OCT, noté Υ , qui soit indépendant de l'ordre dans lequel sont acquises les images tomographiques d'intensité $I_{p \in \llbracket 1; 4 \rrbracket}$. Par conséquent, on utilise l'algorithme de recombinaison (2.5) en imposant $I_1 = I_3$:

$$\Upsilon(r) = \sqrt{(I_{n^\circ 1}(r) - I_{n^\circ 2}(r))^2 + (I_{n^\circ 3}(r) - I_{n^\circ 4}(r))^2} \quad , \tag{2.5}$$

la notation $I_{n^\circ i}$ faisant référence à la position de l'image acquise pour une séquence de quatre images et non pas à l'intervalle d'intégration.

On configure initialement la synchronisation de sorte que $\forall i \in \llbracket 1; 4 \rrbracket, I_{n^\circ i} = I_i$. Ainsi :

$$\Upsilon(r) = \sqrt{(I_1(r) - I_2(r))^2 + (I_3(r) - I_4(r))^2} \tag{2.6}$$

On montrera par la suite que cet algorithme de construction fonctionne pour différents couples $(\psi, \theta) \in (\mathbb{R}, [0, 2\pi[)$. Supposons à présent que la 1^{ère} image acquise, d'intensité notée donc $I_{n^\circ 1}$, soit d'intensité I_2 , c'est-à-dire intégrée sur $[T/4; T/2]$, et non plus I_1 . Dans ce cas :

$$\Upsilon(r) = \sqrt{(I_2(r) - I_3(r))^2 + (I_4(r) - I_1(r))^2} \tag{2.7}$$

Or puisqu'on impose $I_1 = I_3$, il apparaît que (2.6) \Leftrightarrow (2.7). Cela prouve donc que Υ ne dépend pas de l'ordre des images tomographiques. D'après (2.4), on montre que la condition $I_1 = I_3$ est vérifiée si et seulement si $\theta \in \{\pi/4, 5\pi/4\}$ (l'intégralité des calculs relatifs à l'algorithme de reconstruction sont développés en *Annexe A*).

Puisque l'ordre ne modifie pas le résultat, on se contentera par la suite d'étudier les cas pour lequel $\forall i \in \llbracket 1; 4 \rrbracket, I_{n^\circ i} = I_i$. L'expression du signal OCT est alors la suivante :

$$\Upsilon(r) = \frac{2\sqrt{2}A(r)T}{\pi} \sqrt{[\Gamma_u \cos(\phi(r))]^2 + [\Gamma_v \sin(\phi(r))]^2},$$

$$\text{avec } \begin{cases} \Gamma_u = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{4n-2}(\psi)}{2n-1} \sin(2\theta(2n-1)) \\ \Gamma_v = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} (-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) \end{cases} \quad (2.8)$$

On en déduit donc que le signal OCT est proportionnel au signal utile A sans dépendre de la phase ϕ si et seulement si $\Gamma_u = \Gamma_v$. C'est bien cette propriété qui est recherchée, puisque ne pas dépendre de la phase ϕ signifie qu'on extrait l'enveloppe de l'interférogramme et qu'il n'y a donc pas de franges d'interférence résiduelles dans le signal OCT, ce qui garantit une meilleure détection.

En simulant numériquement la variation de Γ_u et Γ_v en fonction de $(\theta, \psi) \in \{\pi/4, 5\pi/4\} \times \mathbb{R}$, on met en évidence un couple optimal $(\theta_0, \psi_0) = (\pi/4, 2,07)$ garantissant $\Gamma_u(\psi_0) = \Gamma_v(\psi_0) = \Gamma$ maximal et $I_1 = I_3$. Finalement, le signal OCT mesuré s'écrit :

$$\Upsilon(r) = A(r) \times \frac{2\sqrt{2}T\Gamma}{\pi}, \quad \text{avec } \Gamma \sim 0,37 \quad (2.9)$$

En pratique, on modifie la phase du signal sinusoïdal, θ_0 , en contrôlant la platine piézoélectrique, afin d'identifier les deux valeurs positives de la phase pour laquelle $I_1 = I_3$. On ajuste ensuite l'amplitude crête à crête, ψ_0 , de ce signal afin d'adapter la valeur de Γ et de réduire la présence des franges dans le signal OCT. On choisit le couple (θ_0, ψ_0) pour lequel le signal OCT est maximal. La figure 2.7 schématise le principe d'une intégration de quatre intensités successives d'un signal interférométrique modulé sinusoïdalement, qui peut se décomposer en fonctions de Bessel (voir *Annexe A*).

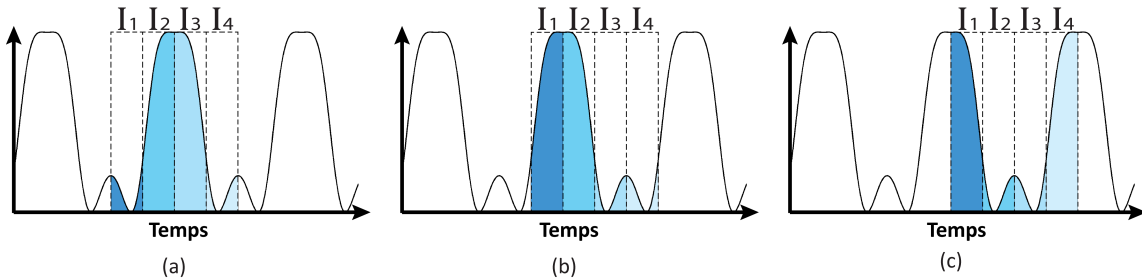


FIGURE 2.7 – Signal interférométrique modulé sinusoïdalement en fonction du temps (voir Eq. (2.2)) pour $\theta_0 = \pi/4$ et $\psi_0 = 2,07$. On représente les quatre zones d'intensité intégrées afin de calculer les intensités $I_{p \in \llbracket 1;4 \rrbracket}$. Dans les trois cas (a), (b) et (c), le signal Υ calculé est identique puisqu'il est indépendant de l'ordre des images.

2.3 Compensation dynamique de la dispersion

Le fait de travailler avec l'air comme milieu d'immersion, afin d'optimiser la transmission de la lumière sur l'ensemble de la plage spectrale, promet l'apparition de différence de dispersion

lorsqu'on image en profondeur dans l'échantillon. Plutôt que d'employer une méthode de compensation statique, en insérant une lame de verre immobile dans chaque bras, on implémente un nouveau (à notre connaissance en OCT plein champ) système de compensation dynamique de la dispersion, basé sur la rotation d'une lame de verre dans le bras référence (voir Fig. 2.6).

On étudiera dans cette section, l'évolution du chemin optique dans le bras référence δ_{ref} en fonction de la rotation de la lame compensatrice de dispersion (notée LCD), ainsi que les différents paramètres guidant le choix des propriétés de cette LCD, tels que son indice de réfraction, son angle d'inclinaison initial θ_0 ou encore son épaisseur.

2.3.1 Calcul de la différence de chemin optique induite par la rotation d'une lame compensatrice de dispersion

Formule théorique

Afin de calculer la différence de chemin optique δ_{ref} engendrée par une rotation d'un angle $\delta\theta = \theta_2 - \theta_1$ de la lame compensatrice de dispersion (LCD) du bras référence, on considère un rayon incident parallèle à l'axe optique du montage (voir Fig. 2.8). On note n l'indice de réfraction de la LCD et e son épaisseur. D'après les lois de la réfraction énoncées par Descartes, le faisceau en sortie est parallèle au faisceau incident et dévié d'une hauteur D_i qui dépend de l'angle de la LCD.

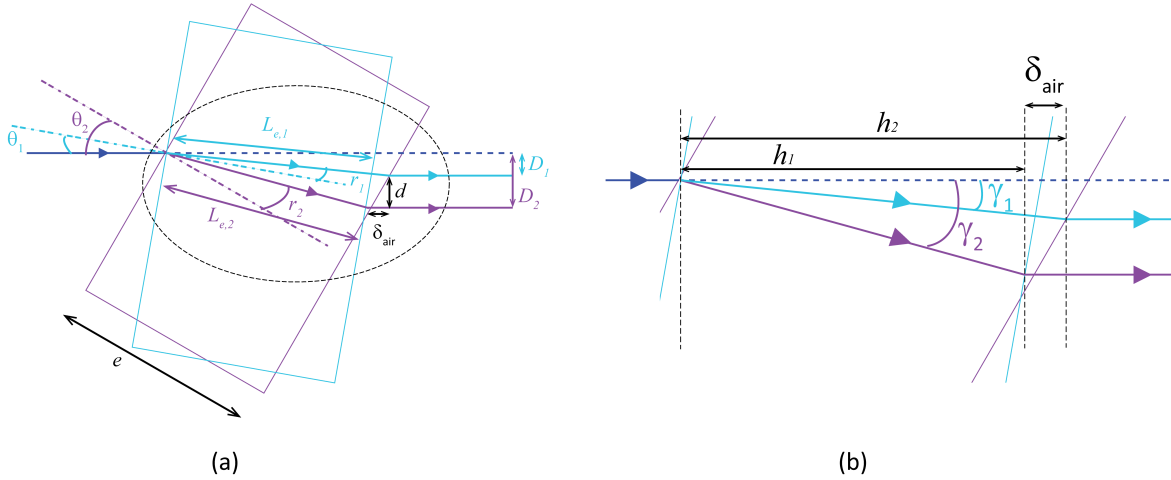


FIGURE 2.8 – (a) : schéma illustrant le trajet d'un rayon lumineux incident à travers une LCD pour deux angles d'inclinaison différents. (b) : schéma correspondant au zoom de la zone encadrée dans (a), qui précise certaines grandeurs utiles au calcul de δ_{ref} .

Le calcul de la différence de chemin optique doit prendre en compte la différence de chemin optique traversé dans la LCD, mais également la différence de distance parcourue dans l'air en sortie des lames et notée δ_{air} (voir la partie zoomée de la figure 2.8). La différence de marche δ_{ref} entre les deux positions de la LCD s'exprime donc de la façon suivante (voir la figure 2.8 pour les notations).

$$\delta_{ref} = 2(nL_{e,2} - nL_{e,1} - \delta_{air}) \quad (2.10)$$

En utilisant les formules de trigonométrie, pour les deux triangles tracés en traits gras sur la figure zoomée ci-dessus, on établit l'expression de δ_{air} :

$$\delta_{air} = h_2 - h_1, \quad (2.11)$$

avec pour $i \in \{1, 2\}$, $h_i = L_{e,i} \cos(\gamma_i)$ et $\gamma_i = \theta_i - r_i$

Il en découle donc l'équation suivante :

$$\delta_{ref} = 2 [L_{e,2} (n - \cos(\gamma_2)) - L_{e,1} (n - \cos(\gamma_1))] \quad (2.12)$$

On obtient alors la formule théorique de la variation du chemin optique dans le bras référence, en fonction des angles d'inclinaison θ_i en utilisant la relation de Descartes reliant r_i à θ_i (voir Fig. 2.8) :

$$\delta_{ref} = 2e \left(\frac{n - \cos \left[\theta_2 - \arcsin \left(\frac{\sin(\theta_2)}{n} \right) \right]}{\cos \left[\arcsin \left(\frac{\sin(\theta_2)}{n} \right) \right]} - \frac{n - \cos \left[\theta_2 - \arcsin \left(\frac{\sin(\theta_1)}{n} \right) \right]}{\cos \left[\arcsin \left(\frac{\sin(\theta_1)}{n} \right) \right]} \right) \quad (2.13)$$

Formule polynomiale approchée

Afin de contrôler expérimentalement l'évolution du chemin optique en fonction de l'angle d'inclinaison de la LCD du bras référence, il convient de simplifier l'expression théorique (2.13) afin de pouvoir éventuellement la rapprocher d'une fonction usuelle plus à même d'être utilisée en pratique.

Pour cela, on effectue un développement limité au troisième ordre de la fonction f_n , définie C^∞ sur l'intervalle $] -\pi/2; \pi/2[$, $\forall n \geq 1$:

$$f : \theta \rightarrow \frac{1}{\cos \left[\arcsin \left(\frac{\sin(\theta)}{n} \right) \right]} \left(n - \cos \left[\arcsin \left(\frac{\sin(\theta)}{n} \right) \right] \right) \quad (2.14)$$

Pour θ_0 fixé, on peut montrer que f s'écrit sous la forme suivante :

$$f(\theta_0 + h) \underset{h \rightarrow 0}{=} T_0(\theta_0) + T_1(\theta_0)h + T_2(\theta_0)h^2 + T_3(\theta_0)h^3 + o(h^3) \quad (2.15)$$

Le calcul détaillé qui a été mené n'apportant pas d'informations pertinentes, on décide de n'exprimer la valeur des coefficients T_i que pour certaines valeurs de θ_0 données, en supposant que $n = 1,42$:

- si $\theta_0 = 0$, $f(\theta_0 + h) \underset{h \rightarrow 0}{=} 0,1 + 0,117h^2 + o(h^3)$
 - si $\theta_0 = \pi/6$ ($= 30^\circ$), $f(\theta_0 + h) \underset{h \rightarrow 0}{=} 0,463 + 0,174h + 0,205h^2 + 0,078h^3 + o(h^3)$
 - si $\theta_0 = \pi/4$ ($= 45^\circ$), $f(\theta_0 + h) \underset{h \rightarrow 0}{=} 0,524 + 0,301h + 0,287h^2 + 0,131h^3 + o(h^3)$
 - si $\theta_0 = \pi/3$ ($= 60^\circ$), $f(\theta_0 + h) \underset{h \rightarrow 0}{=} 0,625 + 0,481h + 0,407h^2 + 0,166h^3 + o(h^3)$
- (2.16)

Cela démontre qu'on peut approximer l'évolution du chemin optique δ_{ref} par une fonction polynomiale de degré 3. Cependant cela reste vrai uniquement pour de faibles modifications de l'inclinaison (puisque $h \rightarrow 0$). Etudions alors numériquement l'allure des développements limités exprimés en équation (2.16), par rapport à la formule exacte donnée en équation (2.13) :

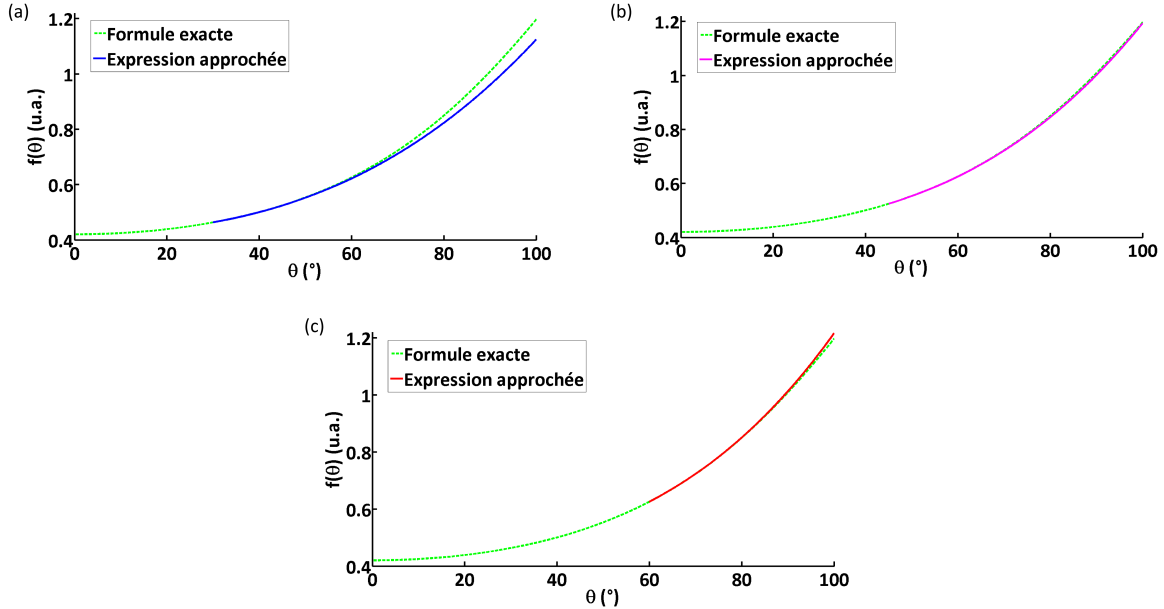


FIGURE 2.9 – Comparaison entre la formule exacte de l'équation (2.13) (courbes en pointillés) et celle approchée issue du développement limité à l'ordre 3 (courbes en trait plein) pour $\theta_0 = 30^\circ$ (a), $\theta_0 = 45^\circ$ (b), $\theta_0 = 60^\circ$ (c). Seules les valeurs de θ supérieures à θ_0 sont représentées pour les courbes issues du développement limité. Dans les trois cas, les deux courbes correspondent bien pour une variation d'angle $\delta\theta$ inférieure à 30° , ce qui est suffisant étant donné la profondeur d'imagerie usuelle atteinte en OCT plein champ.

Outre la configuration pour laquelle $\theta_0 = 0$, ces résultats confirment donc qu'il est possible d'utiliser une fonction polynomiale de degré 3 pour rendre compte de l'évolution du chemin optique δ_{ref} , et cela pour une inclinaison $\delta\theta$ jusqu'à $\sim 30^\circ$ supérieur à θ_0 pour les trois autres cas considérés ici. Cette approximation nous sera utile en pratique comme on le verra plus précisément par la suite.

2.3.2 Choix des propriétés propres aux lames compensatrices de dispersion

Le choix des propriétés des lames compensatrices de dispersion (appelées LCD) joue un rôle dans l'optimisation du montage en ce qui concerne sa vitesse d'exécution, et sa capacité à mesurer précisément le signal d'intérêt. Il est donc important que la présence des LCD affecte peu la transmission de la lumière, tout en garantissant une compensation de la dispersion efficace. De plus, le pas de leur rotation étant au minimum de $\delta\theta = 0,01^\circ$ compte tenu de la platine motorisée employée, celui-ci doit correspondre à un pas en micromètre suffisamment réduit pour assurer un échantillonnage du signal satisfaisant. Deux caractéristiques principales de ces lames

sont donc à prendre en considération : leur indice de réfraction, et leur angle d'inclinaison initiale θ_0 .

Indice de réfraction

Comme on le verra en détail dans le chapitre suivant (voir la section 3.4), le signal mesuré en OCT est affecté lorsqu'il existe une différence entre l'indice de l'échantillon et l'indice du milieu d'immersion. Le fait de pivoter la LCD du bras référence, lorsqu'on image en profondeur dans un échantillon, revient, du point de vue de la compensation de dispersion, à substituer le milieu d'immersion par le matériau constituant ces lames. La formule 3.36 du chapitre 3 met donc en évidence l'importance de la valeur du terme de dispersion de la vitesse de groupe (ou GVD pour *group velocity dispersion* en anglais), ainsi que de l'indice de réfraction moyen n_{LCD} propres aux deux LCD.

Une compensation des différences de dispersion efficace est réalisée en choisissant un matériau qui possède un indice moyen et une GVD proche de ceux de l'échantillon. Afin de développer un système d'imagerie adapté à plusieurs échantillons biologiques, on suppose qu'en moyenne les échantillons biologiques possèdent un indice moyen $n = 1,4$, et qu'ils sont principalement constitués d'eau, ce qui permet d'évaluer la valeur de leur GVD selon celle de l'eau.

Puisque ce matériau se doit d'être transparent à la lumière visible et infrarouge, des lames en verre semblent plus appropriées. Parmi les différents types de verre, on choisit la silice fondue (SiO_2) dont l'indice moyen se situe autour de 1,45 dans la gamme spectrale qui nous concerne. On le préférera au *BK7*, qui bien qu'ayant des valeurs de GVD relativement proches de celles de l'eau, tout comme le SiO_2 d'ailleurs, a un indice moyen de réfraction plus élevé ($n \sim 1,52$), ce qui est défavorable dans le but de compenser la dispersion.

D'autre part un indice de réfraction plus faible réduit également les pertes par réflexion à la surface des LCD, ce qui constitue un autre argument concernant le choix de LCD en SiO_2 . L'amplitude des pertes par réflexions dépendant également de l'angle d'inclinaison des LCD, on doit donc convenablement choisir sa valeur initiale également.

Angle d'inclinaison initial

La valeur initiale de l'angle d'inclinaison θ_0 détermine principalement trois paramètres du montage au cours d'une acquisition : l'amplitude des pertes par réflexion, l'échantillonnage selon l'axe Oz du signal et la déviation du faisceau.

On présente en figure 2.10 l'évolution de δ_{ref} , induite par la rotation de la LCD du bras référence, ainsi que celle de la déviation du faisceau incident et du coefficient de réflexion à la surface de la lame, et cela, pour différentes valeurs de θ_0 . Les calculs numériques reposent sur l'expression exacte de l'évolution du chemin optique dans le bras référence δ_{ref} , explicitée dans l'équation (2.13), et sur la valeur de la déviation D calculée de façon similaire (voir Fig. 2.10b). En ce qui concerne la valeur du coefficient de réflexion, on utilise la formule des coefficients de Fresnel pour une lumière non polarisée.

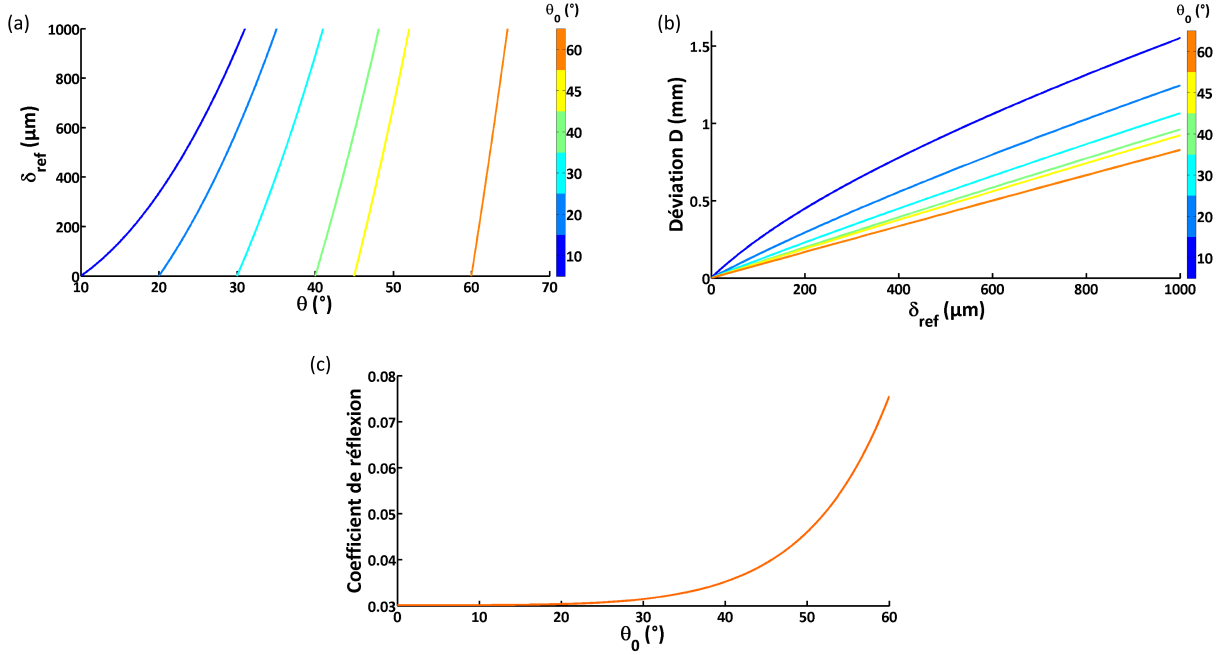


FIGURE 2.10 – (a) : évolution de δ_{ref} en fonction du pivotement de la LCD pour différentes valeurs de l'angle d'inclinaison initial θ_0 . (b) : évolution, pour différentes valeurs de θ_0 , de la déviation D du faisceau incident après traversée de la LCD selon le chemin optique induit par la rotation de la lame. (c) : coefficient de réflexion de la LCD en SiO_2 avec l'air comme milieu ambiant. Dans tous les cas, on considère un indice de réfraction moyen $n_{LCD} = 1,42$ et une épaisseur de la LCD $e = 12$ mm.

En étudiant les trois graphes, on choisit un angle d'inclinaison initial de 30° qui constitue un compromis intéressant par rapport aux autres configurations.

Avec un tel angle θ_0 , la pente de la courbe d'évolution de δ_{ref} en fonction de l'angle de rotation θ est relativement faible (voir Fig. 2.10a), ce qui assure un échantillonnage assez fin de la différence de marche en micromètre.

D'autre part nous choisissons des LCD d'épaisseur assez importante ($e = 12$ mm) afin de garantir une distance de chemin optique maximale suffisamment importante, tout en conservant un angle de rotation approprié. Néanmoins, une augmentation de l'épaisseur de la lame augmente aussi la déviation du faisceau, et l'angle initial doit donc être suffisamment élevé pour diminuer quelque peu la valeur de cette déviation.

Le fait de pivoter la lame induit, dans tous les cas, une déviation dont la conséquence principale est de modifier la position latérale du faisceau. Cela signifie donc que ce dernier n'est plus centré avec l'axe optique de l'objectif de microscope du bras référence, ce qui correspond à un basculement des franges de l'interférogramme. Cet effet indésirable peut malgré tout être compensé en décalant latéralement la position de l'objectif du bras référence, solidaire à la surface de référence. Une alternative consisterait à remplacer chaque lame de verre épaisse par une association de deux prismes en verre identiques. En positionnant ces deux prismes de telle sorte que leurs bases se fassent face, il serait possible d'accroître l'épaisseur de verre traversée sans dévier le faisceau lumineux.

2.3.3 Mise en application de la correction des différences de dispersion

D'après l'étude théorique menée, on a montré qu'il est possible d'approximer efficacement l'évolution de δ_{ref} par un polynôme de degré 3. Afin de calibrer expérimentalement la variation de la différence de marche en fonction de la rotation angulaire de la LCD, on mesure la distance δ_{ref} en micromètre équivalente à une certaine rotation θ . En calculant numériquement un polynôme de degré 3, qui suit au plus près les pointés expérimentaux, on en déduit une loi d'évolution expérimentale propre à chacune des trois bandes spectrales (voir Fig. 2.11).

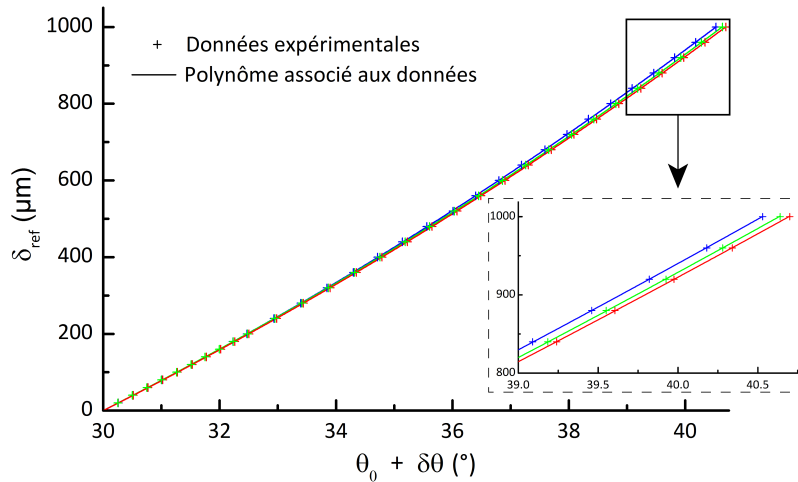


FIGURE 2.11 – Evolution du chemin optique dans le bras référence δ_{ref} mesurée expérimentalement, en fonction de l'angle d'inclinaison $\delta\theta$ de la LCD pour une valeur initiale $\theta_0 = 30^\circ$ et dans les trois bandes spectrales sélectionnées : bande 1 (courbe bleue), bande 2 (courbe verte), bande 3 (courbe rouge). Les données expérimentales, ainsi que les polynômes qui suivent au plus près ces données, sont représentés. Un graphe zoomé souligne la différence d'allure de δ_{ref} selon la bande spectrale.

On note que ces mesures expérimentales diffèrent de moins de 1% avec les calculs théoriques pour une rotation de $\delta\theta = 10^\circ$ correspondant à une différence de marche $\delta_{ref} \sim 1$ mm. De plus, du fait de la variation de l'indice de réfraction avec la longueur d'onde, l'allure de la courbe dépend de la bande spectrale utilisée (δ_{ref} varie de $\sim 2\%$ selon la bande spectrale, lorsque $\delta\theta = 10^\circ$) (voir le graphe zoomé de la figure 2.11), confirmant ainsi la nécessité d'une loi d'évolution spécifique à chaque configuration.

Par ailleurs on prendra soin d'ajuster le pivotement de la LCD, de telle façon qu'un pas constant en micromètre soit induit, afin de favoriser la représentation de l'image finale.

On démontre expérimentalement l'influence d'une compensation dynamique des différences de dispersion en réalisant une image d'une lame de verre BK7 de $\sim 180\mu\text{m}$ d'épaisseur pour une bande spectrale dans le domaine visible. On présente en figure 2.12 deux images en coupe transverse obtenues selon qu'on mesure le signal comme en OCT conventionnel (Fig. 2.12a) ou qu'on applique le système de correction dynamique de la dispersion développé (Fig. 2.12b).

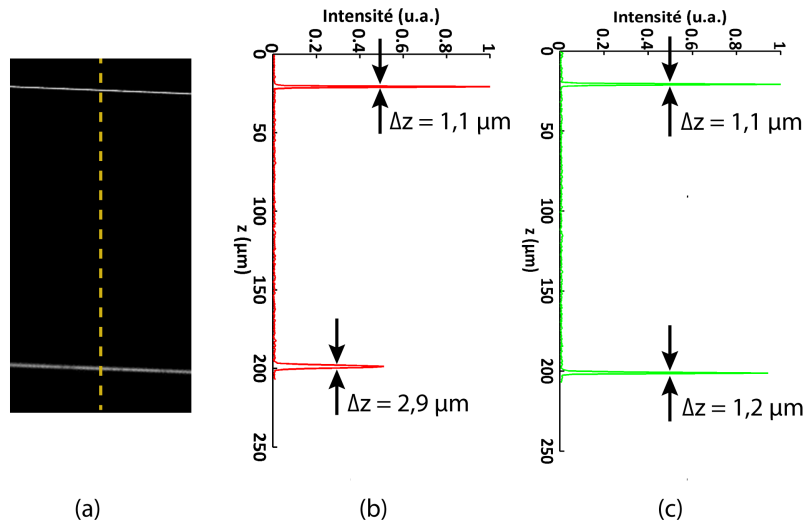


FIGURE 2.12 – (a) : coupe transverse de l'image d'une lamelle de verre BK7 d'épaisseur $\sim 180\mu\text{m}$. (b), (c) : profil d'intensité le long de la ligne en pointillés jaunes indiquée sur (a). Sans correction dynamique de la dispersion (b), la résolution axiale Δz et l'intensité du signal sont dégradées, contrairement au cas où la dispersion est compensée dynamiquement (c). La bande spectrale considérée est proche de la bande 1 (le filtre utilisé étant celui référencé KG1 par le fabricant Schott).

Une amélioration notable apparaît donc puisqu'on observe qu'après avoir traversé la lamelle de verre, la résolution axiale est dégradée d'un facteur 3 et l'intensité du signal OCT divisée par 2 dans le premier cas, alors que ces deux valeurs sont quasiment conservées grâce à la correction dynamique de dispersion.

Ce dernier résultat nous permet donc de conclure quant à l'efficacité et à l'utilité du développement mis en œuvre visant à réduire l'influence des différences de dispersion, pour un système d'OCT plein champ dont le milieu d'immersion est l'air.

2.4 Performances

Cette expérience a pour objectif de réaliser un système d'OCT plein champ capable de produire des images d'échantillons biologiques dans trois bandes spectrales différentes. Ajouté au fait que des performances semblables à l'OCT plein champ conventionnel sont attendues, il est également important que ces performances soient similaires pour les trois bandes considérées, afin de pouvoir superposer efficacement les images obtenues dans chaque cas et produire une image en couleur à contraste augmenté.

2.4.1 Résolution axiale

Comme cela a été décrit dans le chapitre précédent, lorsque l'effet de la dispersion n'est pas considéré, la résolution axiale en OCT plein champ dépend principalement de la densité

spectrale de puissance effective du montage et peut être approximée par la formule suivante :

$$\Delta z = \frac{2ln2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (2.17)$$

En choisissant judicieusement trois configurations de filtres optiques, il est donc possible de contrôler la valeur de la résolution axiale du système dans chaque cas.

L'intérêt étant ici de mener une étude spectroscopique, il est préférable que les trois bandes s'étendent sur un large intervalle spectral. Ce dernier étant limité par la réponse spectrale de la caméra, il correspond potentiellement à une zone allant de 400nm à 1800nm.

L'enjeu consiste, d'autre part, à atteindre des résolutions axiales Δz similaires à l'OCT plein champ conventionnel (c'est-à-dire entre $1\mu\text{m}$ et $2\mu\text{m}$) et qui sont identiques dans les trois bandes. Étant donné la relation qui lie Δz à la longueur d'onde centrale du spectre λ_0 et sa largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda$, il est nécessaire d'ajuster la largeur des bandes en fonction de leur position dans le spectre. Ainsi, une bande correspondant à un intervalle appartenant au spectre visible devra être moins large qu'une bande incluse dans le domaine infrarouge.

Notre choix se porte alors sur des filtres correspondant aux densités spectrales de puissance présentées en figure 2.13a. On indique également les interférogrammes mesurés, associés à chaque bande spectrale.

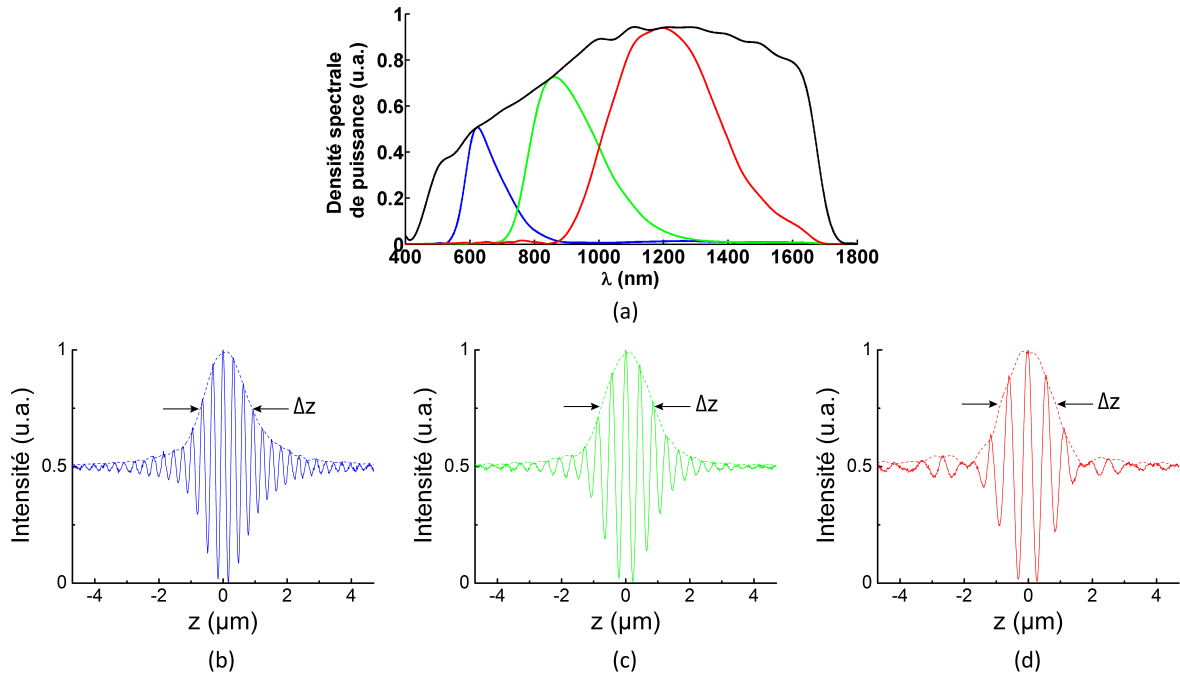


FIGURE 2.13 – (a) : réponse spectrale de la caméra OWL (courbe noire) et densité spectrale de puissance effective associée à chaque bande (courbe bleue = bande 1, courbe verte = bande 2, courbe rouge = bande 3). (b), (c) et (d) : interférogrammes expérimentaux mesurés dans chaque bande avec des couleurs correspondant à (a). La résolution axiale Δz vaut $\sim 1,9\mu\text{m}$ dans les trois cas.

On constate que pour ces trois configurations, la résolution axiale est $\sim 1,9\mu\text{m}$ et satisfait donc aux prérogatives établies. Une première bande est approximativement identifiable au domaine visible, alors que les deux autres appartiennent au spectre infrarouge. La troisième bande (colorée en rouge), étant centrée en $\lambda_0 = 1,2\mu\text{m}$ et s'étendant jusqu'à une longueur d'onde de 1700nm, constitue un zone d'étude originale en OCT et particulièrement pour une telle résolution axiale inférieure à $2\mu\text{m}$.

Les résultats présentés en figure 2.13, sont tous issus de mesures expérimentales réalisées avec notre montage (exceptée la courbe de la réponse spectrale de la caméra).

Pour chacune des bandes, la première étape consiste à enregistrer un interférogramme complet et suffisamment bien échantillonné : une méthode consiste à acquérir plusieurs figures d'interférences décalées et de les juxtaposer afin de reconstruire fidèlement le signal. Ensuite, le calcul de la transformée de Fourier de ce signal interférométrique permet de déduire la densité spectrale de puissance correspondante et de localiser la longueur d'onde centrale du spectre. On peut vérifier que ces résultats sont en accord avec les prédictions théoriques obtenues d'après les données de transmission relatives aux différents filtres employés.

La mesure de la résolution axiale est effectuée en acquérant une pile d'images *en-face* d'une surface réfléchissante, telle qu'un miroir. En déplaçant la surface de référence avec un pas de $0,5\mu\text{m}$, on mesure l'évolution de l'intensité propre à un pixel du détecteur. De cette façon, on obtient la réponse impulsionnelle du montage et donc sa résolution axiale (voir aussi la figure 4.8 du chapitre 4).

2.4.2 Résolution latérale

Contrairement à la résolution axiale, la résolution latérale est, on l'a vu, déterminée uniquement par l'ouverture numérique des objectifs de microscope et par la longueur d'onde centrale du spectre λ_0 (voir Eq. (1.35)).

Afin de mesurer la réponse impulsionnelle latérale du montage pour les trois bandes spectrales, on réalise l'image d'une bille d'or de 100nm de diamètre. Il est essentiel, pour mesurer une réponse impulsionnelle, que l'échantillon considéré soit de dimension inférieure à la résolution du système afin que cet échantillon puisse être assimilé à une "impulsion" ou un point. Puisque la résolution latérale est théoriquement estimée à $\sim 2\mu\text{m}$, un tel diamètre de la bille est donc convenable.

Dans le but de convenablement échantillonner le signal de la réponse impulsionnelle latérale mesurée, il est préférable d'augmenter le grandissement du système d'imagerie. En effet lorsque des images d'échantillons sont réalisées, la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle latérale doit être au moins supérieure à la largeur de deux pixels pour garantir un échantillonnage suffisant (selon le critère de Nyquist). Afin de préserver un champ de vision assez large, on décide d'utiliser une lentille de tube qui garantit que ~ 3 pixels couvrent la largeur à mi-hauteur de cette réponse impulsionnelle. Cependant lorsqu'on cherche à mesurer la résolution latérale, un nombre de points plus importants est requis pour convenablement échantillonner puis reconstruire le signal. Il suffit alors d'augmenter la distance focale de la lentille de tube, ou même de la supprimer, en considérant que l'ouverture numérique demeure limitée par celle de l'objectif de microscope et que la qualité de l'image est très peu modifiée.

On choisit de travailler sans lentille de tube, en supposant que la caméra est suffisamment

éloignée du plan focal de l'objectif pour être considérée à l'infini. Cela nous permet d'obtenir un grandissement tel qu'un pixel corresponde à $0,4\mu\text{m}$ dans l'espace échantillon. A partir d'une image *en-face* de la bille (voir Fig. 2.14a), on trace le profil de la réponse impulsionnelle et d'une fonction gaussienne ajustée à partir de laquelle on déduit $\delta(x, y)$. Une illustration de cette mesure effectuée pour la troisième bande est donnée en figure 2.14b.

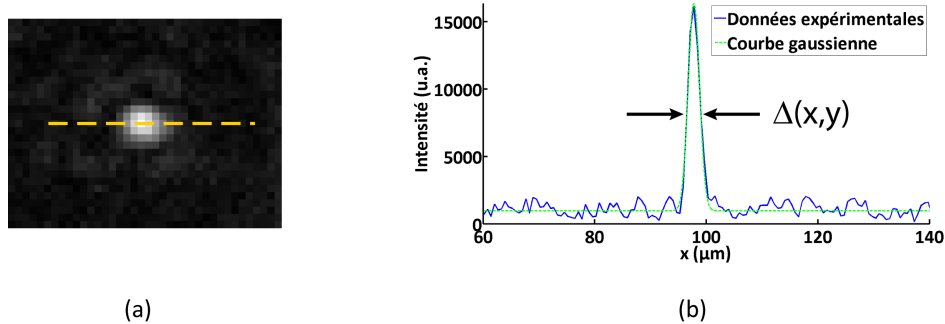


FIGURE 2.14 – (a) : image du signal OCT d'une bille d'or, de 100nm de diamètre, immergée dans un fluide. (b) : profil d'intensité le long de la ligne en pointillés jaunes indiquée en (a), qui correspond à la réponse impulsionnelle latérale du système.

On mesure alors des résolutions latérales pour les trois bandes (voir le tableau 2.16) très proches des valeurs théoriques, et comme escompté, différentes selon la bande spectrale utilisée. Nous verrons par la suite comment les rendre similaires, afin d'améliorer la superposition des images acquises dans les trois bandes.

2.4.3 Sensibilité

Comme on l'a vu au cours du premier chapitre, la sensibilité de détection d'un système OCT considéré en limite de bruit de grenaille est inversement proportionnelle au nombre d'accumulations N , tout en dépendant des coefficients de réflexion R_{ref} de la surface de référence (voir Eq. (1.43)). Cette sensibilité de détection correspond au plus petit coefficient de réflexion d'une structure présente dans l'échantillon, détectable et discernable par le dispositif.

Afin de mesurer ce coefficient de réflexion minimal, on mesure l'intensité du signal interférométrique issu d'un échantillon dont le coefficient, noté R_v , est bien connu. En évaluant l'intensité relative au bruit propre du signal interférométrique, on fait correspondre à cette valeur d'intensité du bruit un coefficient de réflexion R_{min} par une "règle de 3".

Pour cela on peut utiliser une lame de verre dont le coefficient de réflexion de 4 % est assez proche de celui d'un échantillon biologique conventionnel. En translatant la surface de référence, on superpose le centre de la fenêtre de cohérence à la surface de la lame de verre et on mesure le maximum Υ_{max} du signal OCT mesuré. La mesure du bruit du signal OCT s'effectue en décalant suffisamment la fenêtre de cohérence jusqu'à perdre l'interférogramme résultant des interférences entre les deux surfaces. Ainsi le signal résiduel correspond au bruit de mesure. Le coefficient R_{min} est alors relié à son intensité Υ_{min} de la façon suivante :

$$S = R_{min} = 20 \log \left(\sqrt{R_v} \frac{\Upsilon_{min}}{\Upsilon_{max}} \right) \quad (2.18)$$

On présente les résultats des mesures effectuées en fonction du nombre d'accumulations et de la bande spectrale utilisée.

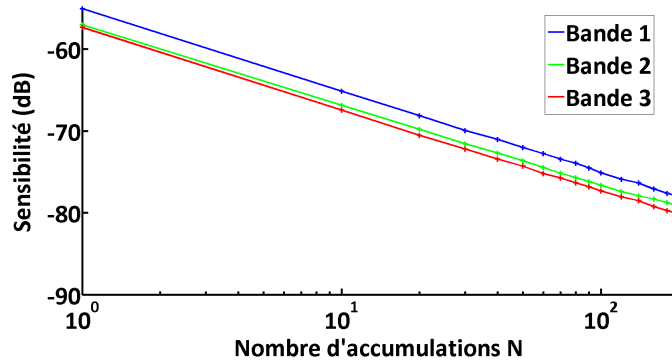


FIGURE 2.15 – Evolution de la sensibilité de détection mesurée dans les trois bandes en fonction du nombre d'accumulations.

On remarque que, conformément à la théorie, la sensibilité évolue linéairement en fonction du logarithme du nombre d'accumulations. On note également que les valeurs de sensibilité sont plus faibles que celles obtenues dans certains montages d'OCT plein champ (voir par exemple Fig. 1.27). Cela est principalement dû au détecteur utilisé et à son bruit propre. Dans notre cas, la caméra OWL présente un bruit de lecture important qui limite fortement la sensibilité de détection du système. De manière générale, les détecteurs de type *InGaAs* sont souvent affectés d'un bruit de détection plus élevé que les détecteurs basés sur un matériau sensible en Silicium (comme on peut l'observer en figure 1.27 notamment). Malgré tout la plupart des systèmes d'OCT plein champ n'atteignent pas une sensibilité de détection au-delà de -80dB pour un nombre d'accumulations raisonnable [Dub04, Gri05, Bor02, Yu04].

Une deuxième remarque concerne les différences des valeurs de sensibilité entre les trois bandes spectrales. On associe celles-ci au bruit de détection de la caméra, qui est plus susceptible d'augmenter avec son temps d'exposition. Or étant donné la sensibilité spectrale de ce détecteur, ce bruit est plus élevé dans la première bande pour laquelle la fréquence d'acquisition de la caméra est 20 fois plus faible par rapport au cas de la troisième bande. Cependant, en étudiant l'allure des interférogrammes mesurés dans chaque bande spectrale (voir Fig. 2.13), on constate la présence de rebonds dans celui de la bande 3 (voir Fig. 2.13d). Ces rebonds conduisent à une baisse du contraste et donc de la sensibilité de détection dans cette bande. Mais le temps d'acquisition étant tellement faible dans cette bande, par rapport aux deux autres, que le bruit de détection réduit permet tout de même d'atteindre une sensibilité supérieure.

A l'instar de la résolution latérale, la valeur de la sensibilité diffère donc selon les bandes. Cela souligne la nécessité d'ajuster certains paramètres afin d'obtenir des performances similaires dans les trois bandes et de garantir ainsi une bonne superposition des images.

2.4.4 Ajustements pré et post-acquisition pour la superposition des images

Alors que la résolution axiale peut être ajustée en choisissant des filtres optiques appropriés et que la sensibilité dépend du nombre d'accumulations choisies, certains paramètres sont difficilement adaptables et doivent être corrigés par un traitement numérique post-acquisition : c'est le cas de la résolution latérale et de la dilatation des images due à la dispersion de la lumière dans les échantillons.

Ajustement du signal maximal détecté. L'ajustement de la sensibilité peut donc s'effectuer assez simplement, une fois le nombre d'accumulations adapté déterminé. Cependant bien que d'après les données de la figure 2.15 il soit trivial d'ajuster N en fonction de la bande spectrale pour faire correspondre les trois valeurs de sensibilité de détection, on s'intéressera davantage à la valeur maximale Υ_{max} du signal interférométrique.

En effet notre but est de superposer les trois images, et par conséquent un échantillon ou une structure dont le coefficient de réflexion est constant dans les trois bandes, doit avoir une intensité identique dans ces trois bandes quel que soit le bruit propre à chaque bande.

La mesure consiste donc à ajuster, selon chaque bande, le nombre d'accumulations N afin d'obtenir un signal Υ_{max} similaire. Il est donc a priori nécessaire de considérer la variation du coefficient de réflexion R_{ref} de la surface de référence, qui est ici un prisme de verre BK7. Cependant ce dernier ne variant que de 5% sur l'étendue du spectre global. La précision sur l'évaluation de Υ_{max} n'étant que de l'ordre de 10%, compte tenu de l'instabilité d'une mesure interférométrique, on peut donc considérer que R_{ref} est constant. En utilisant comme échantillon une lame de verre également, on en déduit qu'avec un nombre d'accumulations $N_1 = 30$ pour la bande visible, $N_2 = 26$ pour la deuxième bande et $N_3 = 24$ pour la plus large bande spectrale, on obtient un signal Υ_{max} quasiment constant dans les trois bandes. Ce choix des nombres d'accumulations permet d'autre part de conserver une fréquence d'acquisition de l'ordre de 1Hz pour la bande 1 et de ~ 4 Hz pour la bande 3.

On s'assure, par ailleurs, que la sensibilité de détection reste relativement proche et voisine pour les trois bandes. Avec de tels nombres d'accumulations, on mesure une sensibilité de détection voisine de -71dB pour les trois bandes.

Ajustement de la résolution latérale. Concernant la résolution latérale, l'enjeu consiste à faire correspondre la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle latérale mesurée précédemment dans les trois bandes. Il serait envisageable de niveler par le haut cette résolution en entreprenant d'améliorer les plus faibles résolutions par des méthodes numériques adaptées. Cela demanderait cependant une étude à part entière du problème de correction numérique des images qui n'est pas l'objet de l'étude ici.

On choisit donc de dégrader les réponses impulsionnelles des cas les plus favorables. Pour cela, on considère que le système d'imagerie est limité par la diffraction et que la réponse impulsionnelle est d'allure gaussienne et on convolue chaque image concernée par une fonction gaussienne de largeur adaptée. Puisque la convolution de deux fonctions gaussiennes, de largeur à mi-hauteur c_1 et c_2 respectivement, est une fonction gaussienne dont la largeur à mi-hauteur $c_s = \sqrt{c_1^2 + c_2^2}$, ce procédé permet d'ajuster facilement la résolution latérale des images acquises.

Puisque cette convolution numérique conduit également à un lissage du bruit des images, il est impératif de réajuster les propriétés du bruit à leurs valeurs initiales. On veille alors dans un

premier temps à mesurer la variance et la valeur moyenne du bruit de l'image qui sont amenées à être corrigées. Puis après correction, on ajoute un bruit gaussien de variance et de valeur moyenne adaptées. Cette reconstitution du bruit est basée sur le fait que le bruit de grenaille, décrit par la statistique de Poisson (voir encadré du chapitre 1 sur les bruits de détection), tend vers une loi gaussienne pour un grand nombre de réalisations, comme c'est le cas ici (on précise que le bruit électronique de la caméra peut également être assimilé à un bruit gaussien, d'après le théorème central-limite).

Ajustement de la dilatation longitudinale. Une correction, liée à la dispersion du signal engendré lors de la traversée de l'échantillon, doit également être apportée.

En effet puisque l'indice de réfraction n_{ech} dépend de la longueur d'onde, et donc de la bande utilisée, une augmentation d'une distance d du chemin optique dans le bras référence, après rotation de la lame, correspond à un déplacement $e = d/n_{ech}$ de la fenêtre de cohérence dans l'échantillon. Par conséquent une structure physiquement présente à une distance e de la surface est détectée après un déplacement équivalent à d/n_{ech} du bras référence, et il existe donc un décalage longitudinal de sa position selon la bande spectrale considérée. On rectifie cette différence en interpolant les données acquises, afin de faire correspondre les différentes structures identifiées.

Une manière de remédier à ce problème de dilatation axiale consisterait à calibrer les lames compensatrices de dispersion (LCD) de telle sorte que e , et non plus d , soit constant à chaque rotation d'angle $\delta\theta$ pour toutes les bandes, entre deux images *en-face*. Cependant cette calibration dépendrait de l'indice n_{ech} de l'échantillon et serait donc probablement moins précise qu'un simple ajustement post-acquisition.

En conclusion de cette partie, destinée à l'évaluation des performances du systèmes, on présente un tableau récapitulatif des valeurs mesurées.

	Bande 1	Bande 2	Bande 3
Combinaison de filtres	OG590, KG1, KG3, KG5	RG780, RG9, KG1	FEL0950, BG36, DMSP1500
λ_0 (nm)	635	870	1170
$\Delta\lambda$ (nm)	120	220	390
Δz (μm)	1,9	1,9	1,9
$\Delta(x, y)^*$ (μm)	2,4	2,4	2,4
$\Delta(x, y)$ (μm)	1,4	1,9	2,4
S (dB)	-70	-71	-71

FIGURE 2.16 – Performances du système OCT plein champ dans trois bandes spectrales. On note qu'elles sont quasiment identiques dans chaque bande. $\Delta(x, y)^*$ dénote la résolution latérale après application du traitement numérique par convolution.

On constate donc que les performances atteintes sont semblables aux systèmes d'OCT plein champ conventionnels, et qu'elles sont similaires dans trois bandes spectrales différentes qui s'étendent sur une plage de longueurs d'onde allant de 530nm à 1700nm.

2.5 Applications de l'imagerie multispectrale

L'analyse de la réponse spectrale de certains échantillons peut, comme on l'a mentionné en introduction, permettre de révéler une information indétectable autrement. Le système d'imagerie en trois dimensions, développé dans ce chapitre, capable de réaliser des images à haute résolution spatiale dans trois bandes spectrales différentes réparties sur un intervalle spectral global très étendu, permet d'apporter un contraste spectroscopique et spatial inédit.

Les applications présentées par la suite ont pour objectif de mettre en évidence deux types d'informations accessibles grâce à l'imagerie dans les trois bandes spectrales sélectionnées : l'identification de structures fines par contraste augmenté et la différenciation d'échantillons.

2.5.1 Amélioration du contraste des images

La détection de structures présentes dans un échantillon du fait de leur réponse spectrale particulière est particulièrement bien adaptée aux éléments dont les propriétés d'absorption ou de réflexion se différencient de celles du milieu environnant. L'identification de vaisseaux sanguins (HbO_2), qui possèdent une absorption spécifique autour de $\lambda = 680\text{nm}$ [Fab05], ou des mélanomes de la peau [Mor00, Dub08] sont des exemples d'applications potentielles. En ce qui concerne les échantillons non biologiques, les œuvres d'art riches en pigments de peinture ont également un intérêt certain. Des travaux, étudiant ce type d'échantillons, ont été menés en OCT [Lat09, Lia11], mais avec des résolutions spatiales ou des étendues spectrales inférieures à celles obtenues avec notre montage d'OCT plein champ.

La capacité du système d'imagerie présenté ici, est illustrée en reconstituant un échantillon diffusant constitué de structures absorbantes. On utilise pour cela un morceau de bois sur lequel on vient déposer deux pigments de peinture différents, l'un correspondant à du bleu de Prusse tandis que le second pigment est de couleur bleu de céruléum, dont les courbes de transparence sont indiquées en figure 2.17.

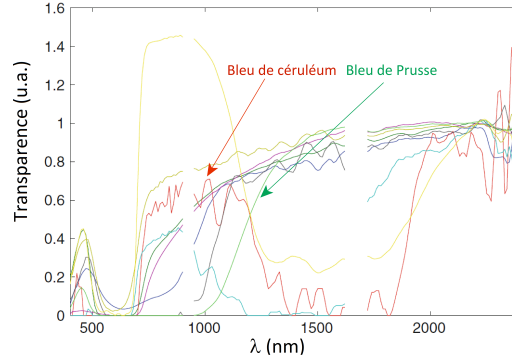


FIGURE 2.17 – Courbes de transparence des pigments de peinture bleu de céruléum et bleu de Prusse. Modifié depuis [Lia13].

On acquiert une image en trois dimensions dans chacune des trois bandes spectrales, en ajustant les réglages comme expliqué précédemment, puis on juxtapose ces trois images afin de produire une image en fausses couleurs, codée selon la représentation RVB, chaque bande étant associée à une couleur (bande 1 = bleu, bande 2 = vert, bande 3 = rouge).

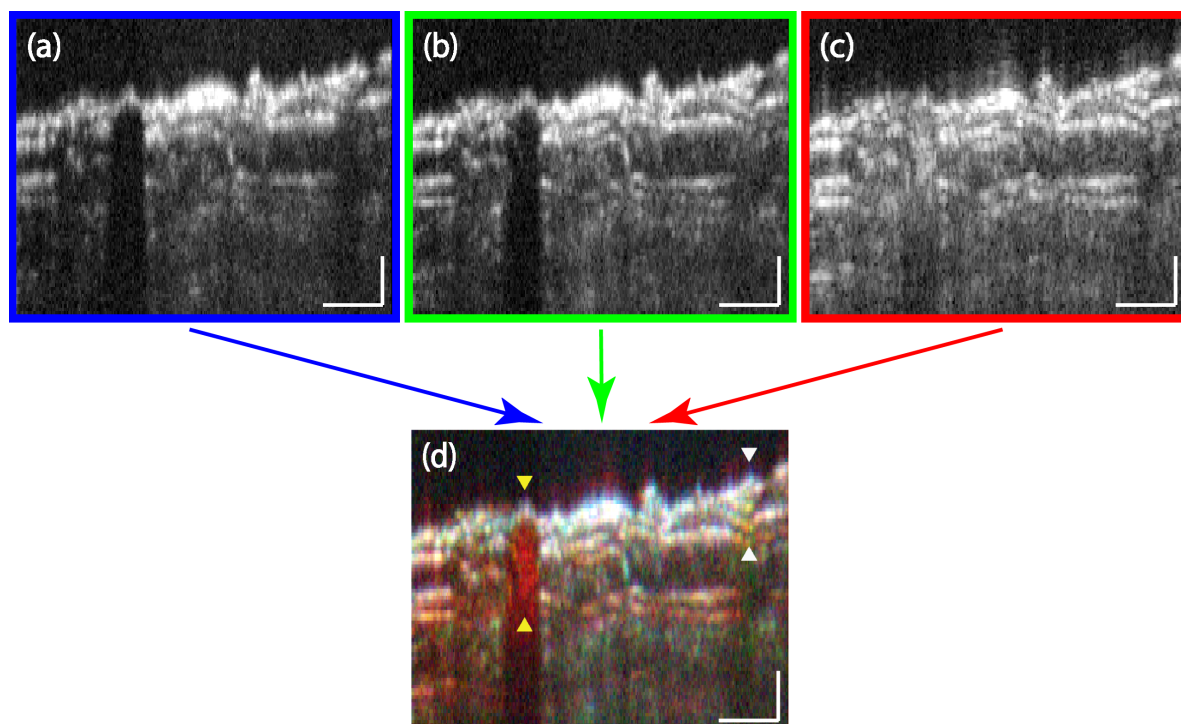


FIGURE 2.18 – Coupes transverses d'un échantillon de bois contenant un pigment de peinture de couleur bleu de Prusse et un pigment de peinture de couleur bleu de céruléum dans la bande 1 (a), dans la bande 2 (b) et dans la bande 3 (c). (d) : image en fausses couleurs, codée en représentation RVB, des trois images (a), (b) et (c) juxtaposées. Les flèches indiquent la position des deux pigments ainsi que la position des coupes réalisées et présentées en figure 2.19. Les barres d'échelle valent $50\mu\text{m}$ selon l'axe Ox et $10\mu\text{m}$ selon l'axe Oz .

Puisque la réflectivité du bois ne varie pas de façon significative sur le spectre global considéré, la surface de l'échantillon apparaît globalement blanche dans l'image en couleur. On distingue cependant deux zones colorées, une en rouge et une en verte, qui correspondent chacune à l'emplacement d'un pigment de peinture. Alors qu'il est impossible de détecter simultanément la taille et la position des deux pigments avec une ou deux images associées à une bande spectrale, le contraste RVB permet d'accéder à ces deux informations.

On note également la présence d'une teinte rouge à la surface de l'échantillon dans l'image colorée (Fig. 2.18d). Cela est dû à la présence de rebonds dans l'interférogramme de la bande trois (voir Fig. 2.13d) provenant de l'allure assez raide de la courbe de transmission de certains filtres employés.

Afin de préciser l'identification de ces pigments, on trace les profils d'intensité le long d'une ligne indiqué en figure 2.18d :

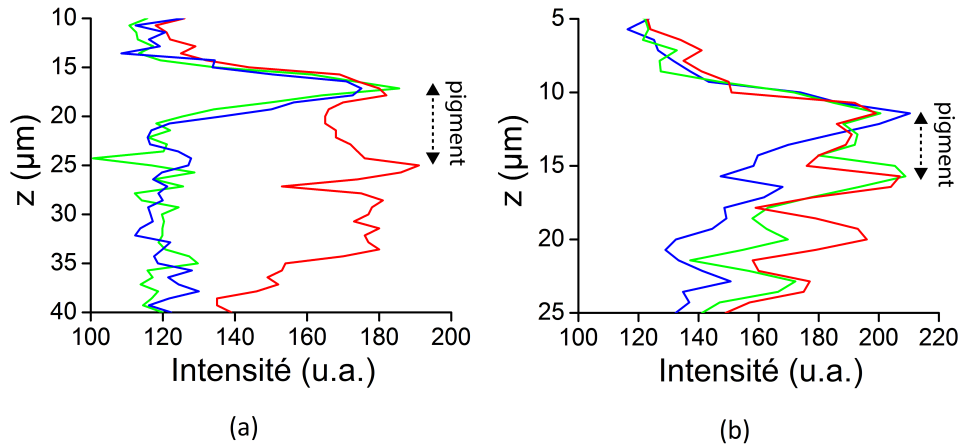


FIGURE 2.19 – Profils d'intensité mesurés à partir de l'image de la figure 2.18d. Un des pigments absorbe davantage la lumière des bandes 1 et 2 (a), alors que le second absorbe essentiellement la lumière visible et infrarouge, au-delà de $1,3\mu\text{m}$ (b).

Cela confirme qu'un des pigments absorbe davantage la lumière des bandes 1 et 2, et apparaît donc rouge, alors que le second absorbe essentiellement la lumière visible et infrarouge, au-delà de $1,3\mu\text{m}$, et apparaît donc verdâtre sur l'image en fausses couleurs RVB ; tout cela en accord avec les courbes d'absorption des peintures à l'huile de couleurs bleue de Prusse et bleue de céruléum.

2.5.2 Différenciation d'échantillons

En plus de la détection et identification de structures absorbantes, l'imagerie en OCT plein champ dans trois bandes spectrales étendues et distinctes peut également s'appliquer à la différenciation et la caractérisation d'échantillons. On illustre cela en présentant des images de cheveux de couleur différente.

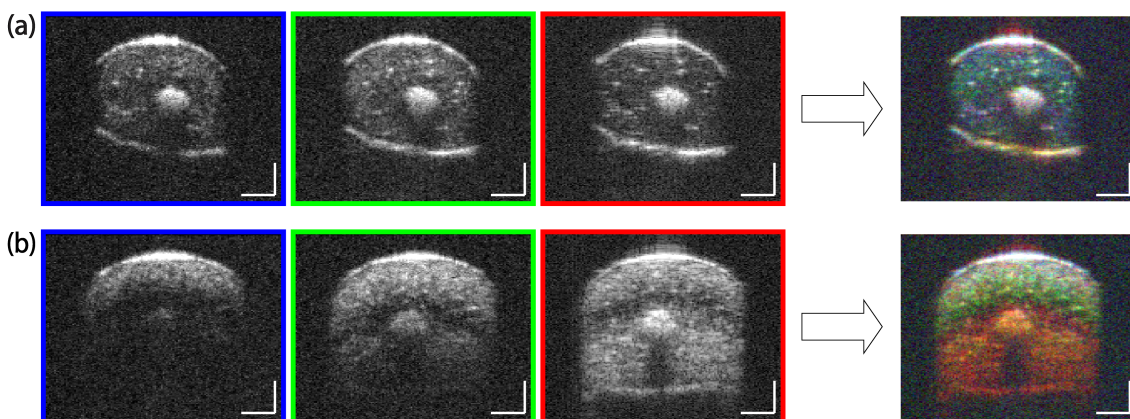


FIGURE 2.20 – Coupes transverses (xz) d'une image d'OCT plein champ d'un cheveu blanc (a) et un cheveu brun (b). De gauche à droite : dans la bande 1, bande 2, bande 3 et avec une représentation en couleur selon le codage RVB. Les barres d'échelle valent $20\mu\text{m}$ dans les deux directions.

La teinte d'un cheveu est relative à la proportion de pigments de mélanine qu'il contient. Puisque la mélanine, ou plus précisément l'eumélanine, absorbe davantage la lumière aux courtes longueurs d'onde, le cheveu brun absorbe de façon plus importante la lumière visible que celle du domaine infrarouge [Sim98, Bas05]. De son côté l'absorption du cheveu blanc ne varie que très peu selon la bande spectrale considérée. Cela explique la différence entre les deux images colorées : après une certaine épaisseur, seule la lumière infrarouge est réfléchiée et le cheveu noir apparaît rougeâtre alors que la seconde interface du cheveu blanc apparaît toujours blanc.

Chez les animaux, il existe deux sortes de pigments de mélanine : l'eumélanine et la phéomélanine. La principale différence entre ces deux types de pigments réside dans leur couleur et leur composition chimique [Ito83]. Alors que l'eumélanine prédomine fortement dans les cheveux ou poils châtain (marrons) à bruns (noirs), les cheveux blonds et roux sont majoritairement constitués de phéomélanine [Ito83, Wan95]. La couleur des cheveux dépend des pigments présents mais également de leur concentration. Les cheveux blanc sont caractérisés, pour leur part, par l'absence de tout pigment de mélanine [Wan95].

D'après les mesures effectuées sur des échantillons de peau [Sim98], les différences de coefficients d'absorption, entre deux concentrations différentes de pigments, est bien plus importante que celles entre les coefficients de diffusion. On en déduit donc que l'absorption est principalement responsable des nuances de teintes observées entre les deux images colorées obtenues. L'effet de la diffusion renforce néanmoins cette différence puisqu'une concentration élevée de pigments favorise les diffusions multiples au sein de l'échantillon. Cela explique notamment le signal diffus présent en profondeur dans l'image du cheveu brun qui brouille le signal issu de la seconde interface. On constate d'autre part que cette seconde interface n'apparaît pas aussi courbée que la première, ce qui est attribué à des inhomogénéités dans l'échantillon, en particulier celles de l'indice de réfraction.

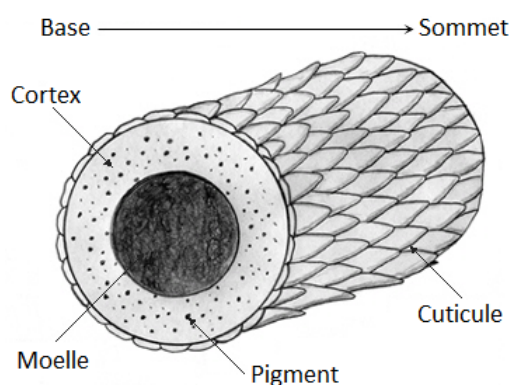


FIGURE 2.21 – *Structure transversale d'un cheveu.*

La structure d'un cheveu comprend, en effet, trois parties : le cortex, la moelle et le cuticule (voir Fig. 2.21).

Le cuticule est la partie externe du cheveu et est relativement fine chez l'homme par rapport aux autres animaux. Le cortex est, lui, le constituant principal ; c'est lui qui contient les pigments de mélanine. Enfin, la moelle est située au centre du cheveu, lorsqu'elle est présente. Elle peut être composée de cellules ou de pigments plus ou moins concentrés. [Wan95]

2.6 Conclusion

Nous avons donc réalisé un système d'OCT plein champ achromatique capable d'atteindre une résolution axiale élevée pour trois bandes spectrales différentes qui couvrent une plage de longueurs d'onde globale s'étendant de 530nm à 1700nm. Un soin particulier a été attaché à l'obtention de performances similaires dans chacune des bandes, afin de garantir une superposition optimale des images.

Le système fournit ainsi une résolution axiale de $1,9\mu\text{m}$, une résolution latérale de $2,4\mu\text{m}$ et une sensibilité de détection proche de -71dB dans les trois configurations spectrales. On atteint donc des performances semblables à l'OCT plein champ conventionnel, mais sur un intervalle spectral bien plus étendu. De plus, un système de compensation dynamique des différences de dispersion a été implémenté, garantissant la conservation de ces performances, y compris pour des images en profondeur.

En comparaison des systèmes d'OCT plein champ ne considérant qu'une ou deux bandes spectrales d'imagerie, la modalité présentée ici permet d'accroître la quantité d'information extraite à partir des images réalisées, en améliorant leur contraste ou en mettant en évidence des différences grâce à une information de type spectroscopique. Une application potentielle serait destinée à l'identification de zones de tissus tumorales, comme des mélanomes de la peau par exemple. De plus, l'utilisation d'une seule caméra et d'une seule source de lumière différencie ce montage des autres techniques d'OCT plein champ multibandes [Sac08, Yu04] et facilite donc son utilisation, tout en réduisant son coût de développement.

Bien que le changement des filtres optiques et de la lentille de tube puisse être effectué rapidement, cela n'est cependant pas suffisant pour atteindre une vitesse d'acquisition d'une image colorée en trois dimensions adaptée à l'imagerie *in vivo*, et seuls des échantillons biologiques *ex vivo* ont pu être utilisés. D'autre part, le lien étroit entre la résolution axiale et la largeur des bandes spectrales ne permet pas d'offrir une résolution spectrale importante, ce qui limite quelque peu l'étude spectroscopique.

Néanmoins la possibilité d'augmenter très simplement le nombre de bandes spectrales considérées pourrait permettre d'accroître cette résolution spectrale, en utilisant une multitudes de bandes plus étroites, au détriment cependant de la résolution axiale et de la vitesse d'exécution. Outre une information spectroscopique enrichie, une étude du phénomène de diffusion d'après la théorie de Mie pourrait conduire à la caractérisation de certaines structures présentes dans l'échantillon. En effet, comme on l'a vu lors du premier chapitre, la variation du coefficient de rétrodiffusion d'une particule sphérique en fonction de la longueur d'onde (voir Fig. 1.3) (ou même en fonction de la distribution angulaire du champ incident) donnerait accès à l'évaluation de sa dimension en étudiant sa réponse spectrale. Certains travaux ont d'ailleurs déjà exploités ce principe, pour l'analyse d'échantillons biologiques en OCT [Adl04, Wax01].

Chapitre 3

L'OCT plein champ à très haute résolution

“Je me fiche de savoir pourquoi sont conçues les choses.
C'est ce qu'elles peuvent faire qui compte.”

Gene Krantz dans *Apollo 13*

Sommaire

3.1	Introduction	79
3.2	Théorie de la résolution axiale en OCT adaptée à un large spectre	81
3.2.1	Formulation exacte de la résolution axiale Δz	81
3.2.2	Influence de l'allure de la densité spectrale de puissance sur la réponse impulsienne axiale	83
3.2.3	Influence de l'ouverture numérique sur l'expression de la résolution axiale	84
3.3	Effet de la cohérence spatiale sur le contraste du signal interférométrique	88
3.4	La dispersion en OCT plein champ	93
3.4.1	Calcul de la résolution axiale en présence de différences de dispersion	94
3.4.2	Mise en évidence d'une configuration spectrale optimale	101
3.4.3	L'OCT plein champ à sectionnement axial exclusivement angulaire	103
3.5	Dispositif expérimental	105
3.5.1	Mise en pratique d'une configuration spectrale optimale	107
3.5.2	Images d'échantillons biologiques épais	110
3.6	Application à l'imagerie cellulaire et illumination en fond noir	114
3.7	Conclusion	120

Les systèmes de microscopie de "super résolution", mentionnés dans l'introduction de ce manuscrit, permettent de surpasser la limite de résolution imposée par la diffraction, mais sont généralement soit toxiques pour les échantillons, soit relativement superficiels en termes de profondeur d'imagerie. Il existe d'autres systèmes d'imagerie dont la résolution spatiale est de l'ordre du micromètre, mais qui permettent néanmoins l'acquisition d'images en trois dimensions d'échantillons épais et diffusants et cela, de manière non invasive.

C'est le cas de l'OCT, la microscopie confocale [Paw06, Raj95] ou la microscopie non linéaire de génération de second harmonique (SHG) [Cam01, Oli10] et de génération de troisième harmonique (THG) [Oli10], dont la résolution latérale est limitée par le phénomène de diffraction de la lumière. Cette capacité à imager en profondeur est due à la possibilité de sectionner axialement le signal rétrodiffusé, en utilisant les propriétés de cohérence temporelle (OCT) ou spatiale (confocal) du champ lumineux, ou bien des phénomènes non linéaires (SHG, THG). Des images en trois dimensions sont donc réalisées de manière non invasive et donc bien adaptées à l'imagerie de tissus vivants *in situ*, sans qu'il ne soit nécessaire d'impacter physiquement l'échantillon ou d'utiliser de marquages spécifiques. Nous nous intéresserons plus particulièrement à la comparaison entre l'OCT et la microscopie confocale, qui possèdent de nombreuses applications en commun.

Le caractère interférométrique d'un système OCT lui confère un avantage certain en ce qui concerne la sensibilité de détection par rapport à la microscopie confocale. En effet la détection homodyne, utilisée en OCT et en OCT plein champ, augmente de plusieurs dizaines de décibels cette sensibilité si on la compare à celle d'un microscope confocal qui est, quant à lui, seulement sensible à l'intensité au carré du signal rétrodiffusé par l'échantillon.

L'atout majeur d'un microscope confocal réside dans sa capacité à obtenir une résolution latérale très élevée, de l'ordre de $0,5 \mu\text{m}$, de par l'utilisation d'un objectif de microscope à grande ouverture numérique.

La production d'images tridimensionnelles à haute résolution imposant une résolution spatiale élevée dans les trois directions de l'espace, le principe même de l'OCT, qui utilise les propriétés spectrales de la source de lumière, garantit une réponse impulsionnelle axiale de meilleure qualité et semble donc mieux adapté à la réalisation de coupes tomographiques à haute résolution axiale.

L'utilisation d'objectifs de microscope à grande ouverture numérique dans un système d'OCT plein champ, permet donc de réunir les avantages des deux méthodes et de réaliser un microscope à haute résolution spatiale isotrope, adapté à l'imagerie de tissus biologiques en profondeur.

3.1 Introduction

Le lien direct entre la réponse impulsionnelle (notée RI) axiale du système d'imagerie et la densité spectrale de puissance (DSP) effective de détection est une particularité des techniques d'OCT, qui permet non seulement d'obtenir une RI axiale d'allure gaussienne, ce qui est approprié à l'imagerie tomographique en trois dimensions, mais également d'entraîner une quasi-indépendance entre la résolution axiale et l'ouverture numérique des objectifs de microscope (voir la sous-section 1.5.2 du premier chapitre).

Cette caractéristique permet donc d'atteindre des résolutions axiales élevées, submicrométriques, quand bien même l'ouverture numérique et donc la résolution latérale est relativement faible. C'est ainsi qu'en utilisant une lampe halogène et un détecteur possédant une zone de sensibilité étendue, une résolution axiale de $0,9 \mu\text{m}$ (dans l'air) a été atteinte en OCT plein champ [Dub04], ce qui constitue la meilleure résolution axiale obtenue jusqu'à présent avec cette technique. Une valeur similaire et même supérieure de $0,7 \mu\text{m}$ a été démontrée en FD-OCT [Pov02] en utilisant un laser supercontinuum comme source de lumière, dont le spectre d'émission est

centré autour 700nm et de largeur à mi-hauteur 325nm. Cependant la forme irrégulière et non lisse du spectre d'émission engendre la présence de rebonds importants dans la RI axiale, qui dégrade non seulement la résolution axiale, mais également le rapport signal sur bruit (noté RSB) d'après le principe de conservation d'énergie.

L'allure du spectre d'émission de la source, tout comme la réponse spectrale du détecteur, sont, en effet, des paramètres capitaux à l'obtention d'une RI axiale étroite et dépourvue de rebonds, puisque cette dernière correspond à la transformée de Fourier de la DSP effective de détection. Or, les sources spatialement cohérentes, comme celles utilisées en OCT à balayage, dont le spectre d'émission est large de plus de 200nm, produisent généralement ces effets indésirables, qu'il s'agisse de lasers à impulsions ultra courtes [Bou95], de diodes superluminescentes (SLD) [Ko04], ou de lasers supercontinuum [Nis04]. L'emploi d'une source incohérente spatialement telle que les diodes électroluminescentes (DEL) ou les lampes halogènes, permet de disposer d'un spectre d'émission lisse et régulier qui convient bien aux systèmes OCT à haute résolution.

La très large bande spectrale d'émission d'une lampe halogène est particulièrement appréciable puisqu'elle prévient une limitation due à la source lumineuse et permet, selon le détecteur utilisé, de jouir d'un intervalle spectral conséquent dont on peut facilement optimiser les caractéristiques en insérant différents filtres optiques. L'OCT plein champ apparaît donc être une technique privilégiée afin d'atteindre une résolution axiale importante tout en garantissant une réponse impulsionnelle axiale d'allure convenable.

Si l'on souhaite, par ailleurs, atteindre une résolution latérale importante, comme c'est le cas dans ce chapitre, l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique est nécessaire puisque la résolution latérale est inversement proportionnelle à cette dernière.

L'acquisition d'images *en-face* et la possibilité d'ajuster dynamiquement la mise au point au cours d'une acquisition, que ce soit en TD-OCT à balayage ou en OCT plein champ, est alors plus adaptée. En ce qui concerne les montages de FD-OCT, l'existence du compromis entre résolution latérale et profondeur d'imagerie (voir la sous-section 1.4.2) limite ces systèmes à l'utilisation d'objectifs de microscope à ouverture numérique relativement réduite. En effet, il est difficilement concevable d'utiliser des objectifs d'ouverture numérique supérieure à 1 dont la profondeur de champ est généralement inférieure à $3\mu\text{m}$.

L'association d'un montage de TD-OCT à balayage à une détection de type confocale permet de s'affranchir d'une partie de la lumière hors du plan d'imagerie [Agu08]. Des résolutions latérales de l'ordre de $2\mu\text{m}$ peuvent être obtenues [Agu03] grâce à l'emploi d'objectifs d'ouverture numérique 0,22. On parle alors de systèmes OCM (pour *Optical Coherence Microscopy* en anglais, ou microscopie par cohérence optique) plutôt que d'OCT, lorsque de telles résolutions latérales sont atteintes.

Cependant cette modalité utilise une source de lumière cohérente spatialement et requiert deux balayages transverses. En OCT plein champ, une source faiblement cohérente spatialement est employée, telle qu'une lampe halogène ou une diode électroluminescente (DEL). Par conséquent une illumination plein champ, ne nécessitant pas de balayages transverses, est réalisable tout en garantissant une densité spectrale de puissance étendue et lisse.

Fort de ces atouts, l'OCT plein champ apparaît donc comme la technique la mieux adaptée au développement d'un montage d'OCT à très haute résolution axiale et latérale en utilisant des

objectifs à immersion d'ouverture numérique supérieure à 1. Quelques expériences utilisant de tels objectifs ont déjà été publiées [Cho10, Saf12], mais la résolution axiale était dans les deux cas inférieure à $1\mu\text{m}$. L'intérêt étant porté sur l'imagerie de phase dans [Cho10], et la sensibilité de détection demeurant insuffisante dans [Saf12], aucune image en amplitude suffisamment contrastée d'échantillons diffusants n'ont été présentées. Un dispositif utilisant un objectif de Mirau avec une ouverture numérique de [Tsa14] a de son côté permis de réaliser des images en amplitude d'échantillons de peau, mais avec une résolution axiale limitée à $1,2\mu\text{m}$ dans l'air.

On entreprend donc de développer un montage d'OCT plein champ (ou OCM plein champ) réalisant des images d'échantillons biologiques en profondeur et dont la résolution est $\sim 0,65\mu\text{m}$ ($\Leftrightarrow 0,5\mu\text{m}$ dans l'eau) dans les trois directions avec une sensibilité de détection similaire à l'OCT plein champ conventionnel. On étudiera pour cela les enjeux liés à l'expression de la résolution axiale en OCT, comme le phénomène de dispersion et de sectionnement angulaire lorsque l'ouverture numérique des objectifs est élevée, puis on cherchera à optimiser cette résolution pour des conditions adaptées à l'imagerie optique des milieux biologiques.

3.2 Théorie de la résolution axiale en OCT adaptée à un large spectre

3.2.1 Formulation exacte de la résolution axiale Δz

Comme on l'a dit dans le premier chapitre, en négligeant l'effet dû à l'ouverture numérique des objectifs ou en considérant une faible ouverture numérique, la résolution axiale en OCT est proportionnelle à la longueur de cohérence temporelle. Elle est alors habituellement [Bou95, Dub02, Fer01] exprimée d'après la formule approximative (3.1) :

$$\Delta z = \frac{2ln2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (3.1)$$

Cette formule présume un spectre gaussien en fréquence, centré en $\lambda = \lambda_0$ et de largeur $\Delta\lambda = \lambda_{max} - \lambda_{min}$ suffisamment réduite pour qu'on puisse supposer l'égalité $\lambda_0^2 = \lambda_{min}\lambda_{max}$. Cette formule n'étant qu'approximative, et valide dans un cas non adapté ici, il est nécessaire de reformuler l'expression exacte de l'intensité du signal détecté.

Une façon simplifiée, mais équivalente, d'exprimer l'intensité détectée en OCT, par rapport aux équations du chapitre 1 (voir la sous-section 1.4.1), est de noter U_1 et U_2 l'amplitude des champs réfléchis par la surface de référence et l'échantillon respectivement, et d'utiliser la fonction de corrélation $\tau \rightarrow \Gamma(\tau) = \langle U_1(t)U_2(t+\tau) \rangle_t$, où τ correspond au retard temporel de l'onde issue du bras échantillon introduit par une différence de marche non nulle entre les deux bras. L'intensité mesurée par chaque pixel du détecteur s'écrit alors :

$$\begin{aligned} I(\tau) &= \left\langle |U_1(t) + U_2(t+\tau)|^2 \right\rangle_t \\ &= \left\langle |U_1(t)|^2 \right\rangle_t + \left\langle |U_2(t+\tau)|^2 \right\rangle_t + \Gamma(\tau) + \Gamma^*(\tau) \\ &= I_1(t) + I_2(t+\tau) + 2\Re(\Gamma(\tau)) \end{aligned} \quad (3.2)$$

La fonction d'autocorrélation Γ , également appelée fonction de cohérence, correspond au signal utile mesuré en OCT. En considérant que $U_1 = U_2 = U$, d'après le théorème de Wiener-Khinchine, la densité spectrale de puissance $\omega \rightarrow S(\omega) = |U(\omega)|^2$ est égale à la transformée de Fourier de la fonction Γ :

$$\Gamma(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) e^{-i\omega\tau} d\omega \quad (3.3)$$

On suppose une densité spectrale de puissance suivant une distribution gaussienne en fréquence, et s'exprimant en fonction de la pulsation ω de la façon suivante :

$$S(\omega) = \exp \left[-4 \ln 2 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{\Delta\omega^2} \right]$$

On en déduit donc que :

$$\begin{aligned} \Gamma(\tau) &= \frac{\Delta\omega}{4\sqrt{\pi \ln 2}} \exp \left(-\tau^2 \frac{\Delta\omega^2}{16 \ln 2} \right) \\ \Leftrightarrow \Gamma(\tau) &= \frac{\Delta\omega}{4\sqrt{\pi \ln 2}} \exp \left(-4 \ln 2 \frac{\tau^2}{\Delta\tau^2} \right), \quad \text{avec} \quad \Delta\tau = \frac{8 \ln 2}{\Delta\omega} \end{aligned} \quad (3.4)$$

La durée de cohérence temporelle τ_c est donc égale à $\frac{8 \ln 2}{\Delta\omega}$, et la longueur de cohérence temporelle $l_c = c\tau_c$, où c est la célérité de la lumière dans le vide, vaut donc :

$$l_c = \frac{4 \ln 2}{\pi} \frac{1}{\Delta\sigma}, \quad \text{avec} \quad \sigma = \frac{1}{\lambda} = \frac{\omega}{2\pi c} \quad (3.5)$$

On en déduit ainsi la formule exacte de la résolution axiale en OCT, sous l'hypothèse d'une distribution spectrale gaussienne en fréquence :

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{1}{\Delta\sigma}, \quad \text{avec} \quad \sigma = \frac{1}{\lambda} \quad (3.6)$$

On peut alors exprimer la résolution axiale en fonction de deux variables λ_{min} et λ_{max} , qui définissent la largeur spectral $\Delta\lambda$:

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_{min} \lambda_{max}}{\Delta\lambda} \quad (3.7)$$

On en conclut donc que pour une largeur $\Delta\lambda$ donnée, plus la longueur d'onde minimale λ_{min} est faible, meilleure est la résolution. Par conséquent, afin d'évaluer la configuration qui correspond à une résolution axiale maximale, on choisit de fixer λ_{min} à une valeur relativement faible puis on étudie la valeur optimale correspondante de λ_{max} . Cela revient donc à étudier l'évolution d'une fonction à une variable (*i.e.* λ_{max}) qui s'écrit de la façon suivante :

$$x \rightarrow f_a(x) = K \frac{a \lambda_{max}}{x - a}, \quad \text{définie sur l'intervalle} \quad]a; +\infty[\quad , \quad (3.8)$$

où K et a sont des constantes, a étant égal à λ_{min} . Etant donné l'intervalle de longueurs d'onde optimal, défini comme "fenêtre thérapeutique" (voir chapitre 1), pour l'imagerie optique d'échantillons biologiques, on choisit de fixer $\lambda_{min} = 500 \text{ nm}$.

La fonction f_a étant strictement décroissante sur l'intervalle considéré (voir Fig. 3.1b), il n'y a pas d'optimum de résolution axiale pour une densité spectrale de puissance possédant une distribution gaussienne en fréquence, la résolution augmentant à mesure que l'intervalle spectral s'élargit.

On calcule numériquement les interférogrammes reliés à différents spectres gaussiens en fréquence. Afin d'étudier l'évolution de la résolution lorsque λ_{min} est fixé, on choisit des spectres dont les densités spectrales de puissance sont toutes identiques en $\lambda = 500nm$ (voir 3.1a). A partir de ces interférogrammes et du calcul de son enveloppe, on mesure la résolution axiale considérée ici comme la largeur à mi-hauteur de cette enveloppe. On présente en figure 3.1, l'allure de ces spectres en fonction de la longueur d'onde ainsi que l'évolution de Δz d'après les simulations et selon l'expression théorique (3.7). Ces dernières correspondent bien et confirment la monotonie de la fonction f_a .

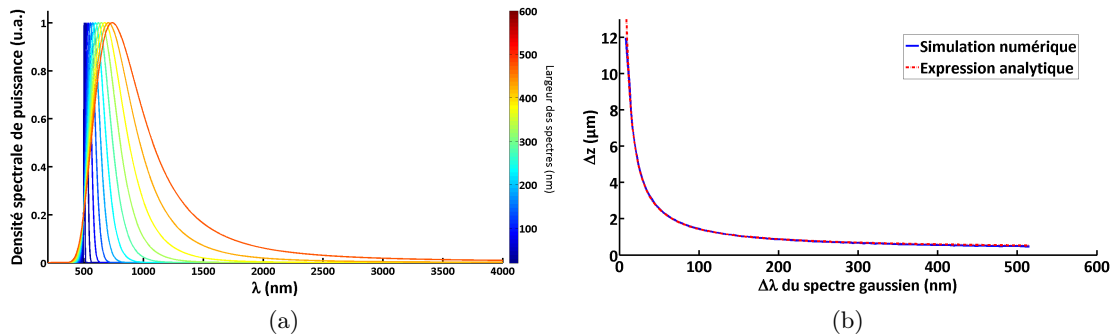


FIGURE 3.1 – (a) : spectres gaussiens en fréquence considérés en fonction de la longueur d'onde λ , (b) : évolution de la résolution Δz en fonction de la largeur spectrale $\Delta\lambda$. La courbe bleue est issue des simulations numériques alors que la rouge découle de (3.7)

On notera également que lorsqu'ils sont exprimés en fonction de la longueur d'onde, les spectres ne sont pas gaussiens puisque $\sigma = 1/\lambda$. Plus les spectres s'élargissent, plus leur allure s'éloigne d'une allure gaussienne. Ces allures restant néanmoins similaires aux allures des courbes de transmission de la plupart des filtres optiques, ces distributions spectrales demeurent pertinentes et appropriées à l'étude menée.

Dans le cas où on considère la formule approximative (3.1), en fixant de la même façon λ_{min} et en faisant varier uniquement λ_{max} après avoir réécrit $\lambda_0 = (\lambda_{max} + \lambda_{min})/2$, on identifie une configuration optimale correspondant à $\lambda_{max} = 3\lambda_{min}$. Ce résultat erroné dans le cas d'un spectre large justifie donc l'emploi de formule exacte (3.7) pour l'étude de notre montage.

Nota bene : Au-delà d'une certaine valeur de $\Delta\lambda$, l'interférogramme est si étroit qu'il n'est plus possible de mesurer une résolution axiale d'après la définition établie précédemment. Cela représente un cas physique limite, pour lequel l'interférogramme est constitué de moins d'une période d'oscillation du champ électromagnétique.

3.2.2 Influence de l'allure de la densité spectrale de puissance sur la réponse impulsionnelle axiale

Une distribution gaussienne en fréquence de la densité spectrale de puissance constitue un cas idéal puisque la fonction de cohérence Γ est ainsi également d'allure gaussienne, garantissant une enveloppe de l'interférogramme lisse et régulière et une résolution axiale limitée par transformée de Fourier. Cette relation directe attribue à la forme de la DSP un rôle important dans l'obtention d'une réponse impulsionnelle axiale étroite et de qualité, c'est-à-dire dépourvue de rebonds.

Lors du choix des filtres optiques à insérer dans le système d'illumination afin de modéliser la DSP effective finale, on doit donc veiller à ne pas introduire de défauts dans le spectre qui pourraient nuire à la RI. Si l'on utilise un filtre interférentiel abrupt, à l'instar de l'exemple d'un spectre carré (voir Fig. 3.2b(2)), cela entraînera des rebonds importants et semblables à ceux présents dans la fonction *sinus cardinal*. Si la transmission du filtre est régulière mais présente des stries, cela perturbe également la forme de l'enveloppe (voir Fig. 3.2b(3)). Afin d'illustrer cela, on présente en figure 3.2b le signal interférométrique et son enveloppe dans les trois cas représentatifs des RI en OCT.

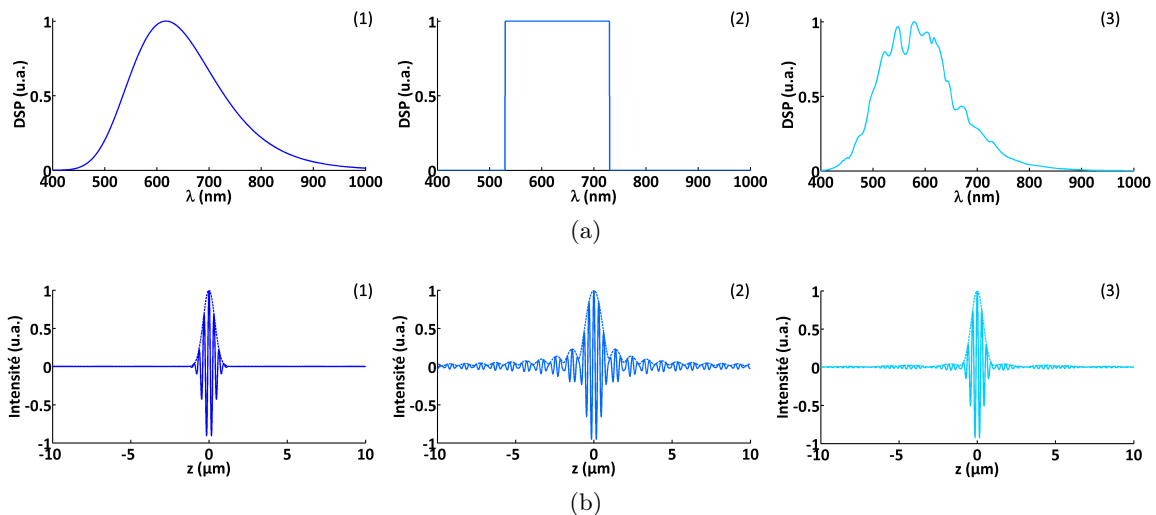


FIGURE 3.2 – (a) : densités spectrales de puissance (DSP) d'une distribution gaussienne en fréquence (1), carrée (2) et gaussienne en fréquence mais striée (3), toutes de largeurs à mi-hauteur identique, tracées en fonction de λ . (b) : interférogrammes correspondant au spectres de (a).

On observe donc bien un sectionnement plus efficace lorsque l'allure de l'enveloppe est gaussienne. Cela est rendu possible en OCT puisque la réponse impulsionnelle axiale est la transformée de Fourier de la DSP. En microscopie confocale par exemple, pour laquelle le sectionnement est dû à la profondeur de champ, la RI axiale suit l'allure d'un sinus cardinal au carré [Mul06] et n'est donc pas optimale. Etudions à présent l'influence de l'ouverture numérique des objectifs de microscope en OCT et notamment son effet de sectionnement angulaire sur la réponse impulsionnelle axiale.

3.2.3 Influence de l'ouverture numérique sur l'expression de la résolution axiale

L'ouverture numérique déterminant la profondeur de champ des objectifs, elle induit un sectionnement axial du signal, qui est utilisé en microscopie confocale notamment. On parle alors de sectionnement angulaire par opposition au sectionnement temporel qui est, de son côté, relatif aux propriétés spectrales du champ et qui est à la base des systèmes OCT.

En OCT la capacité de sectionnement angulaire s'associe donc au sectionnement temporel. L'influence de ce sectionnement angulaire sur la RI axiale dépend du rapport entre la profondeur de champ des objectifs et la longueur de cohérence temporelle, cette dernière prédominant largement dans la plupart des systèmes OCT, aussi bien en OCT plein champ qu'en FD-OCT. Dans ce cas, l'effet de l'ouverture numérique peut être négligé. Cependant, l'utilisation d'objectifs à grande ouverture numérique impose de s'intéresser plus en détail à ses conséquences induites sur le signal interférométrique.

On précise, au préalable, que pour le cas d'une source monochromatique, l'ensemble de la théorie, développée dans cette sous-section, est largement issue de la littérature et notamment de l'article [Dub00]. Comment cela a donc été montré, en supposant une source de lumière monochromatique et un angle d'inclinaison des rayons, variant de 0 à θ_{max} , avec $ON = \sin(\theta_{max})$, la fonction d'autocorrélation Γ_λ s'exprime de la façon suivante [She95, Dub00, Abd12] :

$$\Gamma_\lambda(z) = \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos[2kz\cos(\theta) + \varphi] \cos(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (3.9)$$

De cette équation exacte, en accord avec la théorie de Richards and Wolf [Ric59], et qui suppose que la réflectivité de la surface de référence et de l'échantillon ne dépend pas de l'angle θ du rayon incident, on peut en déduire une expression analytique suivante :

$$\Gamma_\lambda(z) = \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \left(\frac{\cos(2kz + \varphi) - \cos[2kz\cos(\theta_{max}) + \varphi]}{4k^2 z^2} + \frac{\sin(2kz + \varphi)\cos(\theta_{max})\sin[2kz\cos(\theta_{max}) + \varphi]}{2kz} \right) \quad (3.10)$$

Cette formule exacte sera utile pour les simulations numériques. En revanche elle est difficile à exploiter analytiquement, c'est la raison pour laquelle on décide d'utiliser l'approximation d'un angle θ_{max} suffisamment faible pour que $\cos(\theta_{max}) = 1$ dans l'équation (3.9). Bien qu'elle ne semble pas appropriée à l'étude qu'on souhaite mener concernant les grandes ouvertures numériques, on verra en fait que cette approximation ne modifie pas fondamentalement les résultats et nous permet surtout d'explicitier plus clairement les enjeux de l'effet de l'ouverture, qui est le propos principal de cette sous-section. L'application de cette approximation conduit à

l'expression de la fonction de corrélation, $\Gamma_{\lambda,ap}$, suivante :

$$\Gamma_{\lambda,ap}(z) = \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos [2kz \cos(\theta) + \varphi] \sin(\theta) d\theta \quad (3.11)$$

$$\Leftrightarrow \Gamma_{\lambda,ap}(z) = \frac{2}{1 + \cos(\theta_{max})} V_{ON}(z) \cos [kz(1 + \cos(\theta_{max}) + \varphi)], \quad (3.12)$$

$$\text{avec } V_{ON}(z) = \text{sinc} [kz(1 - \cos(\theta_{max}))]$$

L'équation (3.12) permet donc de mettre en évidence l'influence de l'ouverture numérique sur le signal interférométrique dont la source est, on le rappelle, supposée monochromatique.

Deux facteurs retiennent ici notre attention : d'une part, l'enveloppe V_{ON} du signal interférométrique qui est une fonction *sinus cardinal* dont les annulations sont directement liées à θ_{max} (et donc à l'ouverture numérique) et d'autre part la période du signal (contenue dans le terme en *cosinus*), c'est-à-dire l'interfrange, qui est modifiée par rapport au cas où l'effet de l'ouverture numérique est négligé.

Comme cela est bien connu dans la littérature, et qui concerne notamment les mesures de phases réalisées à grandes ouvertures comme nous aurons l'occasion d'en parler plus précisément dans le chapitre 4, la période du signal interférométrique, notée Λ , qui vaut $\lambda/2$ lorsque l'ouverture numérique est considérée nulle, est modifiée par un facteur α_{ON} de la façon suivante :

$$\Lambda = \frac{\lambda}{2\alpha_{ON}} = \frac{\lambda}{2} \frac{2}{1 + \cos(\arcsin(ON))} \quad (3.13)$$

Les conséquences de la présence d'une enveloppe s'identifiant à un *sinus cardinal* nous concernent davantage lors de l'étude de la résolution axiale en OCT plein champ. En effet cela signifie que, malgré le fait que la source soit monochromatique, il est tout de même possible de sectionner axialement le signal, en profitant d'un sectionnement angulaire dépendant de l'ouverture numérique des objectifs. Cela correspond au principe sur lequel repose la technique de microscopie confocale, qui utilise une source laser monochromatique mais parvient à réaliser des coupes axiales grâce à la courte profondeur de champ de l'objectif de microscope. On verra cependant par la suite (voir la sous-section 3.4.3) que ce type de sectionnement présente quelques défauts relatifs à la forme de la réponse impulsionnelle axiale.

La largeur à mi-hauteur de l'enveloppe V_{ON} correspond donc à la résolution axiale du système Δz_{ON} :

$$\Delta z_{ON} \sim \frac{0,6\lambda}{1 - \cos(\arcsin(ON))} \quad (3.14)$$

En effectuant un développement limité au second ordre de la fonction $x \rightarrow 1 - \cos(\arcsin(x))$ qui est valable pour de faibles valeurs de x , c'est-à-dire, ici, de faibles ouvertures numériques, la résolution axiale suit l'égalité suivante :

$$\Delta z_{ON} \sim \frac{1,2\lambda}{ON^2} \quad (3.15)$$

On retrouve ainsi la formule généralement utilisée de la profondeur de champ d'un objectif d'ouverture numérique ON pour une source de longueur d'onde moyenne λ . Cela satisfait donc le principe selon lequel le sectionnement angulaire est étroitement lié à la profondeur de champ

des objectifs.

Après avoir mis en évidence l'influence de l'ouverture numérique sur un signal interférométrique pour une source monochromatique, on s'intéresse à présent au cas d'une lumière polychromatique, qui nous concerne davantage. En reprenant les équations analytiques (3.9) et (3.10) ne considérant pas l'approximation des petits angles, la fonction d'autocorrélation Γ s'écrit alors :

$$\begin{aligned} \Gamma(z) &= \int_{-\infty}^{\infty} S_{\lambda}(\lambda) \Gamma_{\lambda}(z) d\lambda \\ \Gamma(z) &= \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_{-\infty}^{\infty} \int_0^{\theta_{max}} S_{\lambda}(\lambda) \cos(2kz \cos(\theta) + \varphi) \cos(\theta) \sin(\theta) d\theta d\lambda \\ \Leftrightarrow \Gamma(z) &= \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_{-\infty}^{\infty} S_{\lambda}(\lambda) F(z, \theta) d\lambda, \quad (3.16) \\ \text{avec } F(z, \theta) &= \frac{\cos(2kz + \varphi) - \cos(2kz \cos(\theta_{max}) + \varphi)}{4k^2 z^2} \\ &\quad + \frac{\sin(2kz + \varphi) \cos(\theta_{max}) \sin(2kz \cos(\theta_{max}) + \varphi)}{2kz} \quad \text{avec } k = \frac{2\pi}{\lambda} \end{aligned}$$

Compte tenu de la complexité de cette équation analytique, on poursuit l'étude par des calculs numériques, afin de mettre en évidence l'influence des deux types de sectionnement sur la valeur de la résolution axiale. On présente différents interférogrammes obtenus pour trois ouvertures numériques différentes ($ON \rightarrow 0$, $ON = 0,6$, $ON = 0,9$) dans le cas d'une densité spectrale de puissance de largeur à mi-hauteur 10nm (Fig. 3.3) ou 250nm (Fig. 3.4), et de longueur d'onde centrale voisine de $\lambda = 700\text{nm}$. On précise qu'on choisit d'exprimer les valeurs d'ouvertures numériques dans l'air. Par conséquent, les trois valeurs mentionnées ci-dessus sont équivalentes dans l'eau aux valeurs suivantes : 0, 0,8 et 1,2.

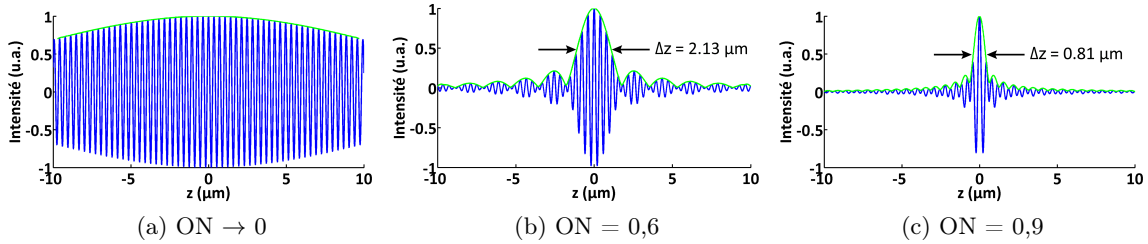


FIGURE 3.3 – Interférogrammes et résolutions axiales théoriques (d'après Eq. (3.10)) pour une densité spectrale de puissance gaussienne de largeur à mi-hauteur 10nm et centrée en $\lambda_0 = 710\text{nm}$ (filtre passe-bande FB710-10), et différentes ouvertures numériques. La résolution axiale est dans ce cas essentiellement déterminée par la profondeur de champ des objectifs.

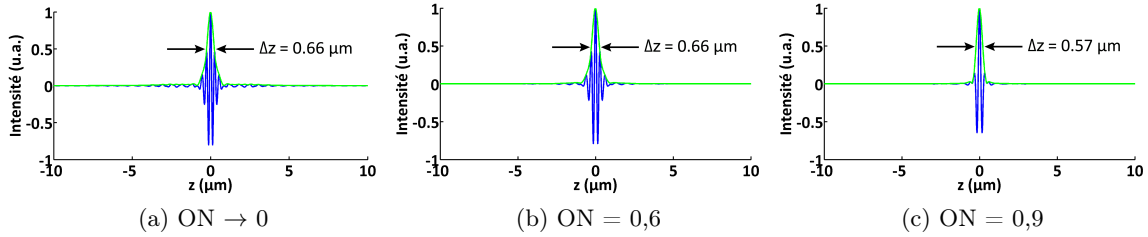


FIGURE 3.4 – Interférogrammes et résolutions axiales théoriques (d’après Eq. (3.10)) pour une densité spectrale de puissance gaussienne de largeur à mi-hauteur 250nm et centrée en $\lambda_0 = 700\text{nm}$ (filtre KG1), et différentes ouvertures numériques. Excepté pour des valeurs supérieures à 0,6, l’effet de l’ouverture numérique reste négligeable devant le sectionnement dû à la cohérence temporelle.

Lorsque la bande spectrale est très large, l’effet de l’ouverture numérique est négligeable sauf pour des valeurs supérieures à $\sim 0,6$ (dans l’air). Cependant de telles valeurs sont difficilement atteignables en pratique.

En revanche, lorsque la longueur de cohérence temporelle est faible, l’effet de sectionnement dépend alors uniquement de l’ouverture numérique effective du système qui garantit un sectionnement axial de type angulaire (voir Fig. 3.3). Si l’ouverture numérique vaut 0,9, la largeur à mi-hauteur de l’enveloppe du signal est proche de $0,9\mu\text{m}$ (voir Fig. 3.4c) ce qui correspond bien à la formule théorique (3.15), qui indique une valeur de $\sim 1\mu\text{m}$ en considérant l’approximation des angles faibles. On en déduit que la variation de l’ouverture numérique, et donc également celle de la cohérence spatiale du champ incident puisqu’on fait varier ON en changeant la dimension du diaphragme d’ouverture, modifie les propriétés de sectionnement axial du signal. Etudions à présent l’effet de la cohérence spatiale du champ sur le contraste du signal interférométrique.

3.3 Effet de la cohérence spatiale sur le contraste du signal interférométrique

L’ouverture numérique, dont on vient de voir les capacités de sectionnement axial, est déterminée non seulement par l’ouverture numérique de collection (notée ON_{col}), qui pour des objets diffusants rétroémettant de la lumière dans toutes les directions, est supposée maximale, mais également par l’ouverture numérique d’illumination (qu’on notera ON_{ill}) qui dépend de la variété des vecteurs d’ondes émis par la source, ce qui est équivalent pour un montage utilisant un système d’illumination Köhler au diamètre du diaphragme d’ouverture.

Comme cela est expliqué plus en détail en *Annexe C*, en modifiant le diaphragme d’ouverture, il est alors possible de varier ON_{ill} ainsi que l’étendue spatiale de la source, ce qui revient à modifier les propriétés de cohérence spatiale du champ d’illumination. Ainsi, en décomposant le champ incident qui illumine les objets dans chaque bras, l’extension spatiale de l’ouverture de ce diaphragme accroît la distribution angulaire des ondes planes incidentes et il convient donc d’ajouter la contribution de chaque onde plane de vecteur d’onde k_i .

Afin d’évaluer le signal détecté et l’effet de la cohérence spatiale en OCT plein champ, on

note θ_i l'angle entre la composante longitudinale $k_{z,i}$ du vecteur k_i et l'axe optique du système et on étudie le cas équivalent d'un montage interférométrique de Michelson en coin d'air, dont le champ d'illumination est une somme d'ondes planes d'inclinaison θ_i différente.

Considérons donc le schéma classique de deux miroirs dont l'inclinaison selon l'axe Ox diffère d'un angle α . Cette situation est communément appelée "interférences en coin d'air" étant donné l'angle formé par les deux surfaces. On représente un schéma de cette situation en figure 3.5.

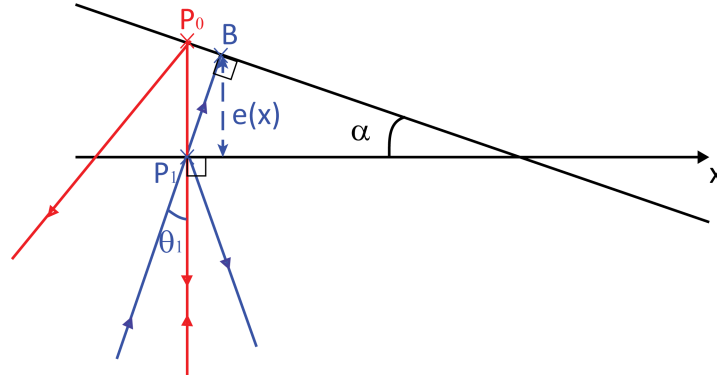


FIGURE 3.5 – Schéma d'une configuration en coin d'air d'un système interférométrique dont le champ d'illumination est une somme d'ondes planes d'inclinaison θ_i par rapport à l'axe optique du système. Les franges d'interférence sont localisées au point P_i dont la position dépend de l'angle d'incidence θ_i . Ici $\theta_0 = 0$ rad, et la différence de marche dans le cas des rayons bleus (θ_0) est différente de celles des rayons rouges ($\theta_1 = \alpha$) en notant α l'angle entre les deux surfaces.

On étudie dans un premier temps la différence de marche δ dans le cas d'un angle d'incidence nul (θ_0) et pour un angle d'incidence $\theta_1 = \alpha$. On peut montrer pour un angle d'inclinaison θ_i , la différence de marche δ_i suit l'expression suivante :

$$\delta_i(x) = 2e(x)\cos(\theta_i) + \frac{\lambda}{2} \quad , \quad (3.17)$$

où λ est la longueur d'onde moyenne du champ incident considéré monochromatique ici, et $e(x)$ est l'épaisseur locale de la lame au niveau des points P_0 et B comme indiqué sur le schéma ci-dessus.

On supposera que la variation de cette épaisseur est négligeable selon le rayon considéré, et qu'elle demeure égale à $\tan(\alpha)x \sim \alpha x$, l'angle α utilisé étant petit devant l'unité. On utilisera donc la relation suivante :

$$\delta_i(x) = 2\alpha x \cos(\theta_i) + \frac{\lambda}{2} \quad , \quad (3.18)$$

où x est l'abscisse commune des point P_i .

Il est habituellement admis que l'ouverture numérique d'illumination (ON_{ill}) est suffisamment réduite de sorte à ce que l'angle maximal des rayons incidents soit faible et qu'on puisse négliger le cosinus de l'angle θ_i lors du calcul de la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre. Notre intérêt étant d'analyser le signal pour des grandes ouvertures numériques,

nous calculerons le signal interférométrique sans utiliser cette approximation.

Le schéma de la figure 3.5 représente deux rayons incidents dont les rayons réfléchis sur chaque surface s'interceptent en P_0 ou P_1 , dont l'abscisse x_a est identique. Ce sont en ces points que les franges sont localisées, et puisque leur position latérale est identique (ici on considère un angle α entre les deux surfaces uniquement dans la direction Ox), l'intensité $I(x_a, y)$ intégrée par le détecteur sera égale à la somme des intensités du signal exprimé en ces points. Afin de généraliser le cas à des rayons d'angles d'incidences quelconques, on représente en figure 3.6 un troisième rayon incident d'angle θ_2 quelconque dont le point P_2 correspondant à la localisation des franges a une abscisse x_a également.

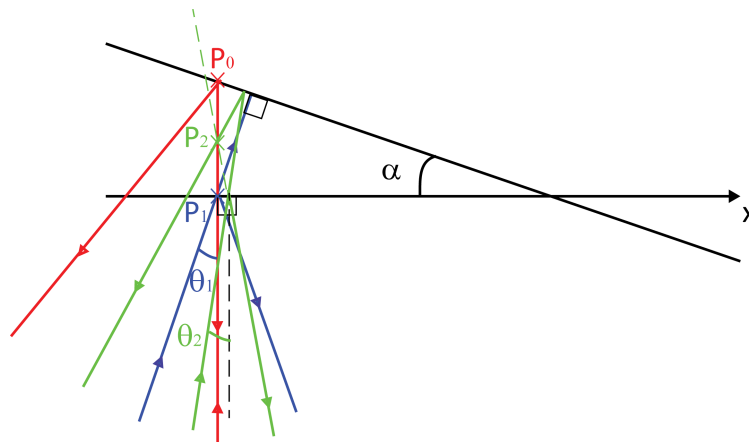


FIGURE 3.6 – Schéma d'une configuration en coin d'air d'un système interférométrique dont le champ d'illumination est une somme d'ondes planes d'inclinaison θ_i par rapport à l'axe optique du système. L'intensité $I(x_a, y)$ intégrée par le détecteur est égale à la somme des intensités du signal en chaque point P_i dont l'abscisse est x_a .

D'après l'équation 3.9 qui établissait l'expression de la fonction de corrélation $\Gamma(x, y, z)$ dans le cas où l'on considère l'influence de l'ouverture numérique, et pour laquelle la différence de marche $\delta(x, y, z, \theta)$ ne dépendait que de z et de θ et valait $2z\cos(\theta)$, on en déduit une relation plus générale de l'intensité exprimée en fonction de $\delta(x, y, z, \theta)$

$$\Gamma_\lambda(x, 0, 0) = \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos[k\delta(x, y, z, \theta) + \varphi] \cos(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (3.19)$$

En considérant que les positions axiales des deux surfaces sont ajustées de sorte à ce que la différence de marche ne dépende que de la position x , cela conduit donc à l'expression suivante :

$$\Gamma_\lambda(x, y, z) = \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos[2k\alpha x \cos(\theta) + \varphi] \cos(\theta) \sin(\theta) d\theta \quad (3.20)$$

Cette équation est donc très similaire à l'expression de la fonction de corrélation de l'équation (3.9), si ce n'est que la variable spatiale est désormais αx . Le calcul analytique complet mènerait donc à des résultats équivalents, et dans le but de faciliter la compréhension des phénomènes mis en jeu, on choisit de considérer un angle maximal suffisamment faible pour supposer que le

3.3. Effet de la cohérence spatiale sur le contraste du signal interférométrique

terme en cosinus de l'angle dans l'intégrale est égal à 1. De cette façon, le calcul analytique est simplifié et permet une étude clarifiée sans modifier les principes qui nous intéressent. De manière équivalente à ce qui a été fait dans la sous-section précédente (voir Eq. (3.12)), on obtient, pour une source de lumière monochromatique de longueur d'onde λ , la relation suivante :

$$\Gamma_\lambda(x, 0, 0) = \frac{2}{\sin^2(\theta_{max})} \int_0^{\theta_{max}} \cos[2k\alpha x \cos(\theta) + \varphi] \sin(\theta) d\theta$$

$$\Leftrightarrow \Gamma_\lambda(x, 0, 0) = \frac{2}{1 + \cos(\theta_{max})} S_{\alpha, ON_{ill}}(\theta_{max} x) \cos[2k\alpha x(1 + \cos(\theta_{max})) + \varphi], \quad (3.21)$$

avec $S_{\alpha, ON_{ill}}(x) = \text{sinc}[2k\alpha x(1 - \cos(\theta_{max}))]$

Le contraste du signal est donc défini par la fonction $S_{\alpha, ON_{ill}}$, et similairement aux conclusions de la sous-section précédente, on en déduit donc que pour une inclinaison α fixée, le contraste décroît plus rapidement si l'ouverture numérique d'illumination est élevée et que cette décroissance est accentuée si la valeur de α est plus élevée.

On entreprend à présent de démontrer expérimentalement ce phénomène de diminution du contraste.

On considère donc quatre positions différentes du diaphragme d'ouverture, qu'on ordonne et qu'on numérote de telle sorte que la position n° 1 corresponde à une cohérence spatiale maximale, *i.e.* une ON_{ill} minimale. On utilise également quatre angles d'inclinaisons α différents afin d'évaluer leur effet sur le contraste. Si l'angle est faible les franges sont larges et ces dernières se resserrent lorsqu'il augmente, comme cela est illustré dans le tableau de mesures présenté en figure 3.7a.

On associe à ce tableau de mesures les courbes correspondantes (Fig. 3.7b) qui mettent en évidence la décroissance du contraste du signal en fonction de la cohérence spatiale de la source et de l'angle entre les deux surfaces.

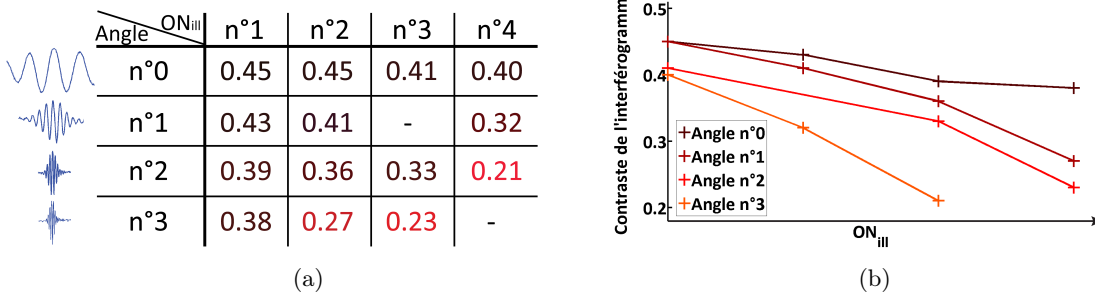


FIGURE 3.7 – (a) : tableau de mesure du contraste d'interférogrammes en fonction de l'ouverture numérique d'illumination (ON_{ill}) et de l'angle d'inclinaison α entre les deux surfaces, qui sont ici deux miroirs métalliques. Les valeurs ne sont pas quantifiées mais ordonnées de façon croissante et numérotées. On juxtapose l'allure des interférogrammes correspondant afin d'illustrer le resserrement des franges à mesure que l'angle augmente. (b) : graphique correspondant au tableau de mesures. Il met en évidence la pente de la courbe de contraste, selon l'angle considéré, en fonction de ON_{ill} .

Comme le prédisait la théorie (voir Eq. (3.21)), pour un angle donné, le contraste est meilleur lorsque l'ouverture numérique d'illumination est faible. Cela s'explique donc par le fait que le brouillage du signal est moindre puisque le nombre d'angles d'incidence différents est réduit.

On retrouve également que pour un angle α important, la chute du contraste est plus importante lorsque ON_{ill} est élevée. Si on travaille avec un diaphragme d'ouverture ouvert, afin d'accroître le flux lumineux et l'ouverture numérique du système, il est donc primordial de travailler avec un échantillon dont la surface est quasiment parallèle à la surface de référence, sous peine de réduire le contraste.

On précise qu'un mauvais positionnement des objectifs de microscope, qui ne seraient alors pas centrés sur l'axe optique du système, modifie l'inclinaison des rayons incidents et est donc susceptible de diminuer le contraste du signal, quand bien même les deux surfaces seraient parallèles entre elles.

Afin d'illustrer cette perte de contraste en fonction de la cohérence spatiale du champ d'illumination, on présente en figure 3.8 des coupes transverses d'images 3D du même échantillon, acquises avec une ON_{ill} en position $n^{\circ} 2$ ou en position $n^{\circ} 4$ (voir tableau 3.7a).

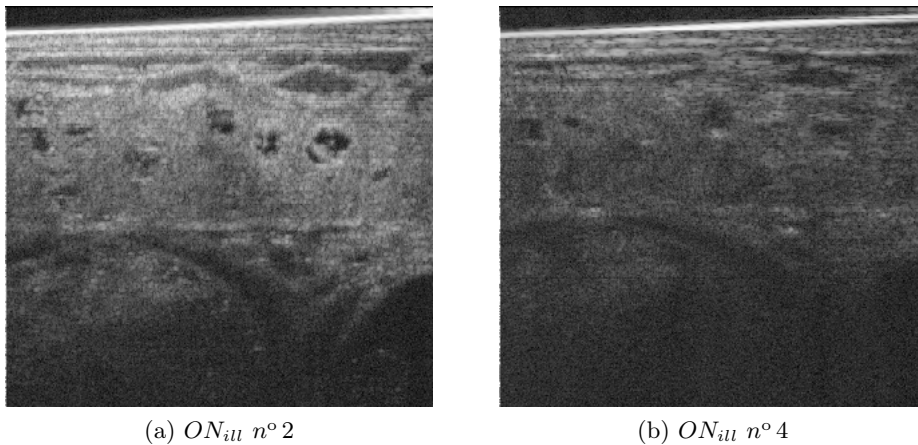


FIGURE 3.8 – Coupes transverses d'une image d'un échantillon de grenouille *Xenopus Laevis* pour deux degrés de cohérence spatiale de l'illumination différents : élevé (a) et faible (b). Le degré de cohérence spatiale est régulé en modifiant l'ouverture du diaphragme d'ouverture et donc l'ouverture numérique d'illumination. Le rapport signal sur bruit est moins important lorsque l'ouverture numérique d'illumination est plus élevée.

On en déduit donc qu'il est préférable d'utiliser un diaphragme d'ouverture assez fermé afin de ne pas trop affecter le rapport signal sur bruit. Cependant, cela réduit le flux lumineux et donc également la fréquence d'acquisition. Une solution appropriée consiste donc à aligner au mieux le montage afin de conserver un contraste équivalent lorsque ce diaphragme est ouvert largement.

3.4 La dispersion en OCT plein champ

D'après l'étude sur la résolution axiale en OCT effectuée dans la partie précédente, on a démontré que pour une densité spectrale de puissance gaussienne en fréquence, il n'existe pas de spectre optimal qui optimise la résolution axiale, puisque plus le spectre est large meilleure est Δz . Cependant, cette analyse ne considérait pas un phénomène majeur en OCT qu'est la dispersion chromatique de la lumière. Nous entreprenons donc d'étudier à nouveau l'existence d'un spectre optimal en examinant l'allure de la réponse impulsionnelle axiale, mais en tenant compte, cette fois, de l'effet de la dispersion sur le signal OCT.

Dispersion de la lumière en Optique

La dispersion est un phénomène qui entraîne une variation de l'indice de réfraction n d'un milieu en fonction de la longueur d'onde λ de la lumière. L'indice de réfraction déterminant la vitesse de phase v_Φ d'une onde électromagnétique, par la relation $v_\Phi = c/n$ où c est la célérité de la lumière dans le vide. La vitesse de phase s'exprime de façon équivalente en fonction de la pulsation de l'onde ω et de la norme de son vecteur d'onde $k = 2\pi/\lambda$:

$$v_\Phi = \frac{\omega}{k} \quad (3.22)$$

On parle aussi de dépendance de la vitesse de l'onde avec sa longueur d'onde, ou sa pulsation.

Si on considère une onde électromagnétique comme la somme d'ondes planes monochromatiques, à la traversée d'un milieu dispersif, comme le verre, chaque longueur d'onde sera déviée différemment puisque cela dépend de leur indice de réfraction propre (voir Fig. 3.9), ou autrement dit, possèdera une phase Φ différente qui dépend de ω donc et peut s'exprimer ainsi :

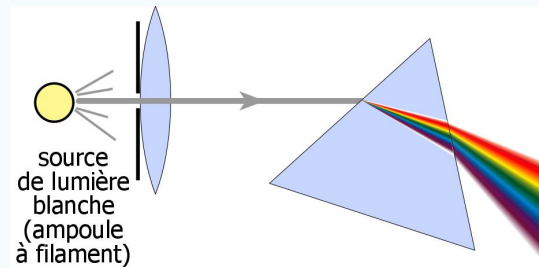


FIGURE 3.9 – Illustration du phénomène de dispersion de la lumière blanche par un prisme de verre.

$$\Phi(\omega) = 2k(\omega)L = 2n(\omega)k_0L \quad , \quad (3.23)$$

où k_0 est la norme du vecteur d'onde \mathbf{k} dans le vide, et L l'épaisseur du matériau dispersif

Afin de caractériser la vitesse de ce paquet d'onde, on définit une vitesse de groupe $v_g = d\omega/dk$, qui correspond au déplacement de l'enveloppe de l'onde, c'est-à-dire de son énergie.

Dans un milieu dispersif, k dépend de ω et l'équation (3.23), pour des pulsations ω suffisamment proches de la pulsation moyenne du spectre ω_0 , peut s'écrire selon un développement de Taylor tronqué à l'ordre 2, les autres termes étant en ce qui nous concerne négligeable :

$$\Phi(\omega) = \left[\Phi_0 + \Phi_1(\omega - \omega_0) + \Phi_2 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \right] L + o(\omega - \omega_0)^2, \quad (3.24)$$

où L est l'épaisseur de l'échantillon, $\Phi_1 = \frac{dk(\omega)}{d\omega} \Big|_{\omega=\omega_0}$ est définie comme la vitesse de groupe, et $\Phi_2 = \frac{dk^2(\omega)}{d\omega^2} \Big|_{\omega=\omega_0}$ correspond à la dispersion de la vitesse de groupe, qu'on nommera GVD (pour *group velocity dispersion* en anglais) dans la suite.

3.4.1 Calcul de la résolution axiale en présence de différences de dispersion

Calcul analytique

En OCT, en présence de différences de dispersion entre les deux bras de l'interféromètre, le signal interférométrique est modifié. En effet les deux ondes interférant après avoir traversé chacune un bras de l'interféromètre, si ces deux bras ne sont pas identiques en termes de dispersion, la différence de phase entre les deux dépend alors de la longueur d'onde et peut engendrer une déformation de l'interférogramme.

Explicitons ce phénomène par un calcul analytique en considérant une DSP incidente, S , gaussienne en fréquence, centrée en ω_0 et de largeur à mi-hauteur $\Delta\omega$:

$$S(\omega) = \exp \left[-4 \ln 2 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{\Delta\omega^2} \right] \quad (3.25)$$

On rappelle les formules suivantes issues de l'équation (3.3) :

$$\Gamma(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} W_{12}(\omega) e^{-i\omega\tau} d\omega, \quad \text{avec} \quad W_{12}(\omega) = U_1(\omega)U_2(\omega) \quad (3.26)$$

On suppose que les deux ondes sont d'amplitude identique et décalées d'une phase Φ . L'équation (3.26) est ainsi équivalente à :

$$\begin{aligned} \Gamma(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} U_1(\omega)U_1^*(\omega) e^{i\Phi(\omega)} e^{-i\omega\tau} d\omega \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) e^{-i\Phi(\omega)} e^{-i\omega\tau} d\omega \end{aligned} \quad (3.27)$$

En développant l'expression de la phase Φ d'après l'équation (3.24) :

$$\Gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) e^{-iL\Phi_2(\omega-\omega_0)^2} e^{-i(\omega-\omega_0)(\tau-2L\Phi_1)} d\omega \quad (3.28)$$

Etant donnée l'expression de S (Eq. (3.25)) cela revient à calculer une transformée de Fourier d'une fonction gaussienne possédant un terme de phase. Le calcul (détaillé en *Annexe B*) démontre que :

$$\Gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left[-\frac{\Delta\tau^2}{\Delta\tau^4 + (16\ln 2\Phi_2 L)^2} 4\ln 2\tau^2\right] \exp[i\Psi(\tau - 2L\Phi_1)^2] \quad , \quad (3.29)$$

où L est l'épaisseur de l'échantillon que la lumière traverse deux fois et Ψ une phase constante (voir Eq. (B.9) en annexe).

On observe que la différence de vitesse de groupe entre les deux bras, caractérisée par Φ_1 , induit un décalage de la position de la fenêtre de cohérence temporelle sans modifier la forme de l'enveloppe qui est elle proportionnelle à $|\Gamma|$. En revanche la différence de dispersion de la vitesse de groupe, représentée par Φ_2 , entraîne une modification de la largeur de l'enveloppe, et cela de façon équivalente au phénomène de *chirp* en Physique des Lasers, qui rend compte de l'élargissement d'une impulsion après la traversée d'un milieu dispersif.

En supposant que le spectre considéré est suffisamment étroit pour qu'on puisse supposer que le terme de phase $\Phi(\omega)$ tende vers son développement limité à l'ordre 2, il est alors possible d'établir (voir l'*Annexe B*) la relation qui exprime, dans le cas d'un montage en FD-OCT, la résolution axiale en présence d'un échantillon dispersif, Δz_d , d'épaisseur L et dont le coefficient de dispersion de la vitesse de groupe est notée Φ_2 , en fonction de la résolution axiale sans effet de dispersion Δz_i (Eq. (3.7)) [Fer01] :

$$\Delta z_d^2 = \Delta z_i^2 + \left[4\ln 2c^2 \frac{(\Phi_2 L)}{\Delta z_i}\right]^2 \quad (3.30)$$

$$\Leftrightarrow \Delta z_d^2 = \Delta z_i^2 + \left(\frac{\frac{2\ln 2}{\pi} \frac{d^2 n}{d\lambda^2}|_{\lambda_0} \lambda_0^3 L}{\Delta z_i}\right)^2 \quad (3.31)$$

On observe alors que si on utilise l'approximation $\lambda_0^2 = \lambda_{min}\lambda_{max}$, l'expression de Δz (Eq. (3.7)) entraîne l'expression suivante qu'on retrouve dans la littérature [Hit99], mais qui n'est pas pertinente dans notre cas :

$$\Delta z_d^2 = \Delta z_i^2 + \left(\lambda_0 \Delta\lambda \frac{d^2 n}{d\lambda^2}|_{\lambda_0} L\right)^2 \quad (3.32)$$

La relation 3.30 établit donc la dégradation de la résolution axiale pour une certaine différence de GVD. Cette relation est convenable en FD-OCT, pour lequel on n'adapte pas la position de l'objectif du bras échantillon à mesure qu'on pénètre dans l'échantillon. Ainsi l'expression de la résolution axiale (3.30) ne prend pas en compte la variation de l'épaisseur de la couche du milieu d'immersion présente entre l'objectif et l'échantillon, dont la valeur est égale à la distance de travail de cet objectif, et n'est donc pas adaptée à l'OCT plein champ.

Le rétrécissement de la couche du milieu d'immersion dans le bras échantillon modifie la différence de chemin optique, *i.e.* la différence de phase, entre les deux bras. On écrit alors le nouveau développement limité de la phase (Eq. (3.24)), en prenant en compte le milieu d'immersion :

$$\begin{aligned} \Phi(\omega) \sim & \left[\Phi_0 + \Phi_1(\omega - \omega_0) + \Phi_2 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \right] 2L_{ech} \\ & - \left[\Phi_{0,im} + \Phi_{1,im}(\omega - \omega_0) + \Phi_{2,im} \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \right] 2\delta L_{im} \quad , \end{aligned} \quad (3.33)$$

où δL_{im} est la variation d'épaisseur du milieu d'immersion et $\Phi_{2,im}$ sa GVD.

On constate que le coefficient d'ordre 2 de la phase s'écrit désormais, $(\Phi_2 L_{ech} - \Phi_{2,im} \delta L_{im})$ et que par conséquent la relation explicitant la résolution axiale compte tenu de la différence de GVD équivaut à :

$$\Delta z_d^2 = \Delta z_i^2 + \left[4ln2c^2 \frac{(\Phi_2 L_{ech} - \Phi_{2,im} \delta L_{im})}{\Delta z_i} \right]^2 \quad (3.34)$$

Puisque le mouvement de l'objectif du bras échantillon dépend de la profondeur de pénétration dans l'échantillon en fonction de son indice de réfraction moyen n_0 et de celui du milieu d'immersion $n_{0,im}$, (Eq. (3.35)) , on peut exprimer Δz_d uniquement en fonction de l'épaisseur de l'échantillon :

$$\delta L_{im} = \frac{n_{0,im}}{n_0} L_{ech} \quad (3.35)$$

$$\Rightarrow \quad \Delta z_d^2 = \Delta z_i^2 + [4ln2c^2]^2 \frac{\left[\left(\Phi_2 - \frac{n_{0,im} \Phi_{2,im}}{n_0} \right) L_{ech} \right]^2}{\Delta z_i^2} \quad (3.36)$$

Pour une résolution axiale initiale Δz_i donnée, correspondant à une distribution spectrale donnée centrée en $\lambda_0 = 700nm$, on compare cette expression avec la relation (3.30). Cela nous permettra d'estimer la modification de l'effet de la dispersion sur la résolution axiale en profondeur, lorsqu'on considère un montage d'OCT plein champ assurant une focalisation dynamique au cours d'une acquisition 3D.

Pour cela, on suppose un échantillon de verre en BK7, d'épaisseur variable, dont l'indice de réfraction et la GVD, *i.e.* le coefficient Φ_2 , sont connus tout comme ceux de l'eau, pour $\lambda \in [360nm; 2300nm]$ (données fournies par www.schott.com). On trace alors l'évolution de Δz_d en fonction de l'épaisseur de verre traversée, selon qu'elle soit donnée par la relation (3.30), et donc approprié au FD-OCT, ou par la relation (3.36) qui est adaptée au FF-OCT :

Nota bene : On choisit pour cette figure un spectre centré en $\lambda_0 = 600nm$ et de largeur à mi-hauteur $120\mu m$. Cela se justifie par le fait qu'un spectre plus étendu ne remplirait pas tout à fait les conditions nécessaires à l'approximation par le développement de Taylor de la phase $\Phi(\omega)$ (voir l'encadré en début de section) et biaiserait donc les résultats.

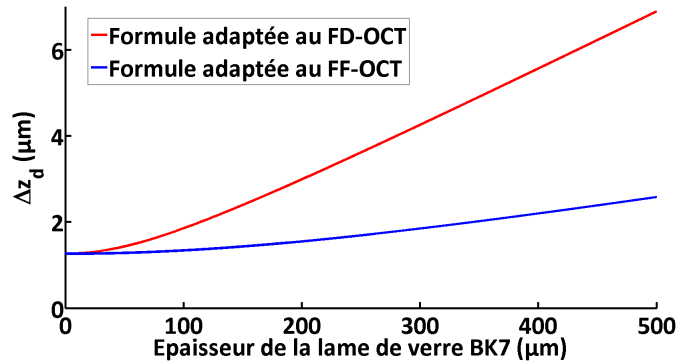


FIGURE 3.10 – Comparaison des formules théoriques (3.30) (en rouge) et (3.36) (en bleu) exprimant la variation de Δz_d en fonction de la profondeur, en prenant en compte la dispersion. On considère, ici, un spectre centré en $\lambda_0 = 600\text{nm}$ et de largeur à mi-hauteur $\sim 120\mu\text{m}$ équivalent à une résolution Δz_i sans dispersion égale à $1,3\mu\text{m}$.

On constate donc qu'il existe une différence notable entre les deux expressions de la résolution axiale Δz_d . Celle-ci est en effet doublée pour une épaisseur de lame de $200\mu\text{m}$, et multipliée par 2,6 si la lame de BK7 fait $500\mu\text{m}$ d'épaisseur. Cela justifie donc la considération d'une formule adaptée à l'OCT plein champ qui prend en compte la focalisation dynamique, cette dernière garantissant également une compensation partielle de la différence de dispersion.

Bien que l'OCT plein champ contraigne mieux l'effet de la dispersion lors de l'acquisition, le fait de pouvoir, en FD-OCT, compenser efficacement la dispersion par un traitement numérique résout généralement le problème [Mar03, Fer02]. Cela n'étant pas le cas en OCT plein champ, il est nécessaire de prendre en considération ce phénomène et d'utiliser pour cela la bonne formule, comme le souligne la figure 3.10.

Compte tenu des suppositions préalables au calcul de la relation 3.36, concernant l'approximation de la phase par développement limité, le calcul analytique de la présence d'un optimum par dérivation de l'expression de Δz_d (voir Eq. (3.36)) en fonction de $\Delta\lambda$, et avec λ_{min} fixé, ne saurait être pertinent. En effet le fait que les coefficients de GVD, Φ_2 et $\Phi_{2,im}$, soient exprimés en $\lambda = \lambda_0$, grandeur qui est une variable dans le cadre de notre étude, complique l'étude analytique et on lui préférera donc des simulations numériques qui sont plus pertinentes.

Simulations numériques

Afin de tenir compte de l'effet de la dispersion lorsqu'on image à une profondeur L dans l'échantillon, on évalue la différence d'épaisseur des différents milieux traversés qui sont chacun caractérisés par leur indice de réfraction $n(\lambda)$. Le seul milieu dont l'épaisseur parcourue ne rentre pas en jeu est l'air, puisque c'est un milieu quasiment non dispersif.

Comme on l'a vu dans le chapitre 1, les déplacements motorisés, qui garantissent l'adaptation dynamique de la focalisation lors de l'acquisition d'une pile d'images, sont tels que le signal rétrodiffusé à une profondeur L dans l'échantillon requiert une distance $WD - Ld_{ech}$ entre la surface de l'échantillon et le plan focal de l'objectif, où WD est la distance de travail de

l'objectif et $d_{ech} = n_{im,0}/n_0$ est une valeur constante dépendant seulement de l'indice moyen du milieu d'immersion, $n_{im,0}$ et de l'échantillon n_0 . On rappelle qu'on note n_{im} l'indice du milieu d'immersion et n celui de l'échantillon.

Cela signifie donc que la lumière traverse une épaisseur $L_{im,ech} = WD - Ld_{ech}$ du milieu d'immersion dans le bras échantillon alors que dans le bras référence, l'épaisseur traversée de ce même milieu demeure égale à $L_{im,r} = WD$. Il s'ensuit donc que la lumière parcourt une distance immergée plus importante dans le bras de référence. Cette différence valant $\delta L_{im} = L_{im,r} - L_{im,ech} = Ld_{ech}$, on peut alors schématiser cela en supposant, sous certaines autres conditions (voir Fig. 3.11), qu'une lame emplie du milieu d'immersion et d'épaisseur δL_{im} est placée dans le bras référence. De même, on peut interpréter la pénétration dans l'échantillon comme la présence dans le bras échantillon d'une lame d'indice n et d'épaisseur L .

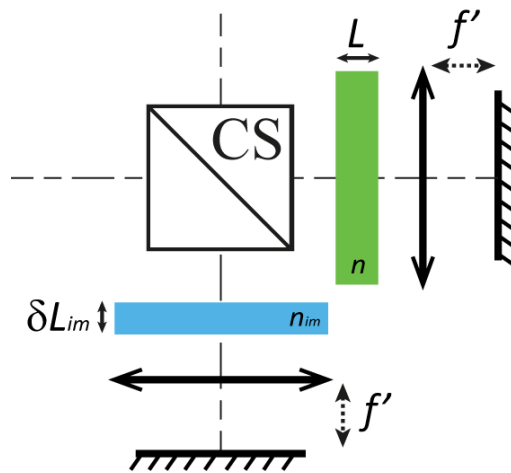


FIGURE 3.11 – Représentation schématique et équivalente pour le calcul de la différence de dispersion, lorsqu'une image à une profondeur L dans l'échantillon est acquise. Le calcul est identique au cas représenté dans la figure dont la surface de référence et l'échantillon sont tous deux des miroirs distants de f' du plan focal de leur objectif propre. Les seules différences de dispersion sont donc induites par les lames placées en amont des objectifs. La lame du bras référence, d'épaisseur δL_{im} , est emplie d'un milieu identique au milieu d'immersion des objectifs (ex : de l'eau), d'indice n_{im} , alors que la lame placée dans le bras échantillon possède le même indice que ce dernier et a pour largeur L .

Les seules différences entre ce schéma et la situation "réelle" étant les épaisseurs d'air, puisque l'air est un milieu quasiment non dispersif, la différence de marche calculée à l'aide de ce schéma équivalent rend très bien compte de l'influence de la dispersion. On perd uniquement l'information concernant la position axiale du centre de l'enveloppe (c'est-à-dire la valeur de la différence de chemin optique exacte), mais cela n'est pas prioritaire en ce qui concerne l'étude de la dispersion.

On calcule donc aisément la différence de marche δ équivalente :

$$\begin{aligned} \delta &= n_{im}\delta L_{im} - nL \\ \Leftrightarrow \delta &= L \left(\frac{n_{im,0}}{n_0} n_{im} - n \right) \end{aligned} \quad (3.37)$$

D'après l'équation (1.23), on en déduit donc l'expression du signal interférométrique suivant, pour une pénétration d'une distance L dans un échantillon d'indice n :

$$\begin{aligned} I(z) &\propto \int_{-\infty}^{\infty} S_{\sigma}(\sigma) \cos[4\pi\sigma(\delta(\sigma) + z)] d\sigma \\ \Leftrightarrow I(z) &\propto \int_{-\infty}^{\infty} S_{\lambda}(\lambda) \cos\left[\frac{4\pi}{\lambda}(\delta(\lambda) + z)\right] d\lambda, \end{aligned} \quad (3.38)$$

avec $\delta(\lambda) = L \left(\frac{n_{im,0}}{n_0} n_{im}(\lambda) - n(\lambda) \right)$

On compare, en figure 3.12, l'évaluation de la résolution axiale, via les simulations numériques, avec celle issue de la formule théorique explicitée précédemment (Eq. (3.36)), et cela pour différentes épaisseurs de verre BK7. Afin de déterminer Δz numériquement, on substitue l'intégrale continue par une somme discrète, puis on calcule la transformée de Fourier de l'interférogramme afin d'extraire son enveloppe dont on mesure la largeur à mi-hauteur.

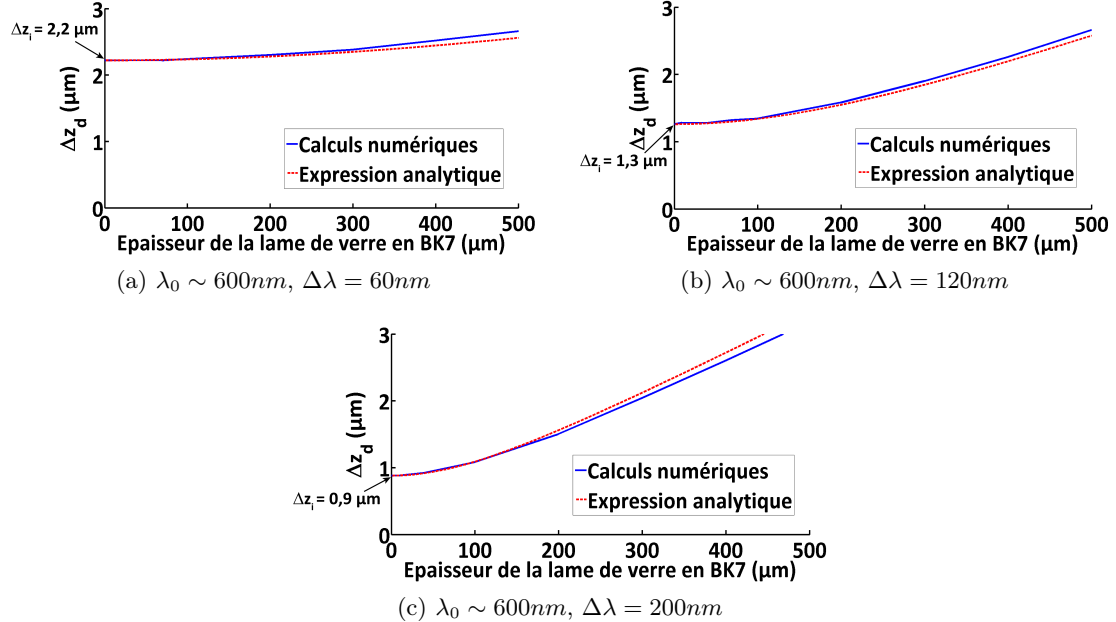


FIGURE 3.12 – Evolution de la résolution axiale Δz_d , prenant en compte la dispersion, d'après l'expression théorique (Eq. (3.36)) (en pointillés rouges) et d'après les simulations numériques (en bleu). On présente les résultats pour trois distributions spectrales différentes, correspondant à des résolutions axiales initiales Δz_i égales à $2,2\ \mu\text{m}$ (a), $1,3\ \mu\text{m}$ (b) et $0,9\ \mu\text{m}$ (c).

On constate le bon accord entre la formule théorique et les simulations, puisqu'un écart maximal de 0,1nm est mesuré entre les deux. Cette légère divergence est probablement due à une erreur dans l'estimation des indices du BK7 ou de l'eau, dont on a fixé la GVD égale à $51,970fs^2/mm$ [Ked12]. On observe que la différence s'accroît entre les deux courbes lorsque $\Delta z_i = 0,9\mu m$ (Fig. 3.12c), ce qui s'explique par le fait que le spectre étant plus large, l'approximation d'un spectre relativement étroit, qui conduit à identifier la phase au terme principal de son développement limité d'ordre 2 (Eq. (3.24)), perturbe le calcul théorique. Cependant les résultats restent assez proches, et l'expression de l'équation 3.36 est donc pertinente pour rendre compte de la dégradation de la résolution axiale du fait de différences de dispersion en OCT plein champ.

On notera également l'allure de la fonction $L \rightarrow \Delta z_d(L)$ qui présente deux régimes : pour des faibles épaisseurs L , sa dérivée est faible et ses valeurs évoluent donc peu, alors que pour des épaisseurs plus importantes, son évolution est presque linéaire avec L . Cela peut se vérifier analytiquement en dérivant la fonction $L \rightarrow \Delta z_d(L)$ qui est de la forme $x \rightarrow \sqrt{a + (b/a)x^2}$, avec $a = \Delta z_i^2$ et $b = 4ln2c^2 \left(\Phi_2 - \frac{n_{0,im}\Phi_{2,im}}{n_0} \right)^2$ (voir Eq. (3.36)).

$$\forall L \in \mathbf{R}_+, \quad \frac{d\Delta z_d(L)}{dL} = \frac{b}{a} \frac{L}{\sqrt{a + \frac{b}{a}L^2}} \quad (3.39)$$

$$\Rightarrow \begin{cases} \frac{d\Delta z_d(L)}{dL} \xrightarrow{L \rightarrow 0} 0 \\ \frac{d\Delta z_d(L)}{dL} \underset{L \rightarrow +\infty}{\sim} \sqrt{\frac{b}{a}} \end{cases} \quad (3.40)$$

Cette planéité initiale de $L \rightarrow \Delta z_d(L)$ engendre une plage d'incertitude lorsqu'on cherche à compenser la dispersion expérimentalement. Cela apparaît lorsqu'on cherche à ajuster finement les lames de verre, situées chacune dans un bras de l'interféromètre, afin de compenser la différence de dispersion introduite par des objectifs qui ne sont pas rigoureusement identiques.

On constate alors une incertitude sur la position angulaire des lames, compte tenu du fait que pour une faible différence de dispersion, la variation de Δz_d , et donc du signal, est difficilement observable. Puisqu'il est nécessaire de tenir compte de cette incertitude si l'on veut mesurer l'effet de la dispersion pour une épaisseur précise, ce qui n'est pas trivial en pratique, cela peut engendrer des disparités entre la théorie et les mesures expérimentales.

On conclura la première partie de cette étude en soulignant qu'il est possible de réduire l'effet de la dispersion en choisissant un milieu d'immersion adapté. En pratique, cela est concevable uniquement dans le cas d'un système destiné à un type d'échantillon précis. L'équation (3.36) permet de mettre en évidence le rôle prépondérant de la valeur de la dispersion de la vitesse de groupe (ou GVD) Φ_2 dans l'élargissement de l'enveloppe du signal. Quand bien même l'indice moyen du milieu d'immersion est similaire à celui de l'échantillon, il est nécessaire que leur GVD soit proche, en particulier si un large spectre est utilisé. Cependant des GVD identiques ne seront efficaces que si les indices moyens, dont la différence déterminera l'ampleur de la dégradation, sont similaires. Dans la sous-section suivante, nous aurons l'occasion d'étudier les conséquences de ces variations de GVD, ou d'indice moyen, sur la résolution.

3.4.2 Mise en évidence d'une configuration spectrale optimale

Après avoir établi analytiquement et numériquement l'évolution de la résolution axiale pour différentes conditions initiales (voir Fig. 3.12), et vérifié que les deux méthodes donnaient des résultats très similaires, nous avons pu observer que l'effet de la dispersion était plus ou moins important selon la résolution axiale initiale Δz_i . Il est alors intéressant d'étudier numériquement la variation de Δz_d en fonction cette fois de Δz_i afin d'identifier une éventuelle condition initiale optimale :

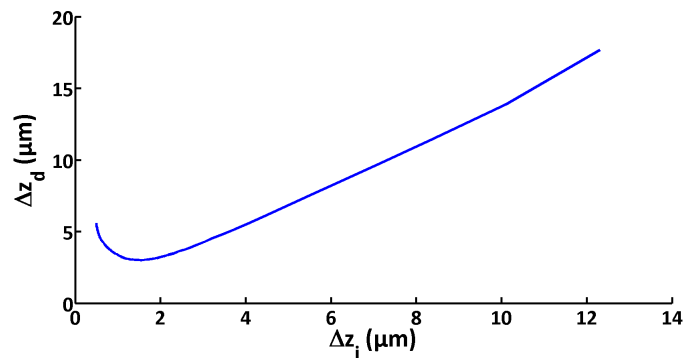


FIGURE 3.13 – Evolution théorique de la résolution axiale Δz_d , tenant compte de la dispersion, en fonction de la résolution axiale initiale Δz_i non affectée par la dispersion (d'après l'équation (3.36)). L'échantillon considéré est une lame de verre BK7 d'épaisseur $500\mu\text{m}$. On observe la présence d'un minimum de la fonction Δz_d en fonction de Δz_i correspondant à un optimum.

Un optimum est ainsi mis en évidence, puisque la résolution axiale Δz_d , prenant en compte la dispersion, est minimale pour $\Delta z_i \sim 1,5\mu\text{m}$. On rappelle qu'étant donné la supposition qui permet d'approximer la phase ϕ (voir Eq. (3.24)), il n'est pas pertinent, pour des spectres étendus, de calculer analytiquement cet optimum en dérivant la formule (3.36) en fonction de Δz_i .

La présence de cette situation optimale, qui n'existe pas en l'absence de différence de dispersion (voir Fig. 3.1), nous conduit donc à rechercher le spectre gaussien en fréquence idéale pour l'imagerie en profondeur de différents échantillons, tels que l'épiderme de la peau, et ainsi à identifier une configuration optimale dont on tentera de s'approcher au mieux en pratique.

De façon similaire à ce qui a été fait pour la figure 3.1, on génère un ensemble de spectres gaussiens en fréquence dont la longueur d'onde minimale est fixée à $\lambda_{min} = 500\text{nm}$, et on étudie la largeur de la réponse impulsionnelle (notée RI) axiale du système en considérant cette fois-ci l'effet de la dispersion pour des objectifs de microscope à immersion, dont le milieu d'immersion est l'eau (voir Fig. 3.14).

Afin de rendre compte au mieux de l'effet de dispersion nous choisissons de mesurer, ici, non pas la largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle, mais la largeur à $1/e$ de sa valeur maximum, comme cela est également usuel pour évaluer la largeur d'une fonction gaussienne.

Puisqu'on utilise habituellement une représentation en échelle logarithmique pour représenter les images d'OCT, un élargissement à la base du signal aura des conséquences considérables sur leur qualité. Or la dégradation du signal due à la dispersion modifie principalement la largeur

de la réponse impulsionnelle à sa base ; il est donc plus pertinent de modifier la convention de mesure de la résolution axiale afin de mieux correspondre au cas pratique qui nous intéresse.

On note $\Delta z_{d,1/e}$ cette résolution axiale mesurée à $1/e$ en présence de dispersion. De la même façon, la résolution sans effet de dispersion et mesurée à $1/e$ est appelée $\Delta z_{i,1/e}$. Puisque, $\Delta z_{i,1/e}^2 = \Delta z_i^2 / \ln 2$, d'après l'équation 3.36, on en déduit l'expression de $\Delta z_{d,1/e}$ suivante :

$$\Delta z_{d,1/e}^2 = \Delta z_{i,1/e}^2 + (4c^2)^2 \frac{\left[\left(\Phi_2 - \frac{n_{0,im} \Phi_{2,im}}{n_0} \right) L_{ech} \right]^2}{\Delta z_{i,1/e}^2} \quad (3.41)$$

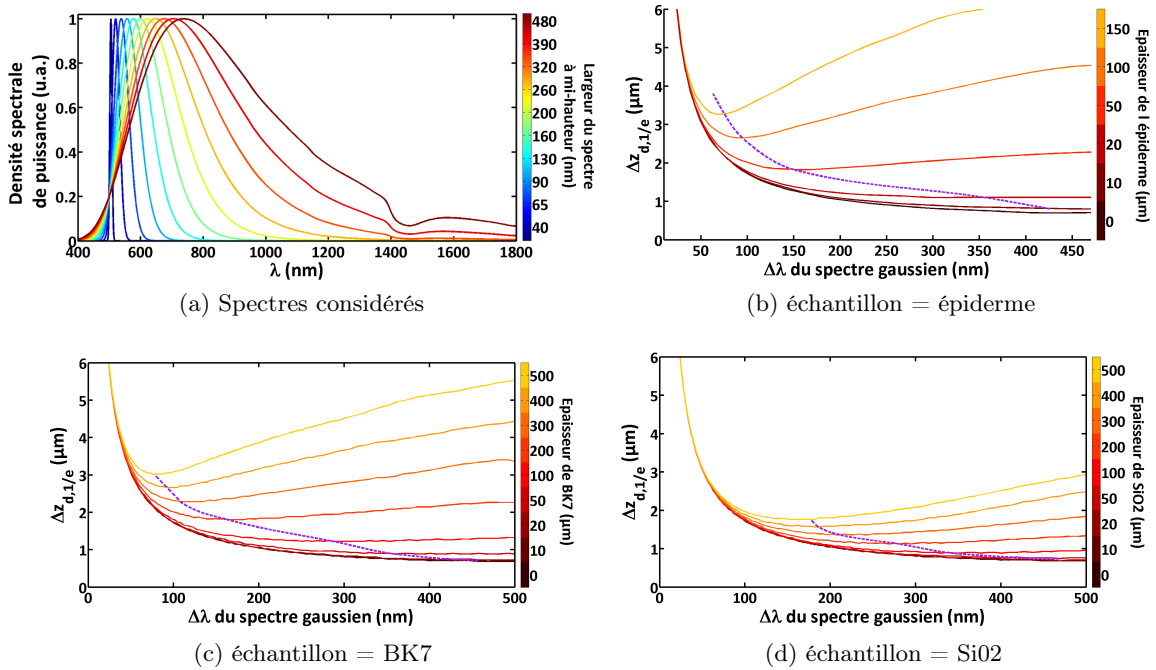


FIGURE 3.14 – (a) : représentation d'un panel de densités spectrales de puissance (DSP), considérées gaussiennes en fréquences, et prenant en compte l'absorption de la couche d'eau utilisée pour l'immersion. Leur valeur en $\lambda_{min} = 500\text{nm}$ est commune et vaut 0,2 (en % de leur valeur maximum). (b), (c), (d) : évolution de la résolution axiale $\Delta z_{s,1/e}$, évaluée à la hauteur de $1/e$, en fonction de la largeur à mi-hauteur des spectres, représentés en (a), et de l'épaisseur de l'échantillon considéré. La courbe violette des graphes (b), (c) et (d), trace la valeur de Δz_d maximale en fonction de $\Delta\lambda$.

On en déduit donc l'existence d'une configuration optimale pour la résolution axiale qui dépend des propriétés dispersives de l'échantillon et de la profondeur d'imagerie. Ainsi un spectre, dont la largeur à mi-hauteur vaut $\sim 150\text{nm}$, est le mieux adapté pour imager un échantillon de peau à $50\mu\text{m}$ de profondeur, alors que jusqu'à $30\mu\text{m}$ de profondeur un spectre de plus de 200nm de large permet d'atteindre une meilleure résolution axiale.

On notera également qu'un échantillon de silice fondue (SiO_2) induit une différence de dispersion bien moins importante que du verre BK7, ce dernier possédant un indice moyen n_0 et

une GVD plus éloignés de ceux de l'eau qui est ici le milieu d'immersion (voir Fig. 3.15). Cela est donc cohérent avec les conclusions de l'étude sur la dispersion qui pointaient l'influence de la GVD et de l'indice de réfraction moyen.

D'autre part l'épiderme, bien qu'ayant un indice moyen plus proche de celui de l'eau que le BK7, a une GVD très différente (voir Fig. 3.15), ce qui explique un élargissement de l'enveloppe du signal plus important qu'avec un échantillon de BK7 pour une épaisseur identique, confirmant ainsi l'influence de la différence de GVD sur la résolution axiale.

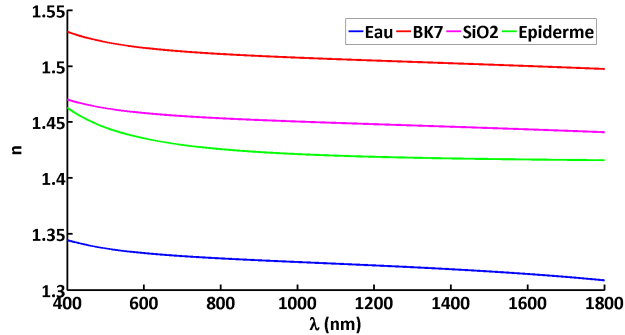


FIGURE 3.15 – Indice de réfraction n de différents milieux en fonction de la longueur d'onde λ .

3.4.3 L'OCT plein champ à sectionnement axial exclusivement angulaire

Une technique alternative, qui constitue un moyen de s'affranchir des effets de dispersion, est de considérer un sectionnement angulaire, en utilisant une ouverture numérique élevée, plutôt qu'un sectionnement temporel [dG04, Saf12]. Cela permet d'utiliser une bande spectrale étroite ce qui annihile la dégradation du signal induite par la présence de différences de dispersion.

Comme on l'a étudié dans la section précédente (voir la sous-section 3.2.3), l'enveloppe du signal interférométrique est alors similaire, ou même égale en considérant l'approximation paraxiale, à une fonction sinus cardinal (voir Eq. (3.12)).

De fait, l'extraction du signal par un algorithme à décalage de phase revient à considérer la valeur absolue de cette enveloppe. On en déduit donc l'expression de la réponse impulsionnelle axiale (notée RI), en fonction de l'ouverture numérique ON , de la longueur d'onde centrale λ_0 du spectre étroit, et de la position le long de l'axe z :

$$RI(z) \propto \left| \text{sinc} \left(\pi \frac{ON^2 z}{\lambda} \right) \right| \Rightarrow \Delta z \sim \frac{3,8}{\pi} \frac{\lambda}{ON^2} \quad (3.42)$$

De façon similaire au cas de la microscopie confocale, ou au cas d'un sectionnement temporel combiné à un spectre carré (voir Fig. 3.2), le fait que la RI soit proportionnelle à une fonction sinus cardinal, qui possède des rebonds secondaires assez importants, nuit fortement au rapport signal sur bruit ainsi qu'à la capacité de sectionnement axial, d'autant plus qu'on présente généralement les images avec une échelle d'intensité logarithmique.

On précise que, bien qu'elle en soit proche, la RI présentée ici est différente de celle d'un microscope confocal, pour lequel la RI axiale est égale au produit de deux fonctions identiques à celle de l'équation 3.42. Ceci est dû à l'utilisation de deux diaphragmes, un pour le champ

excitateur et un pour le champ détecté, ce qui a pour effet de réduire quelque peu l'amplitude des rebonds et la largeur à mi-hauteur de cette réponse impulsionnelle des systèmes confocaux [Paw06].

On présente en figure 3.16, une mesure de la réponse impulsionnelle axiale d'un montage d'OCT plein champ à grande ouverture numérique ($0N \sim 0,7$), en utilisant soit un spectre étroit, soit un spectre étendu, afin de comparer la qualité des signaux pour une échelle linéaire (Fig. 3.16a) et logarithmique (Fig. 3.16b). Dans le premier cas, le sectionnement sera dû à la profondeur de champ des objectifs, alors que pour la seconde configuration, c'est la cohérence temporelle de la lumière qui déterminera principalement la forme de la RI. On précise que mis à part le filtre inséré dans le système d'illumination et donc le temps d'exposition du détecteur, le montage est rigoureusement identique dans les deux cas. Afin d'extraire ces enveloppes, on acquiert une pile d'images en translatant pas à pas l'objectif du bras échantillon afin de bien considérer les deux sectionnements, angulaire et temporel.

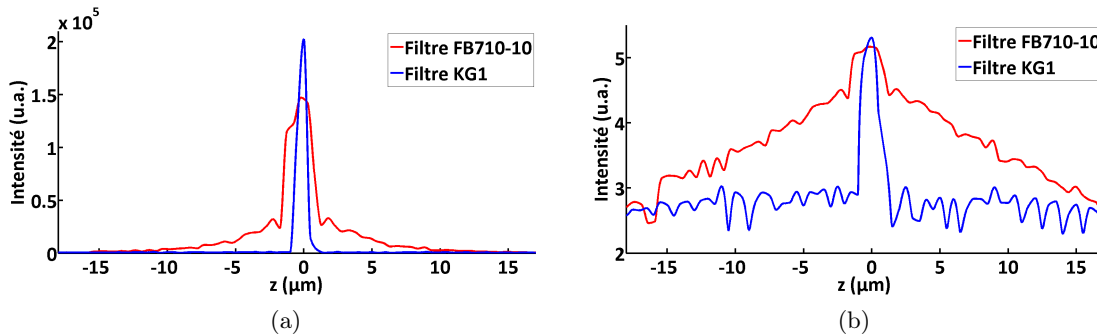


FIGURE 3.16 – Comparaison des réponses impulsionnelles axiales dans le cas d'une densité spectrale de puissance étroite (*i.e.* $\Delta\lambda = 10\text{nm}$) (en rouge) et large (*i.e.* $\Delta\lambda \sim 280\text{nm}$) (en bleu), représentées pour une échelle linéaire (a) et logarithmique (b). Le rapport signal sur bruit plus faible (a) et l'étalement plus important du signal (b) dans le cas d'un sectionnement angulaire illustrent les inconvénients de cette méthode.

Bien que l'emploi d'un sectionnement exclusivement de type angulaire réduise l'effet de la dispersion ainsi que celui des aberrations chromatiques, puisque le spectre est étroit, la dégradation considérable de la réponse impulsionnelle et donc de la résolution axiale rend cette technique moins bien adaptée à l'imagerie tomographique en trois dimensions, par rapport aux systèmes considérant un sectionnement de type temporel.

Certains articles [dG04, Saf12] plaident néanmoins en faveur d'un sectionnement de type angulaire uniquement, en pointant le fait que les fenêtres de cohérence et de focalisation se séparent très vite lorsqu'elles sont toutes deux très étroites. Par conséquent ils préconisent l'utilisation d'un spectre étroit, et donc d'une fenêtre de cohérence très large. Cependant ces articles font référence à des systèmes de type interféromètres de Mirau (voir la sous-section 1.5.1 du chapitre 1) qui ne permettent pas de translater dynamiquement la fenêtre de focalisation, contrairement au montage que nous utilisons, qui est basé sur un interféromètre de Linnik.

Un argument plus recevable dans notre cas serait de considérer, non pas l'impossibilité, mais la difficulté de conserver les deux fenêtres superposées en profondeur si elles sont toutes deux

étroites. Cependant une bonne connaissance préalable, ou une évaluation expérimentale, de l'indice moyen de l'échantillon permettent de remédier assez efficacement à cette contrainte.

En privilégiant donc un sectionnement basé sur la cohérence temporelle de la lumière, bien plus performant, l'enjeu consiste donc à appliquer en pratique les résultats issus de l'étude théorique de l'effet de la dispersion. On cherchera notamment à se rapprocher d'une distribution spectrale optimale afin de réaliser des images en profondeur d'échantillons biologiques, tels que la peau, avec une grande résolution axiale. On garantira également une résolution transverse élevée en utilisant des objectifs d'ouverture numérique (notée ON) égale à 1,2.

3.5 Dispositif expérimental

Le montage est, comme celui de l'OCT plein champ conventionnel, basé sur un interféromètre de Linnik, mais il nécessite plusieurs modifications, dans le but d'adapter le dispositif à l'utilisation d'objectifs très ouverts ainsi qu'aux propriétés spectrales requises, afin d'atteindre une résolution axiale optimale. La surface de référence ainsi que le pas des différents moteurs seront donc sélectionnés en conséquence et nous utiliserons un détecteur possédant une zone de sensibilité spectrale très étendue offrant ainsi un large choix de configurations spectrales.

On présente en figure 3.17 le schéma du montage expérimental du système d'OCT plein champ à haute résolution.

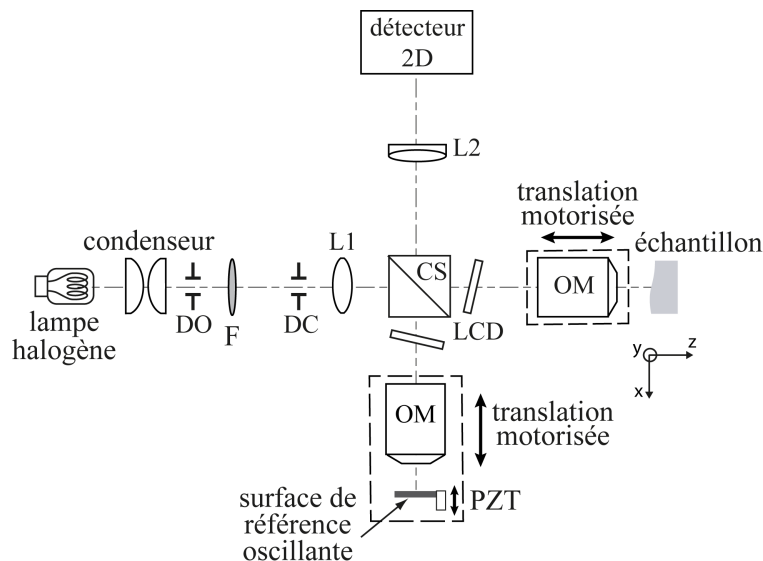


FIGURE 3.17 – Schéma du montage. DO : diaphragme d'ouverture, DC : diaphragme de champ, F : filtre optique, CS : cube séparateur, LCD : lames compensatrices de dispersion (immobiles), OM : objectif de microscope, PZT : platine piézoélectrique, L1 : lentille, L2 : lentille de tube (doublet).

Outre le filtre utilisé, le système d'illumination et le détecteur sont identiques à ceux présentés dans le chapitre précédent (voir les sous-sections 2.2.1 et 2.2.2) et leur description ne sera pas

détaillée dans ce chapitre. La principale nouveauté technique de ce montage réside dans l'utilisation d'objectifs de microscope dont l'ouverture numérique vaut 1,2, en considérant l'eau comme liquide d'immersion. L'eau est un milieu approprié pour les échantillons biologiques, contrairement à l'huile qui est employée dans [Saf12] et qui est jusqu'à présent, à notre connaissance, l'unique système utilisant une ouverture numérique supérieure à 1 en OCT plein champ.

Ces objectifs à immersion à eau, plans et apochromatiques, d'ouverture numérique 1,2 (CFI Plan Apo VC 60XWI produits par *Nikon*), permettent de corriger efficacement les aberrations, chromatiques et sphériques notamment, pour des longueurs d'onde du domaine visible voire proche infrarouge (jusqu'à $\sim 1000\text{nm}$).

Leur agencement est optimisé en supposant la présence d'une lamelle de verre de $145\mu\text{m}$ d'épaisseur précédant l'échantillon. Il est donc recommandé de suivre ces préconisations compte tenu de leur grande ouverture numérique, qui les expose à une dégradation significative de la qualité de l'image dès lors qu'on s'éloigne des conditions requises optimales. Cela est particulièrement critique quand on pénètre en profondeur dans un échantillon biologique, dont l'indice de réfraction ne correspond pas tout à fait à celui du milieu d'immersion, ce qui affecte la trajectoire des rayons lumineux et peut donc engendrer des aberrations.

Afin d'optimiser encore davantage leurs performances, ces objectifs sont constitués d'un anneau permettant de modifier finement l'épaisseur de verre traversé par l'onde lumineuse. Cela offre donc la possibilité de corriger précisément les aberrations sphériques selon la profondeur d'imagerie et les conditions expérimentales, et d'optimiser ainsi la qualité des images.

Afin de limiter ces effets on utilise une surface de référence qui satisfait aux recommandations. On positionne alors dans le bras référence une lamelle de verre en BK7 de $145\mu\text{m}$ d'épaisseur, dont on vient faire la mise au point sur sa seconde face qui correspond donc à une interface verre/air (voir schéma en ci-contre). De cette façon, on dispose d'une surface de référence dont le coefficient de réflexion est de 4%, ce qui est bien adapté au regard de la sensibilité de détection (voir la sous-section 1.5.2), et qui respecte les conditions optimales d'utilisation des objectifs.

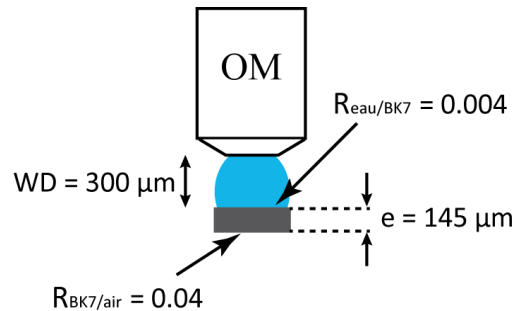


FIGURE 3.18 – Schéma représentant la surface de référence à l'interface verre/air utilisée ($R = 0,04$), qui satisfait aux conditions optimales d'utilisation de l'objectif à immersion, dont la distance de travail (noté WD) vaut $300\mu\text{m}$.

Il est alors nécessaire de compenser la dispersion introduite par la traversée de cette lamelle de verre en BK7. Cela peut être fait en disposant une lamelle identique entre l'objectif du bras échantillon et le tissu biologique, ou bien en ajoutant une lame de verre identique dans chaque bras de l'interféromètre (voir Fig. 3.17) et en les orientant légèrement différemment, faisant ainsi office de lame compensatrice de dispersion (noté LCD).

Contrairement au montage du chapitre précédent (voir Fig. 2.6), ces LCD sont toutes deux immobiles et servent à corriger les différences de dispersion engendrées par la lamelle utilisée comme objet de référence ou le cube séparateur, mais surtout celles engendrées par les objectifs

de microscope. Elles sont indispensables si l'on considère un spectre large, qui plus est avec des objectifs complexes et constitués de nombreuses lentilles comme c'est notre cas. En effet la grande ouverture des objectifs requiert, pour assurer une bonne qualité d'image y compris pour des rayons très inclinés, un certain nombre d'éléments optiques qui sont alors susceptibles de générer des disparités entre deux objectifs fabriqués et donc une différence de dispersion de la lumière.

Puisque ces objectifs sont utilisés avec de l'eau comme milieu d'immersion, et que l'indice de réfraction de l'eau est en général plus proche de celui des échantillons biologiques que la silice fondue, il n'y a alors plus d'intérêt à pivoter la LCD du bras de référence, comme c'était le cas dans le montage présenté dans le chapitre précédent.

On choisit donc de translater conjointement l'objectif et la surface de référence afin de modifier pas à pas la différence de marche et donc de déplacer la fenêtre de cohérence en profondeur dans l'échantillon. En translatant simultanément la position de l'objectif dans le bras échantillon, comme cela a été décrit en détail dans le chapitre 1 (voir la sous-section 1.5.1), on est alors capable d'ajuster la mise au point en profondeur sans soumettre l'échantillon à un déplacement, ce qui est mieux adapté à l'imagerie rapide ou *in vivo* que lorsqu'on agit directement sur la position de l'échantillon, comme c'est le cas dans certains montages d'OCT plein champ conventionnel [Sac08, Yu04]. Afin de garantir un échantillonnage de la réponse impulsionnelle suffisant, on utilise un pas du moteur du bras de référence de $0,3\mu\text{m}$.

En ce qui concerne la réponse impulsionnelle transverse qui dépend uniquement de l'ouverture numérique des objectifs, elle est estimée à $\sim 0,4\mu\text{m}$ (voir Eq. (1.35)) et il est donc nécessaire, compte tenu de la dimension des pixels du détecteur ($30\mu\text{m} \times 30\mu\text{m}$), de positionner une lentille de tube de distance focale égale à 400 mm, afin d'échantillonner convenablement le signal. Le grandissement du système d'imagerie étant égal au rapport des distances focales de la lentille de tube et de l'objectif, on mesure un champ de vision de $\sim 75\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$. Cela est relativement faible compte tenu de la taille importante des pixels de la caméra et de leur faible nombre (320×256).

3.5.1 Mise en pratique d'une configuration spectrale optimale

L'atout du détecteur choisi (décrit en détail dans le chapitre précédent) réside plutôt dans sa sensibilité spectrale remarquable, qui s'étend de $\lambda = 400\text{nm}$ à $\lambda = 1700\text{nm}$ (voir Fig. 3.20a ci-dessous), ce qui donne accès à de nombreuses possibilités de spectres. On cherche alors à ajouter un ou plusieurs filtres optiques dans le système d'illumination afin de correspondre au cas optimal mis en évidence théoriquement. Ce dernier dépendant de l'échantillon considéré et de la profondeur d'imagerie (*i.e.* de l'épaisseur du tissu biologique), on décide de sélectionner une configuration qui optimise la résolution axiale à quelques dizaines de micromètres de profondeur sous la peau, typiquement $\sim 20\mu\text{m}$. On privilégie ainsi l'image de couches proches de la surface avec une résolution axiale plus importante. Cela est d'autre par cohérent avec la profondeur de pénétration assez limitée ($\sim 80\mu\text{m}$) de ce système d'OCT plein champ employant des objectifs à grande ouverture.

L'utilisation de filtres optiques, associés aux propriétés spectrales de la source et de la caméra

ne permet pas d'obtenir des spectres de forme rigoureusement gaussienne en fréquence. On sélectionne néanmoins deux filtres optiques (appelés KG1 et KG3), dont la transmission induisent des densités spectrales de puissance de détection effectives proches des spectres gaussiens optimaux (voir Fig. 3.20a). On précise ici qu'on néglige l'absorption des objectifs de microscope et des autres éléments optiques du système dans le calcul de la densité spectrale de puissance effective, puisqu'on considère des longueurs d'onde inférieures à 1000nm. On calcule alors, d'après les caractéristiques spectrales du montage, l'évolution de la résolution axiale lorsqu'on pénètre dans l'épiderme, pour les deux configurations sélectionnées (Fig. 3.20b).

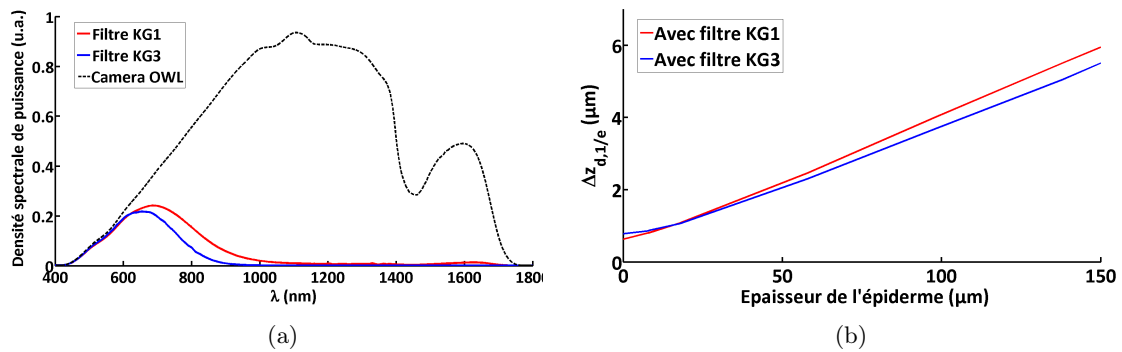


FIGURE 3.19 – (a) : densités spectrales de puissance de détection effectives du montage en utilisant le filtre KG1 (courbe rouge) ou KG3 (courbe bleue) ou aucun filtre (courbe noire). (b) : évolution de la résolution axiale en fonction de la profondeur de pénétration dans l'épiderme.

On constate que le filtre KG1 entraîne une résolution axiale plus importante en surface et jusqu'à $\sim 30\mu\text{m}$, alors qu'au delà de $100\mu\text{m}$, l'étroitesse du filtre KG3 réduit l'effet de la dispersion et favorise la résolution axiale. On retrouve ainsi le compromis présent dans l'étude théorique, dont l'optimum dépend de l'épaisseur de l'échantillon. Etant donné les spécifications établies concernant l'imagerie de la peau, on choisit d'utiliser le filtre KG1 dans la suite puisqu'il garantit une meilleure résolution axiale jusqu'à $\sim 30\mu\text{m}$ et ne devient réellement préjudiciable qu'au delà de $100\mu\text{m}$ par rapport au cas d'une utilisation du filtre KG3.

Afin de mettre en évidence expérimentalement le changement d'optimum selon l'épaisseur de l'objet observé, on utilise comme échantillon une superposition de deux lamelles de verre en BK7 de $145\mu\text{m}$ d'épaisseur chacune. Cela équivaut donc à une différence d'épaisseur de verre de $\sim 300\mu\text{m}$ entre le bras de référence et le bras échantillon. Puisqu'il est difficile d'aligner précisément la position des LCD, comme on l'a souligné dans la sous-section 3.4.1, la différence exacte d'épaisseur de verre entre les deux bras est difficilement estimable.

On acquiert le signal interférométrique en positionnant soit le filtre KG1, soit le filtre KG3 (Fig. 3.20b). Comme cela était prédit par la théorie, on constate que pour une telle épaisseur de verre de BK7, le filtre KG3 offre de meilleures performances, en termes de résolution et de rapport signal sur bruit, du fait de sa transmission plus étroite spectralement qui réduit l'effet de la dispersion. En revanche on peut vérifier expérimentalement qu'en surface de l'échantillon, le filtre KG1 est plus avantageux, ce qui nous conduit donc à l'utiliser comme justifié précédemment.

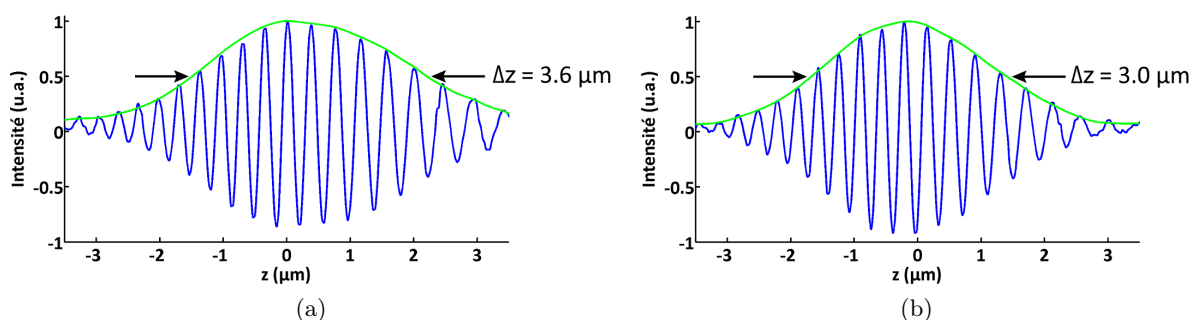


FIGURE 3.20 – *Interférogrammes expérimentaux dispersés correspondant à une épaisseur de BK7 $\sim 300\mu\text{m}$ en utilisant le filtre KG1 ou un filtre plus étroit KG3. On constate que la dispersion dégrade moins le signal si le spectre est plus étroit.*

Mesure de la résolution axiale

La résolution axiale du système étant particulièrement élevée ($\sim 0,7\mu\text{m}$), elle nécessite un échantillonnage spatial très fin, de sorte à extraire l'enveloppe du signal fidèlement. La translation du bras de référence ou la rotation des LCD ne permettant pas d'atteindre un pas inférieur à $0,3\mu\text{m}$, on choisit, contrairement au chapitre précédent, d'acquérir un interférogramme brut, et de calculer ensuite numériquement son enveloppe en utilisant la transformée de Fourier.

Afin de mesurer la largeur à mi-hauteur de cette enveloppe, il est nécessaire de déterminer la période de l'interférogramme brut, *i.e.* la longueur d'onde moyenne du spectre. Cela peut être fait précisément en enregistrant exactement le même interférogramme mais en plaçant cette fois-ci un filtre passe-bande interférentiel très étroit (typiquement 10nm de largeur à mi-hauteur) dont la longueur d'onde centrale est très bien connue, ce qui permet de calibrer la mesure et d'en déduire la valeur de la résolution axiale avec une précision de l'ordre de $0,1\mu\text{m}$.

Afin de garantir l'efficacité de la mesure, il est également important de considérer l'effet de l'ouverture numérique effective du système sur la valeur de l'interfrange. Comme on l'a vu précédemment, l'inclinaison maximale des rayons peut modifier la période de l'interférogramme et donc la calibration effectuée avec le filtre passe-bande interférentiel. On veille donc à diminuer l'ouverture numérique d'illumination en réduisant le diamètre du diaphragme d'ouverture, afin que cette modification soit négligeable par rapport à notre précision de mesure.

On précise que puisque l'effet de l'ouverture numérique sur la valeur de la résolution axiale est négligeable tant qu'elle reste inférieure 0,6 (voir la sous-section 3.2.3), *i.e.* 0,8 en la multipliant par l'indice du milieu d'immersion, on néglige son influence étant donné qu'en pratique l'ouverture numérique effective du montage est mesurée inférieure à 0,6 (dans l'air). Cette méthode de mesure de la résolution axiale demeure par conséquent pertinente et appropriée dans notre cas, bien qu'elle ne prenne pas en compte l'effet de la défocalisation, et donc celui de l'ouverture numérique, puisqu'on ne translate pas la position de l'échantillon.

Comment il en fut question dans la sous-section 3.3, l'inclinaison relative de l'échantillon et de la surface de référence est cruciale dans la quête d'un contraste important et donc d'une résolution élevée. Bien qu'on travaille avec une ouverture réduite, cela peut néanmoins compro-

mettre la mesure et on ajuste donc les deux surfaces, qui sont deux miroirs métalliques pour la mesure, de telle façon qu'elles soient presque parallèles entre elles. Cependant il nous est nécessaire, compte tenu de la méthode utilisée pour la mesure, de conserver des franges suffisamment étroites pour qu'on puisse visualiser l'interférogramme dans son ensemble et ainsi effectuer une mesure plus précise. Cela constitue donc un compromis à satisfaire, qui n'existe pas lorsqu'on acquiert une pile d'images (comme expliqué en sous-section 2.4.1), qui serait donc une méthode plus appropriée pour mesurer la résolution axiale lorsque l'ouverture numérique est élevée, si le pas d'échantillonnage axial était suffisant. Malgré tout, comme on l'a montré en figure 3.7, pour des franges larges, *i.e.* des surfaces quasiment parallèles, le contraste reste similaire pour des grandes ouvertures numériques d'illumination.

Après avoir ajusté finement la position des LCD l'une par rapport à l'autre (voir Fig. 3.17), afin de compenser la dispersion introduite par le montage optique lui-même, on mesure de cette façon une résolution axiale de $0,67\mu\text{m}$, évaluée dans l'air. Cette valeur est très proche de la résolution théorique estimée d'après les propriétés spectrales de la source halogène, de la caméra et du filtre KG1. On présente en figure 3.21, l'interférogramme calculé numériquement (Fig. 3.21a) ainsi que celui mesuré expérimentalement (Fig. 3.21b).

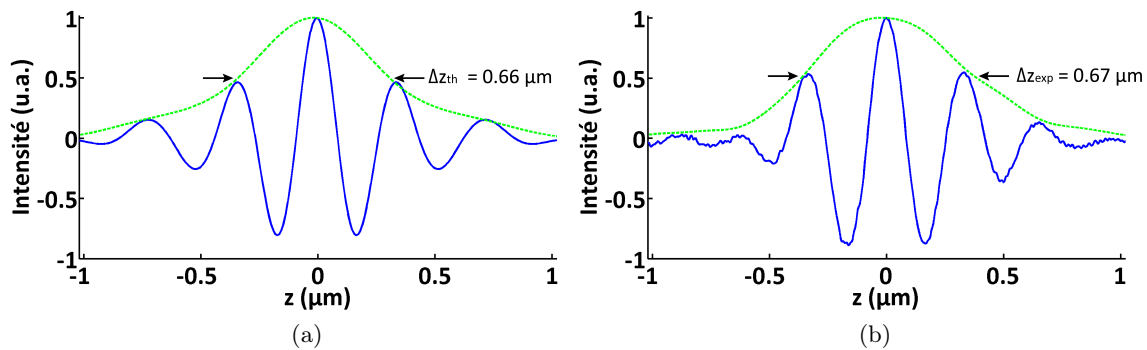


FIGURE 3.21 – Interférogramme théorique (a) et interférogramme expérimental (b) obtenus en considérant l'insertion du filtre KG1.

On note la grande ressemblance entre ces deux signaux et notamment le contraste important de l'interférogramme expérimental, qui nous permet d'atteindre une résolution axiale encore jamais obtenue en OCT, qui équivaut donc à $0,5\mu\text{m}$ dans un milieu d'indice similaire à l'eau, comme le sont la plupart des échantillons biologiques. Combiné à une résolution latérale, estimée à plus de $0,5\mu\text{m}$ dans l'eau compte tenu de la grande ouverture numérique des objectifs, on dispose d'un système d'imagerie capable d'imager des échantillons diffusants à $\sim 100\mu\text{m}$ de profondeur avec une résolution spatiale supérieure à $0,5\mu\text{m}$ dans un échantillon biologique.

3.5.2 Images d'échantillons biologiques épais

Outre une résolution spatiale élevée, il est nécessaire de garantir une sensibilité de détection convenable afin de réaliser des images en profondeur dans des tissus biologiques diffusants. De la même manière que cela est expliqué dans la sous-section 2.4.3 du deuxième chapitre, on mesure la sensibilité du système, en utilisant une lame de verre BK7 comme échantillon qui réfléchit 4% de

la lumière incidente. On l'évalue alors à -71dB en accumulant 50 images qui est la configuration retenue dans la suite. On souhaite ainsi privilégier ici la qualité des images plutôt que la vitesse d'exécution, qui est moins primordiale pour l'imagerie d'échantillons *ex vivo*. Une nouvelle fois, le bruit de détection étant assez élevé, la sensibilité reste plus faible que pour certains montages d'OCT plein champ.

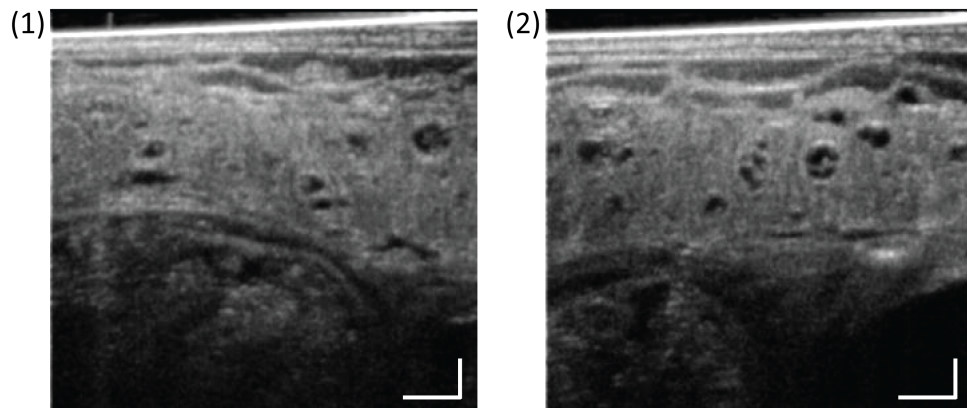
Grâce à la modulation sinusoïdale appliquée à la surface de référence par la platine piézo-électrique, et à l'algorithme de combinaison des images performant (voir la sous-section 2.2.4), la fréquence d'acquisition d'une image *en-face* accumulée 50 fois est proche de 1Hz, comme c'est le cas pour la plupart des montages d'OCT plein champ [Sac08, Dub04, Saf12]

Cette vitesse peut être accrue en ouvrant davantage le diaphragme d'ouverture, ce qui augmentera le flux lumineuse incident sur l'échantillon. Le cas échéant, il faudra cependant s'assurer d'un parallélisme convenable de la surface de référence et de l'échantillon afin de conserver un bon contraste et donc une bonne sensibilité de détection. La planéité de l'échantillon est par ailleurs indispensable compte tenu de la profondeur de champ réduite des objectifs de microscope, qui est proche de $1,5\mu\text{m}$ pour ouverture numérique de 1,2. En effet si le basculement de l'échantillon correspond à une distance supérieure à l'étendue de la profondeur de champ, en plus d'une perte de résolution, la fenêtre de focalisation ne couvrira pas la totalité du champ observé sur une image *en-face*, et l'intensité du signal OCT ne sera donc pas uniforme.

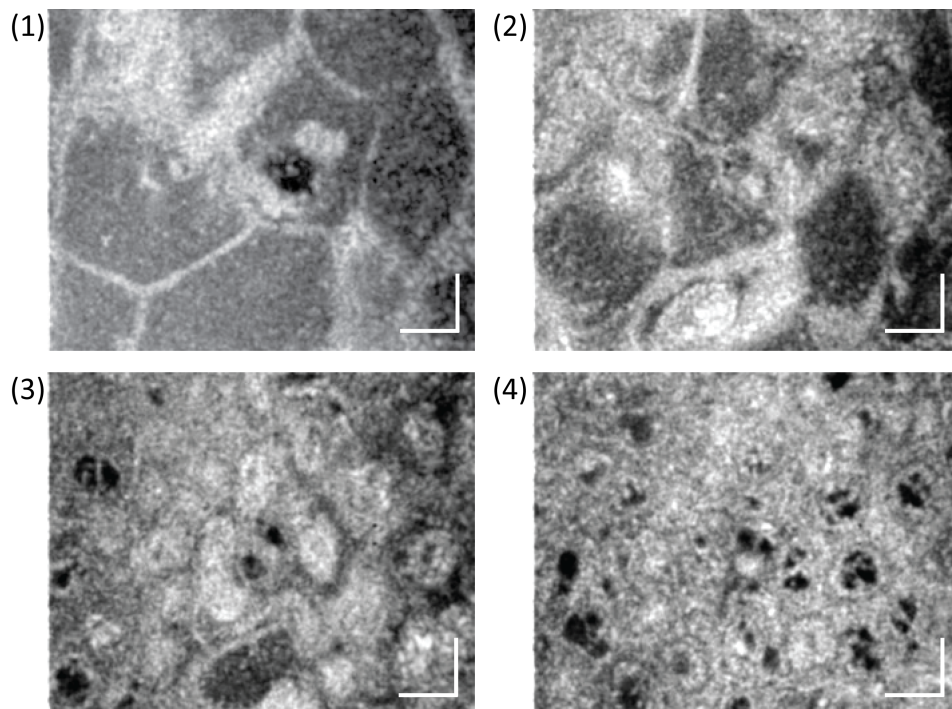
On réalise une image en trois dimensions *in situ* d'un échantillon de peau d'une grenouille *Xenopus Laevis* (partie ventrale de l'animal) (voir Fig. 3.22 ci-après). On positionne l'échantillon sous une lamelle de verre (identique à celle du bras de référence) afin d'une part, de réduire les aberrations optiques, mais également d'aplanir l'échantillon, optimisant ainsi le signal mesuré. Le champ d'observation des images *en-face* est $75\mu\text{m} \times 60\mu\text{m}$.

Les coupes transverses présentées en figure 3.22a mettent en évidence les différences structures composant l'échantillon de grenouille jusqu'à $100\mu\text{m}$ de profondeur. On note ainsi la présence de deux couches proches de la surface puis de structures cellulaires contenant des noyaux qui deviennent de plus en plus denses en profondeur, où il est plus difficile de les distinguer. Enfin, à $\sim 60\mu\text{m}$ de profondeur, une nouvelle organisation du tissu apparaît, correspondant à une autre couche de l'échantillon.

Les images *en-face* (voir Fig. 3.22b) confirment les observations concernant l'accroissement de la densité cellulaire en profondeur et permettent d'évaluer la dimension des cellules et de leurs composites. De diamètre $\sim 40\mu\text{m}$ en surface (Fig. 3.22b(1)), ces cellules sont réduites à $\sim 10\mu\text{m}$ (Fig. 3.22b(3)) en profondeur.



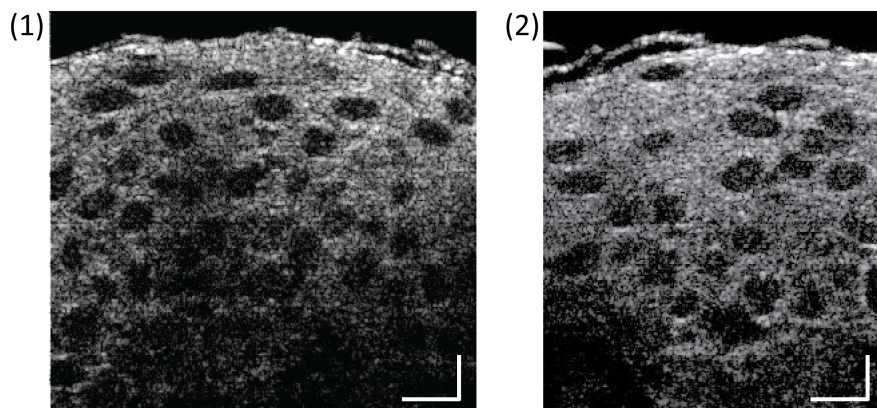
(a) Les barres d'échelles correspondent à $10\mu\text{m}$ dans les deux directions.



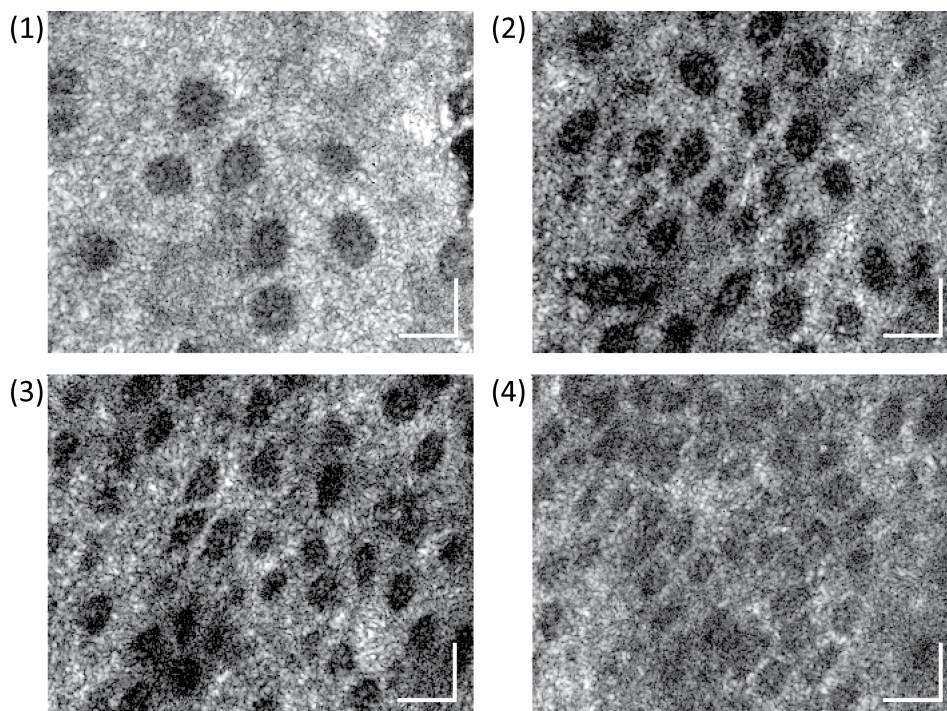
(b) Les barres d'échelles correspondent à $10\mu\text{m}$ dans les deux directions.

FIGURE 3.22 – Coupes transverses d'images 3D d'un échantillon de grenouille *Xenopus Laevis* (a) et images en-face (b) à une profondeur de $10\mu\text{m}$ (1), $18\mu\text{m}$ (2), $20\mu\text{m}$ (3) et $30\mu\text{m}$ (4) dans l'échantillon.

Ce type d'organisation cellulaire est également observable pour un échantillon de peau humaine, comme le montrent les différentes images de la figure 3.23.



(a) Les barres d'échelles correspondent à $10\mu\text{m}$ dans les deux directions.



(b) Les barres d'échelles correspondent à $10\mu\text{m}$ dans les deux directions.

FIGURE 3.23 – (a) : coupes transverses d'une image 3D d'un échantillon de peau humaine *ex situ*. (b) : images en-face (b) à une profondeur de $10\mu\text{m}$ (1), $20\mu\text{m}$ (2), $30\mu\text{m}$ (3) et $41\mu\text{m}$ (4) dans l'échantillon.

Les noyaux des cellules, entourés d'un cytoplasme rétrodiffusant un fort signal, apparaissent sombres sur les images [Raj95, Tsa14]. On est alors capable d'observer de façon détaillée différentes couches successives de la peau, dont la plus superficielle est le *stratus corneum* et ne contenant pas de noyau, qui est sus-jacente à la couche épineuse supérieure, qui constitue la

première couche viable de la peau capable de se renouveler [Raj95], et à la couche épineuse inférieure. Une telle imagerie en trois dimensions de la peau pourrait permettre, par exemple, de détecter des carcinomes épidermoïdes, ou spinocellulaires, se développant dans la couche épineuse de l'épiderme qui sont parmi les cancers de la peau les plus fréquents.

Afin d'ajuster précisément les deux fenêtres l'une par rapport à l'autre lors de l'acquisition de la pile d'images, il est primordial de connaître l'indice moyen de l'échantillon. On évalue alors la position optimale de la mise au point, *i.e.* de la fenêtre de focalisation, pour une différence de marche donnée, ce qui nous permet de déduire le rapport entre les déplacements des deux fenêtres à une certaine profondeur (voir Eq. (1.32)), et donc l'indice de réfraction moyen de la peau de grenouille.

De cette façon, on mesure un indice moyen de $\sim 1,33$ correspondant ainsi à celui de l'eau. Concernant l'échantillon de peau humaine, on estime un indice moyen de 1,43, ce qui est en accord avec l'indice de réfraction de la couche épidermique de la peau, donné dans la littérature pour l'intervalle spectral considéré [Din06].

On note d'autre part, que l'utilisation d'un filtre optimisant la résolution axiale en profondeur permet de conserver une résolution importante dans les tissus et de distinguer des structures très proches les unes des autres, comme l'illustrent notamment les coupes transverses de l'image de peau de grenouille (Fig. 3.22a) dont différentes couches proches les une des autres (autour d'une profondeur de $\sim 10\mu\text{m}$ ainsi qu'aux alentours d'une profondeur de $\sim 50\mu\text{m}$ de profondeur) sont distinguables. Bien que la microscopie confocale soit sujette à une meilleure pénétration dans ce type de tissu [Raj95], elle ne permet cependant pas de représenter les images selon une coupe transverse avec une résolution axiale de qualité similaire à la résolution latérale. Cela entraîne donc une perte d'information qui n'est pas présente avec le système d'OCT présenté ici. On est par exemple capable de mesurer précisément la dimension longitudinale des cellules épineuses de la peau et ainsi d'identifier leur morphologie en trois dimensions, ce qui est plus difficile dans le cas de la microscopie confocale [Raj95].

Ce montage d'OCT plein champ à haute résolution offre donc la possibilité d'observer des détails et des structures présents dans les tissus biologiques ainsi que le permettrait la microscopie confocale, à la différence près que l'OCT plein champ ne requiert pas de balayage latéral et surtout, qu'il possède une réponse impulsionnelle axiale de meilleure qualité favorisant une représentation en coupe transverse (*i.e.* selon le plan XZ) qui apporte d'autres informations comme on a pu le montrer avec l'échantillon de peau.

3.6 Application à l'imagerie cellulaire et illumination en fond noir

Comme on peut le voir sur les images de tissus biologiques présentées ci-dessus, le signal rétro-réfléchi par la lamelle de verre, qui précède l'échantillon, est visible à la surface des représentations en coupe transverse (voir Fig. 3.22a et 3.23a). Elle apparaît alors comme une bande lumineuse dont l'épaisseur est directement liée à la fonction de réponse impulsionnelle axiale. De façon entendue, plus la résolution axiale est élevée, moins l'est la largeur du signal émanant de la lamelle et donc plus il est possible d'observer des structures proches de cette lamelle. Cela est

donc particulièrement contraignant lorsqu'on désire observer des tissus peu épais dont l'information se trouve à proximité de la surface, comme par exemple des cellules. Alors qu'on pourrait trouver une alternative pour certains échantillons en supprimant la lamelle de verre sus-jacente, dans le cas de corps cellulaires, leur préparation nécessite la plupart du temps de les apposer contre deux lamelles de verre les enserrant, et la lumière réfléchie par une lamelle de verre est donc inévitable.

On propose alors un dispositif, basé sur l'illumination en champ sombre, permettant de supprimer le signal émanant des lamelles de verre et ainsi d'améliorer l'imagerie cellulaire en OCT de par le gain d'information engendré.

La microscopie de fond noir, encore appelée microscopie à illumination oblique, est une technique classiquement utilisée, afin d'augmenter le contraste des images de façon relativement simple (voir Fig. 3.24). Pour les systèmes de microscopie optique en transmission, il suffit alors de positionner un diaphragme annulaire dans le plan du diaphragme d'ouverture ainsi qu'un second diaphragme, de type sténopé ou de type annulaire, conjugué avec le diaphragme annulaire dont le diamètre d'ouverture se conjugue avec le disque centrale opaque de ce dernier (voir le schéma de principe en figure 3.24). De cette façon, seuls les rayons diffractés par l'échantillon sont transmis par le système optique, réduisant ainsi l'intensité du fond ne contenant pas d'information utile. Les images résultantes possèdent donc un fond noir, d'où l'appellation de "fond noir", et les structures des échantillons sont davantage visibles (voir Fig. 3.28)

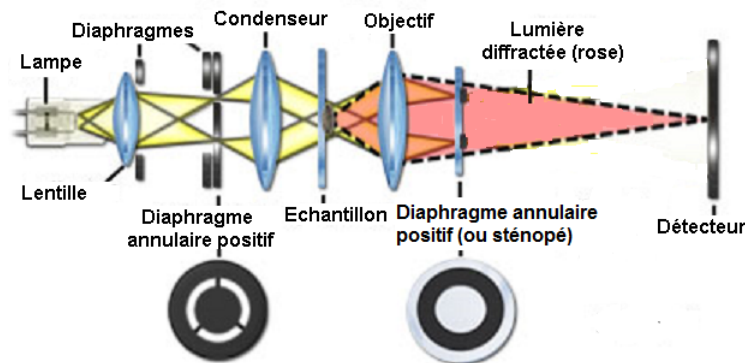


FIGURE 3.24 – Schéma d'un montage de microscopie de fond noir pour un système travaillant en transmission et utilisant une illumination plein champ. Seuls les rayons diffractés par l'échantillon sont détectés. Image modifiée depuis "www.microscopyu.com".

Lorsqu'on travaille en réflexion et en illumination plein champ, comme c'est le cas en OCT plein champ, l'association d'un diaphragme annulaire et d'un sténopé réciproque conduirait à une intensité détectée nulle. Une solution consiste donc à utiliser un objectif de microscope spécialement conçu, pour lequel le faisceau d'illumination parcourt un trajet différent du faisceau rétrodiffusé par l'échantillon (voir figure 3.25). En obliquant le faisceau incident, sa réflexion spéculaire à la surface d'une lamelle de verre est rejetée hors du champ de l'objectif destiné à l'imagerie et il est ainsi possible de s'affranchir du signal de la lamelle. L'utilisation de rayons lumineux incidents exclusivement inclinés justifie le terme de microscopie à illumination oblique.

Ce type de dispositif est utilisé en OCT à balayage et appliqué à l'imagerie cellulaire, afin de ne pas détecter le signal issu de la lamelle superposée à l'échantillon [Vil10].

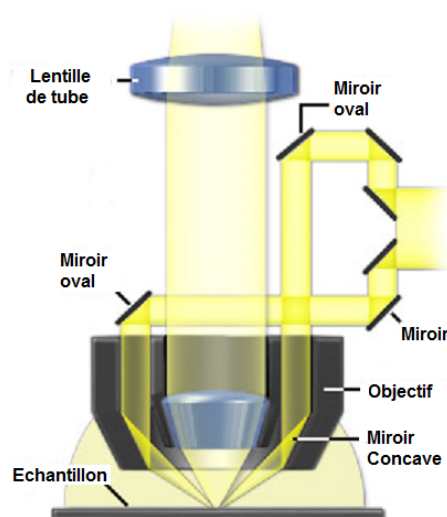


FIGURE 3.25 – Schéma d'un montage de microscopie de fond noir pour un système travaillant en réflexion. Un objectif spécialement conçu est utilisé afin de s'affranchir de la lumière réfléchie spéculairement. Image modifiée depuis "<http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/basics/reflectedcontrast.html>".

Il n'est pas concevable non plus d'utiliser de tels objectifs en OCT plein champ car, comme on l'a vu dans la sous-section 3.3, du fait de la faible cohérence spatiale de la source, on doit garantir des chemins optiques de la lumière similaires dans les deux bras. Or le trajet de la lumière réfléchie spéculairement par la surface de référence et celui de la lumière rétrodiffusée par un échantillon diffusant sont par construction différents pour une onde incidente inclinée.

On propose donc un arrangement alternatif qui est adapté à la fois aux microscopes travaillant en réflexion et aux systèmes interférométriques faiblement cohérents spatialement, comme l'est l'OCT plein champ. On présente le schéma de ce montage dans la figure 3.26 ci-dessous.

Le principe est similaire au montage de la figure 3.24, excepté qu'ici on utilise un diaphragme rectiligne afin de s'adapter à la configuration en réflexion du microscope. Comme on peut l'observer sur le schéma de la figure 3.26, la fraction de la lumière incidente transmise par la fente est bloquée par cette dernière dans le cas d'une réflexion spéculaire sur l'échantillon. En revanche la lumière rétrodiffusée dans toutes les directions est en partie transmise, et aucune information, relative aux fréquences spatiales du signal, n'est perdue. L'inconvénient de ce dispositif réside dans la perte de 50 % de la lumière diffusée par l'échantillon, ce qui n'est pas le cas pour les deux autres modalités présentées, dont les pertes affectent presque exclusivement le faisceau incident.

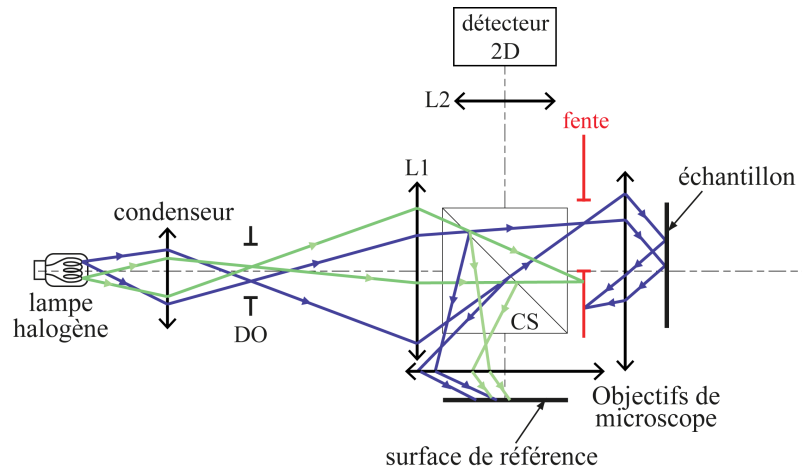


FIGURE 3.26 – Schéma de principe, et trajet "aller" de rayons lumineux, d'un montage d'OCT avec une illumination plein champ et utilisant des objectifs de microscopes classiques. Les rayons verts et bleus représentent la trajectoire de rayons issus de deux points de la source différents. Les rayons verts sont bloqués par la fente sans même être réfléchis par l'échantillon. Les rayons bleus réfléchis spéculairement par l'échantillon sont bloqués par la fente.

On insert ce dispositif dans le montage d'OCT plein champ utilisant un interféromètre de Linnik et on ajoute une fente dans le plan du diaphragme d'ouverture, afin de garantir un faisceau d'illumination identique entre les deux bras (voir figure 3.27). On fait en sorte que l'image de cette fente soit superposée et de taille identique à celle du bras échantillon. De cette manière, cela ne réduit pas l'intensité de lumière incidente sur l'échantillon. En ce qui concerne le bras référence, la lumière perdue était de toute façon inutile puisqu'elle n'était pas cohérente spatialement avec le faisceau du bras échantillon et ne générerait donc qu'un signal de fond parasite. On optimise ainsi le rapport signal à bruit du système OCT plein champ en fond noir.

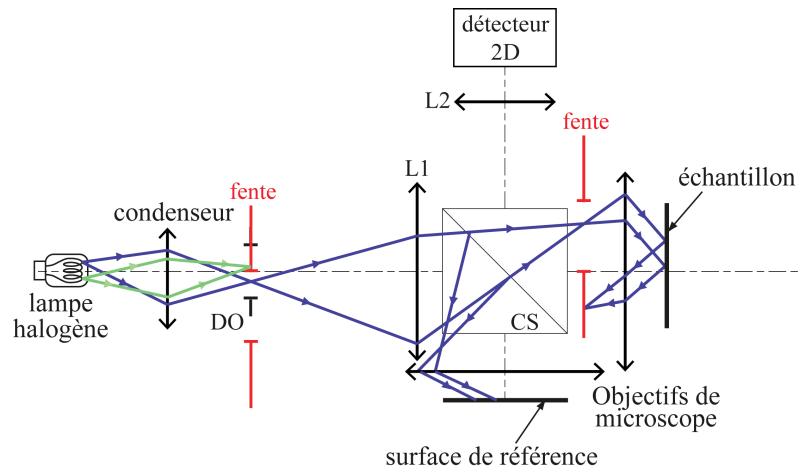


FIGURE 3.27 – Schéma de principe identique au précédent de la figure 3.26 à l'exception de la présence d'une fente au niveau du diaphragme d'ouverture (DO). Cette fente bloque les rayons verts qui ne sont donc plus réfléchis par la référence augmentant ainsi le rapport signal sur bruit.

Afin d'illustrer l'effet de ce type d'illumination, on présente en figure 3.28, une image de microscopie classique, réalisée avec notre système, d'une surface en silicium, sur laquelle est gravé un circuit imprimé, et composée donc de structures diffusantes et de zones lisses qui, quant à elles, réfléchissent la lumière de façon spéculaire et apparaissent sombres lorsque les fentes sont insérées dans le système.

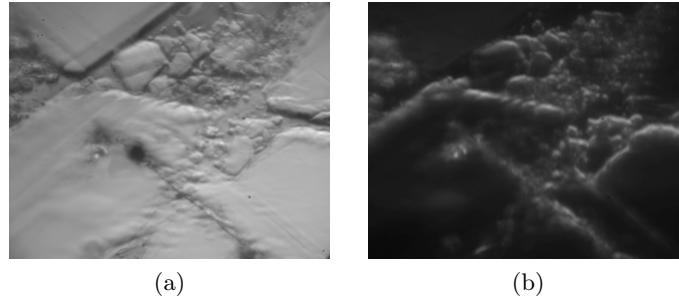


FIGURE 3.28 – (a) : image de microscopie d'un échantillon possédant des zones réfléchissant la lumière spéculairement et d'autres rétrodiffusant la lumière. (b) : image de microscopie de fond noir du même échantillon, utilisant le montage présenté en figure 3.27. En microscopie de fond noir, seules les structures diffusantes sont visibles dans l'image, et on s'affranchit donc du signal réfléchi spéculairement.

La nécessité de cette illumination en fond noir réside donc dans l'étendue du signal de la lamelle de verre qui s'identifie à celle de la réponse impulsionnelle du système. Cela sera d'autant plus efficace si la forme de cette RI axiale contient des rebonds, puisque quand bien même la largeur de son pic central à mi-hauteur demeure identique, le signal, et tout particulièrement celui issu des réflexions spéculaires de la lamelle, s'étalera davantage en profondeur et parasitera encore plus l'observation de structures en périphérie de la surface. Ces rebonds, comme on l'a dit, peuvent être dus à une distribution spectrale trop abrupte (voir Fig. 3.2b(2)) ou striée (voir Fig. 3.2b(3)). Le premier cas est en général la conséquence de l'utilisation de filtres optiques interférométriques qui possèdent une courbe de transmission très raide au niveau de leur longueur d'onde de coupure. En choisissant un filtre adapté, il est relativement aisé de remédier à cela. Les ondulations à fréquences assez élevées présentes dans le spectre, similaires à des stries, découlent plutôt de la forme irrégulière de la réponse spectrale du détecteur, qu'il est plus difficile de compenser.

Afin d'illustrer cela, on présente en figure 3.29 l'image d'une cellule endothéliale de vaisseaux sanguins d'aorte de bœuf, dont l'épaisseur est de $\sim 4\mu\text{m}$. Cette cellule est fixée et apposée contre une lamelle de verre.

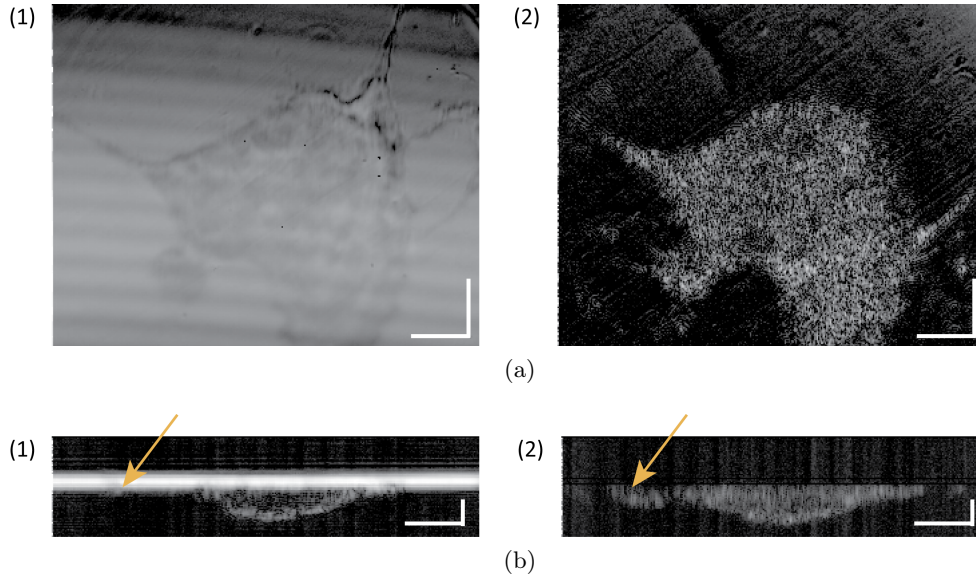


FIGURE 3.29 – (a) : images *en-face* acquises avec un système d'OCT plein champ classique (1) et en fond noir (2). Les barres d'échelle sont de $10\mu\text{m}$ dans les deux directions. (b) : coupes transverses d'images 3D réalisées avec un système d'OCT plein champ classique (1) et en fond noir (2). Les flèches indiquent une zone de la cellule visible uniquement en fond noir. Les barres d'échelle correspondent à $10\mu\text{m}$ dans la direction latérale Ox , et $2\mu\text{m}$ dans la direction axiale Oz .

On précise que le but de ces images réside davantage dans la preuve de principe de l'efficacité d'une illumination en fond noir pour l'imagerie cellulaire en OCT plein champ, plutôt que dans la richesse de l'information apportée. On ne s'attardera donc pas sur la description des structures observées, mais on soulignera par contre l'effet de cette illumination en fond noir qui permet d'accéder à des zones de la cellule autrement parasitées par le signal de la lamelle et constitue ainsi une modalité intéressante dans l'application de l'OCT plein champ à l'imagerie cellulaire à haute résolution. En effet, le signal de la lame obstrue celui du sommet de la cellule comme on peut le voir sur les images *en-face* présentées (Fig. 3.29a). En représentant les images tridimensionnelles selon une coupe transversale, l'amélioration de la détection grâce à la technique de fond noir permet de visualiser des structures autrement invisibles en OCT plein champ classique, comme celle indiquée par une flèche sur les images (Fig. 3.29b).

On a ainsi démontré la faisabilité d'une technique permettant d'augmenter l'information des images, réalisées avec un montage d'OCT plein champ, d'échantillons fins comme le sont la plupart des structures cellulaires. Notre dispositif est, contrairement à la plupart des techniques de microscopie en fond noir, adapté aux systèmes interférométriques qui utilisent une source de lumière incohérente spatialement et une illumination plein champ.

On peut noter, principalement sur les images *en-face*, une légère inhomogénéité du champ qui est plus intense d'un côté de l'image que de l'autre. Cela est dû au fait que les fentes ne sont pas tout à fait confondues avec le plan conjugué du diaphragme d'ouverture, *i.e.* le plan focal des objectifs, et donc que les fentes ne sont pas projetées à l'infini dans l'espace échantillon des objectifs. On observe alors que le signal est plus intense proche de l'image du bord de la fente,

qui est visible car mal conjuguée.

Puisqu'il est parfois difficile de positionner les fentes dans le plan focal des objectifs, pour des raisons d'encombrement, une solution consisterait à ne pas utiliser une fente simple, mais une grille, ou une lame de verre composée de zones opaques périodiquement entremêlées de zones transparentes de largeurs identiques. De cette façon, l'inhomogénéité du champ, qui dépend de l'éloignement du point par rapport à la distance du bord de la fente, serait fortement réduite (en fonction de la fréquence de la grille qui détermine la dimension des zones opaques et transparentes) sans que l'intensité soit diminuée puisque, nonobstant la fréquence de la grille, 50 % de la lumière est transmise à chaque passage.

3.7 Conclusion

On a développé dans ce chapitre un système d'OCT plein champ à haute résolution axiale optimisée, en considérant les principaux effets physiques entrant en jeu dans la détermination de cette résolution, comme le phénomène de dispersion de la lumière ou bien la cohérence spatiale du champ liée notamment à l'ouverture numérique du montage. Au terme d'une étude théorique adaptée au cas particulier de l'OCT plein champ, on a adopté une configuration spectrale optimale afin d'imager en profondeur des échantillons biologiques tels que la peau. Une résolution axiale de $0,67\mu\text{m}$ (dans l'air) (*i.e.* $0,50\mu\text{m}$ dans l'eau) a été obtenue, ce qui constitue un record en OCT, tout en correspondant de façon satisfaisante aux prédictions théoriques simulées. De plus cette résolution a été atteinte en considérant un spectre centré autour de $\lambda_0 = 700\text{nm}$, qui est une longueur d'onde bien adaptée à l'imagerie des milieux biologiques, étant donné les propriétés d'absorption et de diffusion de la lumière.

L'utilisation d'objectifs de microscope d'ouverture numérique égale à 1,2 a permis de démontrer, pour la première fois, la possibilité de réaliser des images en amplitude de tissus biologiques jusqu'à $\sim 100\mu\text{m}$ de profondeur, avec une résolution spatiale isotrope valant, dans l'eau, $\sim 0,5\mu\text{m}$. La sensibilité de détection est, quant à elle, de -71dB.

Enfin, afin d'adapter le système à l'imagerie cellulaire, on a développé un montage d'OCT plein champ en fond noir qui améliore la qualité des images de structures proches de la surface d'une lamelle de verre, en s'affranchissant des réflexions spéculaires issues de cette dernière.

La profondeur de champ relativement réduite des objectifs, étant donné leur ouverture numérique, nécessite une superposition précise des fenêtres de cohérence et de focalisation au cours de l'acquisition d'une pile d'images. En effet, le mouvement des différentes translations motorisées étant basé sur l'indice de réfraction moyen de l'échantillon, qui est à même de varier selon la zone de cet échantillon, peut entraîner des imprécisions réduisant fortement le signal.

Un système de focalisation numérique adapté à un tel système d'OCT plein champ garantirait un maintien du signal en profondeur indépendamment de la distribution de l'indice de l'échantillon. Des travaux ont été publiés concernant cette implémentation de focalisation post-acquisition [Lab09] ouvrant la voie à de futures expériences. On étudiera dans le chapitre 5 de ce manuscrit une méthode de focalisation numérique qui est utilisable pour un montage d'OCT plein champ dans le domaine spectral, et non temporel comme celui concerné ici.

La grande ouverture numérique des objectifs conduit également à une inclinaison importante des rayons lumineux collectés, et rend le système particulièrement sensible aux aberrations qui

constituent probablement le facteur limitant la profondeur de pénétration.

Un système d'optique adaptative couplé à l'OCT plein champ serait alors particulièrement bien adapté à ce type de montage et augmenterait probablement la profondeur de pénétration de façon non négligeable. Bien qu'assez répandue en ce qui concerne l'OCT à balayage dans le domaine spectral [Kum13], seulement quelques travaux, visant à coupler l'OCT plein champ à l'optique adaptative, ont été menés [Bla09] et représentent donc une perspective de développement potentiel.

Chapitre 4

L'OCT plein champ à large champ de vision

“An experiment is a question which science poses to Nature,
and a measurement is the recording of Nature’s answer.”

Max Planck

Sommaire

4.1	Introduction	123
4.2	Montage expérimental	124
4.2.1	Système d'imagerie	124
4.2.2	Source et détecteur	128
4.3	Méthode d'acquisition	129
4.3.1	Déplacement des fenêtres de cohérence et de focalisation	129
4.3.2	Optimisation de la disposition des éléments de l'interféromètre	131
4.4	Performances	133
4.4.1	Résolution axiale	133
4.4.2	Résolution transverse	136
4.4.3	Sensibilité et vitesse d'acquisition	137
4.5	Applications à l'imagerie d'amplitude	139
4.5.1	Images d'échantillons <i>ex vivo</i>	139
4.5.2	Imagerie <i>in vivo</i> d'empreintes digitales et problématiques	142
4.6	Imagerie de phase tomographique	145
4.6.1	Imagerie de phase et profilométrie par interférométrie en lumière blanche	146
4.6.2	Mesure du signal de phase en OCT plein champ	150
4.6.3	Application à l'imagerie d'échantillons multicouches	158
4.7	Conclusion	163

Une spécificité des systèmes d'OCT, dans la communauté de l'imagerie optique en trois dimensions, est le fait que la résolution axiale ne dépende que des propriétés spectrales du montage (voir formule 1.16) en étant donc généralement indépendante de l'ouverture numérique des objectifs de microscope employés, comme nous l'avons souligné au chapitre précédent. Cela octroie à l'OCT une capacité de résolution axiale élevée quel que soit le grandissement du système d'imagerie, ce dernier étant relié à l'ouverture numérique effective du montage.

Les microscopes confocaux destinés à l'imagerie en trois dimensions, qui utilisent deux diaphragmes afin de ne collecter que la lumière proche du plan focal de l'objectif [Raj95], possèdent une résolution de sectionnement axial reposant sur l'étendue de la profondeur de champ de l'objectif de microscope, *i.e.* son ouverture numérique. Bien que cette technique à balayage point par point à deux dimensions [Raj95, Nak02] puisse étendre son champ de vision en augmentant son amplitude de balayage, cela induit un accroissement du temps d'acquisition total ou de la complexité du montage contrairement au cas de l'OCT plein champ.

Les techniques de microscopie à sectionnement axial, basées sur le principe de l'illumination structurée, qui utilisent une grille [Gus08] ou une figure de *speckle* (ou tavelures en français) [Lim08] afin de moduler spatialement le champ d'illumination, ont une qualité de sectionnement axial également liée à l'ouverture numérique de l'objectif. En effet, ce sectionnement repose, ici, sur la fréquence de coupure de la fonction de transfert de modulation du système qui déterminera la transmission du motif modulant caractérisé par sa fréquence spatiale et donc par la capacité à supprimer le signal hors du plan focal.

Les techniques d'OCT utilisant une illumination plein champ, en domaine fréquentiel (voir chapitre 5) ou temporel, constituent donc des systèmes particulièrement appropriés à l'imagerie d'échantillons en trois dimensions avec une résolution axiale importante de l'ordre du micromètre et un large champ de vision de plusieurs millimètres.

4.1 Introduction

Une des caractéristiques qui différencie l'OCT plein champ des autres techniques d'OCT à balayage est, comme on l'a dit, l'acquisition d'images *en-face* sans nécessiter de balayage de faisceau mécanique. Cela confère à l'OCT plein champ, entre autres, un potentiel de vitesse d'exécution élevé compte tenu de la réduction du nombre de mouvement mécanique. Cet avantage est d'autant plus important que le champ imagé est grand, puisqu'en OCT plein champ la vitesse d'acquisition peut être considérée indépendante au regard de la dimension du champ de vision. De plus, la possibilité d'utiliser une source de lumière thermique réduit notablement le coût du montage et permet d'atteindre des résolutions axiales élevées sans affecter la rapidité du système.

Plusieurs expériences d'OCT à large champ existent dans la littérature et particulièrement en OCT à balayage [Gol05, Gru12] pour lesquelles le champ maximal atteint est de l'ordre de $15\text{mm} \times 15\text{mm}$. Néanmoins, le besoin de déplacer mécaniquement un miroir afin de couvrir le champ, n'est pas optimal en termes de vitesse et de stabilité, surtout lorsque ce champ est large.

Dans [Wat08], un champ de vision de $\sim 8\text{mm} \times 8\text{mm}$ a été atteint en OCT plein champ mais avec une sensibilité de détection ne dépassant pas -73dB et une résolution axiale n'excédant pas $10\mu\text{m}$ ce qui limite les applications potentielles. D'autres montages ont atteint une sensibilité de

détection de l'ordre de -80dB et ont réalisé des images d'échantillons biologiques en profondeur [Bor02, Wat08], mais la résolution axiale demeure inférieure à $5\mu\text{m}$ alors que le champ de vision n'est pas plus grand que $5\text{mm} \times 5\text{mm}$. Une équipe [Har14] a été au-delà de ces performances en OCT plein champ, avec un champ de $15\text{mm} \times 15\text{mm}$ et une résolution axiale de l'ordre de $3\mu\text{m}$. Aucune publication ne développe par ailleurs d'étude théorique approfondie spécifique à la technique d'OCT plein champ, à champ large, utilisant un seul objectif de microscope, ni ne clarifie les avantages et les inconvénients sous-jacents de ce type de montage, comme par exemple, la profondeur d'imagerie accessible relativement faible étant donnée la configuration optique du montage.

Nous avons donc décidé de développer un système d'OCT plein champ à large champ de vision dont la résolution axiale et les performances en termes de sensibilité et de profondeur d'imagerie sont similaires à l'OCT plein champ conventionnel.

Le dispositif a été appliqué à la réalisation d'images tomographiques en amplitude d'échantillons biologiques, ainsi qu'à la détermination du profil topographique de structures multicouches épaisses, résolues en profondeur, en mesurant le signal de phase. Pour cela, un nouvel agencement des éléments de l'interféromètre, adapté à un montage d'OCT plein champ à large champ de vision, a été envisagé. De plus, une technique à décalage de phase novatrice fut développée afin d'extraire efficacement et rapidement le signal OCT, et notamment le signal de phase.

Le développement de ce système a été effectué en collaboration étroite avec le groupe *Stanford Biomedical Optics*, de l'université de Stanford (Californie, Etats-Unis), dirigé par Pr. Audrey Ellerbe.

4.2 Montage expérimental

Le système développé doit garantir un champ de vision élargi ($\sim 18\text{mm} \times 18\text{mm}$) tout en assurant une qualité d'image et une sensibilité de détection homogène sur l'ensemble du champ. Le choix des optiques du système d'imagerie doit également permettre d'atteindre une profondeur d'imagerie similaire à l'OCT conventionnel. Enfin, la bande spectrale utilisée doit, elle, garantir une résolution axiale proche de $2\mu\text{m}$ et une profondeur de pénétration satisfaisante pour des échantillons diffusants.

4.2.1 Système d'imagerie

Afin d'obtenir un champ de vision de $18\text{mm} \times 18\text{mm}$, le grandissement du système optique d'imagerie doit être faible et inférieur à l'unité compte tenu de la taille du détecteur ($=10,8\text{mm} \times 10,8\text{mm}$). Il est par conséquent préférable d'utiliser des objectifs de microscope avec un faible grandissement dont l'ouverture numérique est généralement plus faible. Or une ouverture numérique réduite signifie une profondeur de champ étendue pouvant rendre inutile une adaptation dynamique de la position de la fenêtre de focalisation, comme c'est le cas en OCT plein champ conventionnel en configuration Linnik. En choisissant un objectif dont la profondeur de champ est suffisamment importante, une configuration de type Linnik devient obsolète et un arrangement n'employant qu'un seul objectif de microscope, qui collecterait la lumière provenant de la surface de référence ainsi que de l'échantillon, est préférable. Il est alors nécessaire d'utiliser un

objectif dont la distance frontale est importante afin d'intercaler un dispositif séparateur aux dimensions adaptées (i.e. $25\text{mm} \times 25\text{mm}$) entre l'objectif et l'échantillon.

Une telle configuration permet, outre une réduction du coût du montage puisqu'un seul objectif de microscope est employé, de réduire la différence de dispersion améliorant ainsi la sensibilité de détection du montage. En effet, avec un interféromètre de Linnik, si les deux objectifs ne sont pas parfaitement identiques, une différence de dispersion apparaît, surtout lorsqu'on utilise une lumière spectralement étendue. Cela est particulièrement significatif lorsque des objectifs complexes constitués d'un grand nombre de lentilles sont utilisés, comme c'est le cas pour des objectifs garantissant des images de haute qualité et pour un large champ de vision. Bien qu'une différence de dispersion puisse être compensée par l'insertion de lames de verre dans l'interféromètre, la réflexion de la lumière sur ces lames engendre une baisse du signal et donc de la vitesse d'acquisition.

On propose donc une configuration de type Michelson constituée d'un seul objectif de microscope positionné hors de l'interféromètre (voir Fig. 4.1) et réalisant l'acquisition d'images 3D.

L'un des premiers montages d'OCT plein champ publié [Bea98] utilisait une configuration de type Michelson mais pour un champ de vision assez réduit et avec un objectif non adapté à l'imagerie en profondeur. D'autres systèmes utilisent cette configuration avec des champs de vision élargis, mais en utilisant, comme système optique d'imagerie, des associations de lentilles simplifiées tels que des doublets par exemple [Har14, Wat08, Yu04]. Cependant, l'emploi d'un tel système d'imagerie limite la qualité des images et/ou la profondeur d'imagerie accessible du fait par exemple de la présence d'aberrations en bord de champ.

Dans notre cas, on privilégie l'utilisation d'un objectif de microscope qui garantit de bonnes performances en terme d'imagerie. Ce type d'instrument étant généralement optimisé pour travailler en conjugaison foyer-infini, une lentille de tube est nécessaire pour projeter l'image intermédiaire sur le détecteur. On utilise alors un objectif photographique à focale fixe de 50mm.

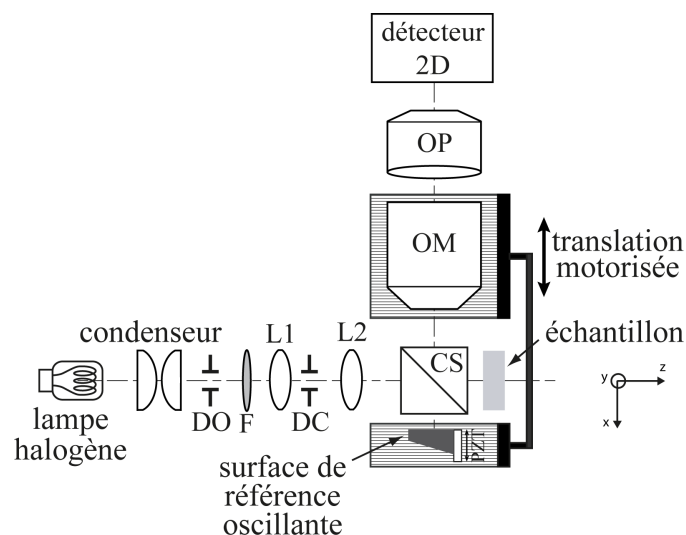


FIGURE 4.1 – Schéma de principe du montage d'OCT plein champ à large champ de vision. DO : diaphragme d'ouverture, DC : diaphragme de champ, F : filtre optique, CS : cube séparateur, OM : objectif de microscope, OP : objectif photographique, PZT : platine piézoélectrique.

Cette configuration de Michelson n'utilisant qu'un seul objectif, elle ne permet pas, comme il est d'usage avec un interféromètre de Linnik [Dub02], d'adapter dynamiquement la mise au point de l'échantillon au cours de l'acquisition d'une pile d'images. Il est donc essentiel que l'ouverture numérique du système d'imagerie soit faible afin d'accroître la profondeur de champ et par conséquent la profondeur d'imagerie accessible. Cela est d'autant plus important si le milieu d'immersion est l'air du fait de l'importante différence d'indice avec un échantillon. On utilise alors un objectif de microscope achromatique (*2X Mitutoyo Plan Apo Infinity-Corrected Long WD Objective*) d'ouverture numérique 0,055 et de distance frontale valant ~ 34 mm.

L'ouverture numérique étant dans notre cas limitée par l'objectif de microscope, la profondeur de champ est théoriquement de l'ordre de $200\mu\text{m}$. Pour atteindre une profondeur d'imagerie accessible supérieure à $200\mu\text{m}$, il est alors nécessaire de déplacer correctement la position de l'objectif de microscope relativement à l'échantillon lors de l'acquisition comme expliqué dans la prochaine section. Afin de garantir une qualité d'image optimale et dépourvue d'aberration, on utilise un objectif photographique de focale fixe égale à 50mm pour projeter le signal sur le détecteur matriciel.

En dehors de l'objectif de microscope et de la lentille de tube, l'élément agissant comme séparatrice de l'interféromètre peut également limiter la taille du champ image projeté sur le détecteur. Celui-ci doit donc avoir un diamètre suffisamment grand pour ne pas rogner le champ image final en deçà des $18\text{mm} \times 18\text{mm}$, mais doit être également suffisamment mince afin de respecter la distance frontale de l'objectif, à savoir ~ 34 mm. Nous avons pu tester deux types de séparateur optique : un cube non polarisant dont les côtés mesurent plus de 20mm ainsi qu'un film optique d'épaisseur $2\mu\text{m}$ seulement. Ce dernier a l'avantage de minimiser les différences de dispersion, ce qui représente un avantage non négligeable étant donné la largeur spectrale de la source que nous utilisons. Cependant, la fine membrane qui le compose rend cet élément très sensible aux vibrations extérieures et cela a engendré une instabilité du signal rendant impossible toute mesure interférométrique.

Le choix s'est donc porté sur un cube séparateur plus épais mais garantissant une stabilité du signal indispensable. La largeur du cube doit être adaptée à la distance frontale de l'objectif mais ne doit pas limiter le champ de vision. Un cube dont les côtés mesurent 20 mm limitant notre champ de vision, nous avons opté pour un élément de côtés 25,4 mm. Bien que celui-ci soit davantage susceptible d'induire des différences de dispersion, comme nous pourrions l'observer par la suite (voir Fig. 4.7), cette présence de différences de dispersion ne semble pas intrinsèquement liée à l'emploi d'un cube épais. En effet, l'utilisation d'un cube de 20mm de côtés n'entraînait pas de problème de dispersion pour une largeur de spectre équivalente, ce qui n'est pas le cas de celui que nous utilisons bien qu'il soit optimisé pour un intervalle de longueurs d'onde compris entre 700nm et 1100nm.

Il est d'autre part important de centrer le cube séparateur par rapport à l'axe optique du montage afin que celui-ci ne limite pas le champ de vision. Pour cette raison, on n'incline pas le cube comme c'était le cas dans les expériences précédentes, mais on l'oriente perpendiculairement à l'axe optique du montage. Puisqu'on utilise un spectre essentiellement compris dans le domaine spectral du proche infrarouge, les réflexions parasites émanant du cube sont rendues négligeables puisqu'elles correspondent principalement à de la lumière visible. On peut ainsi vérifier que le champ imagé est limité par la pupille d'entrée de l'objectif de microscope et non par le cube séparateur.

Le cube étant positionné entre l'objectif et les deux objets (la surface de référence et l'échantillon), il pourrait également, du fait de son épaisseur, entraîner une déformation du front d'onde rétrodiffusé incongrue conduisant à la présence d'aberrations, étant donné que la courbure du front d'onde est relativement importante avant la collection par l'objectif de microscope. Néanmoins, la faible ouverture numérique de l'objectif, égale à 0.055, assure une faible inclinaison des rayons lumineux collectés et cela n'engendre donc pas d'aberrations considérables liées au cube.

On évalue grossièrement la présence d'aberrations en étudiant une image de microscopie d'un échantillon contenant des rayures réparties sur tout le champ et dont on réalise la mise au point sur sa partie centrale (voir figure 4.2). On constate donc que, avec le système d'imagerie utilisé (*i.e.* objectif de microscope + objectif photographique) les structures sont nettes quelle que soit leur position dans le champ (Fig. 4.2a). En revanche, si un ou plusieurs doublets de lentilles sont utilisés à la place d'un des éléments optiques du système d'imagerie, la présence d'aberrations de champs est cette fois significative (Fig. 4.2b). Cela justifie donc l'emploi de systèmes optiques optimisés et bien adaptés à l'imagerie afin d'atteindre des performances élevées sur un champ de vision étendu.

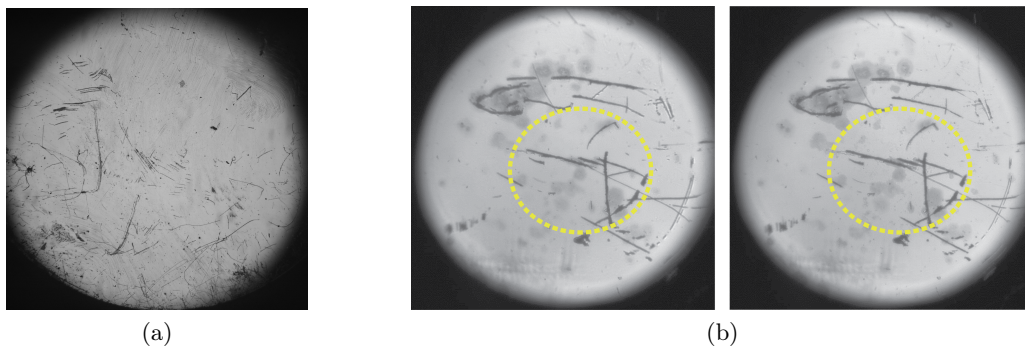


FIGURE 4.2 – Images de microscopie de deux échantillons similaires mais différents révélant la présence ou non d'aberration de champ. Si un système optimisé est utilisé (a), les structures sont nettes sur tout le champ, contrairement au cas (b) pour lequel un doublet de lentilles a été inséré comme lentille de tube. Les bords (en périphérie du cercle jaune pointillé) et le centre (à l'intérieur du cercle jaune pointillé) du champ ne sont pas focalisés simultanément selon l'endroit du champ où l'on effectue la mise au point

On notera la présence d'une variation de l'intensité en bord de champ des images qui correspond à un effet de vignettage dû à la dimension limitée de la pupille d'entrée de l'objectif de microscope. La réduction du diamètre du diaphragme d'ouverture influant sur l'inclinaison maximale des rayons illuminant les objets ou l'augmentation de la distance focale de la lentille précédent le cube séparateur sont des solutions restreignant cet effet indésirable, mais qui comportent pour la première la conséquence de réduire la vitesse d'exécution du système en diminuant le flux lumineux incident alors que la seconde augmente l'encombrement d'un système d'imagerie se voulant compact.

4.2.2 Source et détecteur

La source de lumière employée est une lampe thermique de type halogène couvrant un large spectre allant du visible au proche infrarouge. Un système d'illumination basé sur le principe d'illumination Köhler est mis en place afin de garantir un champ lumineux homogène. Puisqu'on utilise une configuration de type Michelson ici, le diaphragme d'ouverture est au foyer objet du système de deux lentilles $\{L1 - L2\}$ alors que le diaphragme de champ est lui conjugué avec le foyer objet de l'objectif de microscope.

On dispose un filtre optique afin de sélectionner une bande spectrale adaptée aux performances attendues. La densité spectrale de puissance du système dépend essentiellement de la source, du filtre et de la réponse spectrale du détecteur. La caméra considérée est différente de celle employée dans les chapitres précédents, en raison de la nécessité de disposer de pixels de dimensions réduites et en nombre plus important afin de satisfaire les objectifs de résolution latérale et de champ de vision. On utilise ainsi un détecteur CMOS (*Photonfocus MV-D1024E-CL*) dont la zone de sensibilité s'étend de 300nm à 1000nm, sa surface sensible étant en silicium. Il possède également une capacité de charge maximale des puits d'électrons de 200 000 électrons, garantissant ainsi une sensibilité de détection correcte. Elle est constituée d'une matrice de 1024×1024 pixels carrés de $10,6\mu\text{m}$ de côté, ce qui correspond donc à une surface de détection de $10,9\text{mm} \times 10,9\text{mm}$ et est donc bien adaptée aux attentes du montage. La figure 4.3 résume ses principales caractéristiques y compris sa réponse spectrale qui déterminera en grande partie l'allure de la réponse impulsionnelle axiale de notre système.

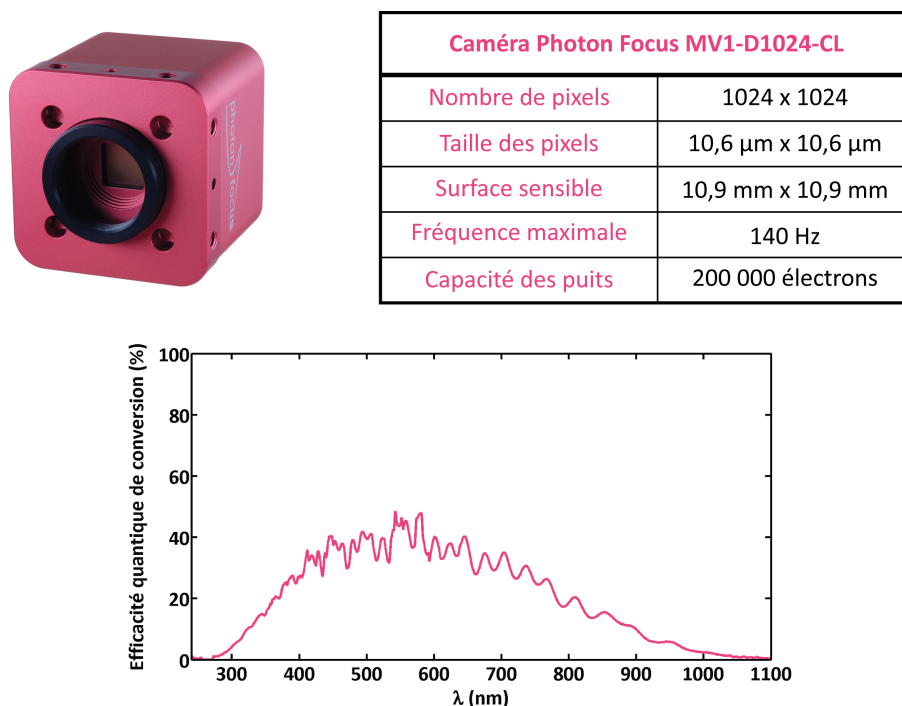


FIGURE 4.3 – Caractéristiques principales de la caméra PhotonFocus

L'étendue relativement importante de la sensibilité spectrale de la caméra pourrait a priori permettre d'atteindre une résolution axiale très élevée. Cependant, plus la gamme spectrale

considérée est large, plus on est sujet à la dégradation du signal due aux différences de dispersion notamment.

Concernant la résolution spatiale, une bande spectrale dans la gamme visible serait plus avantageuse puisque dans les trois directions de l'espace cette résolution s'améliore à mesure que la longueur d'onde centrale du spectre λ_0 diminue. Il serait par ailleurs possible de réduire la largeur de la bande spectrale tout en conservant une résolution identique à celle obtenue pour une valeur de λ_0 plus élevée. Comme on le verra par la suite, cela favoriserait aussi légèrement la précision sur la mesure de la phase en diminuant l'incertitude sur λ_0 et en minimisant les incertitudes liées aux paramètres qui dépendent de la longueur d'onde.

Cependant, nous avons vu que la profondeur de pénétration en OCT est supérieure dans le proche infrarouge ce qui conduirait à utiliser une bande entre 700nm et 1000nm. De plus, la dispersion du verre et de l'eau est plus importante dans le visible que dans le proche infrarouge. De ce fait, la différence de dispersion, qui apparaît entre les deux bras lorsqu'on pénètre dans l'échantillon, plus susceptible de détériorer le signal OCT si l'on travaille avec de la lumière visible pour une largeur de bande spectrale similaire.

On décide de favoriser la profondeur de pénétration dans les tissus, et on choisit donc d'utiliser un filtre sélectionnant un intervalle spectrale compris entre 665nm et 1000nm (voir Fig. 4.7).

4.3 Méthode d'acquisition

Afin de garantir au dispositif une profondeur de pénétration similaire à l'OCT plein champ conventionnel, le choix de l'ouverture numérique du système d'imagerie est également important. Celle-ci doit être suffisamment réduite afin de se prémunir du besoin d'une focalisation dynamique au cours de l'acquisition, qui n'est pas réalisable avec un interféromètre de type Michelson. Cela réduira également le nombre de mouvements mécaniques du système comparé à l'OCT plein champ conventionnel tout en conservant une profondeur d'imagerie identique.

4.3.1 Déplacement des fenêtres de cohérence et de focalisation

Le fait d'utiliser un objectif de microscope de faible ouverture numérique augmente la profondeur de champ et élargit donc la fenêtre de focalisation. Si cette profondeur de champ est supérieure ou égale à la profondeur d'imagerie escomptée, il n'est pas nécessaire de décaler cette fenêtre en translatant la position de l'objectif par rapport à la surface de référence et à l'échantillon, puisque la mise au point sera assurée pour l'ensemble de la pile d'images réalisée. En revanche, si la profondeur de champ est trop faible, soit celle-ci limite la profondeur de pénétration, ce qui est le cas généralement en FD-OCT, soit il faut déplacer mécaniquement la fenêtre de focalisation au cours d'une acquisition comme cela est effectué en OCT plein champ lorsqu'une configuration Linnik est utilisée.

En observant l'évolution de netteté d'une mire de résolution lorsqu'on déplace l'échantillon, on mesure pour notre système une profondeur de champ de $300\mu\text{m}$. Cette valeur est plus faible que la profondeur de pénétration attendue qui est de $500\mu\text{m}$ et il est donc nécessaire d'ajuster la position de la fenêtre de focalisation au cours de l'acquisition d'une pile d'images. Etant donné notre configuration, on ne peut l'ajuster indépendamment de la position de la fenêtre de

cohérence comme cela est fait avec un interféromètre de Linnik puisque nous ne disposons que d'un seul objectif de microscope.

Une solution consiste à traduire conjointement l'objectif de microscope et la surface de référence en laissant l'échantillon immobile. On décale ainsi la section imagée en profondeur dans l'échantillon en maintenant les fenêtres de cohérence et de focalisation superposées jusqu'à une certaine profondeur.

Comme cela a été expliqué en sous-section 1.5.1, les deux fenêtres se déplacent différemment lors de l'acquisition d'une pile tomographique, du fait de la différence entre l'indice du milieu d'immersion, ici l'air, et de celui de l'échantillon biologique noté n . Dans le cas d'un interféromètre de Michelson n'utilisant qu'un seul objectif, le déplacement d'une distance z de ce dernier engendre une translation de la fenêtre de focalisation d'une distance nz alors que la fenêtre de cohérence se déplace de z/n dans l'échantillon (voir Fig. 4.4)

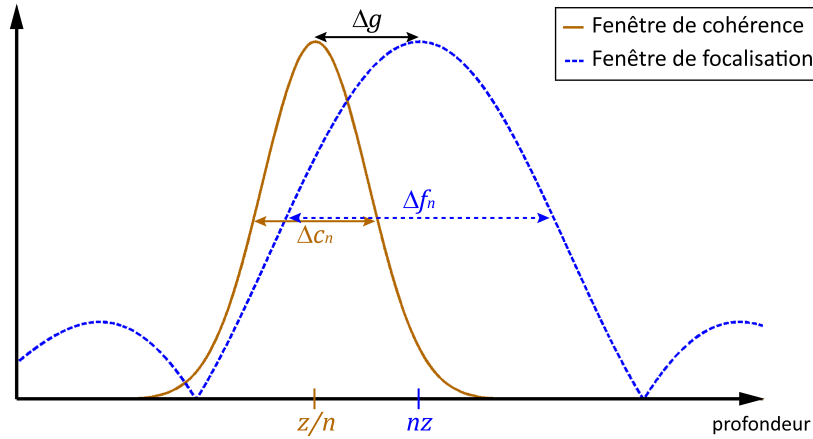


FIGURE 4.4 – Position de la fenêtre de focalisation (en bleue) et de cohérence (en orange) dans l'échantillon pour une translation de la platine motorisée (i.e l'objectif et la surface de référence) d'une distance z . Δg correspond à la distance entre le centre des deux fenêtres (ici $\Delta g > 0$).

On définit alors une profondeur d'imagerie maximale, notée z_{max} , qui correspond à la profondeur z pour laquelle les fenêtres sont disjointes. On nomme Δf_n et Δc_n la largeur à mi-hauteur respectivement de la fenêtre de focalisation et de cohérence. On précise que ces dernières correspondent aux largeurs estimées dans l'échantillon, et sont donc multipliées (pour la fenêtre de focalisation) ou divisées (pour la fenêtre de cohérence) par n par rapport aux grandeurs données dans l'air. On considèrera les fenêtres disjointes lorsque leurs centres sont distants d'une distance Δg supérieure à $\Delta f_n/2 + \Delta c_n/2$. On note Δg_0 la valeur initiale de Δg . Ainsi, en supposant que les fenêtres sont initialement centrées à la surface de l'échantillon (i.e. $\Delta g = \Delta g_0 = 0$), cette limite z_{max} s'exprime de la façon suivante :

$$nz_{max} - \frac{\Delta f_n}{2} = \frac{z_{max}}{n} + \frac{\Delta c_n}{2} \quad \Leftrightarrow \quad z_{max} = \frac{n}{2(n^2 - 1)}(\Delta f_n + \Delta c_n) \quad (4.1)$$

On appellera $z_{max,a}$ cette distance limite, correspondant au cas $\Delta g = 0$.

4.3.2 Optimisation de la disposition des éléments de l'interféromètre

Dans le but d'atteindre une profondeur d'imagerie plus importante que $z_{max,a}$, on décale initialement la fenêtre de focalisation au-dessus de la surface des objets (i.e. $\Delta g_0 < 0$) de sorte que les deux fenêtres soient confondues depuis la surface jusqu'à une profondeur z_{max} plus importante. Dans ce cas, la profondeur limite, notée $z_{max,b}$, s'écrit :

$$z_{max,b} = \frac{n}{2(n^2 - 1)}(\Delta f_n + \Delta c_n - 2\Delta g_0) \quad (4.2)$$

La valeur de Δg_0 est bornée par la valeur $\Delta f_n/2$, puisque la surface des objets doit initialement être incluse dans la fenêtre de focalisation. En positionnant les deux objets par rapport aux objectifs de sorte que $\Delta g_0 = -\Delta f_n/2$ et que le fenêtre de cohérence soit centrée à la surface de l'échantillon (voir Fig. 4.5b), on peut élargir la profondeur d'imagerie d'une valeur $\Delta f_n/2$ et $z_{max,b}$ vérifie la relation suivante :

$$z_{max,b} = \frac{n}{2(n^2 - 1)}(2\Delta f_n + \Delta c_n) \quad (4.3)$$

En pratique, cela signifie qu'on écarte la surface de référence juste avant qu'elle ne devienne floue sur le détecteur. On déplace alors l'échantillon jusqu'à la position correspondant à une différence de marche nulle entre la surface de ces deux objets. Ainsi, la fenêtre de cohérence est bien centrée au niveau de leurs surfaces alors que la fenêtre de focalisation est, elle, décalée. On peut vérifier expérimentalement que le signal OCT et le contraste des franges d'interférences n'est pas détérioré par ce déplacement. Si la largeur de la fenêtre de cohérence est suffisamment faible devant celle de focalisation pour être négligée, ce qui est notre cas ici, on peut reformuler l'expression de $z_{max,a}$ et $z_{max,b}$:

$$z_{max,a} = \frac{n}{2(n^2 - 1)}\Delta f_n \quad , \quad z_{max,b} = \frac{n}{2(n^2 - 1)}2\Delta f_n \quad (4.4)$$

On note qu'en optimisant la position des différents éléments de l'interféromètre on double la profondeur d'imagerie maximale. La profondeur de champ de notre objectif étant de $450\mu\text{m}$ dans un échantillon d'indice $\sim 1,4$, on peut ainsi augmenter cette distance de plus de $200\mu\text{m}$ et z_{max} est alors égal $\sim 650\mu\text{m}$. Cela correspond donc à une limite intrinsèque du système qui n'existe pas pour un interféromètre de Linnik avec lequel il est possible d'ajuster les fenêtres indépendamment. Cependant, puisque la profondeur d'imagerie en OCT plein champ n'est généralement pas supérieure à $500\mu\text{m}$ dans des échantillons biologiques usuels du fait de la diffusion et de l'absorption de la lumière, une profondeur d'imagerie accessible limitée à $650\mu\text{m}$ n'est donc pas préjudiciable. Une solution pour accroître davantage cette distance serait de réduire l'ouverture numérique effective du système d'imagerie, mais cela diminuerait la résolution latérale du montage.

La figure 4.5 schématise le déplacement des fenêtres au cours d'une acquisition. On observe notamment que, dans le cas optimisé, le fait que l'objectif de microscope et la surface de référence soient fixés au même support motorisé maintient cette dernière à la limite de la fenêtre de focalisation (Fig. 4.5b). Ainsi, la surface de référence est maintenue dans la profondeur de champ de l'objectif lui garantissant ainsi une position adaptée tout au long de l'acquisition de la pile d'images.

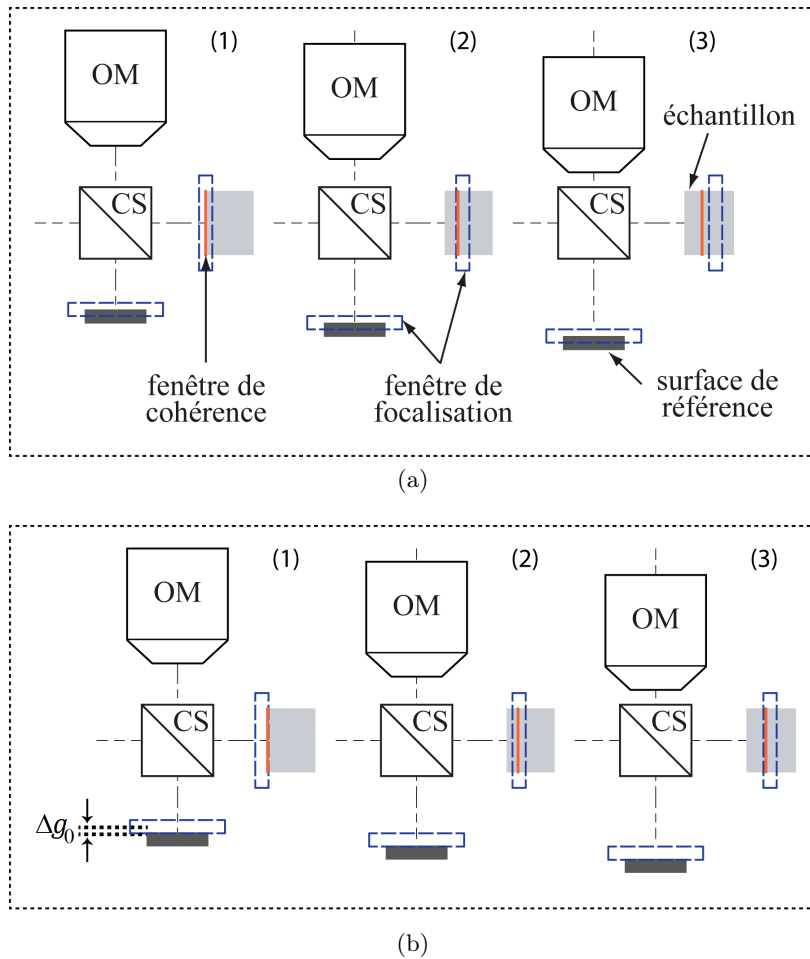


FIGURE 4.5 – Déplacement des fenêtres de cohérence (trait plein orange) et de focalisation (trait pointillé bleu) au cours d'un balayage axiale pour trois positions différentes (1), (2) et (3) du moteur contrôlant l'objectif de microscope (OM) et la surface de référence. Si la position initiale des fenêtres n'est pas adaptée (a) les fenêtres se disjoignent précocement contrairement au cas optimisé (b) pour lequel la profondeur d'imagerie est alors supérieure.

On démontre expérimentalement l'effet de cette optimisation en mesurant le signal à la surface d'un échantillon structuré précédé de deux lames de verre de $145\mu\text{m}$ d'épaisseur chacune. On utilise une mire de résolution comme échantillon structuré afin de mesurer la résolution latérale en profondeur dans le cas où la position de la surface de référence est optimisée (*i.e.* $\Delta g_0 = -\Delta f_n/2$) ou non (*i.e.* $\Delta g_0 = 0$) (voir Fig. 4.6).

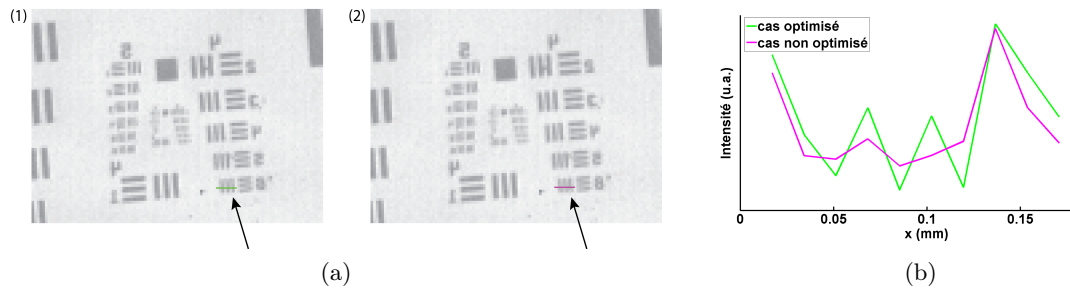


FIGURE 4.6 – Images d’une mire de résolution avec lames de verre en BK7 situées au-dessus (a). L’image (1) correspond au cas optimisé contrairement à l’image (2). (b) : profils d’intensité au niveau de la zone concernée (ligne indiquée par une flèche sur les images). Une différence de netteté des structures de la zone 4.6 de la mire de résolution est alors visible sur les images et la coupe d’intensité.

On observe donc une variation de la résolution latérale lorsque la mire de résolution est positionnée sous des éléments d’indices différents de celui de l’air (Fig. 4.6) selon l’ajustement de la surface de référence. On mesure alors une baisse de résolution qui affectera non seulement la qualité des images, mais aussi l’amplitude du signal interférométrique et donc la profondeur de pénétration. On vérifie qu’en l’absence de lame de verre, la résolution latérale est équivalente dans les deux cas ce qui confirme l’existence d’une configuration optimale.

Ce choix de la position initiale des fenêtres est d’autant plus important que la différence d’indice entre le milieu d’immersion et l’échantillon est élevée. En imaginant un montage totalement immergé dans un milieu d’indice identique à celui de l’échantillon, ou bien en supposant que l’indice de l’échantillon est identique à celui de l’air, la différence de déplacement des deux fenêtres ne limiteraient aucunement la profondeur d’imagerie accessible. Cependant ces deux hypothèses sont ici hors de propos, puisqu’il n’est réalisable ni d’immerger totalement le montage ni d’utiliser un échantillon d’indice $n=1$. Il est donc crucial d’adapter ainsi la position des deux fenêtres puisque le milieu d’immersion est l’air (*i.e.* $n=1$) et que les échantillons qu’on utilise ont un indice compris entre 1,4 et 1,6.

4.4 Performances

Les performances attendues de ce système sont au moins celles de l’OCT plein champ conventionnel, c’est-à-dire une résolution axiale proche du micromètre, une sensibilité de détection comprise entre -80dB et -90dB selon le nombre d’accumulations choisi, et une profondeur d’imagerie de l’ordre de plusieurs centaines de μm pour des échantillons biologiques.

4.4.1 Résolution axiale

Comme on l’a vu dans les chapitres précédents, la résolution axiale en OCT ne dépend que des propriétés spectrales du système (voir Eq. (1.16)) et est inversement proportionnelle à la largeur de la densité spectrale de puissance de détection effective. Elle dépend également de la longueur d’onde centrale de ce spectre qu’on a choisie égale à $\sim 800\text{nm}$ pour améliorer la sensibilité de

détection en profondeur comme ce fut expliqué précédemment. On positionne alors un filtre coloré passe-haut dont la fréquence de coupure est 665nm afin de répondre aux spécifications. On présente en figure 4.7a, la densité spectrale de puissance de détection théorique incluant le filtre utilisé. La figure 4.7b contient l'interférogramme théorique simulé à partir de ce spectre et celui obtenu expérimentalement. La mesure de la résolution axiale affichée sera détaillée par la suite.

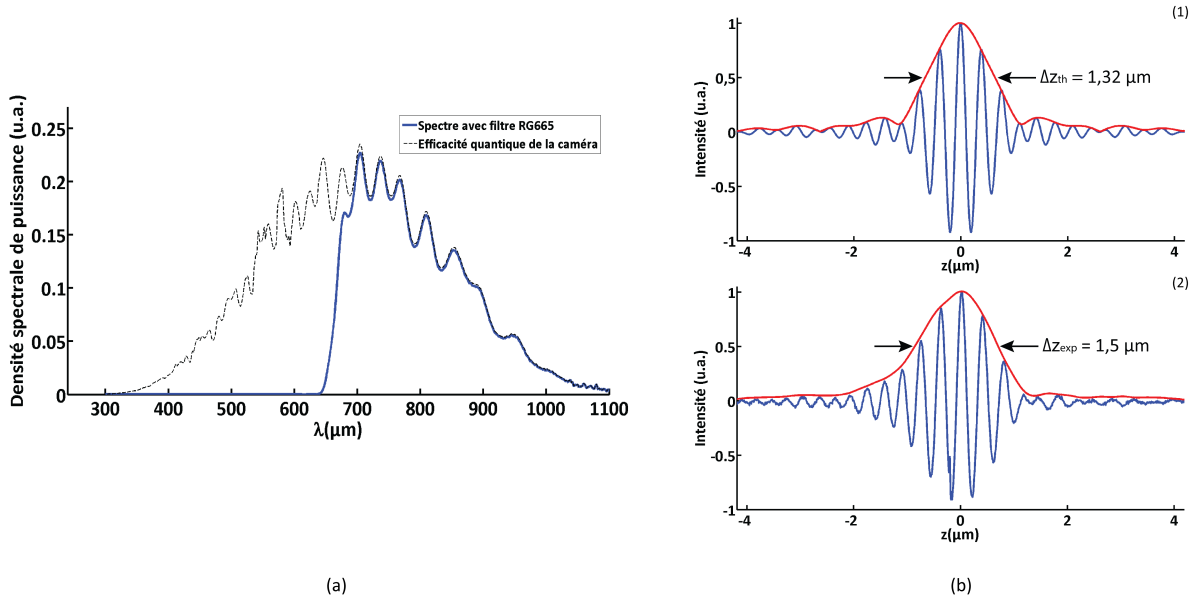


FIGURE 4.7 – Densité spectrale de puissance du montage et interférogramme théorique (b(1)) et expérimental (b(2)) résultant. La similitude de la résolution axiale mesurée expérimentalement avec celle simulée théoriquement suppose que l'effet de dispersion, qui s'exprime par une dissymétrie de la réponse impulsionnelle (b(2)) ne dégrade pas considérablement le signal.

Comme mentionné précédemment, on peut observer que l'allure de la réponse impulsionnelle axiale n'est pas tout à fait lisse 4.7b et contient des rebonds qui sont dus aux stries présentes dans la réponse spectrale de la caméra. En observant l'interférogramme expérimental (Fig. 4.7b(2)), on note la présence d'une légère assymétrie de ce dernier, résultant, comme on l'a déjà souligné dans le chapitre 2, de différences de dispersion dont la cause ici ne peut être qu'un défaut du cube séparateur employé, et qui conduit à un affaissement de l'enveloppe de l'interférogramme.

Un moyen de corriger cela, consisterait à insérer une lame de verre dans chaque bras de l'interféromètre. Cependant, compte tenu de l'architecture très resserrée du montage et la grande profondeur de champ du système d'imagerie, les réflexions induites détérioreraient la qualité des images et leur dynamique, sans pouvoir efficacement compenser la dispersion. Il a été mesuré que l'ajout de lames compensatrices de dispersion réduit de 30% le contraste des franges d'interférences et donc du signal OCT, du fait des réflexions induites. Compte tenu du bon contraste du signal d'interférence et de la résolution axiale mesurée, on considère donc que la dégradation du signal sans compensation de la dispersion reste tolérable et surtout préférable en termes de performances globales du système par rapport au cas où des lames compensatrices sont insérées dans l'interféromètre.

Afin de mesurer la résolution axiale, on acquiert une pile d'images tomographiques en modifiant pas à pas la différence de marche via la platine piézoélectrique, dont la précision de déplacement permet d'échantillonner convenablement l'enveloppe du signal. Une calibration du mouvement de la platine piézoélectrique est alors nécessaire afin d'évaluer précisément la distance de translation effective.

Comme on l'a explicité dans le chapitre précédent (voir la sous-section 3.2.3), si l'ouverture numérique du système est faible, comme c'est le cas ici, la période d'un interférogramme est égale à $\lambda_0/2$ où λ_0 est la longueur d'onde centrale du spectre. Cela signifie qu'en translatant axialement la surface de référence de $\lambda_0/2$, l'interférogramme se décale d'un interfrange ce qui nous permet donc de calibrer précisément la platine piézoélectrique. Pour cela, on utilise une lumière monochromatique, en positionnant un filtre passe-bande centré à $\lambda_0 = 710\text{nm}$ et de largeur à mi-hauteur 10nm afin de réduire l'incertitude sur la longueur d'onde centrale.

On suppose également que le déplacement de la platine est linéaire sur l'intervalle de déplacement considéré. Etant donné les données constructeur de la platine et de sa source de tension, qui génère un signal compris entre 0 et 100 Volt, le coefficient de linéarité de son déplacement est maximal lorsque cette tension d'entrée est comprise entre 30 V et 70 V. On veille alors à utiliser ce régime de tension pour effectuer la calibration, puis la mesure de déplacement lors de l'acquisition de la pile d'images.

On évalue l'incertitude de cette calibration par une mesure d'erreur de répétabilité en effectuant à plusieurs reprises la mesure. On estime ainsi notre précision à $0,1\mu\text{m}$. La seconde incertitude, concernant l'erreur sur la valeur de λ_0 , étant inférieure à 5nm , on la négligera donc ici.

La mesure de l'intensité d'un pixel de l'image au cours de l'ensemble de la pile nous donne accès à l'enveloppe du signal OCT. En utilisant un pas de $0,15\mu\text{m}$, l'échantillonnage de l'enveloppe est suffisant puisque la largeur à mi-hauteur du signal est proche de $1,5\mu\text{m}$ et garantit une reconstruction fidèle de l'enveloppe par interpolation. La mesure de l'enveloppe ainsi effectuée est présentée en figure 4.8.

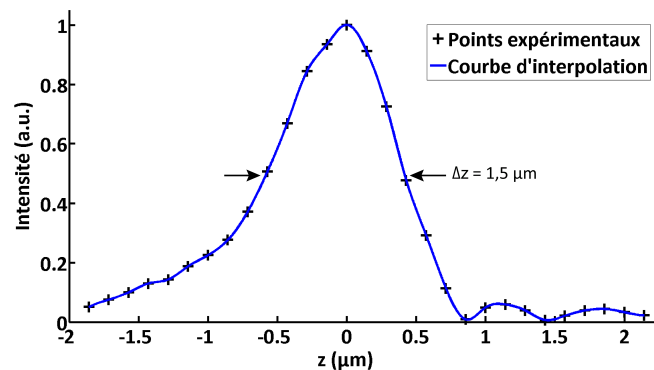


FIGURE 4.8 – Mesure de la réponse impulsionnelle axiale du système d'imagerie en utilisant la translation calibrée de la platine piézoélectrique contrôlant la position de la surface de référence. On représente les points expérimentaux mesurés ainsi que la courbe d'interpolation.

On mesure donc une résolution axiale à mi-hauteur de $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ ce qui est cohérent avec la valeur théorique (Fig. 4.7b(1)) étant donné la légère présence de dispersion. Cette mesure de l'enveloppe sur une distance de plusieurs micromètres permet de visualiser, en accord avec les simulations théoriques, des rebonds relativement éloignés du centre de l'enveloppe dont l'amplitude n'est pas négligeable et qui sont dus aux stries de fréquence assez élevée présentes dans la courbe de réponse spectrale de la caméra. Ces derniers représentent un signal parasite important, principalement lorsqu'on est proche de la surface de l'échantillon pour laquelle ils sont particulièrement visibles car le signal est intense. Ils seront en pratique moins gênants pour des structures qui rétro réfléchissent la lumière de manière plus diffuse, qui constituent en fait l'essentiel du signal utile.

Il est relativement compliqué de s'affranchir de ce signal parasite qui découle d'oscillations à hautes fréquences dans la réponse spectrale de la caméra. Un moyen serait d'utiliser le dispositif en fond noir, comme développé dans le chapitre précédent (voir la sous-section 3.6) qui consiste à bloquer une partie des rayons lumineux afin de diminuer la présence des rebonds présents essentiellement à la surface de l'échantillon sur les images.

4.4.2 Résolution transverse

L'un des avantages de l'OCT plein champ conventionnel par rapport à l'OCT à balayage est la faculté d'obtenir une résolution spatiale élevée dans les trois directions et notamment dans le plan transverse Oxy.

En effet, comme on l'a vu lors du premier chapitre, la possibilité de focaliser dynamiquement au cours de l'acquisition d'une pile d'images permet d'employer des objectifs à grande ouverture numérique sans affecter la profondeur d'imagerie, ce qui n'est pas le cas en OCT à balayage. Cependant pour un détecteur donné, si le rapport entre la fréquence d'échantillonnage et la fréquence spatiale maximale du signal demeure constant, plus la résolution transverse est importante, plus le champ observé dans l'espace de l'échantillon est faible. Les systèmes d'OCT plein champ à très haute résolution possèdent donc un champ de vision relativement étroit de l'ordre de la centaine de micromètres.

L'utilisation d'un champ de vision très large réduit donc la résolution transverse du système. En supposant une fréquence d'échantillonnage du signal fixée, ce compromis est inéluctable en illumination plein champ, puisque la dimension du champ est étroitement liée à l'ouverture numérique des objectifs et donc à la résolution transverse.

Cela n'est pas le cas en OCT à balayage point par point, puisque pour atteindre un large champ de vision, il suffit d'augmenter l'amplitude de balayage en conservant éventuellement la même résolution transverse qui est généralement limitée par la taille du faisceau laser focalisé. Cependant, la nécessité d'un balayage latéral réduit fortement la vitesse d'acquisition de l'image 3D et n'est pas approprié à un large champ de vision même si l'on réduit la résolution transverse.

C'est pourquoi, si les spécifications en termes de résolution transverse sont appropriées, l'OCT plein champ semble mieux adapté puisque les images *en-face* sont acquises d'un coup sans dépendre de mouvement mécanique.

En ce qui concerne le montage présenté ici, étant donné le grandissement du système d'ima-

gerie et la taille des pixels du détecteur, ces derniers correspondent à une zone de $17\mu\text{m} \times 17\mu\text{m}$ dans l'espace objet de l'échantillon. Or la résolution transverse théorique est dans notre cas égale à $1,22\lambda_0/ON = 17,5\mu\text{m}$, où ON est l'ouverture numérique des objectifs de microscope. En effet, ici, l'ouverture numérique d'illumination est différente et négligeable devant l'ouverture numérique de collection. Cela signifie donc que la réponse impulsionnelle du système (qu'on notera PSF pour *Point Spread Function* en anglais) sera sous-échantillonnée par les pixels de la caméra, puisque le critère de Nyquist requiert que la fréquence minimum d'échantillonnage soit deux fois supérieure à la fréquence de coupure du système d'imagerie. Or, ici, la dimension d'un pixel correspond presque à la largeur à mi-hauteur de la PSF. Ce sous-échantillonnage n'optimise donc pas la résolution transverse, mais favorise un large de champ de vision qui est la caractéristique qu'on choisit de privilégier pour ce système.

4.4.3 Sensibilité et vitesse d'acquisition

Ces deux caractéristiques sont généralement antinomiques en OCT plein champ puisqu'un nombre assez important d'images *en-face* sont accumulées. Bien que la sensibilité de détection augmente proportionnellement avec le nombre d'accumulation N (voir Eq. (1.43)), la vitesse d'acquisition décroît, quant à elle, avec N. Le choix de la surface de référence est donc un élément déterminant en ce qui concerne le compromis entre sensibilité et vitesse.

Afin d'optimiser la sensibilité lors d'une acquisition, l'intensité du signal brut détectée doit être juste inférieure au niveau de saturation des pixels de la caméra. Or ce signal correspond à la somme de l'intensité rétrodiffusée par l'échantillon et par la surface référence. Comme on l'a vu dans le chapitre 1 (voir la sous-section 1.5.2), en termes de sensibilité, le coefficient de réflexion optimal de la surface de référence est égal à deux fois le niveau d'intensité du signal incohérent collecté. Ce dernier étant généralement assez faible pour des échantillons biologiques, une surface de référence dont la réflexion est $\sim 4\%$ est donc bien adaptée. Cependant dans ce cas, le temps d'exposition du détecteur devra être suffisamment élevé pour que le signal total détecté atteigne quasiment le niveau de saturation. Une alternative pour améliorer la vitesse d'exécution du système est alors de choisir une surface de référence avec un coefficient de réflexion accru.

Il faut néanmoins souligner qu'une multiplication par 5, par exemple, de ce coefficient, même si elle permet d'être 5 fois plus rapide s'accompagnera d'une division par ~ 5 de la sensibilité, si N est fixé (voir Eq. (1.43)). On peut compenser cette chute de sensibilité en augmentant d'autant N, mais cela supprimerait le gain de vitesse. D'autre part, si le temps de lecture de la caméra est supérieur au temps d'exposition, le gain en vitesse acquis (pour N fixé) n'est même plus égal à 5, et l'augmentation du coefficient de réflexion de la surface de référence n'est plus satisfaisant au regard du compromis entre vitesse et sensibilité

Prenons un exemple concret qui correspond au cas de la caméra *PhotonFocus* que nous utilisons. Le tableau ci-dessous indique les différents temps d'exposition et d'acquisition correspondants selon le nombre de pixels utilisés par cette caméra. Pour le moment, nous nous intéresserons uniquement à une matrice de 1024×1024 pixels (deux premières colonnes du tableau). Les deux cas représentés considèrent soit un miroir en silicium ($R \sim 20\%$) comme surface de référence, soit une lame de verre en BK7 ($R \sim 4\%$).

Référence	1024 × 1024		512 × 512	
	temps d'exposition	temps d'acquisition	temps d'exposition	temps d'acquisition
Verre (BK7)	3,1 ms	9,8 ms	3,1 ms	4,8 ms
Silicium	0,8 ms	7,5 ms	0,8 ms	2,5 ms

FIGURE 4.9 – Temps d'exposition et d'acquisition mesurés, selon le nombre de pixels de la caméra considérés et la surface de référence utilisée

On observe donc que le temps d'acquisition (*i.e.* temps d'exposition + temps lecture) n'est pas 5 fois meilleur avec une surface en silicium, mais seulement 1,3 fois en considérant 1024×1024 pixels. Or la sensibilité est dégradée d'un facteur proche supérieur à 1,3, et le gain en performance n'est donc pas présent si l'on souhaite conserver une sensibilité de détection constante.

On choisit donc d'utiliser une lame de verre en BK7 comme surface de référence afin d'optimiser la qualité de la détection. En revanche, si la priorité est donnée à la vitesse d'exécution, il est plus intéressant d'utiliser un miroir en silicium comme surface de référence. Cela peut s'avérer pertinent si on souhaite réaliser des images *in vivo* pour lesquelles la fréquence d'acquisition est un paramètre clé. Comme nous le verrons dans une prochaine sous-section, on pourra même réduire le nombre de pixels utilisés par la caméra afin d'accroître encore plus cette vitesse ce qui réduira par la même occasion le temps de lecture et donc également la perte de sensibilité due à l'utilisation d'une surface de référence en silicium.

Un autre élément important est celui de la modulation de la surface de référence qui permet d'extraire le signal en combinant des images décalées en phase. Différentes techniques à décalage de phase peuvent être utilisées afin d'extraire l'amplitude du signal OCT. Dans le chapitre 2, on a étudié le cas d'une oscillation sinusoïdale de la surface de référence. Comme on l'a expliqué, cette méthode est performante en termes de vitesse d'exécution mais ne s'avère pas aussi efficace qu'un déplacement pas à pas de la platine piézoélectrique contrôlant la position de la surface de référence.

Un compromis entre ces deux méthodes consiste à moduler linéairement le signal interférométrique afin d'extraire l'amplitude. Nous étudierons en détail ce procédé dans la prochaine section dédiée à la mesure du signal de phase en OCT. En ce qui concerne le signal d'amplitude, noté M , dans le cas d'un déplacement linéaire de la surface de référence, l'algorithme suivant est utilisé en considérant 5 images tomographiques déphasées de $\pi/2$:

$$M(x, y) = \sqrt{4(I_2 - I_4)^2 + (2I_3 - I_1 - I_5)^2} \quad (4.5)$$

Comme nous le verrons dans le chapitre 5, la manière dont nous implémentons la modulation linéaire de la surface de référence nécessite l'accumulation d'au moins 2 images *en-face*. Cependant il est usuel d'accumuler plusieurs images en OCT plein champ afin d'augmenter la sensibilité de détection et cela ne représente donc pas une contrainte en pratique. Pour l'acquisition d'images d'amplitude, 30 images sont accumulées permettant d'atteindre une sensibilité de -80dB ce qui est similaire à celles atteintes avec les systèmes OCT plein champ conventionnels.

La fréquence d'acquisition d'une image *en-face*, incluant le nombre d'accumulations, est alors légèrement supérieure à 1Hz.

4.5 Applications à l'imagerie d'amplitude

4.5.1 Images d'échantillons *ex vivo*

On présente en figure 4.10 des images d'un échantillon de grenouille *ex vivo*. Etant donné l'étendue du champ de vision, la totalité de la partie supérieure de l'animal est imagée comme on peut le voir sur les images *en-face* (Fig. 4.10a et 4.10b), sur lesquelles on peut distinguer la tête (à gauche de l'image) ainsi que les deux pattes et le bassin (à droite de l'image).

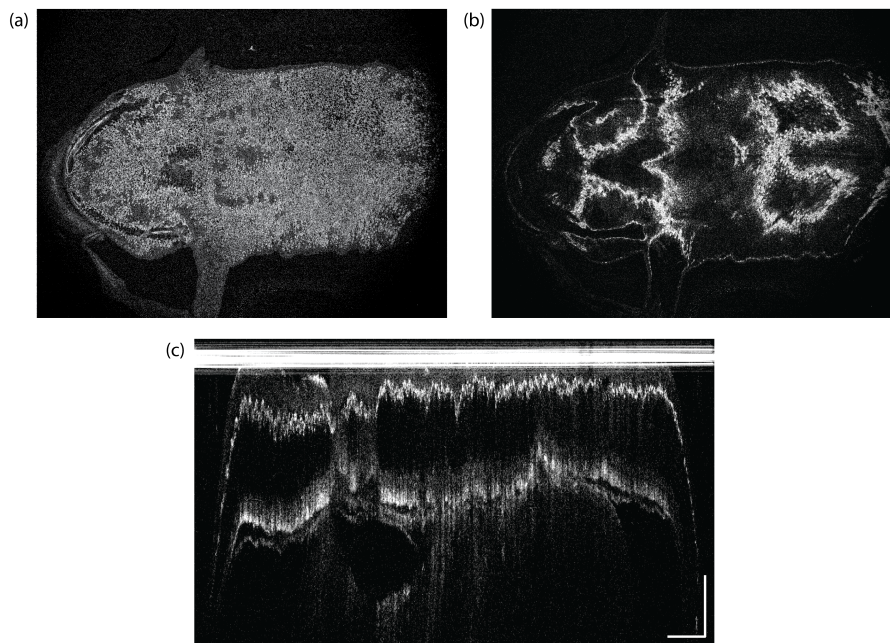


FIGURE 4.10 – Images d'amplitude d'une grenouille *Xenopus Laevis* avec le système d'OCT plein champ à large champ de vision. Deux images *en-face* sont présentées à $45\mu\text{m}$ (a) et $125\mu\text{m}$ (b) de profondeur dans l'échantillon pour un champ $17,5\text{mm} \times 13\text{mm}$. La barre d'échelle correspond à 1mm dans les deux directions. (c) est une coupe transverse du même échantillon. La barre d'échelle est équivalente à $1\text{mm} \times 50\mu\text{m}$ et la profondeur de pénétration est $\sim 300\mu\text{m}$

Afin de garantir la planéité de l'échantillon, on dispose l'animal entier sur une lame de verre qui est visible sur la figure 4.10c. Une lame de verre identique est alors placée dans le bras de référence afin de compenser la différence de dispersion introduite. Afin de réduire la perte de lumière par réflexion sur ces lames, on utilise des lames traitées antireflet pour une bande spectrale s'étendant de 700nm à 1100nm , qui correspond à la gamme spectrale utilisée. Compte tenu de la profondeur de champ importante de l'objectif, il est également nécessaire d'employer des lames épaisses (i.e. au moins 1mm d'épaisseur) afin de ne pas perturber le signal par la réflexion parasite de la première face de la lame positionnée le bras échantillon et de la rejeter hors du champ de netteté.

On utilise alors des lames épaisses de 5mm qui remplissent cette condition. Placées entre l'objectif et les objets, ces lames de verre sont susceptibles d'introduire des aberrations géométriques. Cependant, l'ouverture numérique garantit une inclinaison maximale faible des rayons lumineux et donc peu d'aberrations induites par la présence de ces lames. Les effets les plus indésirables sont finalement les réflexions parasites dues aux lames de verre qui, bien que traitées antireflet, génèrent un signal assez faible mais qui affecte le rapport signal sur bruit.

Lorsque l'échantillon imagé est relativement plat il est possible de s'affranchir de la présence de ces lames. C'est le cas de l'échantillon de peau de rat dont une image est présentée en figure 4.11. Il est intéressant de noter que la coupe transverse, comme pour l'image de la grenouille, permet de distinguer des structures distantes de quelques micromètres seulement, ce qui est favorisé par la haute résolution axiale du système.

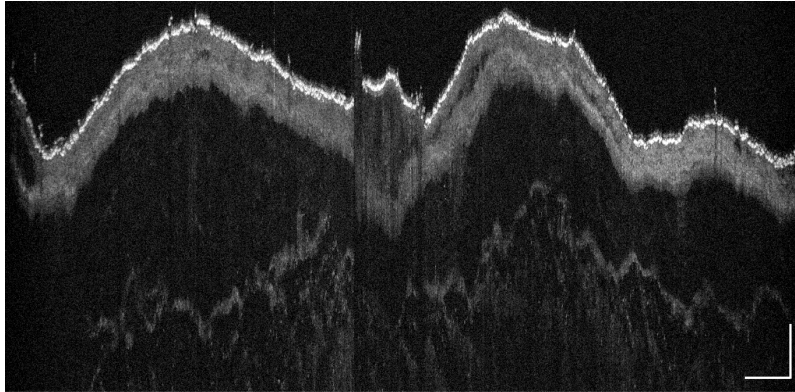


FIGURE 4.11 – Coupe transverse d'une image d'amplitude d'un échantillon de peau prélevé d'un rat. La face interne de l'échantillon est ici présentée. La barre d'échelle est égale à $1 \text{ mm} \times 50 \mu\text{m}$.

Le fait que l'échantillon ne soit pas aplati, entraîne une variation de l'ordre de $100 \mu\text{m}$ de la planéité à la surface de la peau, ce qui se traduit donc par une épaisseur de couche d'air sus-jacente différente selon la zone du champ. Cela peut engendrer une baisse non négligeable du signal car le déplacement des fenêtres est alors dépendant de la zone du champ considérée. En effet, étant donné leur loi de déplacement, il n'est pas possible de centrer les deux fenêtres l'une par rapport à l'autre pour deux zones de l'échantillon dont l'indice est différent.

Afin d'illustrer ce phénomène, considérons un premier cas pour lequel il est possible de déplacer les deux fenêtres indépendamment et donc, a priori, de les garder centrées l'une par rapport à l'autre si les conditions sont favorables : ce cas est celui-ci de l'interféromètre de Linnik. On rappelle que dans ce cas (voir la sous-section 1.5.1), un déplacement de la fenêtre de cohérence d'une distance d/n dans l'échantillon est combiné à une translation de l'objectif du bras échantillon de d/n^2 équivalent à un déplacement de la fenêtre de focalisation d'une distance d/n dans l'échantillon dont l'indice est n . Un schéma (voir Fig. 4.12) représente la situation d'un échantillon dont la surface est irrégulière à l'instar de l'échantillon de peau précédent.

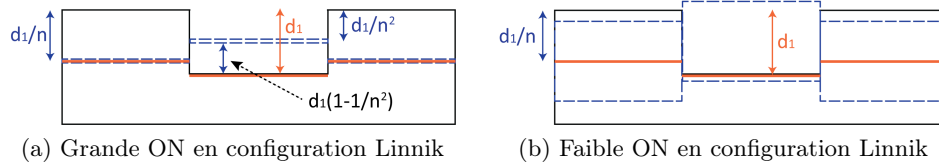


FIGURE 4.12 – Déplacement des fenêtres de cohérence (trait plein orange) et de focalisation (trait en pointillés bleus) dans le cas d'un échantillon présentant des différences de hauteur à sa surface et pour un interféromètre de type Linnik (milieu d'immersion = air) permettant une adaptation de mise au point au cours d'un balayage axial. Le fait que l'échantillon ne soit pas plat induit un décentrage des fenêtres. Si la profondeur de champ est faible par rapport à d_1 , les deux fenêtres sont disjointes et le signal baisse (a), ce qui n'est pas le cas avec une plus grande profondeur de champ (b)

On observe donc que les deux fenêtres sont bien centrées pour les zones dont l'épaisseur de l'échantillon est maximale, mais pas lorsqu'il y a un creux. Pour un déplacement de d_1/n de la fenêtre de cohérence dans l'échantillon, la distance séparant le centre de la fenêtre de focalisation à la surface de l'échantillon dans le creux est égale à $d_{lim} = d_1(1 - 1/n^2)$ (Fig. 4.12a c'est-à-dire $\sim 0,5d_1$ si $n = 1,4$). Un moyen de conserver les fenêtres superposées, à défaut qu'elles soient centrées, est d'utiliser des objectifs de microscope dont la profondeur de champ est supérieure à d_{lim} comme illustré en figure 4.12b. Ainsi, la profondeur de champ très étendue du montage d'OCT plein champ à large champ de vision que nous avons développé en fait un système robuste à l'imagerie d'échantillons non plans.

Cependant, comme il en a déjà été question, ce montage ne permet pas d'ajuster les fenêtres indépendamment et le cas précédent de la figure 4.12 est donc quelque peu modifié. On illustre donc cette fois, en figure 4.13, le déplacement des fenêtres mais dans le cas du montage d'OCT plein champ à large champ de vision.

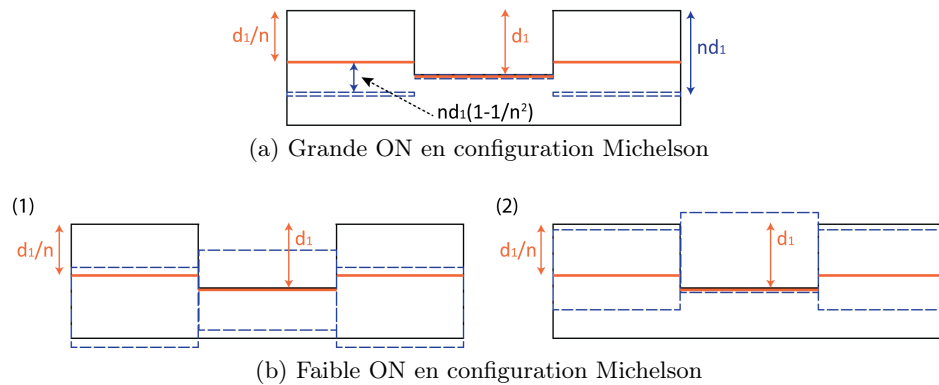


FIGURE 4.13 – Déplacement des fenêtres de cohérence (trait plein orange) et de focalisation (trait pointillé bleu) dans le cas d'un échantillon présentant des différences de hauteur à sa surface et pour un interféromètre de type Michelson ne permettant pas une adaptation de mise au point au cours d'un balayage axial. Cela accroît le phénomène de séparation des fenêtres et une profondeur de champ adaptée (b) est donc nécessaire. La profondeur de pénétration peut être optimisée en décalant initialement la fenêtre de focalisation (b(2)).

On note ainsi que pour cette configuration, la distance d_{lim} , séparant le centre des deux fenêtres, est égale à $nd_1(1 - 1/n^2)$, soit $\sim 0,7d_1$, ce qui est donc plus contraignant. L'avantage d'une grande profondeur de champ est donc encore plus présent. La figure 4.13b confirme la position favorable des deux fenêtres lorsqu'elles sont initialement décentrées y compris pour un échantillon qui n'est pas plan. En ce qui concerne l'échantillon de peau qu'on étudie, les variations à sa surface de l'ordre de $100\mu\text{m}$ des épaisseurs d'air requièrent une profondeur de champ supérieure à $0,7 \times 100\mu\text{m} \sim 70\mu\text{m}$ ce qui est bien notre cas.

Le montage développé est donc bien adapté à l'imagerie d'échantillons diffusants en profondeur du fait de la faible ouverture numérique de l'objectif de microscope et du déplacement optimisé de ce dernier avec la surface de référence. Une sensibilité de détection de -80dB est également atteinte ce qui différencie ce système des autres méthodes d'OCT plein champ à large champ de vision. Néanmoins, la fréquence d'acquisition d'une image *en-face* demeurant relativement éloignée de la vitesse adaptée à l'imagerie *in vivo*, il est nécessaire de consacrer un développement particulier du montage afin d'augmenter cette vitesse d'exécution.

4.5.2 Imagerie *in vivo* d'empreintes digitales et problématiques

L'utilisation des empreintes digitales pour l'identification d'individus est un procédé aujourd'hui courant, mettant en évidence les traces papillaires présentes à la surface de l'épiderme du doigt. Ces dessins papillaires superficiels sont la projection du motif présent à quelques centaines de micromètres de profondeur en superficie du derme qui est, quant à lui, quasiment inaltérable du fait de sa profondeur. Ils sont constitués de crêtes et de vallées qui sont les éléments caractéristiques et permettent l'identification (voir Fig. 4.14).

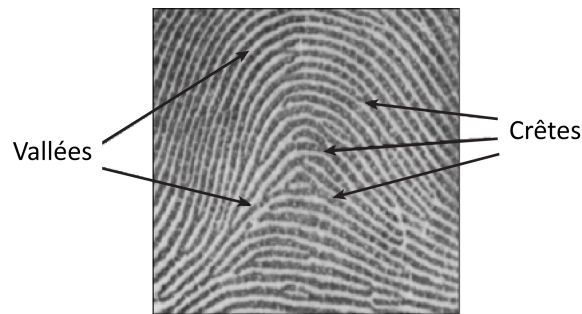


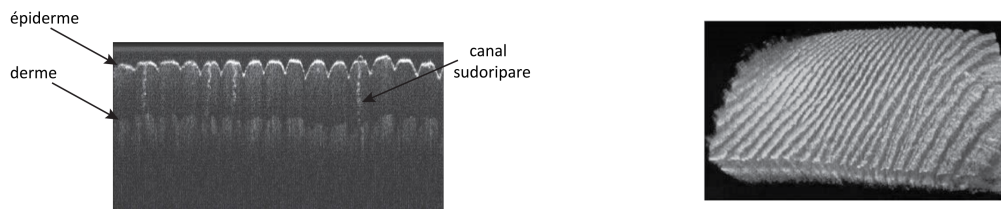
FIGURE 4.14 – Schéma d'une empreinte digitale (issu de "<http://www.griaulebiometrics.com/en-us/book/understanding-biometrics/types/description>") mettant en évidence la structure des traces papillaires constituées de crêtes et de vallées dont les caractéristiques sont des éléments principaux de l'identification.

Une image tomographique des empreintes digitales en profondeur, révélant les deux couches contenant les traces papillaires, permettrait une identification difficile à falsifier et donc particulièrement adaptée à des identifications de type biométrique. La précision de cette identification sera alors reliée au nombre de points caractéristiques dont dispose l'utilisateur. Il est considéré comme nécessaire de posséder au moins une trentaine de points caractéristiques afin que la mesure soit efficace, ce qui correspond dans le cas d'un adulte moyen à un champ imagé de

$\sim 17\text{mm} \times 17\text{mm}$. Une résolution latérale supérieure à $20\mu\text{m}$ est également préférable afin de favoriser les mesures. La profondeur de la couche proche du derme et contenant l'information étant de $\sim 300\mu\text{m}$ chez l'adulte, l'imagerie optique et en particulier l'OCT apparaissent comme des techniques adaptées à ce type d'imagerie.

L'imagerie digitales en OCT

Plusieurs montages d'OCT, dans le domaine fréquentiel [Dub07, Ada13] ou temporel [Wat08] ont été appliqués à l'imagerie en profondeur des empreintes digitales *in vivo*. Une représentation en coupe transverse de traces papillaires adultes (voir Fig. 4.15a) met en évidence la présence des deux couches, à la surface de l'épiderme et du derme, qui contiennent l'information d'identification, alors que les images *en-face* (voir Fig. 4.15b) (dont l'acquisition en illumination plein champ est plus rapide) révèlent l'architecture du motif de ces traces papillaires.



(a) Coupe transverse d'une image OCT d'un doigt. Le champ observé est de 8 mm latéralement et 1 mm en profondeur [Ada13].

(b) Vue de dessus d'une représentation 3D d'une image de doigt acquise en OCT [Ohb11].

FIGURE 4.15 – Image d'empreintes digitales acquises avec des systèmes OCT. La coupe transverse (a) illustre la répétition du motif à la surface du derme ainsi que la présence de canaux sudoripares sécrétant la sueur. L'image *en-face* (b) permet l'étude de la structure des traces papillaire à partir du motif en deux dimensions.

Les systèmes d'OCT plein jusqu'ici mis en œuvre possèdent généralement un champ inférieur à celui recommandé pour parfaire la qualité de l'identification et il est donc nécessaire de développer un montage capable de réaliser des images avec un champ de vision élargi.

Enjeux liés à l'imagerie *in vivo* en OCT plein champ

L'avantage principal de l'OCT plein champ, destiné à l'imagerie des traces papillaires sur un large champ, réside dans le fait que cette technique n'utilise pas de balayage latéral et détecte des images *en-face* dont la vitesse d'acquisition ne dépend pas de la dimension du champ de vision, ce qui n'est pas le cas en OCT fréquentiel (pour une résolution latérale fixée). Le seul balayage employé est une translation longitudinale, mais ce dernier peut être adapté et accéléré si l'on étudie un échantillon précis, comme c'est le cas pour l'imagerie d'empreintes digitales.

En effet, on peut utiliser un pas micrométrique non constant et ne sélectionner que certaines zones de l'échantillon à imager. Cela reste sans conséquence si l'information utile n'est contenue que dans certaines structures dont la profondeur est préalablement connue. Un échantillon, constitué de plusieurs couches dont on connaît a priori les épaisseurs et dont seul le signal issu des interfaces est pertinent, en est un exemple. En FD-OCT, qui est la méthode d'OCT à balayage

la plus utilisée, il n'est pas possible de faire varier aisément le balayage axial puisque celui-ci dépend de l'échantillonnage en longueur d'onde de la source (SS-OCT) ou du spectromètre (SD-OCT). Puisque nous sommes intéressés principalement par le profil de deux couches séparées de $\sim 300\mu\text{m}$ lors de l'imagerie du doigt humain, un gain important en vitesse serait atteint en concentrant les images acquises uniquement au voisinage de ces deux zones. Néanmoins cela nécessite que les couches soient planes et donc que la surface du doigt soit aplanie sur toute la surface observée correspondant au champ de vision du système. Un moyen simple de garantir cela est l'emploi d'un support transparent, tel qu'une lame de verre, afin d'assurer l'appui du doigt contre ce dernier.

Un troisième avantage, qui justifie le développement d'un dispositif d'OCT plein champ pour l'imagerie des empreintes digitales, est le coût réduit du montage final qui n'emploierait qu'un seul objectif de microscope et une lampe halogène comme source de lumière, dont le prix est bas comparé à une source laser employée en OCT spectral.

Il est primordial pour réaliser des images d'échantillons *in vivo* que la vitesse d'exécution du système soit maximisée afin de se prémunir des artefacts de mesures liés aux mouvements et vibrations de l'échantillon ou même du montage global. Une fréquence d'acquisition d'une image (*en-face*, i.e. 4 images interférométriques déphasées multipliées par le nombre d'accumulations) au moins supérieure à 10Hz est alors estimée nécessaire.

Outre la réduction des balayages, la façon de déplacer la surface de référence est une nouvelle fois à prendre en compte afin d'adapter les performances du système en fonction des objectifs de vitesse définis. Une vibration pas à pas de la platine piézoélectrique contrôlant le déplacement de la surface de référence étant rejetée, compte tenu de la lenteur de cette méthode sujette à une instabilité de la position finale de la platine, on se tourne donc vers un algorithme basé sur un déplacement continu.

Plutôt que d'utiliser une translation linéaire comme c'était le cas pour les images d'échantillons *ex vivo*, on privilégiera ici un algorithme considérant une oscillation sinusoïdale, qu'on a déjà présenté en détail dans le deuxième chapitre de ce manuscrit. On rappelle qu'elle est indépendante de l'ordre des images tomographiques acquises, contrairement aux autres techniques à oscillation continue, et garantit donc une vitesse d'exécution plus importante. Néanmoins, l'inertie de l'objet de référence devra être prise en compte afin de favoriser la précision du mouvement oscillatoire à haute fréquence. Si une surface de référence dont le coefficient de réflexion proche de 4% est requis, une lame légère en acrylique sera ainsi mieux adaptée qu'une lame de verre en BK7. Une surface en silicium pouvant être très fine, elle constituera une option appropriée si une surface de référence réfléchissant davantage la lumière est avantageuse.

Une troisième caractéristique décisive est bien sûr la fréquence d'acquisition du détecteur. Celui que nous utilisons, et dont les caractéristiques sont explicitées au début de ce chapitre, possède une fréquence de fonctionnement maximale de 140Hz si l'on utilise l'ensemble des 1024×1024 pixels. Cela signifie que si 5 images sont accumulées la fréquence d'acquisition d'une image *en-face* vaut 7Hz, et même seulement 3,5Hz pour 10 images accumulées. Cela ne permettant pas d'atteindre des résultats convaincants, on décide de réduire le nombre de pixels utilisés par la caméra afin de réduire le temps de lecture et d'accroître ainsi sa vitesse de fonctionnement. En utilisant seulement 512×512 pixels, le temps de lecture de ce détecteur CMOS est fortement

diminué (voir le tableau de données en figure 4.9) et sa fréquence d'exécution maximale augmente jusqu'à 340Hz, ce qui permet d'atteindre une vitesse proche de 10Hz pour 10 images accumulées et même 17Hz avec une accumulation de 5 images, ce qui semble, a priori, suffisant pour être insensible aux artefacts de mouvement pour l'acquisition d'une image *en-face*.

Néanmoins, la réduction de la zone active du détecteur divise par 2 le champ de vision et compromet l'identification d'une empreinte digitale, mais l'intérêt de cette modification réside davantage dans l'étude de l'effet d'une augmentation de fréquence sur la qualité des images *in vivo*. Dans un but similaire, on privilégiera l'utilisation d'une surface de référence en silicium qui, malgré le fait qu'elle ne soit pas optimisée au regard du compromis entre la sensibilité de détection et la vitesse d'exécution, comme vu dans la sous-section précédente (voir le tableau 4.9), elle permet d'accroître davantage la fréquence d'acquisition.

Afin de se prémunir un peu plus contre les mouvements du doigt, on stabilise ce dernier en le maintenant appuyé contre une lamelle de verre assez épaisse de sorte que la pression induite par le doigt de l'utilisateur apposé ne vienne pas déformer localement la lamelle de verre et créer une instabilité. Typiquement, une lame de verre de 5mm d'épaisseur s'est avérée plus performante qu'une lame de 1mm, bien que cela ne permette pas de résoudre totalement le problème lié à la déformation.

Malgré les adaptations du montage, notamment en termes de vitesse d'acquisition, l'instabilité du doigt a, en fait, constitué un problème majeur lors de cette expérience. L'augmentation du nombre d'accumulations des images ne permettait alors pas d'accroître le rapport signal sur bruit, constituant donc une limite importante à l'acquisition d'images en profondeur. Ce phénomène d'incapacité à accroître la qualité du signal, en accumulant de plus en plus d'images, est caractéristique en OCT de la présence de mouvements parasites et pointe donc l'enjeu à résoudre afin de réaliser de telles images *in vivo*.

Une prochaine étape consisterait à modifier quelque peu le dispositif, en remplaçant le détecteur ou la source de lumière afin d'accroître la sensibilité de détection et la vitesse d'exécution dans le but de parvenir à réaliser des images d'amplitude en profondeur d'échantillons *in vivo*, dont l'imagerie des empreintes digitales constitue une application pertinente et d'un intérêt important pour le développement des méthodes d'identification.

4.6 Imagerie de phase tomographique

En plus de l'information contenu dans l'intensité du champ réfléchi par un échantillon, les techniques d'imagerie interférométriques, telles que l'OCT, permettent également, d'accéder à une mesure quantitative de la modification du front d'onde par cet échantillon, autrement dit, à la mesure quantitative de la phase du signal. Ce type de mesure est particulièrement utile pour caractériser et évaluer la qualité de surfaces, comme des miroirs ou des échantillons structurés, à une échelle nanométrique [Dub01b] ou des échantillons biologiques [Cot13].

Différents travaux, basés sur des systèmes holographiques, utilisant une lumière cohérente temporellement [Cot13, Cho07] ou sur des montages d'OCT en domaine fréquentiel, dont la source est cohérente spatialement [Yan01, Sti01, Ell07], ont ainsi été menés afin de réaliser des images de phase tomographiques d'échantillons en trois dimensions. Cependant, ces systèmes,

principalement appliqués à l'imagerie d'échantillons biologiques, nécessitent plusieurs balayages transverses tout en possédant un champ de vision limité.

L'association d'un montage d'OCT à balayage spectral (ou SS-OCT) et d'une illumination plein champ garantit une réduction efficace du nombre de balayage mais produit des images tomographiques *en-face* de faible qualité lorsque l'illumination est cohérente spatialement [Ann11]. En revanche, l'utilisation d'une source faiblement cohérente spatialement permet non seulement de réduire le nombre de balayage tout en s'affranchissant de la présence de bruits cohérents.

Cependant, à notre connaissance, aucun système OCT employant une source faiblement cohérente n'est parvenu à réaliser des images de phases résolues en profondeur, ou tomographiques, et ils se sont donc limités à une analyse topographique superficielle. Par ailleurs, aucun des systèmes OCT mentionnés ne propose une résolution axiale Δz supérieure à $3\mu\text{m}$ ou un champ de vision qui s'étend au-delà de $1,5\text{mm} \times 1,5\text{mm}$.

Nous proposons dans cette section un montage d'imagerie de phase tomographique, qui permet de mesurer quantitativement la courbure et les défauts, c'est-à-dire les déformations, de chacune des surfaces d'un empilement multicouches, et cela en étant capable de distinguer deux couches successives séparées de quelques micromètres seulement, étant donné l'importance de notre résolution axiale Δz valant $1,5\mu\text{m}$. Le développement du montage à large champ de vision ($17,5\text{mm} \times 17,5\text{mm}$) nous permet d'analyser des surfaces relativement larges et cela, sans utiliser de balayages transverses ce qui garantit une vitesse d'exécution élevée et adaptée à l'imagerie en temps réel selon l'échantillon considéré.

4.6.1 Imagerie de phase et profilométrie par interférométrie en lumière blanche

Avant d'étudier la mesure du signal de phase en OCT plein champ et de présenter notre dispositif, nous établissons un bref état de l'art de l'imagerie de phase et de l'imagerie profilométrique en microscopie optique, pour des systèmes utilisant une source de lumière blanche et travaillant en illumination plein champ. On distingue deux grands types de systèmes interférométriques capables de fournir ces types d'information : les montages à décalage de phase, et les montages diffractifs.

Interférométrie en lumière blanche à décalage de phase

Les montages d'interférométrie à décalage de phase en lumière blanche (ou WLPSI pour *white-light phase-shifting interferometry* en anglais) désigne communément des systèmes utilisant une modulation spatiale, via une platine piézoélectrique par exemple, afin d'induire une différence de phase entre plusieurs images acquises puis de les recombinaison afin d'extraire le signal d'intérêt. La similarité avec l'OCT plein champ est claire, mais traditionnellement on les différencie des systèmes OCT puisque leur application principale est la réalisation d'images topographiques d'échantillons structurés peu épais lorsque l'OCT est davantage employé pour produire des images tomographiques d'échantillons biologiques épais. Il existe deux méthodes principales afin de fournir une information topographie : l'imagerie de phase et l'imagerie topographique par localisation du maximum de l'enveloppe.

Imagerie de phase en interférométrie à décalage de phase. La première approche consiste, comme en OCT plein champ, à faire interférer deux ondes et à extraire le signal

de phase par une combinaison judicieuse de plusieurs images déphasées. Cependant, puisque le signal extrait est 2π -*periodique*, il est nécessaire, lors du dépliage du signal de phase (voir ci-après en section 4.6.2, de supposer qu'entre deux pixels voisins, le déphasage du signal est inférieur à $\phi = \pi$ [Sch07]. Puisque les hauteurs h des déformations correspondantes sont égales à $\lambda\phi/(4\pi)$, cela signifie que si l'échantillon possède une discontinuité supérieure à $\lambda/4$ alors le profil de l'échantillon ne sera pas convenablement reconstruit : cela est appelé l'ambiguïté 2π .

Afin d'outrepasser cette limite, plusieurs techniques de mesures de phases à longueurs d'onde multiples ont été développées. Elles consistent à enregistrer le signal de phase pour différents spectres centrés en $\lambda_1, \lambda_2, \dots, \lambda_p$ bien choisies, afin d'étendre artificiellement la longueur d'onde de mesure et donc d'accroître la hauteur maximale des discontinuités observables. La variété des spectres peut être obtenue en associant plusieurs sources [Che85] ou encore en insérant un modulateur acousto-optique [Kim08]. En prenant l'exemple du cas où deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 sont associées, telles que $\lambda_2 > \lambda_1$, on peut schématiser le principe de cette méthode en introduisant une longueur d'onde effective, ou longueur d'onde de battement, $\lambda_{eff} = \lambda_1\lambda_2/(\lambda_1 - \lambda_2)$ [Sch07], comme schématisé ci-contre :

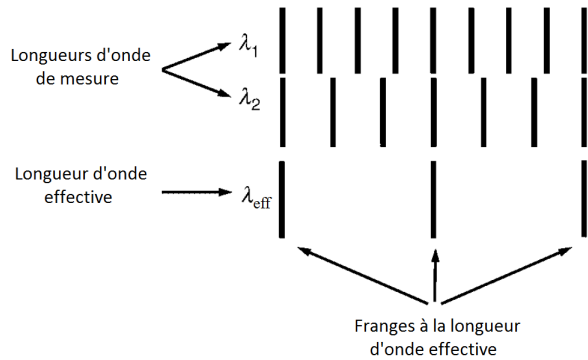


FIGURE 4.16 – Génération d'une longueur d'onde effective en interférométrie à décalage de phase à deux longueurs d'ondes. Les mesures du signal de phase effectuées séparément aux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 entachées chacune d'une $2-\pi$ ambiguïté équivalente à $\lambda_i/4$ résulte en une $2-\pi$ ambiguïté équivalente à $\lambda_{eff}/4$. Modifiée depuis [Sch07].

Lorsqu'une multitude de spectres sont associés, la longueur d'onde effective peut atteindre une valeur cent fois supérieure à la plus importante des longueurs d'ondes de mesures et restreindre très fortement l'ambiguïté 2π , permettant ainsi la mesure de discontinuités de l'ordre de $10\mu\text{m}$.

Imagerie topographique par localisation du centre de l'enveloppe. Cette technique consiste à utiliser le signal d'amplitude, et non la phase, afin de mesurer la hauteur des déformations. En mesurant l'enveloppe de ce signal et en localisant précisément son centre par identification du maximum, elle permet de s'affranchir de l'ambiguïté 2π , tout en garantissant une précision nanométrique de la mesure du profil topographique de l'échantillon.

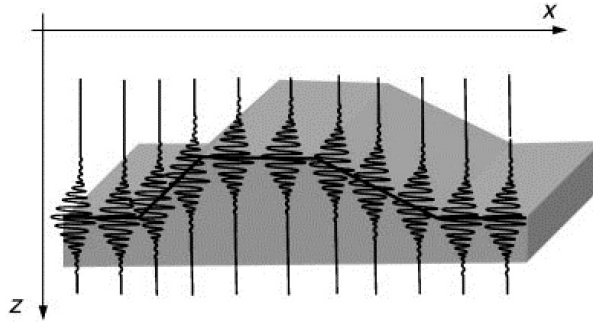


FIGURE 4.17 – *Principe de l'imagerie topographique par localisation du maximum : en identifiant le centre de chaque interférogramme, il est possible de reconstruire précisément le profil d'une surface. Modifiée depuis [Sch07].*

En pratique, le miroir de référence est balayé axialement avec un pas suffisamment fin pour assurer un échantillonnage du signal approprié. Selon la position de la surface de l'échantillon, la position du centre de l'interférogramme sera décalée, comme illustré en figure 4.17. L'identification de ce centre, par interpolation des données, combinée à des algorithmes de calculs efficaces, localise donc précisément chacun des points de cette surface et la reconstruction de son profil est réalisée.

L'échantillonnage du signal est alors un paramètre essentiel de la mesure. Plus le pas du balayage axial est faible, plus la mesure effectuée est précise mais cela au détriment de la vitesse. Il est cependant nécessaire que ce pas soit au moins inférieur à la longueur de cohérence du signal [Hir02, Lar96].

Il est également possible de sous-échantillonner le signal interférométrique (en-deçà de la limite fixée par le théorème de Nyquist) si on utilise l'information spectrale de la phase $\phi(k)$ via un calcul par transformée de Fourier [dG95]. Le calcul pour chaque fréquence k de $I(k)\cos(\phi(k))$, où $\phi(k) = kz$, permet alors de déterminer z si la phase est connue pour au moins deux longueurs d'onde.

La mesure de cette phase spectrale est également à la base des méthodes de topographie de structures fines superposées. Ces échantillons étant composés de deux interfaces structurées séparées d'une distance inférieure à la résolution axiale Δz , le signal interférométrique mesuré est alors le résultat de la superposition des interférogrammes issus des deux surfaces très rapprochées. En analysant les non linéarités de la phase spectrale $\phi(k)$ il est alors possible de mesurer le profil de chacune des deux surfaces autrement indiscernables [Kim99, Ghi13].

Les montages de type diffractif

Le principe de ces montages, basé sur la diffraction de la lumière, est de créer des répliques d'une onde électromagnétique après la traversée de l'échantillon. Une combinaison astucieuse de ces répliques permet alors de calculer le signal de phase escompté.

Microscopie de phase de Fourier. Une onde quasiment plane est émise par une source de lumière blanche, puis diffractée par l'échantillon générant ainsi deux composantes : l'onde

diffractée et l'onde transmise sans avoir été diffusée par l'échantillon. La microscopie de phase de Fourier [Pop04, Bha13] repose sur la séparation dans l'espace de Fourier de ces deux composantes qui sont ensuite déphasées l'une par rapport à l'autre grâce à un dispositif de modulation spatiale de la lumière (ou SLM pour *Spatial Light Modulator* en anglais). La combinaison de quatre images décalées en phase permet donc, comme on l'a vu pour d'autres modalités d'accéder à la mesure de la phase du signal.

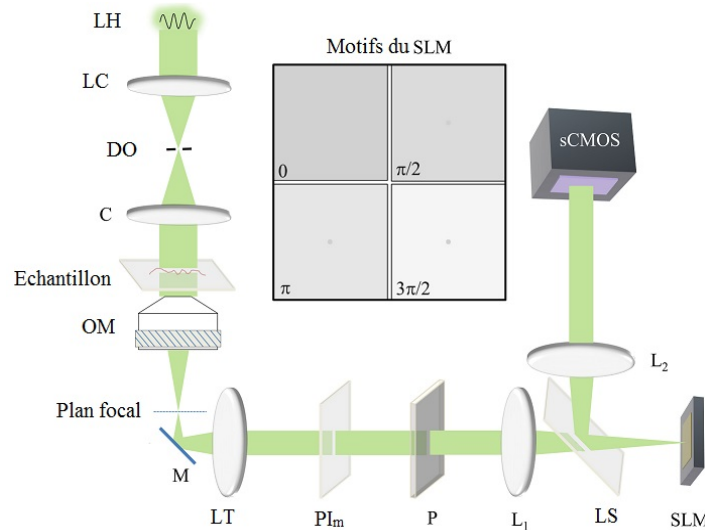


FIGURE 4.18 – Principe d'un montage de microscopie de phase de Fourier utilisant une source thermique. LH : lampe halogène, LC : lentille collimatrice, DO : diaphragme d'ouverture, C : condenseur, OM : objectif de microscope, M : miroir, LT : lentille de tube, PI_{im} : plan image, P : polariseur, L_1, L_2 : lentilles, LS : lame séparatrice. Le SLM placé dans le plan de Fourier modifie la phase de l'onde diffracté par rapport à celle de l'onde non diffusée par l'échantillon ce qui permet d'extraire le signal de phase en combinant quatre images déphasées. Modifiée depuis [Bha13].

Cette technique, offrant des performances similaires avec les systèmes d'interférométrie en lumière blanche en termes de résolution, présente l'avantage d'être plus stable que les montages interférométriques à deux bras et d'être facilement adaptable en sortie d'un microscope. Cependant, la nécessité de travailler en lumière polarisée restreint le champ d'application de cette technique, concernant les échantillons biréfringents notamment.

Imagerie de phase quantitative par interférométrie à décalage quadri-latéral. L'analyse de front d'onde par décalage quadri-latéral [Pri95] est basée, quant à elle, sur la mesure des gradients de phase du champ électromagnétique. En cela, cette technique, développée notamment par l'entreprise *Phasics*, est proche des microscopes à contraste interférentiel (ou DIC pour *Differential Interference Contrast* en anglais) [All81], mais contrairement à eux, elle propose une mesure quantitative de la phase. Comme illustré en figure 4.19, un masque de diffraction génère quatre répliques de l'onde transmise par l'échantillon. Le basculement de quatre ondes, comme pour l'holographie numérique hors d'axe [Cuc99], ajouté au déphasage bidimensionnel des répliques, permet alors d'extraire le signal de phase.

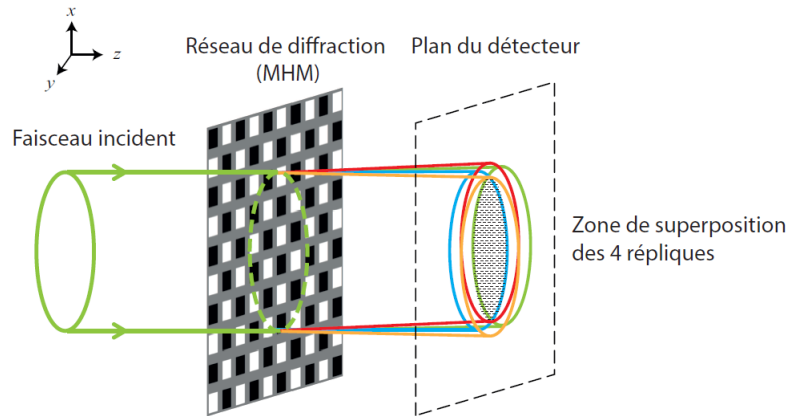


FIGURE 4.19 – Schéma de principe d'un analyseur de front d'onde à décalage quadri-latéral. Le front d'onde incident est diffracté par le masque de diffraction (appelé Masque de Hartmann Modifié (MHM)). Les 4 répliques créées (2 suivant x et 2 autres dans la direction y orthogonale) vont interférer sur le capteur CCD situé quelques millimètres plus loin. Issue de [Akn14].

Contrairement à la microscopie de phase de Fourier, le champ électromagnétique n'est pas polarisé et cette technique est donc compatible avec des mesures d'échantillons biréfringents [Akn15]. De plus le signal mesuré étant indépendant de λ , la mesure n'est pas perturbée par la variation des différents paramètres avec la longueur d'onde. Cette propriété est également un atout de la profilométrie par localisation du maximum, mais pas des méthodes de mesures de phase d'interférométrie en lumière blanche qui requièrent la prise en compte de la variation du coefficient de réflexion notamment [Bie94]. En revanche, le fait de mesurer la réflectivité des échantillons ne restreint pas les systèmes interférométriques à deux bras à l'étude d'échantillons transparents comme c'est le cas pour les montages de microscopie de phase diffractifs présentés.

Une autre application intéressante de cette technique d'imagerie de phase à décalage quadri-latéral est l'utilisation d'un objectif de microscope à grande ouverture numérique associé à un champ d'illumination faiblement cohérent spatialement afin de réaliser des coupes tomographiques [Akn14]. Bien que le sectionnement, semblable à celui d'un microscope confocal, ne soit pas aussi efficace qu'en OCT, cette implémentation permet la réalisation d'images de phase tomographiques *en-face* à hautes résolutions pour des échantillons transparents ou relativement fins.

Les différentes techniques présentées sont donc essentiellement appliquées à l'imagerie de phase d'échantillons peu épais, et l'OCT représente donc une solution intéressante afin d'accroître la profondeur d'imagerie.

4.6.2 Mesure du signal de phase en OCT plein champ

A l'instar de la mesure du signal d'amplitude, comme effectuée jusqu'à présent, il est possible de calculer la phase du signal interférométrique en combinant judicieusement différentes images décalées en phase, comme cela est effectué en interférométrie en lumière blanche décalée en phase. Néanmoins, le caractère périodique de ce signal extrait requiert une étape supplémentaire, appelée dépliage de la phase, qui nécessite l'intervention d'une reconstruction numérique adaptée,

d'autant plus qu'en OCT plein champ des images *en-face*, et donc en deux dimensions, sont acquises.

Extraction du signal de phase par des méthodes à décalage de phase

Comme mentionné précédemment, en considérant une source de lumière monochromatique de longueur d'onde λ , l'intensité mesurée par le détecteur peut s'écrire de la façon suivante (voir Eq. (1.25) du chapitre 1) :

$$I(x, y) = I_{ref}(x, y) + I_{ech}(x, y) + 2\sqrt{R_{ref}R_{coh}}\cos\left(\frac{4\pi}{\lambda}z(x, y) + \varphi\right), \quad (4.6)$$

où φ est un terme de phase constant, dépendant des variations de phase éventuelles lors de la réflexion entre deux interfaces.

Au lieu de s'intéresser au signal, dit d'amplitude, correspondant à R_{ech} , on cherche à mesurer les déformations d'épaisseur de l'échantillon déterminées par la phase $\phi(x, y) = 4\pi z(x, y)/\lambda$. En effet, puisque $z(x, y)$ est proportionnel à la différence de marche entre la lumière réfléchiée par l'échantillon et celle réfléchiée par la surface de référence, en supposant que cette dernière est plane ou du moins connue, les variations de $z(x, y)$ correspondent à l'information topographique à la surface de l'échantillon, qu'on considérera dans un premier temps comme une simple surface réfléchissante.

Il existe plusieurs techniques à décalage de phase permettant d'extraire le signal de phase ϕ , les trois principales reposant sur un déplacement pas à pas de la surface de référence [Bor02, Dub06] ou bien en lui appliquant un mouvement continu qui est soit linéaire [Yu04], soit sinusoïdal [Dub01a]. Ces déplacements sont généralement induits par un transducteur piézoélectrique qui garantit une précision de mouvement nanométrique. Un décalage de phase peut également être généré par un modulateur acousto-optique mais cela nécessite un traitement de la polarisation du champ lumineux et est donc exclu dans notre cas.

Alors qu'une fluctuation pas à pas de la surface de référence possède l'avantage d'affecter une position stable et précise, cette technique n'est pas adaptée aux fréquences d'acquisition élevées compte tenu du temps de latence nécessaire à la stabilisation de la surface de référence. Il est alors préférable d'utiliser un déplacement continu moins saccadé, bien que la position de la surface soit moins bien définie. On décide donc de comparer l'efficacité, en terme d'extraction du signal, d'une translation linéaire et d'une modulation sinusoïdale.

Comparaison entre un mouvement linéaire ou sinusoïdal de la surface de référence

- Le calcul du signal de phase via l'application d'une modulation sinusoïdale est très similaire à ce qui a déjà été présenté lors du deuxième chapitre 2 en sous-section 2.2.4 (ou encore en *Annexe A*), à l'exception de l'algorithme utilisé pour combiner les quatre images acquises, dont l'objectif est à présent de faire apparaître le terme de phase $\phi(x, y)$. Pour cela, il suffit simplement de les assembler différemment et d'utiliser l'algorithme suivant [Dub01a] :

$$\phi_{sin} = \arctan\left(\frac{I_1 - I_2 - I_3 + I_4}{I_1 - I_2 + I_3 - I_4}\right) \quad (4.7)$$

- L'implémentation d'un déplacement linéaire continu, qui consiste donc à intégrer N images consécutivement durant une translation monotone de la surface de référence (voir Fig. 4.21 ci-après pour plus de détails), peut, pour sa part, profiter de la multitude d'algorithmes de combinaison d'images développés pour des techniques en pas à pas principalement considérées en WLPSI. En effet, contrairement au cas d'une modulation sinusoïdale, un déplacement linéaire est compatible avec ces algorithmes et leur diversité favorise l'optimisation de l'extraction avec notre dispositif. Sachant qu'au moins trois images déphasées sont nécessaires afin d'extraire la phase, puisque le signal interférométrique possède trois variables inconnues (le terme continu $(I_{ref} + I_{ech})$, l'amplitude de modulation des franges $\sqrt{R_{ref}R_{coh}}$, et la phase ϕ) [Cre88], plusieurs algorithmes combinant de trois à plus de dix images [Sur96] ont démontré leur efficacité.

On se satisfera, en ce qui nous concerne, d'un algorithme à cinq images (voir Eq. (4.8)) qui présente une robustesse au bruit supérieure aux algorithmes à quatre images, mais permet d'être exécuté plus rapidement que ceux utilisant davantage d'images, tout en restant performant.

$$\phi = \arctan\left(\frac{2(I_2 - I_4)}{2I_3 - I_1 - I_5}\right) \quad (4.8)$$

L'enjeu étant ici de mesurer le signal de phase pour une densité spectrale de puissance effective étendue, la comparaison entre les deux types de déplacements doit être réalisée en considérant un intervalle spectral ajusté et non monochromatique. Avant de présenter des résultats théoriques et expérimentaux concernant l'extraction du signal de phase, on s'intéresse dans un premier temps à la situation classique en OCT : la détection du signal d'amplitude, c'est-à-dire l'enveloppe de l'interférogramme. Pour cela, on utilise deux algorithmes propres à chaque type de déplacement et déjà explicités dans ce manuscrit. La figure 4.20 décrit le comportement, calculé théoriquement (Fig. 4.20b) et mesuré expérimentalement (Fig. 4.20a), des deux configurations sélectionnées pour une source de lumière large bande.

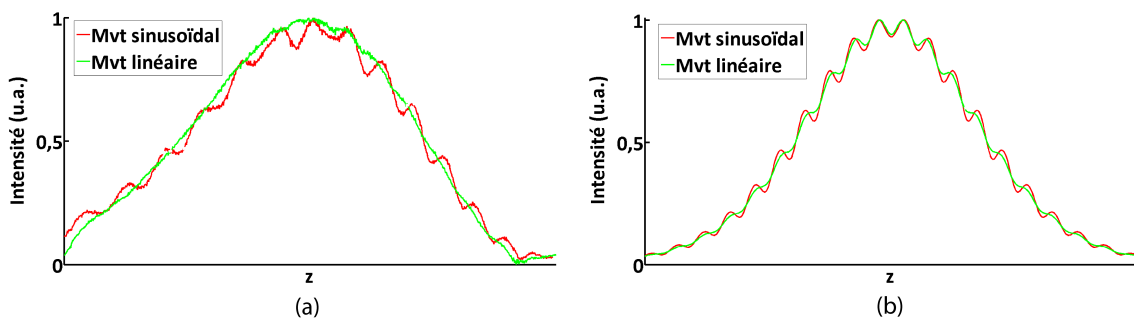


FIGURE 4.20 – Comparaison de l'efficacité d'extraction du signal d'amplitude dans le cas d'un mouvement (mvt) linéaire (courbes vertes) ou sinusoïdal (courbes rouges) de la surface de référence, évaluée expérimentalement (a) et théoriquement (b).

On constate donc que le déplacement linéaire combiné à l'algorithme mentionné dans la section précédente (voir Eq. (4.5)) est plus efficace que celui associé à une modulation sinusoïdale (voir Eq. (2.5) de la sous-section 2.2.4 chapitre 2), et cela aussi bien expérimentalement (Fig.

4.20a) que théoriquement (Fig. 4.20a). Cela peut s'expliquer principalement par une combinaison d'images mieux adaptée à une source large bande, notamment car elle considère cinq images plutôt que quatre, comme c'est le cas pour une modulation sinusoïdale. Aucun algorithme à cinq images n'ayant pour l'heure été développé pour ce type de modulation, la comparaison pure entre les deux méthodes de déplacement reste toutefois quelque peu biaisée. Elle illustre néanmoins la nécessité d'adapter la technique d'extraction, si l'on souhaite restituer le plus fidèlement possible le signal OCT dans le cas d'une densité spectrale de puissance élargie.

D'autres facteurs, dépendant de la longueur d'onde du signal, sont également affectés par cet élargissement spectral, comme la valeur du coefficient de réflexion des objets ou bien l'évaluation de la hauteur $z(x, y)$ d'une déformation qui est directement reliée à λ (voir Eq. (4.6)).

En effet la dépendance du coefficient de réflexion avec la longueur d'onde, et en particulier de sa phase, qui modifie le terme φ (voir Eq. (4.6)), peut perturber la mesure de la topographie d'une surface et affecter l'estimation de z en imagerie de phase en lumière blanche [Par01]. Compte tenu des surfaces considérées ici, généralement en verre ou peu complexes, on choisit d'approximer les variations de phase lors de réflexions à leurs valeurs en λ_0 , qui correspondent à la valeur moyenne du spectre du champ lumineux. La précision de la mesure du signal de phase sera donc réduite si la bande spectrale utilisée est élargie, comme cela fut mentionné lors du choix du filtre optique à insérer dans le système d'illumination (voir la sous-section 4.2.2).

L'influence de l'angle d'inclinaison des rayons lumineux est également un facteur à considérer lorsque l'ouverture numérique est assez élevée. En ce qui nous concerne, la faible valeur de l'ouverture numérique des objectifs nous conduit à négliger l'effet de l'angle sur la valeur du coefficient de réflexion.

Compte tenu de la plus grande efficacité d'extraction de la technique de déplacement linéaire de la surface de référence, on choisit donc de générer un signal électrique en dents de scie, ou triangulaire, contrôlant la platine piézoélectrique. Ce type de signal a déjà été utilisé en interférométrie à décalage de phase [Cre88] ou même en OCT plein champ [Yu04]. Cependant, bien qu'il soit adapté aux fréquences d'exécution importantes, un signal triangulaire classique n'est pas optimal du point de vue de la stabilité du mouvement et on décide donc de recourir à un signal triangulaire symétrique adapté.

Le principe repose donc sur la génération d'un signal triangulaire symétrique (voir Fig. 4.21) dont la période est douze fois inférieure à celle de la fréquence d'acquisition de la caméra. De cette façon, on acquiert en continu dix images successives et déphasées qu'on combine par la suite, le temps résiduel étant réservé au temps de calcul.

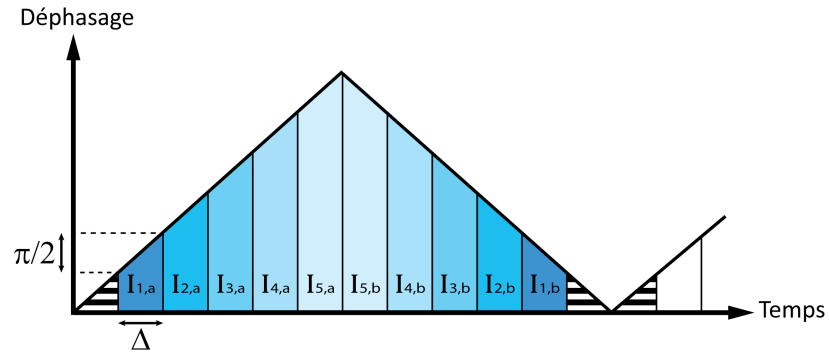


FIGURE 4.21 – Décalage de phase induit par une translation continue et linéaire de la surface de référence contrôlée par un signal triangulaire symétrique. Δ correspond au temps d'intégration du détecteur pour l'acquisition d'une unique image en-face. Les images sont accumulées deux à deux, e.g. l'image d'intensité I_1 est obtenue en sommant $I_{1,a}$ et $I_{1,b}$. Les zones hachurées correspondent au temps consacré aux calculs informatiques.

Les images sont accumulées deux à deux, et l'amplitude du signal est telle qu'un déphasage de $\pi/2$ (en radians) est introduit entre deux images successives (sauf entre $I_{5,a}$ et $I_{5,b}$). Une telle implémentation, unique en OCT plein champ d'après nos recherches, est donc plus rapide et plus stable qu'une technique utilisant un signal triangulaire dissymétrique classique, qui nécessite un temps d'attente durant le front descendant du signal ; s'ajoute à cela une variation brusque de la position de la surface de référence, qui requiert donc un intervalle de temps supplémentaire afin que la surface se stabilise.

Cette technique est donc mieux adaptée à une fréquence d'acquisition élevée qu'un déplacement pas à pas ou basé sur un signal triangulaire classique de la surface de référence. Lorsque cette fréquence devient très importante, le déplacement effectif ne suit plus tout à fait le signal triangulaire, étant donné les hautes fréquences qui composent un tel signal, et un algorithme reposant sur une modulation sinusoïdale de la surface de référence convient alors davantage. Cependant, aucune perturbation de ce type n'a été observée avec notre système dont la fréquence d'exécution est de l'ordre de 130Hz. Un signal de modulation linéaire est donc satisfaisant d'un point de vue de la stabilité.

On compare, à présent, la qualité de l'extraction du signal de phase selon la méthode de modulation utilisée. Pour cela, on utilise comme échantillon un miroir plan et on calcule son image topographique en deux dimensions pour un déplacement linéaire (Fig. 4.22a) ou sinusoïdal ((Fig. 4.22b) de la surface de référence. On trace également un profil du signal de phase dans les deux cas ((Fig. 4.22c) auquel on juxtapose des résultats théoriques simulés dans les mêmes conditions que l'expérience ((Fig. 4.22d).

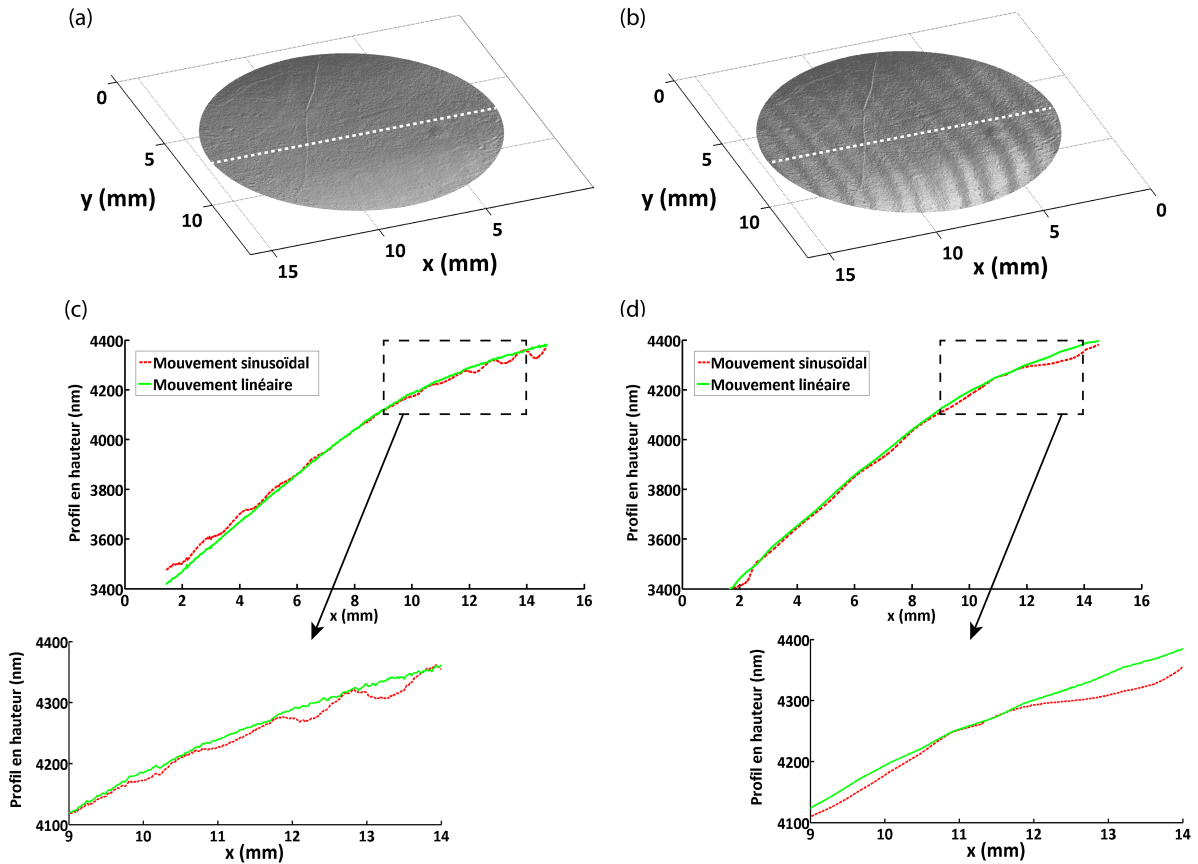


FIGURE 4.22 – (a), (b) : images de phase topographiques d’un miroir plan, en utilisant un mouvement linéaire (a) ou sinusoïdal de la surface de référence pour un spectre large, identique à celui utilisé dans le système présenté (l’échelle des niveaux de gris est la même pour les deux images). (c), (d) : profil topographique du miroir plan mesuré (c) et calculé théoriquement (d). Les courbes présentées en (c) correspondent à une coupe le long d’une ligne indiquée sur les images (a) et (b). Un zoom de chaque graphe est également représenté afin de mieux évaluer l’amplification des irrégularités.

La présence de franges résiduelles sur l’image acquise en utilisant une modulation sinusoïdale, dont les hauteurs correspondent à quelques dizaines de nanomètres, affecte de façon importante la précision des mesures et notamment la détection d’irrégularités présentes à la surface du miroir. Cette observation expérimentale est corroborée par les calculs théoriques (Fig. 4.22d) tout comme l’est la qualité de l’image lorsqu’un signal triangulaire est choisi, justifiant ainsi le choix d’une telle modalité dans la suite de l’étude.

Introduction au dépliage de la phase à deux dimensions

Comme on vient de le voir, il est possible d’extraire la phase d’un signal interférométrique en utilisant une combinaison d’images adaptée. Cependant, la phase étant par essence un signal 2π -périodique, cette dernière n’est définie que sur un intervalle fini $]-\pi, \pi]$ et le signal calculé

n'est donc pas continu. Afin de restituer fidèlement les déformations de l'objet étudié, il est alors nécessaire de transformer le signal extrait en une fonction continue de l'espace réel.

Cas d'un signal 1D. Une première approche vise à considérer un signal à une dimension et d'appréhender une manière de déplier la phase, c'est-à-dire de la rendre continue. L'enjeu consiste donc, à partir d'un signal de phase discontinu (*i.e.* plié, ou *wrapped* en anglais), noté ϕ , comme présenté en figure 4.23a, d'obtenir une fonction continue équivalente, notée Φ (voir Fig. 4.23b).

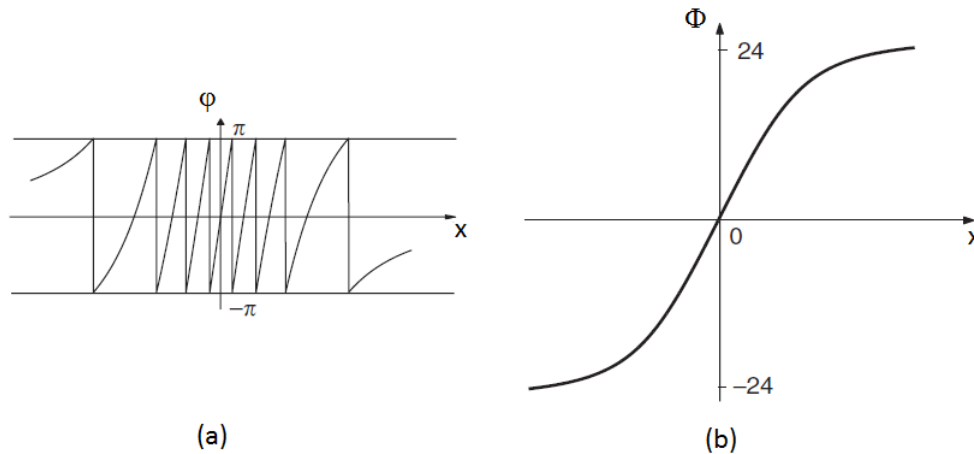


FIGURE 4.23 – Exemple d'un signal de phase à une dimensions plié (a) noté ϕ et de son équivalent déplié (b) noté Φ . Modifiée depuis [Yin06].

On peut montrer [Ito82] que le signal déplié (ou *unwrapped* en anglais) peut être obtenu en intégrant les différences de phases pliées de la fonction ϕ . Cela signifie qu'en un point x_i de la phase dépliée Φ , la différence de phase avec $\Phi(x_{i-1})$ sera identique à $\phi(x_i) - \phi(x_{i-1})$ si cette dernière est inférieure à π en radians ; sinon, on considère que Φ évolue continument. De cette façon, on construit de proche en proche une phase continue en réduisant à 0 les sauts de phase de 2π , c'est-à-dire en traitant les fortes variations de ϕ (*i.e.* les fortes valeurs de son gradient) comme des variations nulles.

Dans le cas d'un rapport signal sur bruit élevé et d'un signal convenablement échantillonné, cette méthode, dite méthode de Itoh, est reconnue et est universellement utilisée pour des dépliages de phase à une dimension. Le problème à deux dimensions apparaît, quant à lui, plus complexe, étant donné que l'intégration doit tenir compte de l'anisotropie des différences de phases éventuelles.

Cas d'un signal 2D. L'approche bidimensionnelle peut a priori être conçue comme un problème à une dimension étendue, à savoir intégrer la différence de phase entre un point d'origine et un point final [Ghi98]. Cependant, en présence de points singuliers, comme c'est généralement le cas en pratique, cette intégration linéaire dépend du chemin choisi, comme illustré en figure 4.24a, et peut conduire à des reconstructions aberrantes.

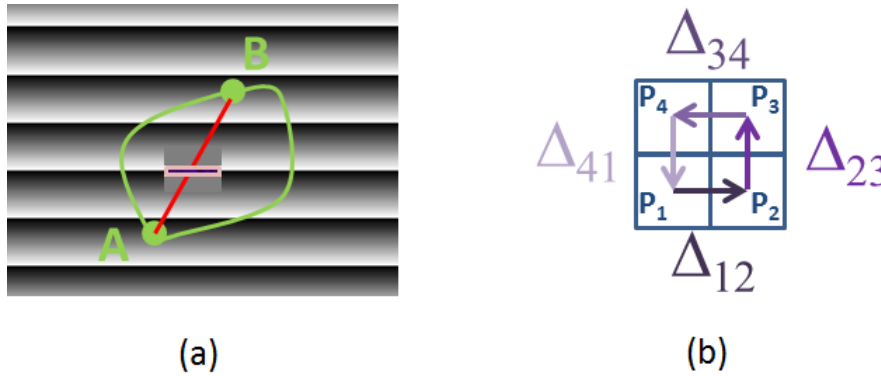


FIGURE 4.24 – (a) : dépendance selon le chemin choisi de la différence de phase entre les points A et B , en présence d'un résidu. Alors que la différence de phase est $\sim 6\pi$ selon les chemins incurvés en vert, elle est de $\sim 4\pi$ le long de la droite rouge. Une ligne, ou "branche", est donc ajoutée afin d'interdire l'intégration le long du chemin rouge. (b) : méthode de détection de la présence de résidu par intégrale des différences de phase Δ_{pq} sur un contour, de quatre pixels, fermé. Si $(\Delta_{12} - \Delta_{23} - \Delta_{34} - \Delta_{41}) \neq 0$, cela signifie qu'un des pixels est un point singulier.

Ces pixels singuliers, appelés résidus, provenant généralement d'un mauvais échantillonnage ou d'un bruit élevé, sont en pratique détectés en intégrant, sur un contour fermé, la différence de phase entre 4 pixels juxtaposés, notés P_1 , P_2 , P_3 et P_4 (voir Fig. 4.24b). Si cette intégrale fermée du gradient de phase est non nulle, cela signifie qu'un résidu est présent parmi les 4 pixels.

Le dépliage de la phase en deux dimensions consiste alors à identifier ces résidus afin de les contourner lors de l'intégration du gradient de phase, qui est alors indépendante du chemin suivi.

Algorithme de Goldstein. L'algorithme de Goldstein [Gol88], également appelé algorithme des "branches coupées" de Goldstein, repose sur une détection efficace des résidus afin de les relier par une ligne, ou "branche", qui constitue une frontière à ne pas traverser lors de l'intégration sur un chemin défini. La phase est alors dépliée tout autour de ces points singuliers sans jamais intercepter ces zones marquées et interdites. Une fois que tous les pixels hors des zones marquées ont été dépliés normalement, les pixels des zones marquées sont à leur tour dépliés selon les valeurs des pixels environnants.

La force de l'algorithme de Goldstein réside dans sa faculté à localiser des résidus proches les uns des autres et ainsi à minimiser la longueur des branches. De plus, son efficacité reconnue s'ajoute à une vitesse d'exécution relativement élevée par rapport aux autres techniques de dépliage à deux dimensions, compte tenu du fait qu'il ne sonde chaque pixel qu'une seule fois. Cependant, cela le rend en contre partie vulnérable aux signaux assez bruités. Enfin, l'isolement de certaines zones, cernées de branches, est susceptible d'induire une différence de phase supérieure à 2π incongrue et donc à générer des valeurs de déformations décalées pour certains blocs de pixels. Cela peut éventuellement être corrigé grossièrement après le dépliage ou même prévenu en introduisant une correction dans l'algorithme de reconstruction.

On peut donc conclure sur ces méthodes de dépliage de phase en signifiant que, bien qu'un problème à deux dimensions soit plus complexe à résoudre, il offre également plus de flexibilité

qu'un problème unidimensionnel pour lequel la présence d'irrégularités sur un seul pixel se propagera sur l'ensemble de la mesure sans qu'il ne soit a priori possible de le contourner.

4.6.3 Application à l'imagerie d'échantillons multicouches

Cette faculté d'extraire le signal de phase $\phi = 4\pi z/\lambda$, permet donc de distinguer des variations très inférieures à λ et d'approcher des résolutions, pour des mesures de hauteurs, de l'ordre du nanomètre. Une application de la mesure de phase est donc l'imagerie topographique de surfaces, caractérisant la qualité de ces dernières en mesurant leurs défauts tels que des rayures et leur planéité. Cependant, comme nous l'avons mentionné en introduction, la plupart des travaux réalisés effectuent des images superficielles d'échantillons peu épais. On propose, ici, un système d'imagerie permettant de caractériser des échantillons multicouches associé à une méthode à décalage de phase rapide et efficace, compatible avec une imagerie en temps réel et avec un champ de vision très large.

Influence de la déformation du front d'onde des interfaces sus-jacentes

La mesure de la phase d'un signal rétrodiffusé par une surface correspondant à l'évaluation du front d'onde du champ dans le plan de cette surface, il est nécessaire de prendre en considération tous les éléments pouvant modifier ce front d'onde, afin d'évaluer correctement la modification du front d'onde induite par la surface d'intérêt.

Un système interférométrique, tel que l'interféromètre de type Michelson, a la capacité d'isoler le signal différentiel entre le champ réfléchi par la surface de référence et celui réfléchi par l'échantillon. Ainsi, si l'on suppose que les deux bras de l'interféromètre sont rigoureusement identiques, alors mis à part les déformations générées par l'échantillon, seule la surface de référence est susceptible d'influer sur la mesure de la phase détectée. En considérant cette surface de référence connue, ou bien préalablement caractérisée par une calibration précise, on se contente alors de soustraire son information topographique à la mesure effectuée, afin de reconstituer le front d'onde propre à l'échantillon.

Lorsque l'échantillon est lui-même composé de plusieurs interfaces, comme c'est le cas d'un échantillon multicouches, l'influence des interfaces sus-jacentes, qui induisent chacune une déformation du front d'onde, doit être analysée et corrigée si nécessaire.

Afin d'étudier les enjeux de cette mesure de front d'onde pour un échantillon multicouches, considérons dans un premier temps un échantillon composé de deux interfaces non parallèles, comme c'est le cas d'une lentille plan-concave par exemple. On suppose qu'on image la surface plane située en-dessous de la surface concave. L'influence de la déformation du front d'onde causée par la première interface dépend alors de la distance entre les deux interfaces. On présente en figure 4.25, une représentation schématique du signal OCT qu'on observerait selon la distance entre les deux interfaces d'indice de réfraction n_1 , séparées par milieu d'indice $n_2 < n_1$.

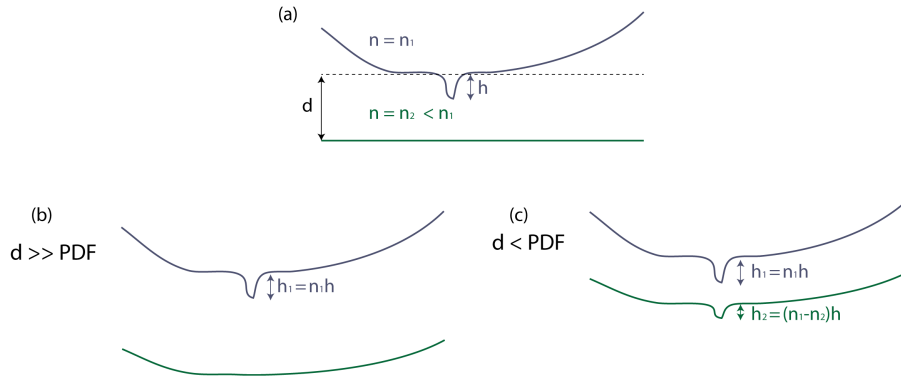


FIGURE 4.25 – Propagation des déformations du front d'onde pour un échantillon composé de plusieurs couches d'indice n_1 et n_2 et tels que $n_1 > n_2$, et dont la première interface est incurvée alors que la seconde est plane (a). Si la distance d entre les deux interfaces est supérieure à la profondeur de champ (PDF) alors seules les déformations correspondant à de faibles fréquences spatiales sont transmises (b). Si d est inférieure à la profondeur de champ, les variations de hauteur à hautes fréquences telles que les rayures sont visibles sur l'image de phase de la seconde interface (c). Les amplitudes des déformations (basses ou hautes fréquences) sur l'image de la seconde interface sont réduites d'un facteur h .

Si cette distance est supérieure à la profondeur de champ de l'objectif de microscope (voir Fig. 4.25a), alors seules les variations correspondantes à des fréquences spatiales faibles seront transmises jusqu'à la seconde interface puisque les déformations à hautes fréquences spatiales, telles que les rayures, seront rendues floues et donc non observables. Les variations à faibles fréquences spatiales correspondant principalement à la courbure de la première interface, après avoir mesuré cette amplitude de courbure il suffit de soustraire judicieusement cette valeur à la mesure de la phase de la seconde interface, afin de restituer la véritable courbure de celle-ci.

Les déformations équivalentes à des variations à hautes fréquences spatiales requièrent donc une correction uniquement lorsque la distance entre deux interfaces consécutives est inférieure à la profondeur de champ. Cependant, compte tenu de la différence d'indice entre le milieu intermédiaire ($n = n_2$) et l'indice des deux couches en jeu ($n = n_1$), l'amplitude des déformations de l'interface supérieure varie d'un facteur $(n_1 - n_2)$ à la surface de la seconde interface (voir Fig. 4.25b) (on précise que ce facteur correctif, calculé par une simple analyse des chemins optiques, est valable quelle que soit la fréquence spatiale de la déformation et est donc applicable à l'amplitude de courbure du front d'onde également). Cependant, en pratique, la dimension réduite de certaines de ces déformations (comme les fines rayures) associée donc à un échantillonnage spatial insuffisant ne permet pas de les corriger efficacement et on préfère donc ne pas intervenir sur leur amplitude, bien que l'on soit capable d'identifier leur présence.

Enfin, une succession de surfaces réfléchissantes entraînent des interférences parasites dues aux réflexions multiples entre les différentes interfaces. Cela perturbe la mesure en créant des signaux similaires à celui d'une interface physique réellement présente, et peut donc conduire à une erreur d'interprétation de l'image produite. Néanmoins, en supposant que les propriétés de l'échantillon et que le nombre de couches successives soient relativement bien connus, ces interfaces parasites sont assez facilement identifiables. En effet, leur intensité étant souvent bien

plus faible, puisqu'elles sont issues de réflexions multiples, et leur position axiale étant l'image par symétrie d'une interface réelle, on considère qu'elles ne constituent généralement pas une perturbation trop importante lorsque l'échantillon est connu.

Exemple d'une image tomographique et topographique d'un échantillon épais

Afin de démontrer la capacité du montage développé, on réalise une image de phase tomographique d'un échantillon constitué de deux lames de verre superposées à un échantillon structuré, comme schématisé en figure 4.26a.

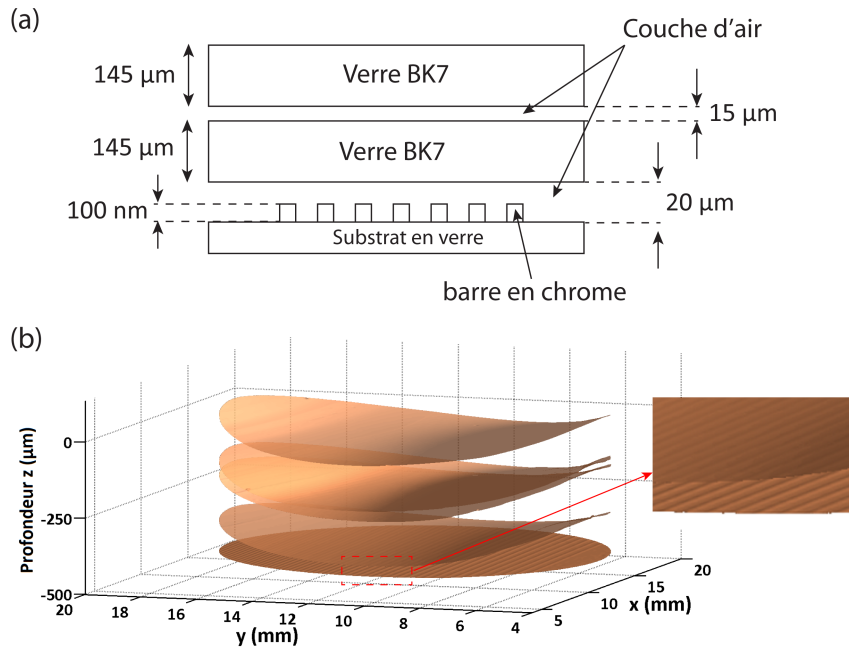


FIGURE 4.26 – (a) : Schéma de l'échantillon multicouche considéré. Il est constitué de deux lamelles de verre de 145 μm d'épaisseur qui sont superposées et déposées au-dessus d'un échantillon structuré composé d'une succession de barres espacées régulièrement. La distance séparant les deux lamelles est de ~ 15 μm alors que la surface structurée est située ~ 20 μm sous la seconde lamelle. La hauteur des barres a été mesurée avec un profilomètre mécanique et vaut ~ 100 nm. (b) : Image de phase topographique et tomographique de l'échantillon composé de cinq interfaces. L'apparence très incurvées des lamelles de verre est due aux échelles de représentation très différentes entre les directions z et (x, y). Le champ de vision est de 15 mm × 15 mm. On ajoute une image correspondant à un zoom d'une partie de la surface structurée afin de mettre en évidence son profil mesuré en trois dimensions.

La capacité de sectionnement axial de notre système, déterminé par une résolution $\Delta z \sim 1,5 \mu\text{m}$, donne la possibilité de différencier des interfaces proches de quelques micromètres les unes des autres. Ainsi le profil topographique de chaque interface peut être mesuré pour l'échantillon multicouche considéré (voir Fig. 4.26b).

Cependant, bien que Δz soit proche de $1 \mu\text{m}$, le calcul de la phase servant à construire l'image topographique d'une interface requiert un interférogramme bien défini, sans que les franges de

l'interférogramme propres à l'interface suivante ne viennent s'additionner et perturber la figure d'interférences. S'ajoutant à cela un étalement relativement important de la réponse impulsionnelle axiale due à la présence de rebonds (voir Fig. 4.7), il est alors requis que les interfaces soient distantes d'au moins $10\mu\text{m}$.

Les deux lamelles de verre étant à faces parallèles, le front d'onde n'est par conséquent pas modifié par ces dernières, et il n'est donc pas nécessaire de corriger une quelconque déformation. Cependant ces lamelles, bien que différentes, ne sont pas tout à fait planes et possèdent une amplitude de courbure crête-à-crête proche de $20\mu\text{m}$. Puisque le signal interférométrique ne s'étend que sur quelques micromètres, il n'est donc pas possible d'extraire le signal de phase d'une interface avec un seul interférogramme, *i.e.* une seule image *en-face*.

Une solution consiste alors à acquérir une série d'images *en-face*, dont les interférogrammes se superposent partiellement, afin de juxtaposer le signal de phase propre à chacune de ces images. Cela peut être automatisé en créant des masques déterminés par seuillage de chaque interférogramme qui sont utilisés afin de les différencier, puis d'accoler les pourtours successifs après extraction du signal de phase (voir le schéma de la routine en figure 4.27)

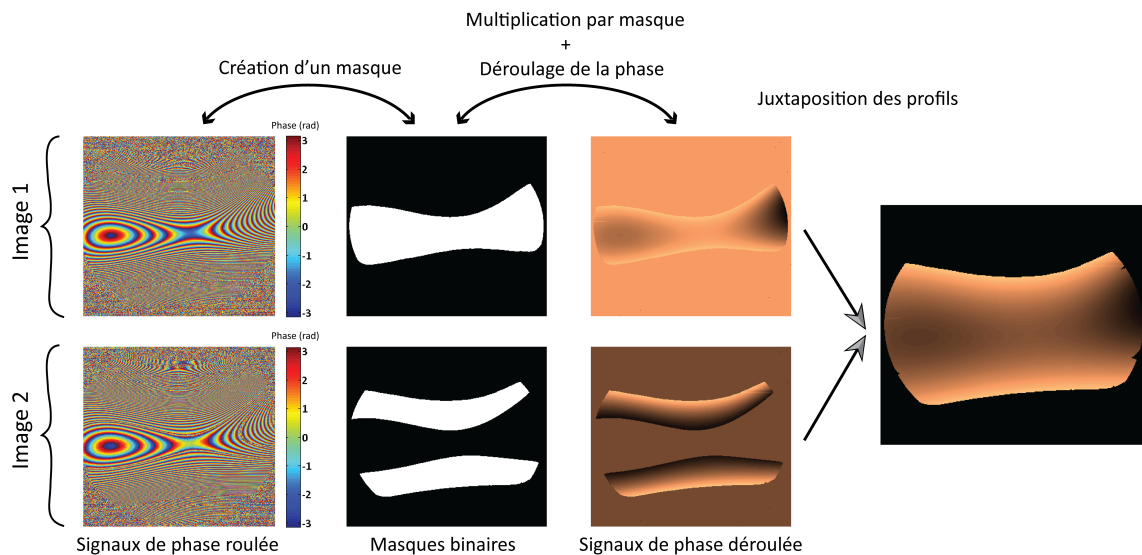


FIGURE 4.27 – Principe de reconstruction du signal de phase dans le cas d'une surface dont l'amplitude de courbure crête-à-crête est très supérieure à la résolution axiale du système : une zone de chaque image, dont le signal de phase est suffisamment contrasté, est sélectionnée puis dépliée. Les deux parties sont juxtaposées en ajoutant une phase constante à la seconde image afin d'assurer la continuité du signal de phase aux frontières.

Cette méthode d'acquisition, rendue nécessaire par la courbure importante des lamelles de verre dont l'amplitude est supérieure à la valeur de la résolution axiale, prouve qu'il est possible de mesurer le profil topographique de surfaces étendues ($\sim 15\text{mm} \times 15\text{mm}$) quelle que soit leur amplitude de courbure, même si le temps d'exécution est augmenté lorsque cette amplitude de courbure est élevée.

On est alors disposé à caractériser chacune des surfaces de l'échantillon en mesurant leur

défaut de planéité ainsi que les différentes structures ou rayures présentes en superficie. On réalise une coupe transverse de la figure tridimensionnelle 4.26b afin de mettre en évidence ces différentes caractéristiques :

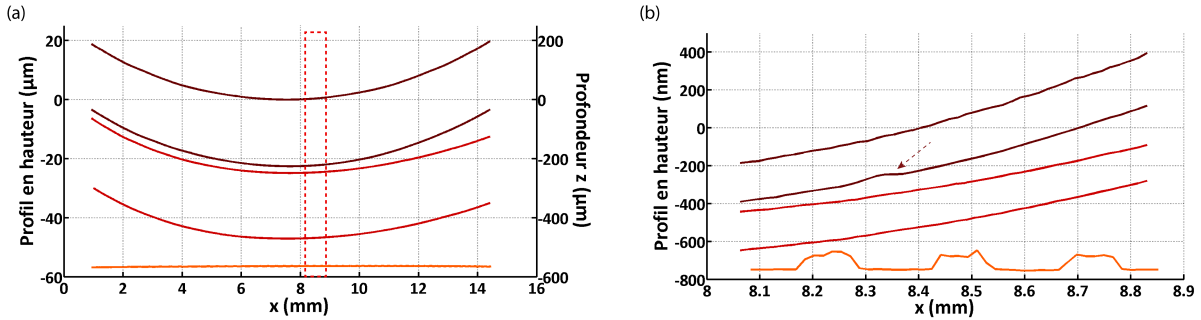


FIGURE 4.28 – Profil du signal de phase, exprimé en hauteur, de l’image tridimensionnelle présentée en figure 4.26b. (a) : Profil de hauteur, ou de façon équivalente, amplitude de courbure (axe des ordonnées placé à gauche) et profondeur du signal (axe des ordonnées placé à droite) mesurées sur l’ensemble du champ. Chaque surface est associée à une couleur différente. (b) : Graphe correspondant à un zoom de (a) (zone indiquée par un rectangle en pointillés) afin de préciser les amplitudes des structures. L’axe des ordonnées est utilisé uniquement pour la hauteur de ces déformations et non pour la position en profondeur des interfaces. Une flèche indique la présence d’une rayure sur la face inférieure de la première lamelle.

Cela confirme donc une amplitude de courbure crête-à-crête des deux lamelles proches de $20\mu\text{m}$, alors que la hauteur des plots présents à la surface de l’échantillon structuré est de l’ordre de $100\mu\text{m}$ (en tenant compte d’une différence de déphasage à la réflexion entre le verre BK7 (πrad) et le chrome ($\sim 2,9\text{rad}$) [Par01] équivalent à $\sim 16\text{nm}$).

On évalue la performance du dispositif en calculant l’erreur de répétabilité sur la mesure de la phase, c’est-à-dire sa consistance, en mesurant à plusieurs reprises, de façon indépendante, la hauteur d’un plot de la dernière surface. On obtient un écart-type proche de 16mrad (*i.e.* 1nm en hauteur) et on en déduit donc une précision maximale de 32mrad sur la mesure de la phase (*i.e.* 2nm en hauteur). On mesure également la sensibilité de la mesure du signal de phase, qui correspond au plus petit déphasage détectable en tenant compte du bruit de mesure, et vaut dans notre cas $\sim 16\text{mrad}$ (*i.e.* 1nm en hauteur) lorsque deux images *en-face* sont accumulées (ce qui correspond à l’intégration de douze images décalées en phase comme expliqué en sous-section 4.6.2). Cette sensibilité peut être améliorée d’un facteur deux en accumulant dix fois plus d’images.

Bien que la juxtaposition de plusieurs images *en-face* soit susceptible d’introduire des variations parasites, celles-ci sont globalement faibles et inférieures à la sensibilité de mesure correspondant à des déformations de 1nm . De la même façon, les erreurs engendrées par le dépliage de la phase restent très localisées et donc éventuellement corrigeables lorsqu’elles sont supérieures au bruit de la mesure.

Le système est donc capable de produire des images topographiques résolues en profondeur d’un échantillon multicouches, dont l’épaisseur globale est supérieure à $300\mu\text{m}$. L’acquisition d’images *en-face*, associée à une technique à décalage de phase efficace en termes de vitesse

et d'extraction du signal de phase, garantissent une sensibilité de mesure de $\sim 16\text{mrad}$ et une fréquence d'acquisition de l'ordre de 10Hz , si deux images *en-face* sont accumulées. La caractérisation profilométrique en temps réel d'un échantillon composé de plusieurs interfaces, séparées de quelques micromètres les unes des autres, et s'étendant sur une surface de plus de $15\text{ mm} \times 15\text{ mm}$, est donc envisageable et pourrait ainsi permettre le suivi de déformations ou d'un écoulement visqueux. Le couplage d'un tel montage à l'étude de la polarisation pourrait s'appliquer à la caractérisation d'échantillons multicouches biréfringents qui font l'objet de nombreuses études [Cho10].

4.7 Conclusion

On a donc développé un système d'OCT plein champ à large champ de vision qui possède des performances au moins similaires à celles de l'OCT plein champ conventionnel en termes de profondeur de pénétration et de résolution axiale. Afin d'atteindre ces résultats, un arrangement original du montage et du déplacement des différents éléments optiques de l'interféromètre a été proposé puis justifié théoriquement et expérimentalement. Le système d'imagerie a également été adapté afin de garantir une qualité du signal homogène sur tout le champ de vision.

Des images d'amplitude en trois dimensions d'échantillons biologiques *ex vivo*, tels que de la peau ou une grenouille, ont été réalisés, démontrant les capacités du système en termes de résolution et de profondeur de pénétration.

La mesure du signal de phase a d'autre part permis de démontrer la possibilité de caractériser précisément des structures multicouches s'étendant sur une profondeur de plusieurs centaines de micromètres. Du fait des propriétés du système développé, et grâce à une méthode de détection efficace, ces images de phase peuvent être obtenues en temps réel et pour un champ de vision très large. La capacité de sectionnement axial garantit également la distinction d'interfaces rapprochées de seulement quelques micromètres.

Cette capacité de sectionnement étant en partie limitée par le chevauchement du signal des interfaces très rapprochées les unes des autres, il serait intéressant d'ajouter une modalité supplémentaire permettant d'extraire les profils relatifs à ces interfaces. Cela pourrait se réaliser en s'inspirant des techniques utilisées en interférométrie à décalage de phase en lumière blanche, appliquées à l'imagerie de structures empilées et fines mentionnées précédemment.

Enfin, l'application de la mesure du signal de phase à des échantillons biologiques constitue une source d'information importante et mériterait de s'y attarder plus profondément, et en particulier l'imagerie à l'échelle cellulaire. Un montage à haute résolution, comme celui développé dans le troisième chapitre de ce manuscrit apparaît bien adapté, même si jusqu'à présent l'imagerie de phase en OCT plein champ (en domaine temporel) consiste à moyenniser le signal après la traversée de l'échantillon cellulaire.

Chapitre 5

L'OCT plein champ en domaine fréquentiel focalisé numériquement

“Et que faudrait-il faire ? Grimper par ruse au lieu de s'élever par force ? Non, merci !
[...] Chez le bon éditeur de Sercy Faire éditer ses vers en payant ? Non, merci !
[...] Mais... chanter, Rêver, rire, passer, être seul, être libre,
Avoir l'œil qui regarde bien, la voix qui vibre,
Mettre, quand il vous plaît, son feutre de travers,
Pour un oui, pour un non, se battre, – ou faire un vers.”

Cyrano de Bergerac

Sommaire

5.1	Introduction	165
5.2	Modèle théorique de la propagation du champ électromagnétique en microscopie optique	166
5.3	Fonction de transfert optique et cohérence spatiale	173
5.4	Correction numérique de la fonction de corrélation Γ	174
5.4.1	Prise en compte du degré de cohérence spatiale du champ	176
5.4.2	Algorithme de focalisation numérique	180
5.5	Démonstration expérimentale	185
5.5.1	Montage de l'expérience	185
5.5.2	Principe et méthode d'acquisition du système SS-OCT plein champ	189
5.5.3	Applications et correction numérique de la mise au point	193
5.6	Conclusion	199

Nous avons vu que l'OCT plein champ était très performant en termes de résolution, de gamme spectrale accessible et de réduction du nombre de balayages. Alors que la résolution axiale et l'étendue de la densité spectrale résultante de détection proviennent essentiellement de la disponibilité technologique de source faiblement cohérente spatialement à large spectre d'émission, la résolution latérale est une caractéristique plus fondamentale qui confère à l'OCT plein champ un potentiel de vitesse important puisqu'il s'affranchit des balayages transverses. Cependant, en pratique, l'utilisation d'un détecteur matriciel et surtout d'une source dont l'intensité lumineuse

est relativement faible ne permet pas d'exploiter au mieux cette capacité. Les sources spatialement cohérentes, comme les lasers, les diodes superluminescentes (SLD), exploitées généralement dans les montages de FD-OCT, sont, elles, en revanche particulièrement intenses et garantissent une vitesse d'acquisition élevée à ces dispositifs.

D'autre part, le fait d'acquérir toute l'information selon z en une seule fois, leur assure une sensibilité de détection plus importante (voir la sous-section 1.5.3) et ne nécessite pas de balayage axial du bras de référence. Cela constitue cependant une limite fondamentale, puisqu'il n'est alors pas possible d'utiliser des ouvertures numériques élevées comme en OCT plein champ conventionnel pour lequel la résolution latérale peut atteindre des valeurs très élevées compte tenu de l'ajustement dynamique de la mise au point au cours de l'acquisition d'une pile d'images.

On cherche donc à développer un système d'imagerie associant les avantages des montages de FD-OCT (*i.e.* surface de référence fixe, haute sensibilité de détection), à ceux de l'OCT plein champ (*i.e.* absence de balayage transverse, résolution latérale élevée), en mettant au point un dispositif d'OCT à balayage spectral (ou SS-OCT) combiné à une illumination plein champ et un traitement numérique de focalisation.

5.1 Introduction

Plusieurs solutions ont été proposées afin d'outrepasser l'existence du compromis, propre au FD-OCT, entre la profondeur d'imagerie et la résolution latérale. Le traitement du signal post-acquisition par déconvolution [Yas06] ou par résolution du problème inverse de diffusion pour un système d'imagerie interférométrique [Ral07] représentent des méthodes numériques implémentées dans ce but. Il existe également des dispositifs modifiant les propriétés physiques du montage conventionnel en utilisant un faisceau lumineux incident de type faisceau de Bessel plutôt que Gaussien ce qui permet d'obtenir une résolution latérale de $\sim 1,5\mu\text{m}$ pour une profondeur de champ étendue jusqu'à $\sim 200\mu\text{m}$ [Lei06]. Malgré tout, ces systèmes requièrent tous un système de balayage transverse du faisceau incident ce qui n'est pas optimal en ce qui concerne la vitesse d'exécution et la stabilité du montage.

Lorsqu'une onde incidente plane est considérée, de sorte à s'affranchir des balayages transverses, les systèmes d'OCT se rapprochent des montages d'holographie numérique pour lesquels de nombreux algorithmes de reconstruction numérique du champ électromagnétique sont aujourd'hui disponibles et validés [Kim10]. Associés à une source à balayage spectral, ces derniers acquièrent une capacité de sectionnement axial et on parle alors de microscopie par holographie numérique (ou DHM pour *digital holographic microscopy* en anglais) [Yu05].

En ce qui concerne l'OCT, l'utilisation d'une illumination en onde plane, c'est-à-dire spatialement cohérente, combinée à une source à balayage spectral (SS-OCT) offre donc la possibilité, tout comme en DHM, d'une focalisation numérique comme cela a été démontré théoriquement dans [Mar07]. L'implémentation d'un processus d'optique adaptative a également été démontré expérimentalement dans [Kum13] (on précise que ce dernier a été publié après la soumission de l'article résultant de l'expérience présentée dans ce chapitre). De plus, ce type de systèmes ne nécessitant aucun déplacement, axial ou transverse, des éléments de l'interféromètre, ils promettent une acquisition d'images en trois dimensions très rapide. Quelques montages ont été ainsi développés pour l'imagerie d'échantillons fabriqués [Ann09, Dub07] ou biologiques [Bon10]

mais sans inclure de correction numérique de la mise au point.

Cependant, la cohérence spatiale importante, et caractéristique, de l'onde d'illumination plane entraîne la présence d'un bruit cohérent dû aux effets d'interférences parasites entre les différentes ondes émises par des structures situées dans des zones différentes de l'échantillon [Kar05, Kar04]. L'imagerie de tissus biologiques est donc favorisée par l'utilisation d'un champ d'illumination plein champ incohérent ou partiellement cohérent spatialement comme c'est le cas pour le montage développé par Drexler et al. [Pov06], qui utilise efficacement une fibre multimode vibrante afin de réduire la cohérence spatiale de la source. Cependant, tout comme les autres systèmes de FD-OCT utilisant une illumination plein champ, et antérieurs à la soumission de l'article résultant de l'étude présentée dans ce chapitre, il n'entreprend pas de traiter l'effet du compromis présent en FD-OCT, et a fortiori en SS-OCT, affectant la résolution latérale, et la profondeur d'imagerie maximale est donc limitée par la profondeur de champ des objectifs.

En 2013, Drexler et al. ont mis au point un système efficace de SS-OCT plein champ couplé à une correction des aberrations par optique adaptative [Kum13]. Néanmoins, ils utilisent une source cohérente spatialement ce qui présente certains inconvénients comme on l'a vu. Dans [Lab09], un système de focalisation dynamique, basé sur l'étude du signal dans l'espace de Fourier spatial, est implémenté en OCT plein champ dans le domaine temporel, jouissant ainsi d'une qualité d'image satisfaisante mais nécessitant un balayage longitudinal afin de réaliser une image en trois dimensions.

Nous proposons donc un système d'imagerie basé sur un montage de FF-SSOCT associé à une illumination plein champ, partiellement cohérente spatialement, dépourvu donc de toute translation motorisée au sein de l'interféromètre et pour lequel, pour une ouverture numérique fixée, la profondeur d'imagerie est étendue par un traitement numérique a posteriori, favorisant ainsi l'obtention d'une résolution latérale élevée.

Ce traitement est adapté à une correction de la fonction de corrélation d'un système SS-OCT plein champ, assurant ainsi l'ajustement de la focalisation des différentes images *en-face*, et cela quel que soit le degré de cohérence spatiale du champ lumineux incident, contrairement aux travaux présents jusqu'à aujourd'hui dans la littérature.

Après une étude théorique de la cohérence spatiale du champ électromagnétique en optique et de la propagation du champ lumineux et de la formation des images en microscopie optique, on démontrera expérimentalement la potentialité de ce système d'imagerie, affranchi des translations mécaniques, en réalisant une image tomographique d'un échantillon métalliques tridimensionnel.

Ce travail a été développé en coopération avec M. Anton Grebenyuk et Pr. Vladimir Ryabukho de l'université de Saratov (Russie) qui ont essentiellement mis au point le traitement numérique des données et l'algorithme de focalisation.

5.2 Modèle théorique de la propagation du champ électromagnétique en microscopie optique

Cette section a pour objectif d'établir une expression théorique du signal détecté, précise et adaptée aux conditions expérimentales du montage développé, afin de pouvoir l'analyser et le

traiter numériquement dans le but d'appliquer un algorithme de focalisation post-acquisition. On développera donc une théorie optique de la formation des images en microscopie basée sur la théorie scalaire de la diffraction et du modèle de Kirchoff dans le cadre de l'approximation de Fresnel [Goo05]. Alors que l'approximation scalaire du champ exclut la prise en compte de la polarisation, qui repose sur une propriété vectorielle, l'approximation de Fresnel considère, en sus, une distance de propagation d grande devant la longueur d'onde λ et approxime la phase d'une onde sphérique à celle d'une onde parabolique en se restreignant donc à des points suffisamment proches de l'axe et à une distance d suffisamment importante (voir Fig. 5.1).

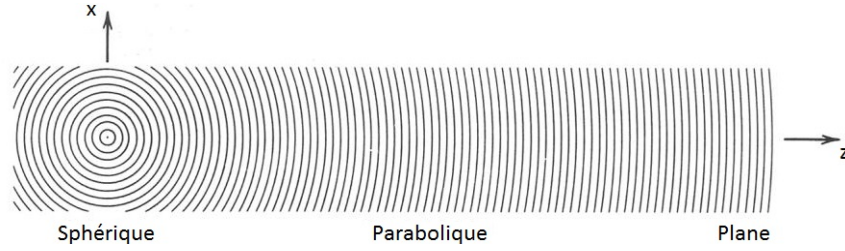


FIGURE 5.1 – Une onde sphérique émise en un point z_0 peut être assimilée à une onde parabolique, à proximité de l'axe optique. Pour des points très éloignés de z_0 l'onde sphérique est proche d'une onde plane.

Ce modèle, satisfaisant à nos conditions expérimentales, a l'avantage de proposer une description relativement simple à mettre en oeuvre et permet donc d'établir une étude analytique approfondie. Il est ainsi possible d'établir une fonction de transfert de l'espace libre $(x, y) \rightarrow h(x, y)$ permettant de calculer, sous l'hypothèse d'un champ initial d'amplitude $U(x, y, z = 0)$ connue, l'amplitude du champ $U_d(x, y, z = d)$ après propagation d'une distance d le long de l'axe optique dans l'espace libre. En notant \tilde{U} la transformée de Fourier du champ U et $k = 2\pi/\lambda$ les relations suivantes décrivent la propagation du champ dans l'espace libre :

$$U(x, y, d) = [h(x', y') * U(x', y', 0)]_{(x, y)} \quad (5.1)$$

$$\tilde{U}(x, y, d) = H(x, y)\tilde{U}(x, y, 0), \quad (5.2)$$

$$\text{avec } \begin{cases} h(x, y) = \frac{e^{jkd}}{j\lambda d} \exp \left[j\pi \frac{x^2 + y^2}{\lambda d} \right] \\ H(k_x, k_y) = e^{jkd} \exp \left[-jd \frac{k_x^2 + k_y^2}{2k} \right] \end{cases}$$

Le spectre spatial \tilde{U} étant défini ainsi :

$$\tilde{U}(k_x, k_y) = \iint U(x, y) \exp [-j(xk_x + yk_y)] dx dy \quad (5.3)$$

Calcul du champ détecté U à partir du champ réfléchi par l'objet U_f . On considère donc le schéma d'un microscope conventionnel composé d'un objectif situé en (x_2, y_2) , d'un diaphragme d'ouverture en (x_3, y_3) et d'une lentille de tube en (x_L, y_L) qui projette l'image de l'objet positionné dans le plan focale arrière de l'objectif en (x_f, y_f) sur le détecteur (x, y) , comme cela est décrit en figure 5.2. On précise que les schémas et l'essentiel de la théorie sont issus de [Gre12c], dont les auteurs sont les collaborateurs du projet :

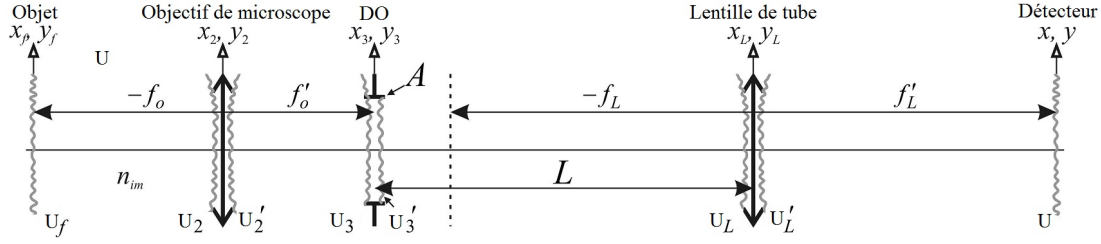


FIGURE 5.2 – Schéma du système d'imagerie. DO : diaphragme d'ouverture ; f_o, f'_o : distance focale avant et arrière de l'objectif ; f_L, f'_L : distance focale avant et arrière de la lentille de tube ; L : distance entre la pupille de l'objectif le plan focal avant de la lentille de tube.

Afin d'exprimer le signal U détecté, en fonction de l'amplitude du champ U_f de l'objet, on calcule la propagation du champ successivement dans l'espace libre et à travers les éléments optiques du montage, en considérant un champ électrique monochromatique de pulsation $\omega = c/k$. On précise à ce propos, que dans le cadre de l'approximation de Fresnel, la fonction de transmission d'une lentille de distance focale f' et dont le milieu d'immersion a un indice de réfraction n_{im} s'écrit :

$$t(x, y) = \exp\left(jn_{im}k\frac{x^2 + y^2}{2f'}\right) \quad (5.4)$$

Cela est bien cohérent avec le fait qu'une lentille transforme la phase d'une onde plane en celle d'une onde parabolique (qui est l'approximation d'une onde sphérique ici) centrée à une distance f' de la lentille.

D'après l'équation de propagation dans l'espace libre (5.1) on déduit tout d'abord que :

$$\begin{aligned} U_3(x_3, y_3, \omega) &= [h(x', y') * U'_2(x', y', 0)]_{(x_3, y_3)} \\ &= \frac{je^{jkf'_o}}{\lambda f'_o} \exp\left[j\pi\frac{x_3^2 + y_3^2}{\lambda f'_o}\right] \iint U'_2(x_2, y_2, \omega) \exp\left[\frac{j\pi}{\lambda f'_o}(x_2^2 + y_2^2)\right] \exp\left[-j\frac{k}{f'_o}(x_2x_3 + y_2y_3)\right] dx_2 dy_2 \end{aligned} \quad (5.5)$$

En utilisant l'équation (5.4), on peut écrire :

$$U'_2(x_2, y_2, \omega) = U_2(x_2, y_2, \omega) \exp\left(-j\pi\frac{x_2^2 + y_2^2}{\lambda f'_o}\right) \quad (5.6)$$

Ce qui conduit à l'équation :

$$U_3(x_3, y_3, \omega) = \frac{je^{jkf'_o}}{\lambda f'_o} \exp\left[\frac{j\pi}{\lambda f'_o}(x_3^2 + y_3^2)\right] \tilde{U}_2\left(\frac{kx_3}{f'_o}, \frac{ky_3}{f'_o}, \omega\right) \quad (5.7)$$

Puis en utilisant la relation (5.2) :

$$\tilde{U}_2(k_x, k_y, \omega) = \tilde{U}_f(k_x, k_y, \omega) e^{-jn_{im}kf_o} \exp\left(j\frac{f_o}{n_{im}}\frac{k_x^2 + k_y^2}{2k}\right) \quad (5.8)$$

On obtient la relation suivante en combinant les équations (5.7) et (5.8) :

$$U_3(x_3, y_3, \omega) = \frac{e^{jkf'_0(1+n_{im}^2)}}{j\lambda f'_0} \tilde{U}_f \left(\frac{kx_3}{f'_0}, \frac{ky_3}{f'_0}, \omega \right) \quad (5.9)$$

Nota bene : Cette relation met en évidence le fait que l'amplitude complexe du champ dans le plan focal arrière d'une lentille est proportionnelle à la transformée de Fourier de l'amplitude complexe du champ dans le plan focal avant. Cette propriété est très utilisée notamment pour influencer sur le spectre spatial du champ, par filtrage par exemple.

De la même façon que l'on a obtenu la relation (5.9), on établit la relation suivante :

$$U(x, y, \omega) = \frac{e^{jk(f'_L+L)}}{j\lambda f'_L} \exp \left[\frac{j\pi}{\lambda f'_L} \left(1 - \frac{L}{f'_L} \right) (x^2 + y^2) \right] \tilde{U}'_3 \left(\frac{kx}{f'_L}, \frac{ky}{f'_L}, \omega \right) \quad (5.10)$$

En notant $(x, y) \rightarrow A(x, y, \omega)$ la fonction pupillaire effective du système, $U'_3(x_3, y_3, \omega) = A(x_3, y_3, \omega)U_3(x_3, y_3, \omega)$ et on obtient finalement l'expression de l'amplitude complexe du champ détecté U en fonction de celle émise par l'objet U_f , les deux plans étant conjugués :

$$U(x, y, \omega) = \mu_i(x, y, \omega) \iint \tilde{U}_f \left(\frac{kx_3}{f'_0}, \frac{ky_3}{f'_0}, \omega \right) A(x_3, y_3, \omega) \exp \left[-j \frac{k}{f'_L} (x_3x + y_3y) \right] dx_3 dy_3,$$

$$\text{où } \mu_i(x, y, \omega) = \frac{e^{jk[f'_0(1+n_{im}^2)+L+f'_L]}}{j\lambda f'_0 f'_L} \exp \left[\frac{j\pi}{\lambda f'_L} \left(1 - \frac{L}{f'_L} \right) (x^2 + y^2) \right] \quad (5.11)$$

Cette relation fait donc apparaître la transformée de Fourier (notée TF) de la fonction $\tilde{U}_f A$ qu'on peut donc écrire comme le produit de convolution de l'amplitude complexe U_f avec la TF de la fonction pupillaire définissant l'ouverture effective du système d'imagerie \tilde{A} :

$$U(x, y, \omega) = \frac{\mu_i(x, y, \omega)}{M^2} \iint U_f \left(\frac{-x_s}{M}, \frac{-y_s}{M}, \omega \right) \tilde{A} \left(k \frac{x - x_s}{f'_L}, k \frac{y - y_s}{f'_L}, \omega \right) dx_s dy_s \quad (5.12)$$

On retrouve donc l'expression caractéristique des systèmes d'imageries dont le signal incident sur le détecteur est identifiable au produit de convolution entre l'amplitude du signal émis par l'échantillon et la réponse percussionnelle du système, cette dernière étant proportionnelle à la TF de la fonction pupillaire du système.

Calcul du champ incident sur l'objet U_I en fonction du champ initial U_0 . On évalue à présent l'expression du champ incident sur l'objet U_I en fonction de l'amplitude du champ dans le plan de l'ouverture, ou du diaphragme d'ouverture, U_0 . Le calcul est similaire à celui de U_3 (voir Eq. (5.9)), et le spectre spatial de ce champ incident U_I suit la relation :

$$\tilde{U}_I(k_x, k_y, \omega) = -j\lambda f'_0 e^{jkf'_0(1+n_{im}^2)} U_0 \left(-f'_0 \frac{k_x}{k}, -f'_0 \frac{k_y}{k}, \omega \right) \quad (5.13)$$

Prise en compte d'un défaut de mise au point. On considère désormais que la surface de l'objet n'est pas confondue avec le plan focal de l'objectif. D'après la théorie de l'Optique de Fourier, le champ se propageant d'une distance $(z - f'_0)$, l'amplitude complexe de son spectre spatial est multipliée par un terme de phase $k_z(z - f'_0)$ où $k_z^2 = k^2 n_{im}^2 - k_x^2 - k_y^2$. On représente cette configuration avec le schéma ci-dessous. On choisit d'indiquer également une configuration du microscope en transmission afin de faciliter la compréhension sachant que celui-ci est équivalent au dispositif en réflexion qu'on utilise, en supposant $(f'_c, n_c, z_{S1}) = (f'_0, n_{im}, z_{S2})$.

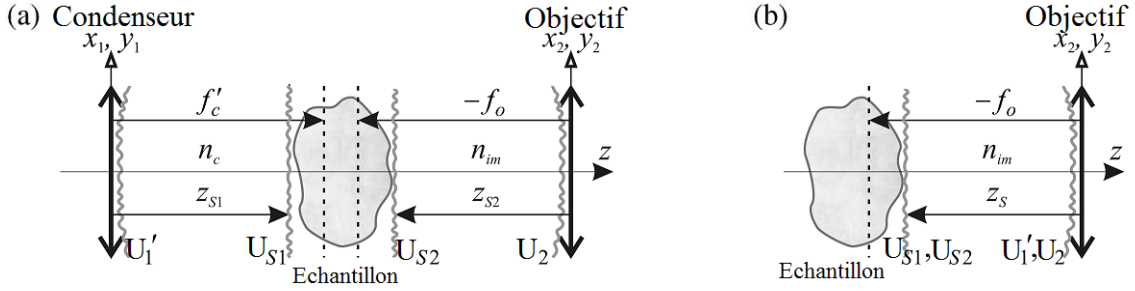


FIGURE 5.3 – Schéma d'un microscope, avec les notations correspondant à l'étude théorique, travaillant en transmission (a) et en réflexion (b) en considérant un échantillon défocalisé.

Les champs U_{S1} et U_{S2} , comme indiqués sur la figure 5.3 sont alors reliés à U_I et U_f de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \tilde{U}_{S1}(k_x, k_y, \omega) &= \tilde{U}_I(k_x, k_y, \omega) \Phi_1(k_x, k_y, \omega), \\ &\text{avec } \Phi_1(k_x, k_y, \omega) = \exp[j(z_{S1} - f'_c)(k^2 n_c^2 - k_x^2 - k_y^2)] \\ \tilde{U}_f(k_x, k_y, \omega) &= \tilde{U}_{S2}(k_x, k_y, \omega) \Phi_2(k_x, k_y, \omega), \\ &\text{avec } \Phi_2(k_x, k_y, \omega) = \exp[j(z_{S2} - |f_o|)(k^2 n_{im}^2 - k_x^2 - k_y^2)] \end{aligned} \quad (5.14)$$

En se plaçant dans une configuration en réflexion ($\Phi_1 = \Phi_2 = \Phi_{ech,ref}$) et en notant R_{obj} la fonction qui caractérise la réflexion de l'échantillon, on écrit :

$$\tilde{U}_{S2}(k_x, k_y, \omega) \simeq \iint \tilde{U}_{S1}(k_{x1}, k_{y1}, \omega) R(k_{x1}, k_{y1}, k_x, k_y, \omega) dk_{x1} dk_{y1} \quad (5.15)$$

L'expression de l'amplitude complexe du champ détecté est donc la suivante :

$$\begin{aligned} \tilde{U}(x, y, \omega) &= \iint U_0(x_0, y_0, \omega) K(x_0, y_0, x, y, \omega) dx_0 dy_0, \\ \text{où } K(x_0, y_0, x, y, \omega) &= \frac{\mu(x, y, \omega)}{\lambda f_0^2} \Phi_{ech} \left(-k \frac{x_0}{|f_0|}, -k \frac{y_0}{|f_0|}, \omega \right) \times \\ &\iint A(x_3, y_3, \omega) \Phi_{ech} \left(\frac{kx_3}{f'_0}, \frac{ky_3}{f'_0}, \omega \right) \exp \left[-j \frac{k}{f'_L} (x_3 x + y_3 y) \right] R \left(-\frac{kx_0}{|f_0|}, -\frac{ky_0}{|f_0|}, \frac{kx_3}{f'_0}, \frac{ky_3}{f'_0}, \omega \right) \\ &\quad \times dx_3 dy_3, \end{aligned}$$

$$\text{avec } \Phi_{ech}(k_x, k_y, \omega) = \exp \left[j(z_{ech} - |f|)(k^2 n_{im}^2 - k_x^2 - k_y^2)^{1/2} \right],$$

où z_{ech} est la position de l'échantillon.

(5.16)

Cas d'un échantillon non diffusant. Dans [Gre12a], la fonction R est estimée, en négligeant l'influence des réflexions multiples, pour un échantillon constitué de N couches dont chaque interface réfléchit la lumière spéculairement.

Afin de simplifier les expressions, on choisit de ne considérer qu'un échantillon composé de deux interfaces (*i.e.* $N = 1$). On note e la distances séparant ces deux interfaces et on écrit donc que :

$$R(k_{x1}, k_{y1}, k_x, k_y, \omega) = \delta(k_x - k_{x1}) \delta(k_y - k_{y1}) (2\pi)^2 \times [r_1(k_{x1}, k_{y1}, \omega) + r_2(k_{x1}, k_{y1}, \omega) t_{im,1}(k_{x1}, k_{y1}, \omega) t_{1,im}(k_{x1}, k_{y1}, \omega) \Phi_e^2(k_{x1}, k_{y1}, \omega)] , \quad (5.17)$$

où r_i correspond au coefficient de réflexion en amplitude de la i^{me} interface alors que $t_{im,1}$ et $t_{1,im}$ sont les coefficients de transmission entre le milieu d'immersion et la première interface. On note également Φ_e le terme de modulation de phase propre à l'échantillon qui vérifie donc la relation suivante (d'après Eq. (5.14)) :

$$\Phi_e(k_x, k_y, \omega) = \exp \left[j e (k^2 n_{ech}^2 - k_x^2 - k_y^2)^{1/2} \right] , \quad (5.18)$$

où n est l'indice de l'échantillon et e son épaisseur.

Le caractère spéculaire de la réflexion est exprimé par la présence des fonctions de Dirac caractérisant la direction de propagation du signal en fonction du champ incident : pour chaque onde plane incidente sur un tel échantillon, les composantes transverses du vecteur d'onde ne sont pas modifiées ; seule la composante longitudinale k_z l'est.

En substituant l'expression de R dans l'équation (5.16) on obtient une expression de K , notée ici K_{ech} , telle que :

$$K_{ech}(x_0, y_0, x, y, \omega) \simeq \frac{\mu(x, y, \omega)}{\lambda f_0^2} \Phi_{ech}^2(-\rho_0/f'_0, \omega) A(\rho_0, \omega) \exp \left[-j \frac{k}{f_L} (x_0 x + y_0 y) \right] \times [r_1(-\rho_0/f'_0, \omega) + r_2(-\rho_0/f'_0, \omega) t_{im,1}(-\rho_0/f'_0, \omega) t_{1,im}(-\rho_0/f'_0, \omega) \Phi_e^2(-\rho_0/f'_0, \omega)] ,$$

avec $\Phi_{ech}(k_x, k_y, \omega) = \exp \left[j (z_{ech} - |f|) (k^2 n_{im}^2 - k_x^2 - k_y^2)^{1/2} \right]$

en posant $\rho_0 = (x_0, y_0)$

$$(5.19)$$

Le terme intégral disparaît du fait de l'intervention des fonctions de Dirac qui rend nul tous termes dont les coordonnées (x_3, y_3) sont différentes de (x_0, y_0)

Cas d'un échantillon diffusant. Pour un échantillon diffusant, les coordonnées transverses du vecteur d'onde ne sont plus conservées et le coefficient R s'écrit comme suit :

$$R(k_{x1}, k_{y1}, k_x, k_y, \omega) = t_{im,1}(k_x, k_y, \omega) \Phi_e(k_x, k_y, \omega) t_{1,im}(k_{x1}, k_{y1}, \omega) \Phi_e(k_{x1}, k_{y1}, \omega) \times \iint r_{ech}(x_s, y_s, \omega) \exp(j[x_s(k_x - k_{x1}) + y_s(k_y - k_{y1})]) dx_s dy_s \quad (5.20)$$

Afin d'alléger l'écriture on assimile dans un premier temps l'échantillon à un point unique, de coordonnées (x_p, y_p) diffusant la lumière, ce qui signifie que :

$$r_{ech}(x_s, y_s, \omega) = r_{ech}(\omega) \delta(x_p - x_s) \delta(y_p - y_s) \quad (5.21)$$

On déduit alors l'expression de K_{ech} relatif à cet échantillon diffusant :

$$\begin{aligned} K_{ech}(x_0, y_0, x, y, \omega) &= \frac{\mu(x, y, \omega)}{\lambda f_0^2} \Phi_{ech}(-k\rho_0/|f_0|, \omega) t_{im,1}(-k\rho_0/f'_0, \omega) \Phi_e(-k\rho_0/f'_0, \omega) \times \\ &\int \int A(x_3, y_3, \omega) \Phi_{ech}\left(\frac{kx_3}{f'_0}, \frac{ky_3}{f'_0}, \omega\right) \exp\left[-j\frac{k}{f'_L}(x_3x + y_3y)\right] \times \\ &t_{1,im}(kx_3/f'_0, ky_3/f'_0, \omega) \Phi_e(-kx_3/f'_0, -ky_3/f'_0, \omega) \times \\ &r_{ech}(x_p, y_p, \omega) \exp\left(j\frac{k}{f'_0}[x_p(x_3 - x_0) + y_p(y_3 - y_0)]\right) dx_3 dy_3, \end{aligned}$$

$$\text{avec } \Phi_{ech}(k_x, k_y, \omega) = \exp\left[j(z_{ech} - |f|)(k^2 n_{im}^2 - k_x^2 - k_y^2)^{1/2}\right] \quad (5.22)$$

Cas de la surface de référence. La surface de référence est un cas particulier d'un objet non diffusant à une seule interface. D'après le calcul déjà réalisé et l'équation (5.19), on en déduit une expression de K_{ref} suivante :

$$\begin{aligned} K_{ref}(\rho_0, x, y, \omega) &\simeq \mu(x, y, \omega) \Phi_{ref}^2(-k\rho_0/f'_0, \omega) r_{ref}(-k\rho_0/f'_0, \omega) \times \\ &A(-\rho_0, \omega) \exp[jk(x_0x + y_0y)/f'_L], \end{aligned} \quad (5.23)$$

$$\text{avec } \Phi_{ref}(k_x, k_y, \omega) = \exp\left[j(z_{ref} - |f|)(k^2 n_{im}^2 - k_x^2 - k_y^2)^{1/2}\right]$$

On précise que ce développement théorique est basé sur un modèle supposant un système isoplanétique, dont la réponse impulsionnelle est limitée par la diffraction et non les aberrations optiques. La restriction principale réside en fait dans l'utilisation de l'approximation scalaire qui ne permet pas d'étudier la propagation du champ pour des grandes ouvertures numériques effectives du système.

A partir de ces expressions de K_{ech} et K_{ref} , on est donc en mesure de déterminer l'amplitude complexe de l'onde issue du bras référence, notée U_{ref} , ainsi que celle issue d'un échantillon composé, ou non, d'une structure diffusante, notée U_{ech} , et donc de calculer la fonction de corrélation Γ correspondant au signal interférométrique utile (voir la sous-section 1.4.1 du premier chapitre). Deux configurations doivent alors être distinguées : le cas d'une illumination spatialement cohérente, et celui d'une illumination incohérente. Avant de développer les calculs conduisant à l'algorithme de focalisation numérique, intéressons nous à l'évolution de la fonction de transfert optique (FTO) en présence d'un défaut de mise au point.

5.3 Fonction de transfert optique et cohérence spatiale

Comme cela est expliqué en détail en *Annexe C*, avec un système d'illumination Köhler (voir Fig. 1.24), comme utilisé en OCT plein champ, il est possible de faire varier les propriétés de cohérence spatiale du champ incident en modifiant la taille du diaphragme d'ouverture.

Si le diaphragme d'ouverture est presque fermé, l'ouverture numérique d'illumination est faible et le champ peut être considéré comme quasiment cohérent spatialement. En revanche, si ce diaphragme est très ouvert, le champ d'illumination est composé d'une multitude d'ondes planes et il est donc incohérent spatialement, ou partiellement cohérent selon l'ouverture.

Selon le degré de cohérence du champ d'illumination, des différences importantes apparaissent dans la formulation de la FTO (voir l'*Annexe D*) pour une explication détaillée). Il est donc nécessaire de distinguer les deux configurations de cohérence spatiale (champ cohérent et incohérent) lors de l'étude de l'évolution de la FTO en présence d'un défaut de mise au point.

De manière générale la prise en compte d'aberrations présentes dans le système d'imagerie revient à multiplier la fonction pupillaire p par un terme de phase $e^{-ik\Delta W(x,y)}$ où W caractérise la déformation du front d'onde de l'aberration considérée et Δ correspond à l'amplitude crête à crête de cette déformation. Lorsque l'aberration est un défaut de mise au point, la fonction pupillaire p_{def} peut s'écrire de la façon suivante [Gha78] :

$$p_{def}(x, y) = p(x, y)e^{-ik2\Delta(x^2+y^2)} \quad , \quad (5.24)$$

Δ étant proportionnel à la distance de défocalisation

Pour une illumination cohérente spatialement, la FTO est proportionnelle à la fonction pupillaire, ici p_{def} , son module qu'est la FTM n'est donc pas perturbée et reste identique à celle présentée figure D.1b. En revanche, le cas d'un champ incohérent est plus complexe et des annulations de la FTM apparaissent pour certaines fréquences spatiales selon le défaut de mise au point. Ces annulations résultent en fait de la présence de valeurs négatives dans la FTO induisant par une variation de la phase de π et qui engendrent une inversion de contraste de la modulation d'une image comme illustrée en figure 5.4 :

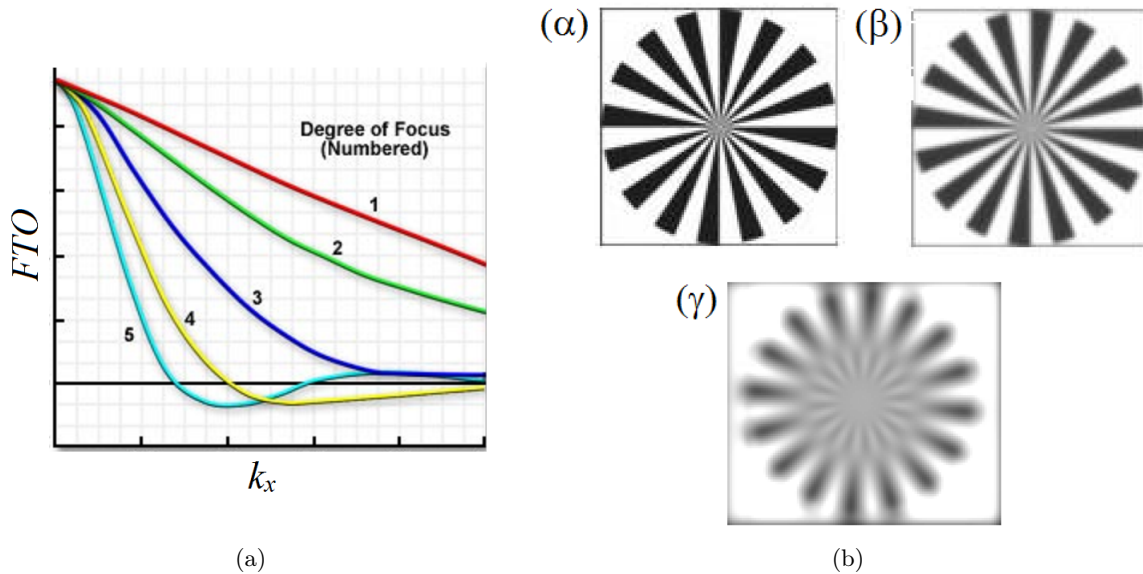


FIGURE 5.4 – (a) : évolution de la partie réelle de la fonction de transfert optique pour plusieurs défauts de mise au point (numérotés dans un ordre croissant de 1 à 5) dans le cas d'un champ d'illumination incohérent spatialement (issue de www.microscopyu.com). (b) : images, dans les mêmes conditions de cohérence, d'une mire radiale parfaite (α), limitée par diffraction (β), avec un défaut de mise au point équivalent au numéro 5 (γ) sur laquelle on peut voir une inversion de contraste (issue de www.telescope-optics.net).

5.4 Correction numérique de la fonction de corrélation Γ

Comme mentionné en introduction, la particularité du système implémenté ici est sa robustesse par rapport aux propriétés de cohérence spatiale. En effet, la méthode développée permet non seulement d'ajuster la mise au point numériquement après l'acquisition de l'image 3D lorsque l'onde incidente est plane et que le champ d'illumination est cohérent spatialement, mais également de lorsque le champ d'illumination est incohérent, ou partiellement cohérent, spatialement. Le cas traitant d'un champ cohérent spatialement est relativement répandu en holographie [Sch02] ou en OCT [Yu05, Mon06b, Mar07, Ral07]. Cependant, un degré de cohérence spatiale important induit un bruit dû aux interférences parasites qui dégrade les images. L'utilisation d'un champ d'illumination partiellement cohérent permet alors de s'affranchir de la présence de ce bruit et améliore la qualité des images.

Ces deux cas de cohérence limite induisant, comme on vient de le voir, des propriétés au signal assez différentes, il est nécessaire de les différencier afin de poursuivre l'étude et le calcul de l'intensité détectée en OCT.

On rappelle que (voir chapitre 1), pour une source de lumière monochromatique de pulsation

ω , l'intensité du signal détecté en OCT suit la relation suivante (voir Eq. (1.9) et (1.10)) :

$$\begin{aligned}
 I(x, y, \omega) &= \left\langle |U_{ref}(x, y, \omega) + U_{ech}(x, y, \omega)|^2 \right\rangle \\
 \Leftrightarrow I(x, y, \omega) &= I_{ref}(x, y, \omega) + I_{ech}(x, y, \omega) + 2\Re[\Gamma(x, y, \omega)], \\
 \text{avec } \begin{cases} 2\pi\delta(\omega - \omega') I_{ref}(x, y, \omega) &= \left\langle U_{ref}(x, y, \omega) U_{ref}^*(x, y, \omega') \right\rangle \\ 2\pi\delta(\omega - \omega') I_{ech}(x, y, \omega) &= \left\langle U_{ech}(x, y, \omega) U_{ech}^*(x, y, \omega') \right\rangle \\ 2\pi\delta(\omega - \omega') \Gamma(x, y, \omega) &= \left\langle U_{ech}(x, y, \omega) U_{ref}^*(x, y, \omega') \right\rangle \end{cases} \quad (5.25)
 \end{aligned}$$

On présente en figure 5.5 un schéma détaillé de l'interféromètre, adapté aux calculs théoriques du signal :

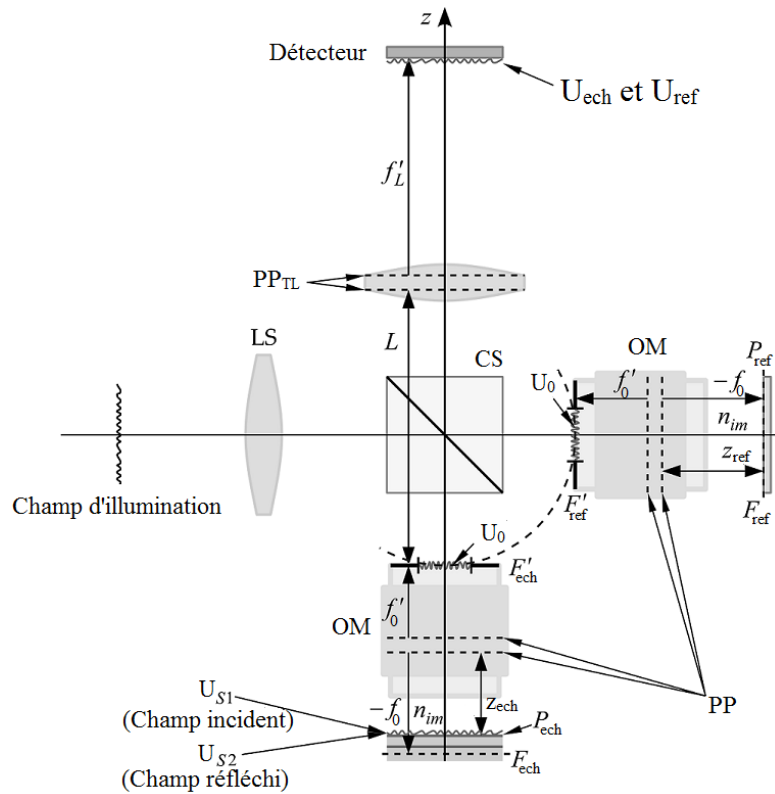


FIGURE 5.5 – Schéma d'un montage d'OCT plein champ correspondant aux notations utilisées. *LS* : lentilles, *CS* : cube séparateur, F'_{ref}, F'_{ech} : plans focaux avant des objectifs, F_{ref}, F_{ech} : plans focaux arrière des objectifs, *OM* : objectif de microscope, P_{ref}, P_{ech} : position de la surface de référence et de la surface de l'échantillon. *PP, PP_{TL}* : plans principaux des objectifs et de la lentille de tube, respectivement.

5.4.1 Prise en compte du degré de cohérence spatiale du champ

Champ cohérent spatialement

D'après la définition du degré de cohérence spatiale (voir Eq. (C.3) en annexe), il vaut dans ce cas 1 et, en considérant un champ incident d'amplitude U_0 , on peut écrire la relation suivante :

$$\langle U_0(x_0, y_0, \omega) U_0^*(x'_0, y'_0, \omega') \rangle = 2\pi\delta(\omega - \omega') J_0(x_0, y_0, \omega) J_0(x'_0, y'_0, \omega) \quad (5.26)$$

La fonction J_0 qui suit la relation $|J_0|^2 = I_0$ représente la distribution d'amplitude complexe de l'onde juste après le plan focal avant de l'objectif qui correspond au plan de l'ouverture du montage (voir Fig. 5.5). En utilisant les fonctions de transmissions K_{ref} et K_{ech} introduites auparavant, on écrit donc :

$$U_{ref,ech}(x, y, \omega) = \iint U_0(x_0, y_0, \omega) K_{ref,ech}(x_0, y_0, x, y, \omega) dx_0 dy_0 \quad (5.27)$$

Notre intérêt étant davantage porté sur l'étude d'un champ incohérent spatialement, on choisit de ne considérer ici que le cas le plus simple d'un échantillon non diffusant. On suppose que la surface de référence est dans le plan focal arrière de son objectif (*i.e.* $z_{ref} = f'_0$), et on calcule donc la fonction de corrélation Γ d'après les équations (5.19) et (5.23) qui déterminent les expressions de K_{ech} et K_{ref} :

$$\begin{aligned} \langle U_{ech}(x, y, \omega) U_{ref}^*(x', y', \omega') \rangle &= \iiint \langle U_0(x_0, y_0, \omega) U_0^*(x'_0, y'_0, \omega') \rangle \times \\ &\quad K_{ech}(x_0, y_0, x, y, \omega) K_{ref}^*(x'_0, y'_0, x', y', \omega') dx_0 dy_0 dx'_0 dy'_0 \\ \Rightarrow \Gamma(x, y, \omega) &= |\mu(\omega)|^2 r_{ref}^*(\omega) \exp[2jk(n_{im}[z_{ech} - f'_0])] [r_1(\omega) + r_2(\omega)t_{im,1}(\omega)t_{1,im}(\omega) \exp(ne)] \\ &\times \iint J_0(x_0, y_0, \omega) \exp\left[-jk\frac{x_0^2 + y_0^2}{f_0^2} \left(\frac{z_{ech} - |f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n}\right)\right] A(-x_0, -y_0, \omega) \exp\left[j\frac{k}{f'_L}(x_0x + y_0y)\right] \\ &\quad \times dx_0 dy_0 \\ &\times \iint J_0^*(x'_0, y'_0, \omega) A^*(-x'_0, -y'_0, \omega) \exp[-jk(x'_0x + y'_0y)/f'_L] dx'_0 dy'_0 \end{aligned} \quad (5.28)$$

Cette équation permet de mettre en évidence analytiquement des phénomènes intéressants. On note ainsi que la valeur de Γ dépend des coordonnées spatiales (x, y) bien que l'échantillon ne possède pas de structures transverses.

Si on suppose que J_0 est l'amplitude d'une onde plane, c'est-à-dire que l'onde incidente est focalisée au niveau du plan focal arrière de l'objectif et donc de l'objet, la valeur de Γ (tout comme celle de I_{ech} et I_{ref} si on développe les expressions [Gre12a]) décroît lorsqu'on s'éloigne de l'axe optique du fait de la présence de la modulation de phase. Cela correspond donc au sectionnement transverse caractéristique des systèmes à balayage, comme la microscopie confocale par exemple. Le cas d'une illumination en onde plane au niveau des objets (*i.e.* $J_0(x_0, y_0, \omega) = J_0(\omega)\delta(x_0)\delta(y_0)$) associée à un échantillon diffusant est traité dans [Gre12b] et ne sera pas détaillé ici.

Ensuite, on voit apparaître deux types de modulation de phase : un premier qui est indépendant des coordonnées spatiales transverses, $\exp[2jk(n_{im}[z_{ech} - f'_0])]$, et un second qui, lui, en dépend : $\exp\left[-jk\frac{x_0^2+y_0^2}{f_0'^2}\left(\frac{z_{ech}-|f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n}\right)\right]$. Tous deux induisent donc un sectionnement du signal, et correspondent respectivement à la fenêtre de cohérence (en intégrant ce terme sur la bande spectrale considérée $\Delta\omega$ dans le cas d'un spectre étendu) et à la fenêtre de focalisation (en intégrant ce terme sur la répartition angulaire bornée par l'ouverture numérique). Il est alors commun de désigner également ces fenêtrages comme des sectionnements temporels ou angulaires.

Champ incohérent spatialement

Dans le cas d'un champ incohérent spatialement, les champs émis par deux points distincts sont totalement décorrélés. Ainsi comme cela est démontré est *Annexe C* qui traite du degré de cohérence spatiale, on peut écrire que :

$$\langle U_0(x_0, y_0, \omega) U_0^*(x'_0, y'_0, \omega') \rangle = 2\pi\delta(\omega - \omega') I_0(x_0, y_0, \omega) \delta(x_0 - x'_0) \delta(y_0 - y'_0) \quad (5.29)$$

Echantillon non diffusant. On considère dans un premier temps un échantillon non diffusant. Le calcul est alors très similaire au cas cohérent, qui permet de calculer la fonction de corrélation Γ à partir notamment de la relation (5.27) :

$$\begin{aligned} \langle U_{ech}(x, y, \omega) U_{ref}^*(x, y, \omega') \rangle &= \iiint \langle U_0(x_0, y_0, \omega) U_0^*(x'_0, y'_0, \omega') \rangle \times \\ &\quad K_{ech}(x_0, y_0, x, y, \omega) K_{ref}(x'_0, y'_0, x, y, \omega) dx_0 dy_0 dx'_0 dy'_0 \\ \Rightarrow \Gamma(x, y, \omega) &= |\mu(\omega)|^2 r_{ref}^*(\omega) \exp[2jk(n_{im}[z_{ech} - f'_0])] [r_1(\omega) + r_2(\omega)t_{im,1}(\omega)t_{1,im}(\omega) \exp(ne)] \\ &\times \iint I_0(x_0, y_0, \omega_0) \exp\left[-jk\frac{x_0^2+y_0^2}{f_0'^2}\left(\frac{z_{ech}-|f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n}\right)\right] |A(-x_0, -y_0, \omega)|^2 dx_0 dy_0 \end{aligned} \quad (5.30)$$

Une première remarque, ici, est la perte de dépendance en fonction des coordonnées spatiales (x, y) , par rapport au cas cohérent. Cela est consistant avec un dispositif d'illumination plein champ tel que le système de Köhler utilisé en OCT plein champ. L'intensité du signal réfléchi (voir Eq. (5.31)) par une surface plane, sans structures diffusantes, que sont ici la surface de référence et l'échantillon, est d'ailleurs indépendante de (x, y, z) . Cela signifie que ce signal de fréquence spatiale nulle n'est sectionné ni transversalement ni longitudinalement.

$$I_{ref} = |\mu(\omega)|^2 |r_{ref}^*(\omega)|^2 \iint I_0(x_0, y_0, \omega_0) |A(-x_0, -y_0, \omega)|^2 dx_0 dy_0 \quad (5.31)$$

En ce qui concerne la fonction de corrélation Γ , elle possède, comme dans le cas précédent, des termes de modulation propre au sectionnement temporel (fenêtre de cohérence ($\Delta\omega$)) et sectionnement angulaire (fenêtre de focalisation (ON)).

Echantillon diffusant. On considère au préalable un échantillon composé d'un seul diffuseur positionné en (x_p, y_p) (voir Eq. (5.21)). En utilisant l'expression de ladite fonction de transmission K_{ech} explicitée dans l'équation (5.22), sachant que l'expression du champ issu de la référence

n'est pas modifié, on en déduit une expression de Γ suivante :

$$\begin{aligned}
 \Gamma(x, y, \omega) &= \frac{|\mu(\omega)|^2}{(\lambda f'_0)^4} R(\omega) r_{ref}^*(\omega) \exp [2jk (n_{im} [z_{ech} - f'_0] + ne)] \\
 &\times \iint I_0(x_0, y_0, \omega_0) A^*(-x_0, -y_0, \omega) \exp \left[-jk \frac{x_0^2 + y_0^2}{f_0'^2} \left(\frac{z_{ech} - |f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n} \right) \right] \\
 &\quad \times \exp \left(-jk \left[x_0 (x/f'_L + x_p/f'_0) + y_0 (y/f'_L + y_p/f'_0) \right] / f'_L \right) dx_0 dy_0 \\
 &\times \iint A(x_3, y_3, \omega) \exp \left[-jk \frac{x_3^2 + y_3^2}{f_0'^2} \left(\frac{z_{ech} - |f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n} \right) \right] \\
 &\quad \times \exp \left(-jk \left[x_3 (x/f'_L + x_p/f'_0) + y_3 (y/f'_L + y_p/f'_0) \right] / f'_L \right) dx_3 dy_3
 \end{aligned} \tag{5.32}$$

Ou bien encore sous une forme réduite :

$$\begin{aligned}
 \Gamma(x, y, \omega) &= \frac{|\mu(\omega)|^2}{(\lambda f'_0)^4} R(\omega) r_{ref}^*(\omega) \exp [2jk (n_{im} [z_{ech} - f'_0] + ne)] \\
 &\times \iint I_0(x_0, y_0, \omega_0) A^*(-x_0, -y_0, \omega) \Phi_\Gamma(x_0, y_0) F_\Gamma(x_0, y_0, x_p, y_p) dx_0 dy_0 \\
 &\times \iint A(x_3, y_3, \omega) \Phi_\Gamma(x_3, y_3) F_\Gamma(x_3, y_3, x_p, y_p) dx_3 dy_3,
 \end{aligned} \tag{5.33}$$

$$\text{avec } \Phi_\Gamma(u, v) = \exp \left[-jk \frac{u^2 + v^2}{f_0'^2} \left(\frac{z_{ech} - |f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n} \right) \right]$$

$$\text{et } F_\Gamma(u, v, x_p, y_p) = \exp \left(-j \frac{k}{f'_L} \left[u (x/f'_L + x_p/f'_0) + v (y/f'_L + y_p/f'_0) \right] \right)$$

Enfin, en considérant un échantillon diffusant étendu spatialement, on somme les contributions de chaque point diffusant et on obtient l'expression :

$$\begin{aligned}
 \Gamma(x, y, \omega) &= \frac{|\mu(\omega)|^2}{(\lambda f'_0)^4} R(\omega) r_{ref}^*(\omega) \exp [2jk (n_{im} [z_{ech} - f'_0] + ne)] \iint dx_p dy_p r_{ech}(x_p, y_p, \omega) \\
 &\times \iint I_0(x_0, y_0, \omega_0) A^*(-x_0, -y_0, \omega) \Phi_\Gamma(x_0, y_0) F_\Gamma(x_0, y_0) dx_0 dy_0 \\
 &\times \iint A(x_3, y_3, \omega) \Phi_\Gamma(x_3, y_3) F_\Gamma(x_3, y_3) dx_3 dy_3,
 \end{aligned}$$

$$\text{avec } \Phi_\Gamma(u, v) = \exp \left[-jk \frac{u^2 + v^2}{f_0'^2} \left(\frac{z_{ech} - |f_0|}{n_{im}} + \frac{e}{n} \right) \right]$$

$$\text{et } F_\Gamma(u, v, x_p, y_p) = \exp \left(-j \frac{k}{f'_L} \left[u (x/f'_L + x_p/f'_0) + v (y/f'_L + y_p/f'_0) \right] \right)$$

(5.34)

L'expression, dans le cas d'un échantillon diffusant, comporte donc deux intégrales distinctes dont l'une est propre au champ d'illumination et l'autre au champ imagé dans le plan de l'ouverture. Contrairement au cas d'un l'échantillon non diffusant (voir Eq. (5.30)), ces deux intégrales

ne fusionnent pas et il est nécessaire de séparer les effets de l'ouverture numérique d'illumination (notée ON_{ill}) et l'ouverture numérique de collection (notée ON_{coll}).

En effet, dans le cas d'un échantillon réfléchissant la lumière spéculairement, ON_{ill} détermine en fait également la répartition angulaire lors de la collection, puisque la projection transverse du vecteur d'onde (k_x, k_y) de chaque onde plane n'est pas modifiée (voir Eq. (5.17)).

En revanche, lorsque l'échantillon diffuse dans toutes les directions le champ incident l'illuminant, l'étendue de l'ouverture est remplie sans tenir compte de ON_{ill} . Ainsi, ON_{coll} est en général maximale quelle que soit la valeur de ON_{ill} . Cela se traduit par la présence d'un sectionnement longitudinal étroit bien que l'ouverture numérique d'illumination soit faible ce qui n'est pas le cas lorsque l'échantillon ne possède pas de structure diffusante comme le montrent les différents graphes présentés en figure 5.6.

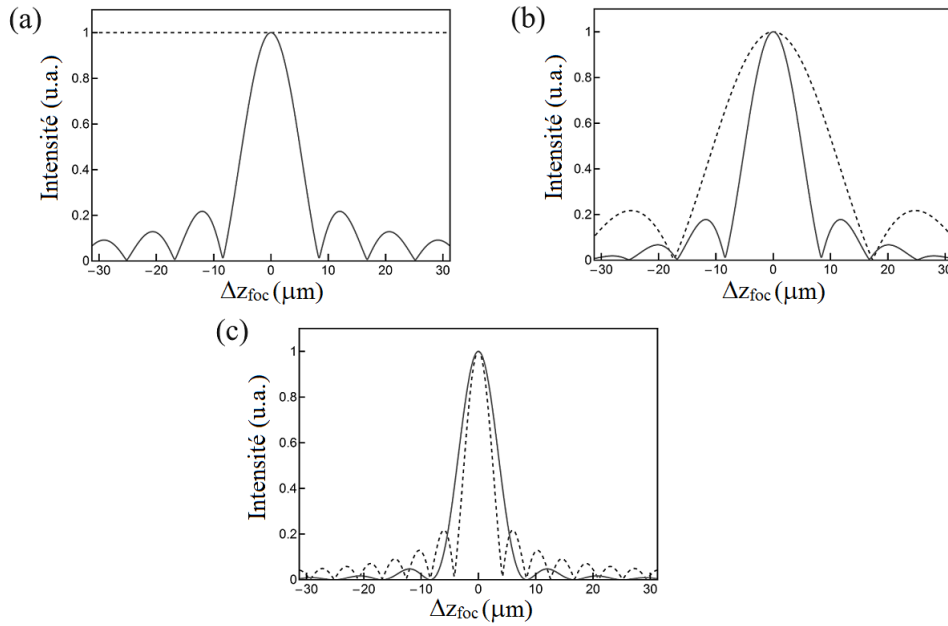


FIGURE 5.6 – Evolution de la réponse impulsionnelle du système Γ_{RI} , normalisée, en fonction du défaut de mise au point Δz_{foc} dans le cas d'un échantillon diffusant (courbe pleine) ou réfléchissant la lumière spéculairement (courbe en pointillés) et pour trois différentes valeurs de l'ouverture numérique d'illumination : $ON_{ill} = 0,005$ (a), $ON_{ill} = 0,2$ (b), $ON_{ill} = 0,4$ (c). Dans tous les cas, $ON_{coll} = 0,4$.

L'influence de ON_{ill} semble donc considérablement réduite lorsqu'on image un objet diffusant, puisque le sectionnement est essentiellement dû aux propriétés de collection. Cependant, bien qu'une ON_{ill} faible ne modifie pas fortement la largeur à mi-hauteur du signal, elle permet de conserver néanmoins l'information relatif au signal dans les zones de l'espace défocalisées. On illustre cela en représentant, en figure 5.7, l'allure de la fonction de corrélation Γ lorsque l'échantillon est assimilé à un objet ponctuel diffusant et pour une source de lumière monochromatique. De fait, cette fonction correspond à la réponse impulsionnelle et on la note Γ_{RI} .

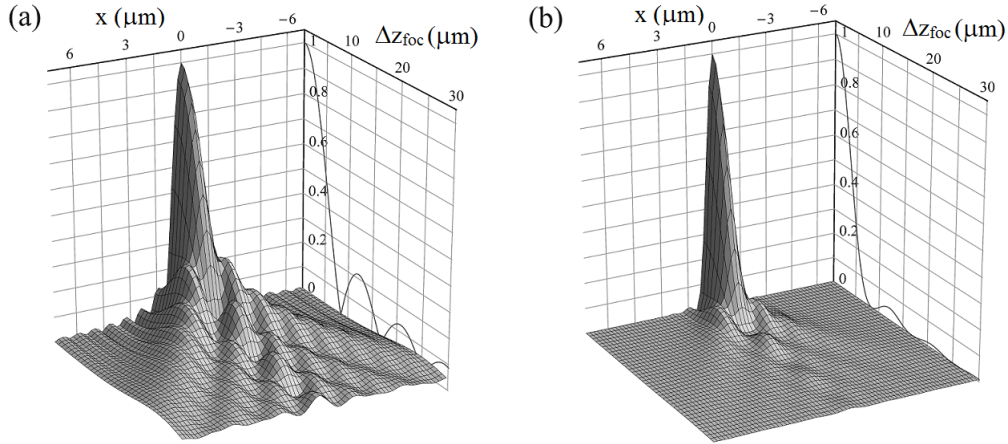


FIGURE 5.7 – Représentations en trois dimensions et normalisées $|\Gamma_{RI}(x, 0, \omega)|$, correspondant à la réponse impulsionnelle du signal OCT, dans deux configurations d’illumination différentes ; (a) : $ON_{ill} = 0,005$ et (b) : $ON_{ill} = 0,4$. Les courbes en deux dimensions projetées correspondent à l’évolution $|\Gamma_{RI}(0, 0, \omega)|$ en fonction de Δz_{foc} . Dans les deux cas, l’ouverture numérique de collection, ON_{coll} , vaut $0,4$ et on considère un champ incident monochromatique de fréquence $\omega/2\pi = 2,69.10^{15} Hz$. On observe la différence de répartition d’énergie selon l’ouverture numérique d’illumination considérée.

On observe donc que dans le cas d’une ON_{ill} restreinte (fig. 5.7a), le signal, même s’il est flouté, est réparti transversalement et longitudinalement et non sectionné strictement comme c’est le cas lorsqu’elle ON_{ill} est élevée ce qui engendre donc une perte d’information. Lors du processus de focalisation numérique, cette perte d’information entraîne, comme on le constatera, une baisse de l’amplitude du signal, pour un rapport signal sur bruit (RSB) constant, et il est donc plus favorable de travailler avec une ouverture numérique d’illumination réduite, de ce point de vue là.

5.4.2 Algorithme de focalisation numérique

Fort de cette analyse du signal OCT et de la description de la fonction de corrélation Γ , dont on a calculé une expression analytique précise dans le cadre du modèle théorique choisi et des approximations établies, il est alors possible de mettre au point un algorithme de focalisation numérique des images. Celui-ci, appliqué ultérieurement à l’acquisition de l’image 3D, est destiné à un système d’OCT plein champ à balayage spectral et s’adapte à n’importe quel degré de cohérence spatiale du champ d’illumination, ce qui le différencie des processus de focalisation présents dans la littérature qui ne sont efficaces que pour un champ cohérent spatialement [Yu05, Mon06b, Mar07, Ral07].

Comme cela est notable avec l’équation (5.34), établissant l’expression de la fonction de corrélation Γ pour une onde monochromatique et un échantillon diffusant composé de deux interfaces, cette dernière est le résultat d’un produit de convolution entre la fonction r_{ech} caractéristique de la réflectivité de l’échantillon qui nous intéresse et une fonction, dont la transformée de Fourier est notée Ξ , qui est donc équivalente à une réponse impulsionnelle par définition. En travaillant dans l’espace de Fourier, *i.e.* l’espace des fréquences spatiales, la fonction Γ s’exprimant selon la

relation (5.34), il est alors possible de restaurer la fonction r_{ech} .

$$\tilde{\Gamma}(k_x, k_y, \omega) \simeq \mu_0 M^2 T(\omega) \times \tilde{r}_{ech}(-Mk_x, -Mk_y, \omega) \Xi(k_x, k_y, \omega) \quad , \quad (5.35)$$

où $\mu_0 = \frac{|\mu(\omega)|^2}{(\lambda f'_0)^4}$ et $M = \frac{f'_L}{f'_0}$ est la valeur absolue du grandissement transverse du système d'imagerie.

L'algorithme de focalisation présenté suit alors les étapes suivantes, qui seront décrites plus précisément dans la prochaine section (voir notamment Fig. 5.15) :

- Evaluation des propriétés du champ d'illumination (fonction pupillaire, ON_{ill} afin de déterminer convenablement Ξ .
- Mesure du signal interférométrique puis extraction du signal OCT et donc de la fonction de corrélation $\Gamma(x, y, \omega)$.
- Calcul du spectre spatial de la fonction de corrélation $\Gamma(k_x, k_y, \omega)$ par transformée de Fourier (TF)
- Ajustement dans le domaine des fréquences spatiales de $\Gamma(k_x, k_y, \omega)$ en appliquant numériquement une fonction correctrice appropriée afin de restituer le signal r_{ech} .

L'expression de Ξ se déduit donc de l'équation (5.34) d'après la théorie de la transformée de Fourier. On précise par ailleurs, qu'afin d'exprimer Ξ précisément, il est nécessaire de prendre en compte la différence de marche entre le bras de référence et le bras échantillon de l'interféromètre qui permettra de séparer le signal de SS-OCT du terme continu après transformée de Fourier (nous reviendrons plus en détail sur cela par la suite). En notant cette différence de distance ΔL et en supposant qu'elle est faible devant la profondeur de champ des objectifs, où bien qu'on corrige son effet numériquement [Gre14], on peut se contenter d'ajouter un coefficient multiplicatif $\exp(2jkL)$ dans l'expression de Ξ . La fonction Ξ peut alors s'écrire de la manière suivante [Gre14] :

$$\begin{aligned} \Xi(k_x, k_y, \omega) = & \exp(2jkL) \iint dx_p dy_p \exp[-jM(k_x x_p + k_y y_p)] \times \\ & \iint A(x_3, y_3, \omega) F_{\Xi}(x_3, y_3) \exp\left[-j\frac{k}{f'_0}(x_3 x_p + y_3 y_p)\right] dx_3 dy_3 \times \\ & \iint A_{ill}(x_0, y_0, \omega) F_{\Xi}(x_0, y_0) \exp\left[-j\frac{k}{f'_0}(x_0 x_p + y_0 y_p)\right] dx_0 dy_0, \end{aligned} \quad (5.36)$$

avec $F_{\Xi}(u, v) = \exp\left(jk \left[(z_{ech} - |f_0|) \sqrt{n_{im}^2 - \frac{u^2 + v^2}{f_0'^2}} + e \sqrt{n_{ech}^2 - \frac{u^2 + v^2}{f_0'^2}} \right] \right)$

et $A_{ill}(x_0, y_0, \omega) = I_0(x_0, y_0, \omega) A^*(-x_0, -y_0, \omega) r_{ref}^*(-kx_0/f'_0, -ky_0/f'_0, \omega)$

Une nouvelle fois, il existe deux intégrales disjointes dont l'une est liée aux propriétés d'imagerie et l'autre à celle de l'illumination et est caractérisée par la présence de A_{ill} . Il est également

possible d'exprimer Ξ selon deux fonctions, Ξ_t et Ξ_a , qui correspondent chacune à un type de sectionnement :

$$\begin{aligned} \Xi(k_x, k_y, \omega) &= \Xi_t(\omega)\Xi_a(k_x, k_y, \omega), \\ \text{avec } \Xi_t(\omega) &= \exp[2jk(\Delta L + n_{im}(z_{ech} - |f_0|) + n_{ech}e)] \end{aligned} \quad (5.37)$$

Alors que Ξ_t ne dépend que de ω et est donc associée au sectionnement temporel (fenêtre de cohérence), Ξ_a , dont l'expression n'est pas nécessaire d'être explicitée puisqu'elle est simplement égale à $\Xi(k_x, k_y, \omega)\Xi_t^*(\omega)$, est fonction des fréquences spatiales transverses et caractérisent donc le sectionnement angulaire (fenêtre de focalisation). Dans le cadre de l'OCT conventionnel utilisant une ouverture numérique faible, le signal est alors essentiellement caractérisé par X_t .

Une méthode naïve de correction de la mise au point serait donc de diviser pour chaque pulsation ω le signal mesuré $\Gamma(k_x, k_y, \omega)$ par la fonction $\Xi(k_x, k_y)$ appropriée. Mais une telle division directe nuirait au RSB du signal. Afin de conserver la valeur de RSB, il est préférable de multiplier Γ par une fonction de phase Ψ , de module unitaire, défini comme suit :

$$\Psi(k_x, k_y, \omega) = \begin{cases} \Xi^*(k_x, k_y, \omega) / |\Xi(k_x, k_y, \omega)| & \text{si } |\Xi(k_x, k_y, \omega)| > 0 \\ 0 & \text{si } |\Xi(k_x, k_y, \omega)| = 0 \end{cases} \quad (5.38)$$

L'ajustement numérique de la focalisation repose principalement sur la détermination de Ξ_a qui correspond à l'effet de flou observé du fait de la profondeur de champ limitée de l'objectif et on entreprend donc de détailler plus précisément son évolution. On présente alors les variations de l'amplitude et de la phase de Ξ_a calculées pour deux valeurs différentes de ON_{ill} , et dans la configuration d'une onde lumineuse monochromatique :

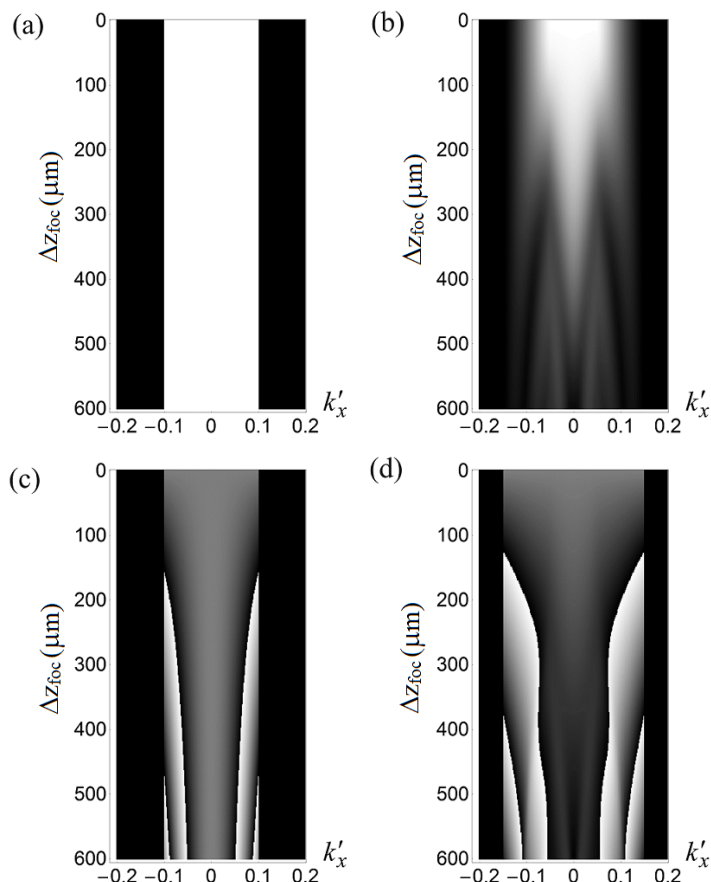


FIGURE 5.8 – Evolution de la valeur absolue ((a) et (b)) et de la phase ((c) et (d)) de la fonction $\Xi_a(k_x, k_y, \omega)$, qui caractérise l'effet de défocalisation, en fonction du défaut de mise au point Δz_{foc} , et cela dans deux configurations d'illumination différentes : $ON_{ill} \rightarrow 0$ pour (a) et (b) et $ON_{ill} = 0,05$ pour (c) et (d). Dans tous les cas, $ON_{coll} = 0,1$ et on considère un champ monochromatique de fréquence $\omega/2\pi = 1,2.10^{15} Hz$ (i.e. $\lambda = 1,57 \mu m$). On utilise la variable réduite $k'_x = k_x/M$, où M est le grandissement du système d'imagerie.

La différence notable de la phase selon l' ON_{ill} (Fig. 5.8c et 5.8d) justifie l'emploi d'une fonction de correction adaptée lorsque le champ d'illumination est faiblement cohérent.

Plusieurs caractéristiques du signal sont par ailleurs mises en évidence par ces différents graphes et corroborent l'étude menée dans la section précédente sur le phénomène de cohérence spatiale du champ. En effet, alors que le cas d'une ouverture numérique faible (Fig. 5.8a et 5.8c) on se rapproche de la configuration d'un montage d'OCT à balayage ou d'holographie pour lesquels le champ est cohérent spatialement (i.e. $A_{ill} = A_{ill}(\omega)\delta(x_0)\delta(y_0)$), en supposant $ON_{ill} = 0,05$ dans le second cas (Fig. 5.8b et 5.8d) la situation est celle d'un champ partiellement cohérent spatialement dont le comportement est similaire à celui d'un champ incohérent.

En s'intéressant aux signaux d'amplitude, on constate ainsi que lorsque l'échantillon est focalisé (i.e. $\Delta z_{foc} = 0$), la distribution de Ξ_a en fonction de la fréquence spatiale est équivalente à

celle de la fonction de transfert de modulation d'un système de microscopie présentée en figure D.1b dans les deux configurations de cohérence spatiale. De plus, comme étudié précédemment et illustré en figure 5.4, dans le cas d'un champ partiellement cohérent ou incohérent, des annulations dans la fonction de modulation (ou ici Ξ_a) apparaissent (pour $\Delta z_{foc} \sim 400\mu\text{m}$ par exemple). Les termes de phases, quant à eux, caractérisent la déformation du front d'onde en présence d'un défaut de mise au point.

Il est également pertinent de remarquer que dans le cas d'un champ quasiment cohérent spatialement, c'est-à-dire ici lorsque le diaphragme d'ouverture est très fermé, l'amplitude de Ξ_a est maintenue élevée et proche de son maximum quelle que soit la valeur de la défocalisation Δz_{foc} , (Fig. 5.8a). Cette propriété assure une efficacité de focalisation sur une distance très étendue et quasiment infinie (elle est en théorie infinie si la fonction pupillaire est une fonction de Dirac parfaite) puisque l'amplitude du signal des zones défocalisées peut être convenablement reconstruite. On en déduira donc que plus l'ouverture numérique d'illumination est faible, plus la focalisation numérique est efficace, en termes de rapport signal sur bruit, sur une distance importante, ainsi qu'on l'avait suggéré en étudiant les graphes de la figure 5.7. La figure 5.9 illustre cela en présentant l'allure de la fonction de corrélation Γ_{RI} selon la valeur du défaut de mise au point Δz_{foc} sans (Fig. 5.9a et 5.9b) ou avec (Fig. 5.9c et 5.9d) l'application du traitement numérique de focalisation.

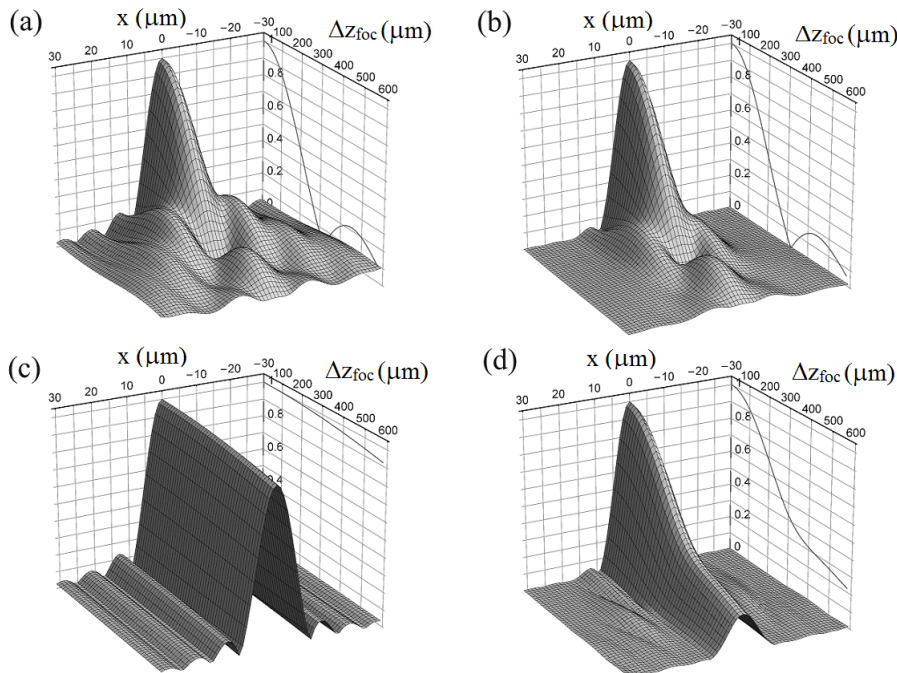


FIGURE 5.9 – Evolution de $|\Gamma_{RI}(x, 0, \omega)|$ en fonction de la valeur du défaut de mise au point Δz_{foc} , sans ((a) et (b)) et avec refocalisation numérique ((c) et (d)) et cela pour deux valeurs de ON_{ill} différentes; (a) et (c) : $ON_{ill} = 0,005$; (b) et (d) : $ON_{ill} = 0,05$. Les courbes en deux dimensions projetées correspondent à l'évolution $|\Gamma_{RI}(0, 0, \omega)|$ en fonction de Δz_{foc} . Dans tous les cas, l'ouverture numérique de collection, ON_{coll} , vaut 0,1 et on considère une source de lumière monochromatique de fréquence $\omega/2\pi = 1,2 \cdot 10^{15} \text{ Hz}$ (i.e. $\lambda = 1,57 \mu\text{m}$).

Même si la correction de la largeur à mi-hauteur du signal est restituée quelle que soit l' ON_{ill} (voir aussi Fig. 5.18c), l'amplitude du signal décroît davantage lorsque l' ON_{ill} est importante ce qui limite donc la possibilité de focaliser efficacement sur des distances très étendues. Cependant, la suppression du bruit dû à la cohérence spatiale élevée du champ conforte l'utilisation d'une ouverture numérique d'illumination relativement grande bien que cela restreigne la distance de focalisation.

L'étude théorique menée jusqu'ici a donc abouti à la détermination précise, dans le cadre du modèle considéré, de la réponse impulsionnelle du signal OCT, qui correspond à la fonction de corrélation Γ_{RI} , afin d'implémenter un algorithme de focalisation numérique adapté à un champ d'illumination partiellement cohérent spatialement. On cherche donc désormais à démontrer expérimentalement l'efficacité de ce processus correctif numérique.

5.5 Démonstration expérimentale

Afin de vérifier l'applicabilité de cette méthode de focalisation numérique, nous avons développé un montage d'OCT plein champ à balayage spectral (ou SS-OCT plein champ) capable de réaliser des images tomographiques d'échantillons en trois dimensions. Le principe est donc équivalent à celui du SS-OCT à balayage présenté dans la sous-section 1.4.2 du premier chapitre, la distinction résidant dans l'utilisation d'une illumination plein champ partiellement cohérente spatialement afin de s'affranchir de certains bruits dus à un degré de cohérence spatiale élevé de la source de lumière.

Nous n'avons connaissance que d'un seul montage expérimental comme celui-ci, développé et présent dans la littérature [Pov06]; mais ce dernier n'implémente pas de technique de focalisation et subit donc le compromis entre profondeur de pénétration et résolution latérale comme en OCT à balayage conventionnel (voir la sous-section 1.4.1). Grâce à l'algorithme de focalisation développé précédemment, nous sommes donc en mesure de présenter un système d'imagerie original permettant l'acquisition d'une image 3D sans nécessiter de balayage mécanique (dans l'interféromètre) et capable d'outrepasser le compromis entre résolution latérale et profondeur de champ.

5.5.1 Montage de l'expérience

A l'instar d'un système SS-OCT conventionnel, on utilise comme source de lumière un laser à balayage spectral (Modèle AQ4320d fourni par *Ando Electric CO.*) qui permet, grâce à la rotation d'un réseau de diffraction disposé au sein de la cavité laser, d'accorder la longueur d'onde d'émission et d'émettre une série d'ondes quasiment monochromatiques de largeur spectral $\delta\lambda$ (ou δk) sur un intervalle total valant $\Delta\lambda = 100nm$, et qui s'étend de $\lambda_{min} = 1520nm$ à $\lambda_{max} = 1620nm$. La lumière émise par le laser est directement couplée à une fibre monomode puis collimatée par une lentille adaptée.

Comme mentionné précédemment, la différence majeure du montage développé ici avec un système SS-OCT à balayage est l'emploi d'une source faiblement cohérente spatialement afin d'éclairer l'échantillon avec un champ large sans affecter la qualité des images *en-face* acquises. En effet, lorsqu'un champ cohérent spatialement est employé, comme c'est le cas d'une source laser, et associé à un système d'illumination plein-champ et une détection parallèle en deux

dimensions, il apparaît un bruit de diaphonie (aussi appelé *crosstalk* en anglais) entre les pixels de la caméra, dû notamment à la présence de réflexions multiples au sein d'un échantillon diffusant (voir encadré ci-dessous). Des interférences constructives entre différents éléments ponctuels (poussières ou autres) interceptant la trajectoire du faisceau lumineux peuvent également affecter la qualité du champ d'illumination et donc celle de l'image détectée.

Phénomène de diaphonie sous illumination plein champ cohérente spatialement

Les systèmes OCT, en tant que dispositifs interférométriques, sont sensibles aux photons cohérents rétrodiffusés par l'échantillon et sont donc capables de discriminer ces photons particuliers avec ceux du fond non cohérent. Comme on l'a vu dans le premier chapitre, le signal utile en OCT repose essentiellement sur la détection des photons balistiques diffusés une seule fois (si on travaille en réflexion).

Les photons multidiffusés (voir Fig. 1.6), quant à eux, peuvent générer un signal parasite lorsque leur chemin optique est identique à celle de la lumière dans le bras référence et sont donc contenus dans la zone de cohérence. En OCT plein champ conventionnel, cette zone de cohérence est définie principalement par la longueur de cohérence temporelle. Mais lorsque le champ d'illumination est cohérent spatialement, les interférences entre deux photons issus de deux points différents de l'échantillon induisent également un signal parasite et sont donc aussi à prendre en compte.

On présente en figure 5.10 un schéma explicatif illustrant la situation d'un photon multidiffusé vers l'avant après une première rétrodiffusion en P_B , et dont le chemin optique ainsi que sa direction de propagation sont identiques au photon balistique rétrodiffusé par le diffuseur situé en P_A . De fait, ces deux photons sont détectés par le même pixel et le signal d'interférences mutuelles résultant dépend du rapport entre leur distance de séparation et la longueur de cohérence spatiale de la source.

En effet, de façon similaire à l'expérience des fentes d'Young (voir la sous-section C.3), ils correspondent à deux sources secondaires dont le contraste du signal d'interférence dépend de la longueur de cohérence spatiale. Par conséquent, lorsque le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination est important, ce contraste est élevé et ce signal parasite est conséquent.

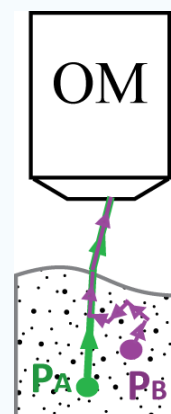


FIGURE 5.10 – Illustration du phénomène de diaphonie (ou *crosstalk*) entre un photon balistique rétrodiffusé par P_A et un photon multidiffusé issu de P_B , au sein d'un échantillon diffusant.

D'autre part, plus la longueur de cohérence spatiale est grande, plus le nombre de photons multidiffusés susceptibles de générer un signal d'interférence contrasté avec le photon balistique en question est importante puisque la zone de cohérence est élargie. Cela est à prendre en compte particulièrement lorsque l'illumination est de type plein champ, puisqu'une zone étendue est alors soumise à un flux de photons.

En OCT à balayage, cette zone étant très restreinte en OCT à balayage et ne correspondant qu'au diamètre du faisceau laser focalisé dans l'échantillon, ce phénomène de bruit de diaphonie est rendu négligeable et n'affecte pas les images.

Ce bruit de diaphonie, spécifique au montage employant une illumination plein champ, ou les autres types de bruit cohérent, dégradent considérablement les images acquises [Kar04], comme on peut le voir en figure 5.11. On cherche donc à les éliminer en réduisant le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination.

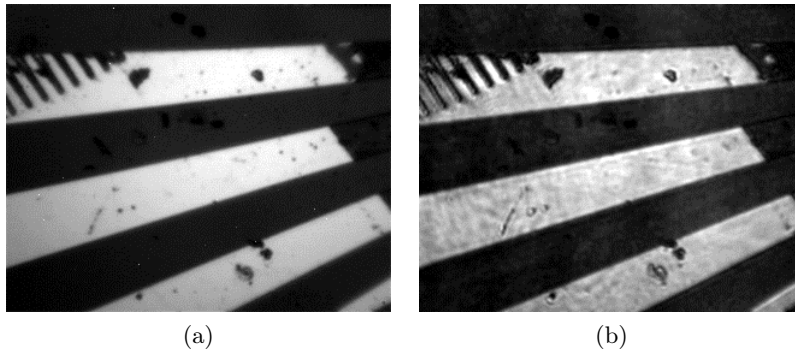


FIGURE 5.11 – Images de microscopie, d'un échantillon structuré, acquise avec un champ d'illumination partiellement cohérent (a) et quasiment cohérent (b) spatialement. Le bruit présent en (b) dégrade la qualité de l'image et empêche la distinction de certaines structures.

Afin de briser la cohérence spatiale de la source, on choisit d'insérer un diffuseur tournant dans le système d'illumination. Lorsqu'il est immobile, ce dernier diffuse fortement la lumière et engendre la présence d'une figure de tavelures (ou *speckle* en anglais). En lui appliquant un mouvement rotatif suffisamment rapide par rapport au temps d'exposition du détecteur, la figure de tavelures est moyennée et on obtient alors un champ d'illumination homogène et donc partiellement cohérent spatialement.

La vitesse de rotation nécessaire dépend également de la rugosité du diffuseur et devra donc être accrue si ce dernier diffuse la lumière de façon moins importante. La faculté de diffusion du matériau employé détermine également sa transmission et un compromis entre ces différents paramètres doit être trouvé.

On choisit, en ce qui nous concerne, une surface en papier calque qui diffuse relativement fortement l'onde lumineuse incidente et de fait, possède l'inconvénient de réduire l'intensité du

champ d'illumination de manière non négligeable. Une autre technique consiste à injecter l'onde laser dans une fibre multimode vibrante [Pov06] qui garantit une réduction du degré de cohérence spatiale tout en conservant une intensité élevée. Ce dispositif assez complexe à mettre en place compte tenu notamment des vibrations introduites n'a donc pas été retenu lors du développement de notre montage destiné à démontrer une preuve de principe du procédé de focalisation numérique.

Le diffuseur tournant, faisant office de source secondaire, est positionné à proximité du diaphragme d'ouverture du système d'illumination Köhler de notre montage (voir Fig. 5.12). Il est alors possible de faire varier le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination en modifiant la taille du faisceau laser incident sur le diffuseur tournant ou la dimension de l'ouverture de ce diaphragme. L'autre partie du montage, identique à un système d'OCT plein champ conventionnel, est basé sur un interféromètre de Linnik contenant deux objectifs de microscope, et l'utilisation d'un détecteur matriciel pour l'acquisition d'images *en-face*.

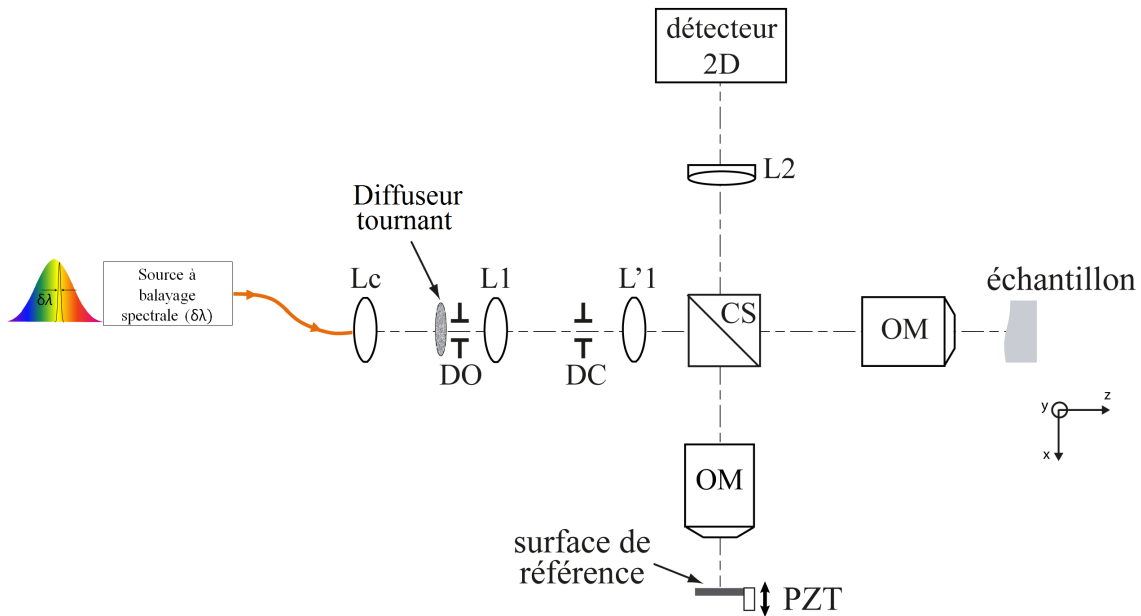


FIGURE 5.12 – Schéma du montage de SS-OCT plein champ. L_c : lentille collimatrice, DO : diaphragme d'ouverture, L1, L'1 : lentilles, DC : diaphragme de champ, CS : cube séparateur, OM : objectif de microscope, PZT : platine piézoélectrique, L2 : lentille de tube (doublet)

On emploie ici des objectifs de microscope d'ouverture numérique égale à 0,1, ce qui est supérieur à la valeur généralement choisie en SS-OCT conventionnel et assure donc une résolution latérale relativement importante (de l'ordre de $10\mu\text{m}$) compte tenu de la longueur d'onde centrale de la source. Ces objectifs, achromatiques et aplanétiques, sont destinés à une utilisation dans l'air, *i.e.* sans milieu d'immersion particulier, et suffisamment performant pour la bande spectrale d'émission de la source laser, située dans l'infrarouge. Une lentille de tube de distance focale 400 mm optimisée pour l'intervalle spectral en question projette les images sur un détecteur CMOS identique à celui utilisé dans les autres montage présentés (caméra OWL de *RaptorPhotonics*)

et dont la sensibilité spectrale est adaptée.

5.5.2 Principe et méthode d'acquisition du système SS-OCT plein champ

Bien que le champ d'illumination soit large et partiellement cohérent spatialement, le principe et les limites du système sont similaires à celle du SS-OCT à balayage introduit dans le premier chapitre (voir la sous-section 1.4.2).

Signal détecté

La source est balayée linéairement en longueurs d'ondes et de façon continue. On enregistre 256 images *en-face* avec un pas $\delta\lambda = 3,91.10^{-1}\text{nm}$, ce qui correspond à une temps d'exécution moyen de ~ 200 secondes pour l'acquisition d'une image 3D. On calcule ensuite la transformée de Fourier du signal détecté afin de mesurer la distribution du signal en profondeur selon l'axe Oz . En supposant un échantillon composé de M structures réfléchissantes, chacune localisée en $z = z_{ech,p \in [1;M]}$ et de coefficient de réflexion $R_{ech,p \in [1;M]}$, l'intensité brute mesurée pour une longueur d'onde λ_0 donnée (ou une fréquence $k_0 = 2\pi/\lambda_0$) peut s'exprimer selon trois termes distincts :

$$\begin{aligned}
 I_d(x, y, k_0) = & \frac{I_0}{4} \left(S(k_0) [R_{ref} + R_{ech,1} + R_{ech,2} + \dots + R_{ech,M}] \quad \text{"composante continue"} \right. \\
 & + 2S(k_0) \sum_{p=1}^M \sqrt{R_{ref}R_{ech,p}} \cos [2k_0 (z_{ref} - z_{ech,p})] \quad \text{"termes de corrélation"} \\
 & \left. + 2S(k_0) \sum_{p \neq q=1}^M \sqrt{R_{ech,p}R_{ech,q}} \cos [2k_0 (z_{ech,p} - z_{ech,q})] \right) \quad \text{"termes d'autocorrélation",} \\
 & \hspace{15em} (5.39)
 \end{aligned}$$

où $S(k_0)$ caractérise la sensibilité spectrale du détecteur alors que I_0 est l'intensité de l'onde incidente. On note qu'on retrouve l'expression de l'équation 1.20 du chapitre 1, lorsque l'échantillon est assimilé à un réflecteur unique.

On distingue donc trois termes caractéristiques : la composante continue, dont l'amplitude est proportionnelle au coefficient de réflexion de la surface de référence et des éléments de l'échantillon, et qui constitue la part la plus importante du signal lorsque R_{ref} est élevé. Le deuxième signal, dit de corrélation, correspond au signal interférométrique utile contenant l'information de position et coefficient de réflexion propre à chaque structure de l'échantillon, et s'identifie donc à la fonction de corrélation Γ que l'on cherche à corriger. Le dernier terme d'autocorrélation est un signal interférométrique parasite issu des interférences entre les différentes structures de l'échantillon. En calculant la transformée de Fourier selon k , on obtient donc l'expression suivante :

$$\begin{aligned}
 I_d(x, y, z) = & \frac{I_0}{8} \left(\gamma(z) [R_{ref} + R_{ech,1} + R_{ech,2} + \dots + R_{ech,M}] \right. \\
 & + 2\gamma(z) * \sum_{p=1}^M \sqrt{R_{ref} R_{ech,p}} \delta [z \pm 2(z_{ref} - z_{ech,p})] \\
 & \left. + 2\gamma(z) * \sum_{p=1}^M \sqrt{R_{ech,p} R_{ech,z}} \delta [z \pm 2(z_{ech,p} - z_{ech,q})] \right) , \quad (5.40)
 \end{aligned}$$

où $*$ représente le produit de convolution et $\gamma(z)$ la transformée de Fourier de $S(k)$, c'est-à-dire la réponse impulsionnelle axiale du système, dont la largeur à mi-hauteur Δz est inversement proportionnelle à $\Delta\lambda$.

Profondeur d'imagerie maximale

En supposant un échantillon composé de seulement 2 interfaces, *i.e.* $M = 2$, le signal calculé $I_d(0, 0, z)$ est typiquement une succession de pics de largeur à mi-hauteur Δz comme illustré en figure 5.13 (modifiée depuis [Iza08]) :

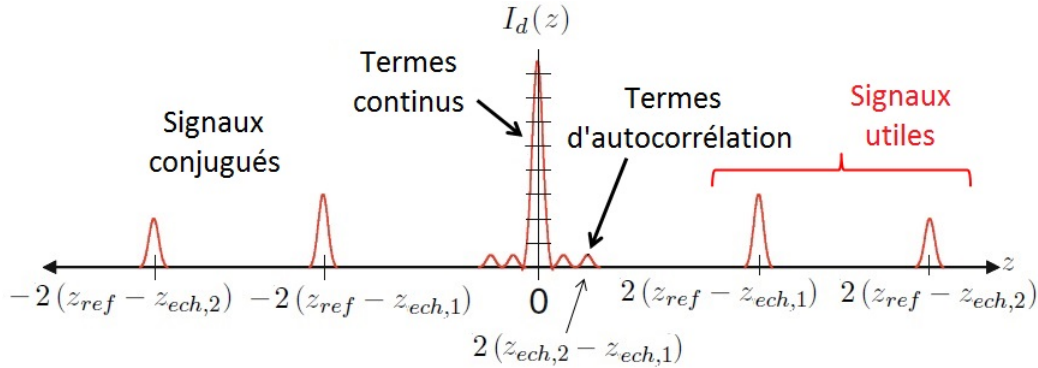


FIGURE 5.13 – Allure du signal $I_d(z)$ calculé par transformée de Fourier des mesures brutes lorsque l'échantillon est composé de deux interfaces localisées en $z_{ech,1}$ et $z_{ech,2}$. Trois types de termes apparaissent, mais le signal utile n'est constitué que des deux pics du côté droit de l'axe $z = 0$. Les termes d'autocorrélation correspondent aux interférences parasites internes à l'échantillon, comme par exemple le signal localisé en $2(z_{ech,2} - z_{ech,1})$ issu des interférences entre les deux surfaces de l'échantillon.

Puisque la transformée d'un signal réel est une fonction symétrique et paire, on remarque la présence de signaux dit "jumeaux" pour des valeurs de z négatives qui sont rigoureusement identiques à leur signaux symétriques pour des valeurs de z positives. Cela impliquera donc la présence d'une image "jumelle" dont il faudra tenir compte lors du traitement du signal par transformée de Fourier. On verra dans la suite comment éliminer ces termes conjugués afin de ne pas limiter la profondeur d'imagerie.

De plus, puisque la distribution de la source en longueur d'onde (ou en fréquence k) est discrète, d'après les propriétés de l'analyse de Fourier, cela induit un signal $I_d(z)$ périodique

dont la période ΔZ est directement reliée à la période d'échantillonnage en longueur d'onde $\delta\lambda$ (ou en fréquence δk). Plus cette dernière est faible, plus ΔZ est important et donc plus les signaux mesurés peuvent s'étendre sur une profondeur étendue sans provoquer de phénomène de recouvrement, appelé *aliasing* en anglais, et bien connu dans le domaine du traitement du signal. Ainsi, on définit une profondeur d'imagerie maximale accessible, z_{max} , proportionnelle à ΔZ , et donc $\delta\lambda$, qui dans le respect du critère de Nyquist-Shannon exigeant une fréquence d'échantillonnage δk supérieure au double de la fréquence maximale du signal observé, z_{max} s'écrit :

$$\begin{aligned} 2z_{max} &= \frac{2\pi}{2\delta k} \\ \Rightarrow z_{max} &= \frac{\pi}{2\delta k} \simeq \frac{\lambda_0^2}{4\delta\lambda} \end{aligned} \quad (5.41)$$

Avec une source laser dont le pas en longueur d'onde $\delta\lambda$ est égale à $3,91.10^{-1}nm$ comme c'est notre cas, la profondeur d'imagerie maximale z_{max} vaut $1580\mu m$ ce qui est très supérieur aux distances de pénétration usuelles en OCT, du fait de la diffusion de la lumière notamment, et cette valeur ne limite a priori donc pas la profondeur d'imagerie.

Cependant, en pratique, chaque longueur d'onde émise par le laser n'est pas parfaitement monochromatique et possède une certaine largeur à mi-hauteur, notée $\delta_r k$. Ceci induit en fait une chute du signal en fonction de sa profondeur comme cela avait été annoncé lors de l'introduction du FD-OCT (voir la section 1.4.2) En supposant une distribution gaussienne autour de la fréquence centrale k_0 de chaque onde émise successivement par le laser à balayage spectral, l'intensité $I_d(x, y, k)$ (voir Eq. (5.39)) s'écrit plus précisément comme le produit de convolution suivant :

$$\begin{aligned} I_d(x, y, k_0) &= \frac{I_0}{4} \left(S(k_0) [R_{ref} + R_{ech,1} + R_{ech,2} + \dots + R_{ech,M}] \right. \\ &\quad + 2S(k_0) \sum_{p=1}^M \sqrt{R_{ref}R_{ech,p}} \cos [2k_0 (z_{ref} - z_{ech,p})] \\ &\quad \left. + 2S(k_0) \sum_{p \neq q=1}^M \sqrt{R_{ech,p}R_{ech,q}} \cos [2k_0 (z_{ech,p} - z_{ech,q})] \right) * e^{-\frac{4ln2k_0^2}{\delta_r k^2}} \end{aligned} \quad (5.42)$$

En ne considérant que le terme de corrélation utile, d'après (Eq. (5.40) et (5.42)) l'intensité du signal OCT suit donc la relation :

$$I(x, y, z) \propto e^{-\frac{z^2 \delta_r k^2}{4ln2}} \times \sum_{p=1}^M \sqrt{R_{ref}R_{ech,p}} (\gamma [2(z_{ref} - z_{ech,p})] + \gamma [-2(z_{ref} - z_{ech,p})]) \quad (5.43)$$

Cette équation met donc en valeur le terme gaussien multiplicatif entraînant une chute progressive du signal et donc de la sensibilité avec la profondeur, comme l'illustre la figure 5.14 (modifiée depuis [Iza08]).

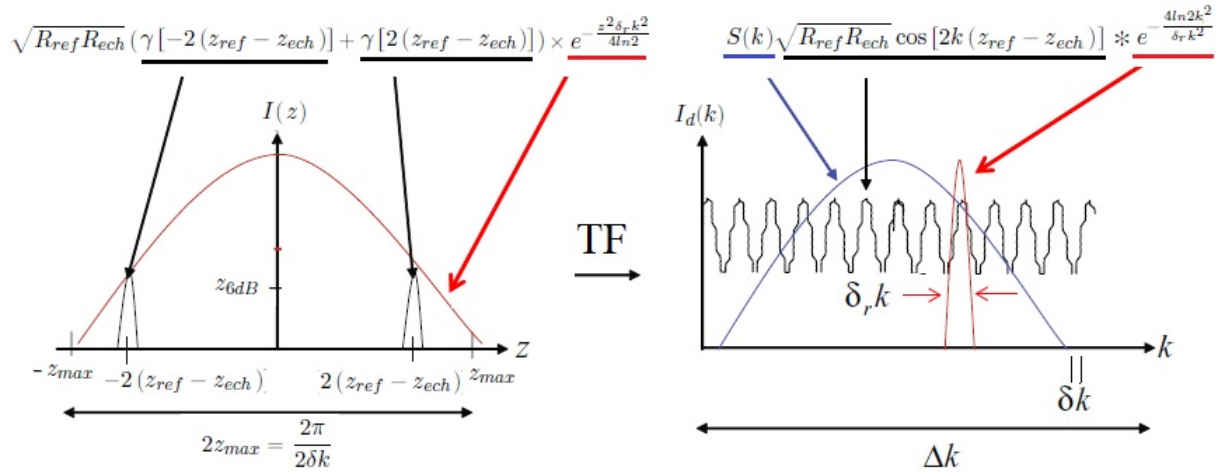


FIGURE 5.14 – Mise en évidence de la profondeur d'imagerie maximale accessible pour un montage de SS-OCT, dans le cas d'un échantillon constitué d'une seule surface. Celle-ci dépend de l'échantillonnage δk de la source laser à balayage ainsi que de la chute de sensibilité en fonction de z qui est elle reliée à la largeur à mi-hauteur finie $\delta_r k$ de chaque bande d'émission quasiment monochromatique.

On définit alors une profondeur typique z_{6dB} correspondant à une baisse de moitié du RSB, *i.e.* 6dB, qui s'exprime en fonction de $\delta_r k$:

$$z_{6dB} = \frac{2 \ln 2}{\delta_r k} \simeq \frac{\ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\delta_r \lambda} \quad (5.44)$$

La valeur typique de $\delta_r \lambda$ étant de l'ordre de $0,20 \text{ nm}$, *i.e.* $z_{6dB} \simeq 2,5 \text{ mm}$, pour ce type de laser à balayage spectral, cette chute de la sensibilité avec la profondeur est donc relativement faible dans ce cas.

Rééchantillonnage et linéarisation en fréquences du signal détecté

Les résultats, reliant la profondeur d'imagerie accessible au pas en fréquence spatiale δk et à la largeur à mi-hauteur $\delta_r k$ supposent un signal linéairement distribué selon la fréquence $k = 2\pi/\lambda$. Or, le laser émet un signal dont la distribution est, elle, linéaire en longueur d'onde, engendrant donc une distorsion de la modulation de l'intensité $I_d(x, y, k)$. Cette distorsion de la phase du signal brut $I_d(x, y, k)$ conduit à un élargissement de sa transformée de Fourier et donc de la réponse impulsionnelle du système [Bay12]. On précise que dans le cas d'un montage SD-OCT, le spectromètre employé et son réseau de diffraction distribuent le spectre de la lumière linéairement avec λ [Iza08]. Il est alors nécessaire d'interpoler le signal brut $k \rightarrow I_d(x, y, k)$ [Bay12] afin qu'il possède une phase linéaire en fonction la fréquence spatiale k et que la résolution axiale du système soit alors optimale.

Nota bene : Cette capacité à corriger la phase du signal post-acquisition pour chaque fréquence k_0 , distinctement, est une particularité intéressante des systèmes de FD-OCT puisqu'ils mesurent un signal échantillonné précisément en fonction de k . Outre l'interpolation du signal pour corri-

ger la non linéarité en fréquence de la source, il est également possible de corriger efficacement les différences de dispersion par des méthodes numériques [Fer01].

Extraction du signal utile

Comme cela fût le cas lors du développement des différents systèmes présentés dans ce manuscrit, on utilise une technique à décalage de phase en recombinaison plusieurs images déphasées par l'intermédiaire d'une platine piézoélectrique contrôlant la position de la surface de référence (voir Fig. 5.12)

L'utilisation d'un algorithme à deux images déphasées de π permet de supprimer les termes continus et d'autocorrélation mais conserve les termes conjugués. Avec un algorithme à quatre ou cinq images déphasées de $\pi/2$ il est possible d'extraire la phase et l'amplitude du signal indépendamment l'un de l'autre (voir la section 4.6 du chapitre 4) ainsi que de s'affranchir des termes conjugués [Iza08]. On choisit donc de privilégier un algorithme à cinq images qui, en nécessitant plus d'images, a la propriété d'être plus robuste au bruit de mesure lors de l'extraction du signal [Lar96]. Néanmoins, un mouvement pas à pas de la surface de référence n'est pas optimal en termes de vitesse, et des techniques de d'oscillation continue, similaires à celles présentées antérieurement, permettent de s'affranchir de l'image jumelle tout en garantissant une vitesse d'exécution satisfaisante [Tao07].

Une technique d'extraction alternative consiste à décaler la position du bras référence d'une distance z_d , de sorte à déplacer la fenêtre de cohérence en amont de l'échantillon. De cette façon, les trois termes du signal mesurés sont bien séparés comme cela est le cas en figure 5.13. Cette méthode suppose que les termes d'autocorrélation soient localisés, dans l'ensemble, à proximité des termes continus centrés, eux, en $z = 0$, et qu'au delà de $z = z_d$ seul le signal utile est présent et donc facilement identifiable et mesurable. Même si cette technique restreint quelque peu la profondeur d'imagerie maximale puisque la surface de l'échantillon est initialement translaturée par rapport à la fenêtre de cohérence, elle a l'avantage d'être plus précise et plus simple à implémenter dans certains cas. Elle peut donc être bien adaptée en fonction des attentes du système, notamment en ce qui concerne la profondeur d'imagerie et la vitesse d'acquisition requises.

Le dispositif de SS-OCT plein champ développé nous permet donc d'accéder à la mesure de la fonction de corrélation complexe $\Gamma(x, y, \omega)$ nécessaire au processus de focalisation numérique. On cherche donc désormais à adapter l'algorithme aux caractéristiques du montage afin de l'appliquer efficacement.

5.5.3 Applications et correction numérique de la mise au point

Processus de focalisation numérique

Après avoir calculé précisément la fonction correctrice appropriée (voir eqs. (5.36) et (5.38)), la détermination des fonctions d'ouverture $A_{ill}(x_0, y_0, \omega)$, propre à l'illumination et caractérisée par son ouverture numérique ON_{ill} , et $A(x_3, y_3, \omega)$, propre au système d'imagerie reliée à l'ouverture numérique de collection ON_{coll} est nécessaire à l'application de l'algorithme de focalisation.

L'ouverture numérique de collection étant assimilée à celle de l'objectif de microscope (*i.e.*

($ON_{coll} = 0, 1$), en supposant que A_{ill} est de forme circulaire et uniforme, on estime alors son ouverture en l'ajustant de sorte que le procédé numérique converge vers une solution satisfaisante. L'extraction de la fonction de corrélation $\Gamma(x, y, \omega)$ pour un échantillon diffusant, tel qu'une plaque de circuit intégré structurée, permet de couvrir l'ensemble de la pupille de l'objectif et peut également être utilisé afin d'évaluer les ouvertures numériques en question via le calcul de $\tilde{\Gamma}(k_x, k_y, \omega)$ par transformée de Fourier de $(x, y) \rightarrow \Gamma(x, y, \omega)$.

On choisira par la suite deux positions du diaphragme d'ouverture qui permettent de générer deux degrés de cohérence spatiale du champ d'illumination différents et pertinents dans le cadre de l'étude menée. On considère deux configurations pour lesquelles l' ON_{ill} est estimée à 0,005 (champ relativement fortement cohérent spatialement) ou 0,05 (champ faiblement cohérent spatialement) alors que ON_{coll} demeure égale à 0,1.

Le schéma ci-dessous décrit la mise en œuvre en pratique, étape par étape, du processus de focalisation dans le cas d'un échantillon structuré, et donc diffusant, constitué d'une seule interface.

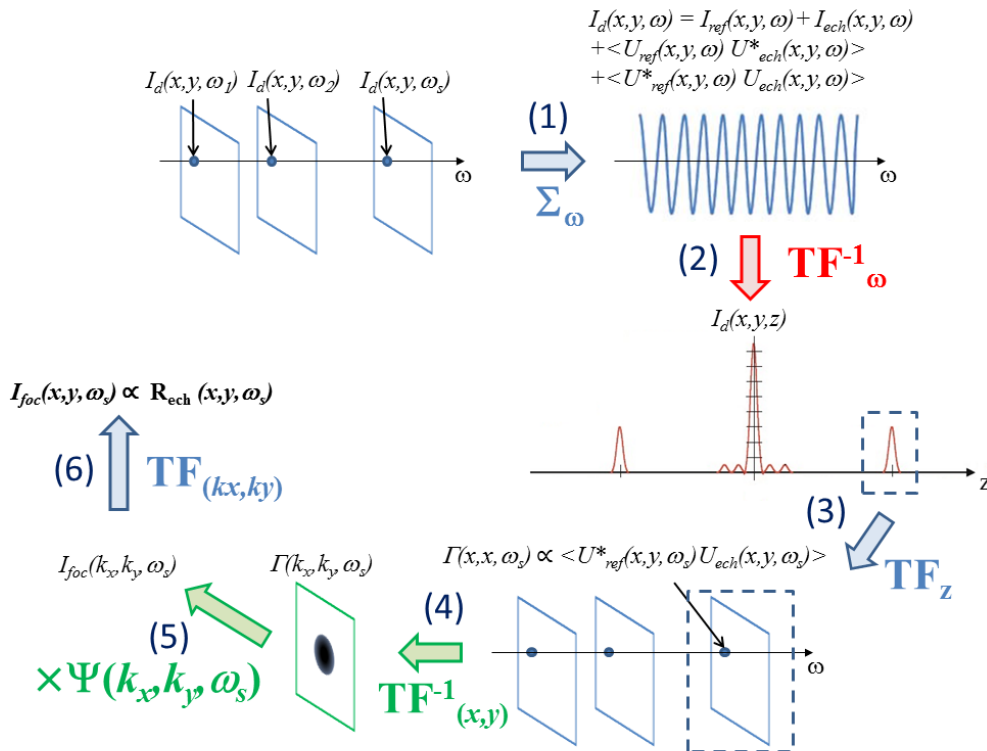


FIGURE 5.15 – Schématisation, étape par étape, du processus de focalisation numérique appliqué dans le cas d'un échantillon ne comportant qu'une seule surface. (1) : recombinaison pour chaque pixel des signaux monochromatiques acquis ; (2) : transformée de Fourier selon ω ; (3) : extraction du signal utile et transformée de Fourier selon z ; (4) : transformée de Fourier selon les coordonnées transverses (x, y) ; (5) : application de la fonction correctrice Ψ au spectre spatial du signal ; (6) : transformée de Fourier selon les fréquences spatiales (k_x, k_y) afin de restituer la valeur du coefficient de réflexion de l'échantillon R_{ech} .

Performances du système

Le système étant basé sur l'utilisation d'un champ faiblement cohérent, la plus grande ouverture numérique d'illumination sera favorisée et on mesure, avec cette configuration, une résolution latérale $\Delta(x, y) \sim 8\mu\text{m}$ en évaluant le profil d'intensité le long d'une marche de type fonction d'Heaviside matérialisée par le bord d'un miroir de silicium [Sac08]. Le calcul théorique de $\Delta(x, y)$ par cette méthode, qui consiste donc à convoluer une fonction d'Heaviside avec la réponse impulsionnelle théorique du système d'imagerie [Sac10], conduit à une valeur de $\sim 6\mu\text{m}$, l'écart avec la valeur expérimentale s'expliquant par l'emploi d'objectifs de microscope non optimisés dans le gamme spectrale autour de $\lambda = 1,5\mu\text{m}$ utilisée.

On en déduit donc que, étant donné l'intervalle de longueurs d'onde considéré, la résolution transverse est supérieure aux systèmes FD-OCT conventionnels. En revanche, la profondeur de champ est elle réduite à $150\mu\text{m}$ mais, grâce à l'implémentation du système de focalisation numérique cela ne constitue pas une limite en soi, et la profondeur d'imagerie peut tout à fait égaler celle des montages de FD-OCT classiques comme nous en discuterons ultérieurement.

La résolution axiale est, quant à elle, déterminée par les mêmes critères que les montages conventionnels et suit la relation classique (voir Eq. (1.16) établie au chapitre 1) propre aux techniques d'OCT. En utilisant l'image tomographique d'un miroir, on mesure une résolution axiale de $\sim 21\mu\text{m}$ après avoir apodisé le signal brut mesuré, $I_d(x, y, \omega)$, ce qui explique la différence avec la valeur théorique proche, elle, de $10\mu\text{m}$. Cette apodisation est, en effet, nécessaire étant donné la distribution spectrale abrupte de la source laser. La densité spectrale de puissance (DSP) de cette source étant de forme carrée, cela engendrerait des rebonds inopportuns, comme cela a été démontré précédemment (voir la figure 3.2 du chapitre 3), et on entreprend donc de multiplier le signal $\omega \rightarrow I_d(x, y, \omega)$ par une fonction gaussienne afin d'apodiser la distribution de la DSP. Par conséquent, la réponse impulsionnelle (RI) axiale est dépourvue de rebonds mais, puisque la largeur à mi-hauteur de la DSP a été réduite, la RI axiale est, elle, élargie.

Application à un échantillon structuré tridimensionnel

Afin de tester l'efficacité de notre processus de focalisation numérique, on compare les images tomographiques obtenues avec et sans application de l'algorithme de focalisation présenté dans ce chapitre, mais également en utilisant un algorithme dédié à l'utilisation d'un champ cohérent spatialement. On choisit alors un échantillon dont l'étendue longitudinale est supérieure à la profondeur de champ du montage et composé de deux plaques de circuit intégré partiellement superposées l'une sur l'autre (voir le schéma en figure 5.16). Les deux surfaces constituent donc deux structures contrastées positionnées dans deux plans parallèles distincts, éloignés de $\sim 300\mu\text{m}$.

Les différentes images sont présentées en figure 5.16 pour laquelle le circuit disposé au-dessus apparaît sur la gauche de chacune des quatre images alors que l'image du circuit sous-jacent est présentée sur la partie droite. Deux types de données sont exposées : la première ligne (Figs. 5.16a et 5.16b) correspondent aux images extraites sans utiliser une quelconque focalisation numérique, alors que les images de la seconde ligne (Figs. 5.16c et 5.16d) sont elles issues d'un calcul incluant un algorithme de focalisation numérique. Alors que la figure 5.16c est un exemple de focalisation avec un algorithme classique spécifique à une source de lumière cohérent spatialement, la figure

5.16d présente, elle, les résultats obtenus après application de l'algorithme de focalisation détaillé précédemment et adapté à un champ d'illumination partiellement cohérent spatialement.

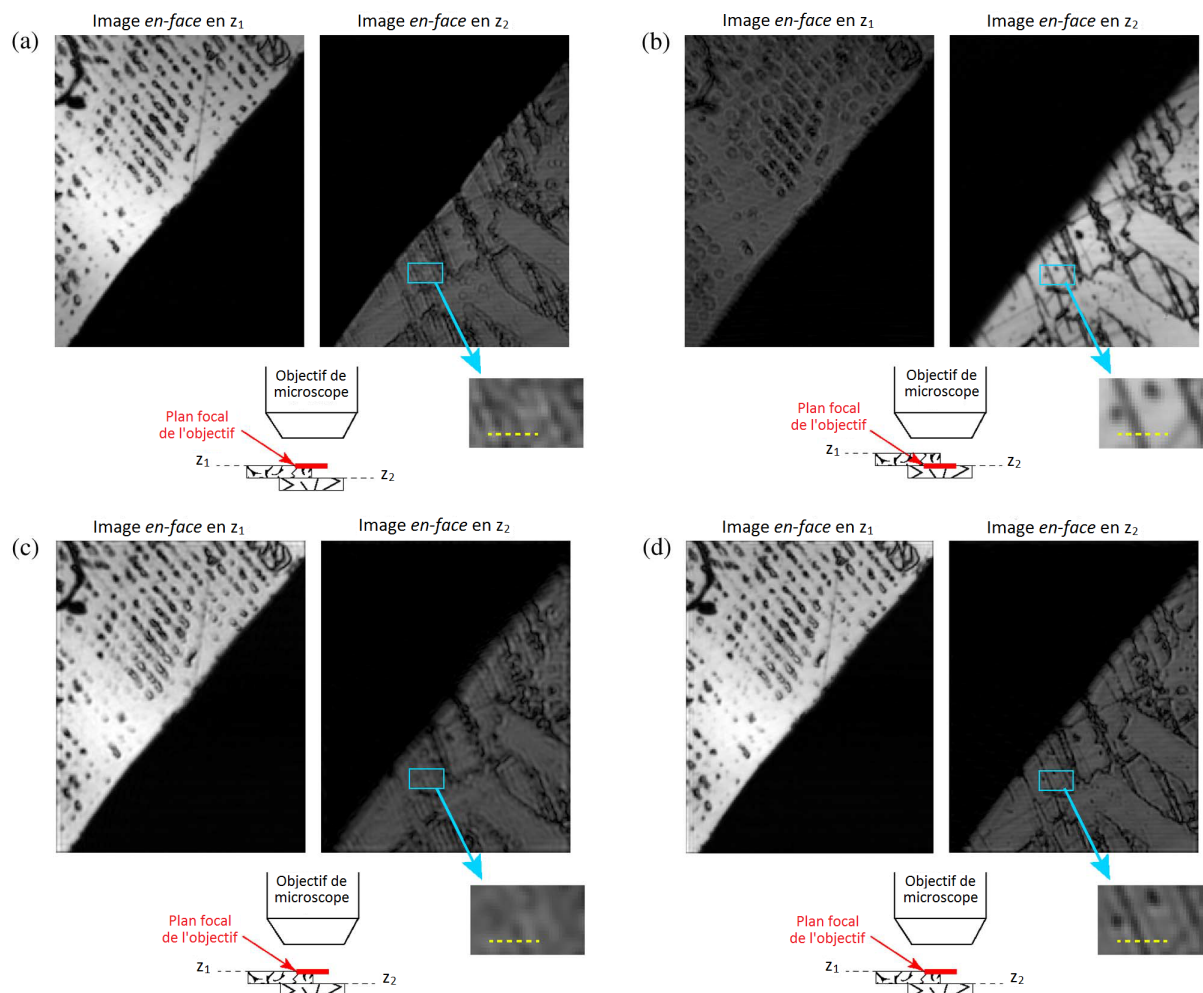


FIGURE 5.16 – Images tomographiques d'un échantillon constitué de deux plaques structurées, superposées et situées au niveau de deux plans distincts ($z = z_1$ et $z = z_2$). (a) et (b) : images en-face des deux plaques obtenues sans traitement numérique. En (a), la mise au point est ajustée mécaniquement à la surface de la première plaque alors qu'en (b), le plan focal de l'objectif est confondu avec la surface de la seconde plaque. (c) et (d) : images obtenues après application d'un algorithme de focalisation, pour une mise au point ajustée mécaniquement à la surface de la première plaque. En (c), un algorithme classique dédié à un champ cohérent spatialement est utilisé alors qu'en (d) on applique l'algorithme présenté, adapté à un champ d'illumination faiblement cohérent spatialement. Afin de visualiser les différences de netteté entre les différentes images, on insère un agrandissement d'une certaine zone de l'image sur laquelle la ligne en pointillés indique la position de la coupe destinée à une représentation des profils d'intensité présentés en figure 5.18a.

Comme indiqué sur le schéma de la figure 5.16b, la position de l'échantillon a été ajustée de sorte que le plan focal de l'objectif de microscope soit confondu avec le circuit positionné en-dessous, alors que dans les trois autres cas (Figs. 5.16a, 5.16c et 5.16d), le plan focal de l'objectif est mécaniquement superposé à la première plaque de circuit intégré.

On constate alors que, sans algorithme de focalisation (Figs. 5.16a et 5.16b), seules les surfaces pour lesquelles une mise au point mécanique a été effectuée apparaissent nettes. Cependant, l'application d'une correction numérique adaptée (Fig. 5.16d) permet d'obtenir des images nettes de chacun des deux circuits quelle que soit leur position longitudinale.

Il est par ailleurs intéressant de noter la chute d'intensité du signal d'une image initialement floue puis focalisée numériquement, dans le cas d'un champ partiellement cohérent, comme prédit par la théorie (voir Fig. 5.7 ou section 5.4.2). Cela est en effet facilement observable en comparant par exemple l'image du second circuit entre une focalisation mécanique (Fig. 5.16b) ou numérique (Fig. 5.16d). En revanche, si l'ouverture numérique d'illumination est réduite, et que le degré de cohérence spatiale est donc augmenté, la conservation du contraste de l'image focalisée numériquement est plus satisfaisante comme on le montre en figure 5.17, où l'on compare deux images dont la netteté a été restituée après application dudit algorithme, pour deux valeurs de ON_{ill} différentes.

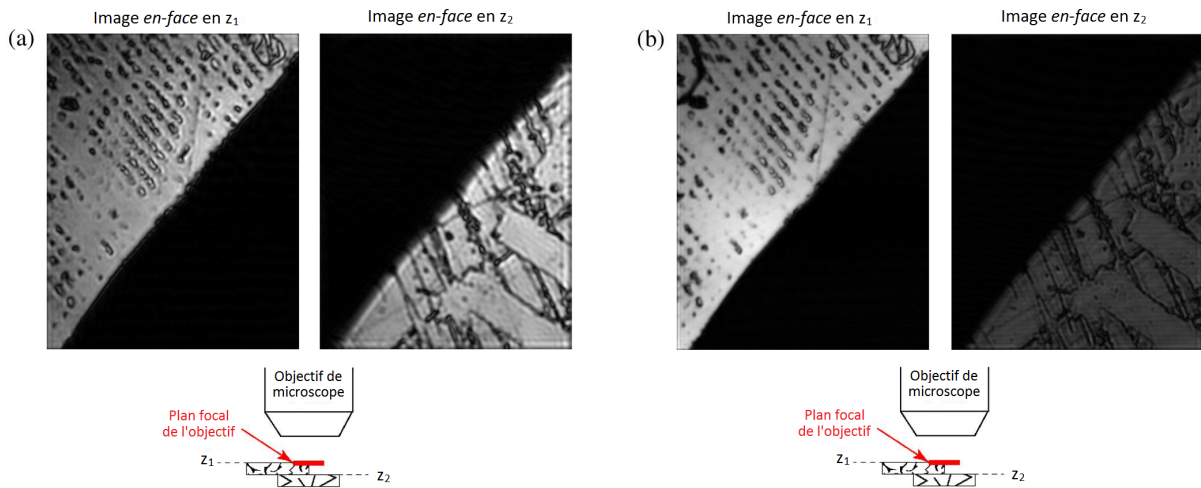


FIGURE 5.17 – Comparaison des images en-face obtenues après application dudit algorithme de focalisation, pour un échantillon composé de deux plaques de circuit intégré superposées l'une sur l'autre, lorsque le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination est élevé ($ON_{ill} = 0,005$) (a) et lorsqu'il est faible ($ON_{ill} = 0,05$) (b). Dans les deux cas, $ON_{coll} = 0,5$. On observe que la chute du contraste de l'image en-face en z_2 est moins importante lorsque ON_{ill} est plus faible.

On en déduit donc qu'une ouverture numérique d'illumination importante restreint la profondeur d'imagerie en ne permettant pas de restituer l'amplitude du signal.

Dans le cas où ON_{ill} élevée est requise ou privilégiée, afin d'accroître le flux lumineux ou la résolution latérale, une alternative consisterait à traduire mécaniquement la position de l'objectif du bras échantillon au terme de l'acquisition d'une pile d'images, afin d'effectuer la mise au point en profondeur et d'acquérir une nouvelle série de 256 images en-face.

Une autre solution serait de positionner initialement la fenêtre de focalisation à l'intérieur de l'échantillon ce qui serait plus avantageux en termes de vitesse que la première proposition.

Dans le but de comparer plus précisément les quatre types d'images acquises et de quantifier leurs différences, on présente en figure 5.18a le profil de $|\Gamma|$ selon la direction Ox le long d'une ligne de l'échantillon contenant une structure fine (voir Fig. 5.16), qui s'apparente donc à la réponse impulsionnelle transverse du système. On ajoute à ces données expérimentales deux graphes, issus des calculs théoriques précédents, représentant l'évolution de la valeur absolue normalisée de la réponse impulsionnelle transverse Γ pour différentes valeurs du défaut de mise au point Δz_{foc} , dans le cas d'une focalisation numérique appropriée (Fig. 5.18c) ou sans focalisation numérique (Fig. 5.18b).

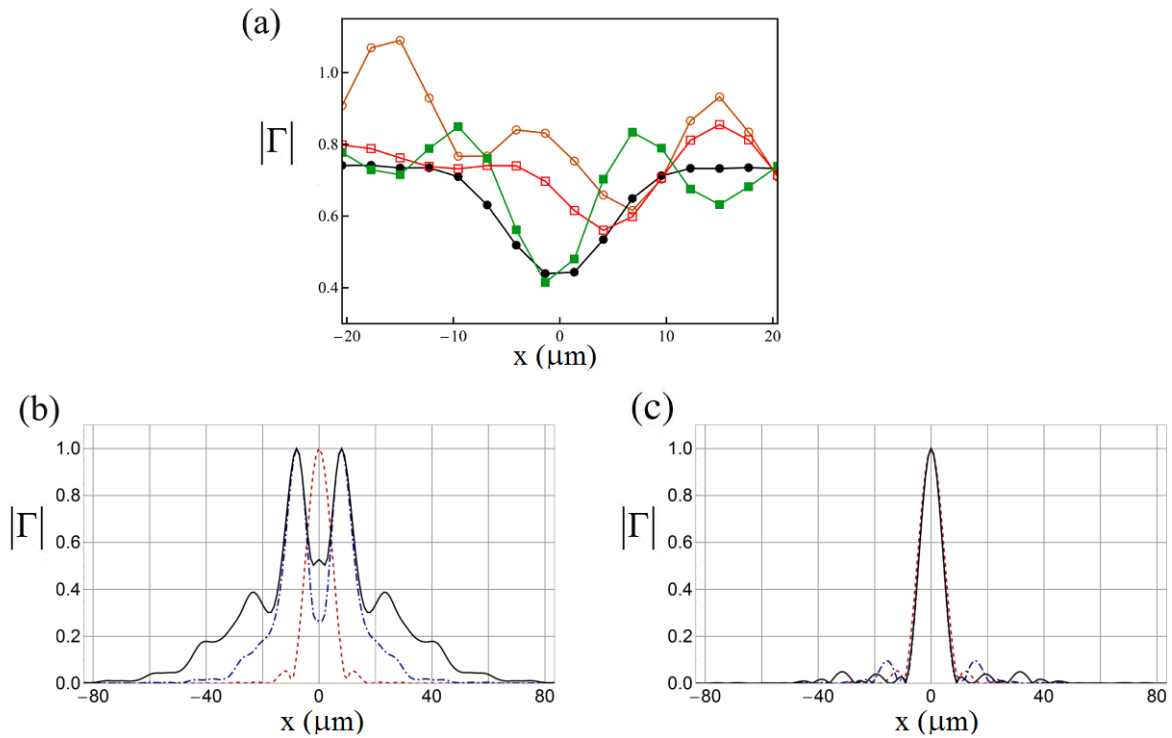


FIGURE 5.18 – (a) : évolution de $|\Gamma(x, 0, \omega)|$ en fonction de la direction transverse x mesurée expérimentalement à partir des images présentées en figure 5.16 (détails donnés dans le texte). La courbe orange est issue de la figure 5.16a, la courbe noire correspond à la figure 5.16b, la courbe rouge à la figure 5.16c et la courbe verte à la figure 5.16d. (b) et (c) : évolution théorique de $|\Gamma(x, 0, \omega)|$, normalisée, en fonction de la direction transverse x pour trois valeurs de défaut de mises au point : $\Delta z_{foc} = 0\mu\text{m}$ (courbe en pointillés rouges), $\Delta z_{foc} = 300\mu\text{m}$ (courbe en pointillés bleus) et $\Delta z_{foc} = 600\mu\text{m}$ (courbe noire); sans (b) et avec (c) application de l'algorithme de focalisation. Ces courbes correspondent à des coupes des graphes 3D présentées en figures 5.9b et 5.9d, respectivement. Dans les trois cas cas, $ON_{coll} = 0,1$ et $ON_{ill} = 0,05$.

On observe que le profil du signal focalisé mécaniquement (courbe noire) devient flou lorsque la mise au point n'est pas assurée (courbe orange) et cela, conformément à l'allure des courbes

théoriques présentées en figure 5.18b.

Ce graphe confirme également que l'application d'un algorithme classique dédié à un champ d'illumination spatialement cohérent n'est pas efficace puisqu'il ne permet pas de restituer la netteté de l'image (courbe rouge) contrairement à notre algorithme de focalisation (courbe verte) avec lequel le profil du signal est très proche de celui correspondant à une focalisation mécanique. Seule la présence de rebonds, d'amplitude légèrement supérieure à ce que les calculs théoriques prévoient (voir Fig. 5.18c), les distinguent l'un de l'autre, cela pouvant être attribué à la méconnaissance de la fonction d'ouverture $A(x_0, y_0, \omega)$ dont on a supposé une forme circulaire et uniforme. Une amélioration de la qualité des images finales pourraient donc être obtenues en mesurant plus précisément les propriétés de cette fonction d'ouverture.

5.6 Conclusion

Nous avons démontré la mise en application d'une technique d'imagerie tridimensionnelle basée sur la combinaison d'un système de SS-OCT plein champ utilisant une illumination faiblement cohérente spatialement, associé à un processus de focalisation numérique permettant d'accroître la résolution latérale par rapport aux montages de FD-OCT conventionnels tout en maintenant une profondeur d'imagerie similaire à ces derniers.

L'implémentation d'un système d'illumination plein champ conduit à la réalisation d'un interféromètre dépourvu de tout balayage motorisé, le seul mouvement mécanique étant inclus dans la source laser, garantissant ainsi une stabilité et une vitesse d'exécution potentiellement très élevées. La réduction du degré de cohérence spatiale de la source assure également une qualité des images convenable, bien que l'emploi d'un diffuseur tournant diminue assez fortement en pratique l'intensité du champ incident et donc la vitesse d'acquisition. Des solutions plus efficaces sont cependant envisageables, comme l'utilisation d'une fibre multimode vibrante.

Une étude théorique a permis d'établir une expression de la fonction de corrélation Γ précise, dans le cadre d'un modèle adapté aux conditions expérimentales conduisant au développement d'un processus de focalisation numérique, efficace quel que soit le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination. La performance de cette correction numérique a également été prouvée expérimentalement en restituant la netteté d'échantillons diffusants structurés. Initialement limitée à $\sim 150\mu\text{m}$ avec des objectifs d'ouverture numérique 0,1, la profondeur d'imagerie accessible a été étendue à plus de $300\mu\text{m}$.

Cependant, compte tenu de la faible sensibilité de détection du système développé, principalement causée par la présence de signaux parasites, des images d'échantillons diffusants plus complexes, tels que des échantillons biologiques, n'ont pu être réalisées de façon satisfaisante. Cela contraint donc cette démonstration de principe à l'imagerie d'échantillons assez réfléchissants. Une étude plus approfondie des différents sources de bruits présentes dans le montage serait nécessaire afin d'envisager la production d'images tomographiques d'échantillons biologiques focalisées numériquement avec ce système.

Plusieurs phénomènes ont néanmoins été mis en évidence, tels que la chute de l'amplitude du signal issu de zones hors de la fenêtre de focalisation quand bien même focalisé numériquement. Cette décroissance est étroitement liée à l'ouverture numérique d'illumination et son effet peut donc être atténué en réduisant cette dernière, *i.e.* en augmentant le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination. Cependant, cela affecterait non seulement la résolution latérale mais

également la vitesse d'exécution du système, puisqu'un flux lumineux moins important serait transmis par un diaphragme d'ouverture presque fermé. Néanmoins, selon les priorités du développement, un compromis peut être trouvé entre un champ d'illumination suffisamment cohérent spatialement pour permettre d'étendre la profondeur d'imagerie par focalisation numérique et un diaphragme d'ouverture suffisamment ouvert afin de s'affranchir du bruit de diaphonie (ou *cross-talk*) et garantir un flux lumineux important. Cette liberté de choix est rendue possible par la robustesse, inédite, de l'algorithme présenté en ce qui concerne le degré de cohérence spatiale du champ d'illumination.

Comme on l'a vu, la correction de la fonction de corrélation $\Gamma(k_x, k_y, \omega)$ est favorisée par la connaissance de la fonction $\omega \rightarrow \Gamma(x, y, \omega)$ qui est finement échantillonnée du fait de l'emploi de la source laser à balayage spectral dont le pas est de l'ordre du dixième de nanomètre. Le développement d'un système d'OCT fréquentiel est donc particulièrement bien adapté à ce type de focalisation numérique. Bien qu'il ne soit pas fondamentalement exclus d'associer un tel processus numérique à un montage d'OCT plein champ en domaine temporel, cela nécessiterait un balayage axial très précis, afin de suffisamment échantillonner le signal en fonction de z pour être capable de calculer fidèlement sa transformée de Fourier en fonction de ω et appliquer la correction numérique. Un tel échantillonnage serait très coûteux en temps et n'est donc en pratique a priori pas plus performant que les systèmes de focalisation dynamique utilisés.

Conclusion et perspectives

Quatre systèmes d'OCT plein champ développés lors de mes travaux de thèse ont été présentés dans ce manuscrit. Ces différents systèmes ont tous en commun la propriété de proposer une ou plusieurs extensions de l'OCT plein champ qui exploitent des capacités propres à cette technique.

Nous avons dans un premier temps implémenté un dispositif d'OCT plein champ profitant d'un intervalle spectral global très étendu (de 530nm à 1700nm en longueurs d'onde), afin d'augmenter le contraste des images. En mesurant le signal issu d'un échantillon dans trois bandes spectrales différentes, l'information spectroscopique déduite a permis de distinguer et caractériser des zones de l'échantillon qui seraient sinon indiscernables.

L'utilisation d'objectifs de microscope à miroirs, combinés à la mise en place d'un système de compensation dynamique de la dispersion, consistant à pivoter progressivement une lame de verre à mesure que la profondeur d'imagerie s'accroît, garantit des performances similaires à l'OCT conventionnel dans les trois bandes spectrales. De cette façon, une résolution axiale et latérale proches de $2\mu\text{m}$ a été atteinte dans les trois bandes.

C'est grâce à la possibilité d'utiliser une source de lumière telle qu'une lampe halogène, dont le spectre d'émission s'étend sur un intervalle de longueurs d'onde allant de $\sim 300\text{nm}$ à plus de $2\mu\text{m}$, qu'il est aisé de disposer d'un très large spectre d'émission en OCT plein champ. De plus, ce type de sources de lumière garantit une densité spectrale de puissance d'émission lisse et régulière et donc une réponse impulsionnelle axiale dépourvue de rebonds parasites.

Le système de détection repose sur l'utilisation d'un détecteur composé d'une matrice de photodiodes de technologie InGaAs étendue au domaine visible. Un tel détecteur est sensible aux longueurs d'ondes comprises entre 400nm et 1800nm. Associé à une lampe halogène, il est alors possible d'obtenir une densité spectrale de puissance de détection effective très étendue et appropriée à l'imagerie des tissus biologiques, compte tenu de leurs propriétés d'absorption et de diffusion en général.

Outre l'analyse spectroscopique du signal, une autre manière d'exploiter les propriétés d'un spectre très étendu est de le mettre au service de la résolution axiale. Cette dernière étant directement reliée à la largeur de ce spectre, nous avons étudié théoriquement et expérimentalement une configuration spectrale optimale dans le but d'obtenir une résolution axiale élevée et adaptée à l'imagerie en profondeur dans les tissus biologiques.

Une étude du phénomène de dispersion a alors mis en évidence la présence d'une situation optimale dont les propriétés dépendent de l'échantillon et de la profondeur du plan d'imagerie. Nous avons démontré, en considérant un échantillon de peau, qu'une distribution spectrale de

largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda \sim 300\mu\text{m}$ et centrée à $\lambda_0 \sim 700\text{nm}$ permettait d'optimiser la résolution axiale jusqu'à $\sim 50\mu\text{m}$ de profondeur. En l'absence de dispersion, nous avons mesuré qu'une telle configuration conduit à une résolution axiale de $0,67\mu\text{m}$ dans l'air (c'est-à-dire $0,50\mu\text{m}$ dans l'eau), ce qui constitue un record en OCT.

L'emploi d'objectifs de microscope d'ouverture numérique égale à 1,2 nous a permis d'atteindre une résolution latérale égale à $\sim 0,7\mu\text{m}$ dans l'air également. Des images d'échantillons de peau mettant en évidence des structures fines à une échelle subcellulaire ont ainsi pu être réalisées. En OCT fréquentiel conventionnel, une telle résolution latérale est incompatible avec l'imagerie en profondeur en raison du compromis entre la résolution latérale et la profondeur d'imagerie.

Une autre caractéristique de l'OCT plein champ est la possibilité d'accroître le champ de vision d'une image *en-face* sans affecter le temps d'acquisition, compte tenu de l'illumination plein champ utilisée.

Afin de profiter de cet avantage, nous avons développé un système d'OCT plein champ basé sur un interféromètre de Michelson, n'utilisant qu'un seul objectif de microscope, et dédié à l'imagerie d'échantillons de grandes dimensions ($17,5\text{mm} \times 17,5\text{mm}$).

De sorte à garantir une profondeur de pénétration suffisante, un objectif de microscope de faible ouverture numérique a été choisi et fixé à la même platine motorisée que la surface de référence. De cette façon la profondeur d'imagerie accessible a été multipliée par deux, en considérant une position initiale de l'échantillon et de la surface de référence adaptée.

Cela nous a également permis de réaliser une image tomographique du signal de phase d'un échantillon multicouches épais et étendu spatialement. Nous avons ainsi mesuré quantitativement le profil topographique de chacune de ces interfaces avec une sensibilité de mesure de $\sim 2\text{nm}$ en hauteur. La capacité de sectionnement axial élevée, étant donné la valeur de Δz proche de $1,5\mu\text{m}$, et l'efficacité de l'extraction du signal de phase assurée par la méthode à décalage de phase présentée, offre un champ d'applications intéressant pour caractériser précisément, et à une fréquence rapide, des échantillons multicouches épais et étendus.

La réalisation d'images en temps réel d'échantillons biologiques *in vivo* fut, quant à elle, contrecarrée par la fréquence d'acquisition limitée du système d'OCT plein champ.

De façon générale, il est jusqu'à présent relativement difficile avec un système d'OCT plein champ de proposer une fréquence d'exécution adaptée aux échantillons *in vivo*, tout en garantissant des performances appropriées à l'imagerie en profondeur dans les tissus biologiques. L'intensité lumineuse réduite des sources faiblement cohérentes spatialement employées, ainsi que les fréquences d'acquisitions relativement faibles des détecteurs matriciels possédant une dynamique de stockage suffisamment importante, sont les causes principales de l'absence de travaux présentant des systèmes d'OCT plein champ adaptés à l'imagerie *in vivo*. Dans [Wat08] des images d'empreintes de doigts *in vivo* sont présentées mais avec une source laser cohérente spatialement, susceptible donc de dégrader les images *en-face* [Kar04].

Le dernier chapitre de ce manuscrit a concerné la mise en œuvre d'un système d'OCT fréquentiel à balayage spectral associé à une illumination plein champ et une méthode de correction numérique de la focalisation.

Afin de ne pas nuire à la qualité des images *en-face* acquises, les propriétés de cohérence

spatiale de la source laser ont été modifiées. Nous avons montré, théoriquement et expérimentalement, la possibilité de corriger la mise au point des images, en appliquant un algorithme de calculs post-acquisition adapté à un champ d'illumination faiblement cohérent spatialement. Nous avons ainsi augmenté la profondeur d'imagerie accessible et réduit l'effet du compromis existant en OCT fréquentiel, entre résolution latérale et profondeur d'imagerie. En utilisant une ouverture numérique des objectifs de microscope de 0,1 la profondeur d'imagerie accessible, normalement limitée à $\sim 150\mu\text{m}$, a été étendue à plus de $300\mu\text{m}$.

En profitant de la forte intensité potentielle d'une source laser, et en s'affranchissant du besoin de translations mécaniques lors de l'acquisition d'une image tridimensionnelle, ce dispositif constitue une alternative intéressante à l'étude d'échantillons *in vivo*, avec une illumination plein champ et une résolution latérale assez élevée. Cela nécessite néanmoins l'utilisation d'un détecteur matriciel suffisamment performant et rapide.

L'OCT plein champ offre des performances remarquables en termes de résolution spatiale, pouvant atteindre $0,6\mu\text{m}$ dans toutes les directions de l'espace, et de profondeur de pénétration dans les tissus biologiques. Actuellement son champ d'application est toutefois restreint par la difficulté de produire des images dynamiques d'échantillons *in vivo*.

Les contraintes qui limitent ce développement sont essentiellement d'ordre technologique. La réalisation de détecteurs matriciels, avec des capacités de charge des puits d'électrons et des fréquences d'acquisitions plus importantes, amélioreront probablement dans quelques années les performances de l'OCT plein champ. De même la production de sources faiblement cohérentes spatialement, mais néanmoins très intenses, sera un enjeu à suivre. L'emploi d'un laser aléatoire, pour lequel la cavité est remplacée par un milieu diffusant, a, par exemple, déjà été appliqué à l'OCT plein champ [Red11], et constitue une perspective intéressante. L'intensité lumineuse incidente sur l'échantillon devra cependant rester en-deçà des seuils de dommage des échantillons. L'utilisation d'un laser supercontinuum, avec un degré de cohérence spatiale réduit, est une alternative que nous avons pu tester expérimentalement, et qui pourrait convenir à l'OCT plein champ, même si la présence d'un pic d'émissivité autour de la longueur d'onde de 1000nm dégrade quelque peu la réponse impulsionnelle axiale du système.

Afin de profiter au mieux des capacités de résolution spatiale des systèmes d'OCT plein champ, l'ajout d'un dispositif d'optique adaptative permettrait non seulement d'améliorer la résolution des images en profondeur, mais également d'étendre la profondeur de pénétration en augmentant le rapport signal sur bruit des images. Quelques travaux ont déjà été initiés en ce sens en OCT plein champ [Bla09]. Un tel système pourrait conduire à la réalisation d'un microscope capable de distinguer, de façon non invasive, des structures à une échelle subcellulaire, tout en garantissant un sectionnement axial efficace et une profondeur d'imagerie de plusieurs centaines de micromètres. D'autre part la correction du front d'onde et des aberrations géométriques, réalisée grâce à la technique d'optique adaptative, pourrait également faciliter l'imagerie *in vivo* en compensant les effets indésirables liés aux mouvements de l'échantillon imagé.

Remerciements

Au cours de ces trois années de doctorat, j'ai eu l'occasion de travailler et de côtoyer différentes personnes qui m'ont toutes, d'une façon ou d'une autre, enrichi professionnellement ou personnellement. Je tiens donc à remercier ces collègues d'un temps, qui seront pour longtemps, et même peut-être plus sait-on jamais, rattachés à cette expérience quelque peu particulière de la thèse.

Mes remerciements s'adressent tout d'abord à mon directeur de thèse, Arnaud Dubois, qui a accepté de diriger mes travaux pendant ces trois années et avec qui ce fut un réel plaisir de travailler. Je tiens à le remercier sincèrement pour sa très grande pédagogie, pour avoir répondu très clairement et patiemment à mes questions et pour s'être rendu disponible autant que possible. Je lui suis également reconnaissant d'avoir guidé et orienté mes travaux tout en me laissant cette espace de liberté qui m'a permis d'évoluer sereinement et relativement efficacement.

Je tiens également à remercier Karen Perronet et Julien Moreau qui ont toujours pris le temps de m'aider et me conseiller lorsque je les sollicitais. Merci à Julien pour les nombreuses fois où il est descendu dans ma salle de manip et pour sa précieuse expertise.

Je n'oublie pas non plus Houssine Makhoul et bien sûr Masreshaw Demelash qui m'ont épaulé au début de ma thèse et m'ont permis de lancer mes premières expériences. Merci Mas d'avoir pris le temps de débayer mes programmes Labview pendant ta rédaction, et merci pour tout ce que tu as partagé avec moi : l'histoire du mouvement Rasta et le restaurant Menelik resteront des expériences originales et enrichissantes chacune dans leur domaine.

Merci à mon coloc' de bureau Mitradeep Sarkar et aux nombreux cafés pris ensemble. Bonne fin de thèse et bonne chance pour la suite.

La grande ligne droite du campus de Polytechnique ne sera jamais plus la même depuis nos footings avec Alexandra parcourus dans le froid et vent de face : tu es désormais prête à aborder le climat helvète, aussi rigoureux soit-il. Merci pour ton soutien et également pour ces incroyables épices Bubba Gump ramenées de San Francisco. Je tiens également à souligner la bonne humeur de Flavie et des autres membres du groupe Biophotonique, Aurore, Jonas, Nicolas, Nathalie Barbier, Nathalie Westbrook sans oublier notre chef de groupe Michaël Canva avec qui ce fut toujours très agréable de discuter et à qui je souhaite bon vent dans les plaines canadiennes.

Félicitations aux membres de Damae Medical, Anaïs Barut, David Siret, Olivier Levecq et Hicham Azimani pour le développement cette jeune entreprise prometteuse que j'ai vue grandir à distance depuis le projet FIE.

J'en profite pour remercier Jérémie et l'équipe de foot du laboratoire Charles Fabry pour ses performances au tournoi inter-laboratoires et pour notre presque-qualification pour les phases finales !

Les différents enseignements que j'ai dirigés à l'Institut d'Optique en tant que chargé de TPs ou de TDs ont été une expérience très intéressante et enrichissante et j'aimerais à ce propos remercier Thierry Avignon, Cédric Lejeune, Guilhem Boeris et Monder Besbes avec qui ce fut un plaisir de travailler. Je suis également reconnaissant envers Frédéric Pain et Amandine Gnaedinger du Laboratoire IMNC pour m'avoir fourni plusieurs échantillons de souris ainsi qu'envers Wallis Nahaboo pour ses échantillons cellulaires. J'ai eu par ailleurs l'opportunité de participer à l'école thématique Mifobio et je remercie les organisateurs et l'ensemble de la communauté pour la qualité des sujets, de l'organisation et de l'ambiance lors de cette semaine qui a permis de proposer un visage plaisant de la recherche scientifique.

J'ai également eu la chance de participer à des projets coopératifs qui m'ont permis notamment de travailler durant deux mois avec un doctorant de l'université de Saratov, Anton Grebenyuk, dont les connaissances et l'expertise théoriques nous ont permis de réaliser un système d'imagerie original et dont le développement se poursuivra je l'espère dans les années à venir.

Durant la fin de ma deuxième année de thèse j'ai également travaillé pendant deux mois à l'Université de Stanford au sein du Stanford Biomedical Group dirigé par Audrey Ellerbee. Je tiens donc à remercier Audrey Ellerbee et l'ensemble de ce groupe de recherche et en particulier Henrique Sergio Gutierrez Costa pour leur accueil. Merci à mon directeur de thèse d'avoir accepté ce projet et cette coopération qui m'ont permis de vivre une expérience professionnelle et personnelle très enrichissante.

Enfin, sur un plan plus personnel, j'aimerais remercier un certain nombre de personnes grâce auxquelles j'ai pu réaliser cette thèse et traverser ces trois années de façon très agréable.

Merci tout d'abord à Florence qui m'a accompagné durant ces trois années, merci pour son soutien, merci pour ces voyages en France ou à l'étranger, merci tout simplement d'être toi et d'être là à mes côtés !

Je remercie mes parents qui m'ont soutenu et guidé tout au long de mes études. Merci de m'avoir inculqué le plaisir d'apprendre et de la découverte, votre goût pour les sciences et l'histoire et merci pour toutes vos analyses qu'ils s'agissent de films, de livres ou de faits historiques qui m'ont permis d'observer et d'appréhender différemment ce qui m'entoure avec, je l'espère, presque autant de pertinence que vous. J'ai finalement peut-être réussi à "tenir jusqu'à ce que l'on me relève" sans chercher à tout prix "à me battre dans l'espoir du succès". Je souhaite remercier également mes deux sœurs pour m'avoir fait partager et transmis leurs expériences et pour avoir veillé sur moi toutes ces années. Merci aussi à leur conjoint/mari, notamment pour les nombreuses courses auxquelles on a participé ensemble avec Julien ou pour les diverses activités plus ou moins folkloriques faites avec Benjamin. Merci également aux chaleureux membres de la famille Wateriaux et enfin merci à mon grand-père Jacques et à mes grands-parents pour le temps et l'attention qu'ils m'ont consacré.

Même si je ne peux pas citer toutes les personnes qui ont compté et que j'ai côtoyées au cours de ces dernières années, certaines sont aujourd'hui essentielles pour moi et je tiens ainsi à remercier Nicolas, Alice, Pacifique et Jeanne pour ce que vous m'avez apporté et tout ce que l'on a partagé de Jard à l'Ariège en passant par la Butte aux cailles et le café Léa. Merci aussi à Beubeu, notamment pour ces déjeuners incontournables durant ma thèse. Un remerciement spécial à Benjamin, Annabel et Sarah et merci aux gens de Phasics, de Supop, de Buffon, de Rodin, de Braque, du RCC, de l'USCMB et du PUC, qui m'ont permis d'arriver jusqu'ici

Remerciements

aujourd'hui et d'écrire ces derniers mots de mon manuscrit de thèse.

Annexe A

Calcul du signal détecté en considérant une modulation de phase sinusoïdale et un algorithme à 4 images adapté

On note $I(r, t)$ l'intensité détectée par chaque pixel de la caméra à l'instant t et selon sa position dans l'espace, notée r . Celle-ci s'exprime de façon simplifiée en fonction d'une intensité $I_b(r)$ constante au cours du temps et de $A(r)$ qui contient le terme de signal utile correspondant au coefficient de réflexion de l'échantillon (voir Eq. (1.27) du chapitre 1) :

$$I(r, t) = I_b(r) + A(r)\cos[\phi(r) + \psi\sin(\omega t + \theta)] \quad , \quad (\text{A.1})$$

où $\phi(r)$ est une phase constante alors que ψ et θ correspondent respectivement à l'amplitude et à la phase du signal de modulation de pulsation ω contrôlant la platine piézoélectrique.

On développe l'expression de I de sorte à faire apparaître les fonctions de Bessel J_n de première espèce :

$$I(r, t) = I_b(r) + A(r)\cos(\phi(r))\cos(\psi\sin(\omega t + \theta)) - A(r)\sin(\phi(r))\sin(\psi\sin(\omega t + \theta)) \quad (\text{A.2})$$

On rappelle que par définition,

$$\forall X \in \mathbb{R}, \quad J_n(X) = \sum_{k=0}^{\infty} \frac{(-1)^k}{k!(n+k)!} \left(\frac{x}{2}\right)^{2k+n} \quad (\text{A.3})$$

D'après la formule de Jacobi-Anger, on obtient la relation suivante :

$$\begin{aligned} \forall X \in \mathbb{R}, \quad e^{iX \sin(\varphi)} &= \sum_{k=-\infty}^{\infty} e^{in\varphi} J_n(X) \\ \Rightarrow \quad \begin{cases} \cos(X \sin(\varphi)) &= \sum_{k=-\infty}^{\infty} J_n(X) \cos(n\varphi) \\ \sin(X \sin(\varphi)) &= \sum_{k=-\infty}^{\infty} J_n(X) \sin(n\varphi) \end{cases} \\ \Rightarrow \quad \begin{cases} \cos(X \sin(\varphi)) &= J_0(X) + 2 \sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(X) \cos(2k\varphi) \\ \sin(X \sin(\varphi)) &= J_0(X) + 2 \sum_{k=1}^{\infty} J_{2k-1}(X) \sin((2k-1)\varphi) \end{cases} \end{aligned} \quad (\text{A.4})$$

On en déduit donc d'après A.2 et A.4 l'égalité qui suit :

$$\begin{aligned} I(r, t) &= I_b(r) + A(r) \cos(\phi(r)) \left[J_0(\psi) + 2 \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n}(\psi) \cos(2n(\omega t + \theta)) \right] \\ &\quad - A(r) \sin(\phi(r)) \left[J_0(\psi) + 2 \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n-1}(\psi) \sin((2n-1)(\omega t + \theta)) \right] \end{aligned} \quad (\text{A.5})$$

Soit $p \in \llbracket 1; 4 \rrbracket$, on note $I_p(r)$ l'intensité intégrée de la $p^{\text{ème}}$ image tomographique qui s'écrit :

$$I_p(r) = \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} I(r, t) dt \quad , \quad (\text{A.6})$$

où $T = \frac{2\pi}{\omega}$ est la période du signal sinusoïdal.

On en déduit alors que :

$$\begin{aligned} I_p(r) &= \frac{T}{4} (I_b(r) + A(r) J_0(r) [\cos(\phi(r)) - \sin(\phi(r))]) \\ &\quad + 2A(r) \cos(\phi(r)) \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n}(\psi) \operatorname{Re} \left(e^{i2n(\omega t + \theta)} \right) dt \\ &\quad - 2A(r) \sin(\phi(r)) \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n-1}(\psi) \operatorname{Im} \left(e^{i(2n-1)(\omega t + \theta)} \right) dt \end{aligned} \quad (\text{A.7})$$

Annexe A. Calcul du signal détecté en considérant une modulation de phase sinusoïdale et un algorithme à 4 images adapté

Puisque $\forall \psi \in \mathbb{R}, \forall t \in \mathbb{R}, \forall n \in \mathbb{N}, |J_n(\psi)e^{i2n\omega t}|$ est borné, alors la série $\sum_{n>0} J_n(\psi)e^{i2n\omega t}$ converge uniformément sur tout compact de \mathbb{R} et donc a fortiori sur l'intervalle $[(p-1)T/4; pT/4]_{p \in [1;4]}$

On en déduit donc que $\int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} \sum_{n=1}^{\infty} J_{2n}(\psi)e^{i2n(\omega t+\theta)} dt = \sum_{n=1}^{\infty} \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} J_{2n}(\psi)e^{i(2n-1)(\omega t+\theta)} dt$.

Or puisqu'une suite converge si et seulement si sa partie réelle et sa partie imaginaire converge, on conclut donc que :

$$\begin{aligned} I_p(r) &= \frac{T}{4} (I_b(r) + A(r)J_0(r) [\cos(\phi(r)) - \sin(\phi(r))]) \\ &\quad + 2A(r)\cos(\phi(r)) \operatorname{Re} \left(\sum_{n=1}^{\infty} J_{2n}(\psi) \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} e^{i2n(\omega t+\theta)} dt \right) \\ &\quad - 2A(r)\sin(\phi(r)) \operatorname{Im} \left(\sum_{n=1}^{\infty} J_{2n-1}(\psi) \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} e^{i(2n-1)(\omega t+\theta)} dt \right) \end{aligned} \quad (\text{A.8})$$

Soit $n \in \mathbb{N}^*$, on note alors $Q_{1n,p} = \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} e^{i2n(\omega t+\theta)} dt$ et $Q_{2n,p} = \int_{(p-1)\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}} e^{i(2n-1)(\omega t+\theta)} dt$, avec $\omega = 4\pi/T$.

$$\begin{aligned} Q_{1n,p} &= \frac{T e^{2in\theta}}{4\pi in} (e^{in p\pi} - e^{in(p-1)\pi}) \\ &= \frac{T e^{2in\theta}}{4\pi n} \times (-1)^{n(p-1)+1} \times i \times [(-1)^n - 1] \end{aligned} \quad (\text{A.10})$$

$Q_{1n,p}$ est donc nul si n est pair. Soit $q \in \mathbb{N}^*$, tel que $n = 2q - 1$, ainsi :

$$Q_{1q,p} = \frac{2T e^{2i\theta(q+1)}}{4\pi(2q+1)} \times i \times (-1)^{p-1} \quad (\text{A.11})$$

D'autre part,

$$\begin{aligned} Q_{2n,p} &= \frac{T e^{i(2n-1)\theta}}{2\pi i(2n-1)} \left[e^{i(2n-1)p\frac{\pi}{2}} - e^{i(2n-1)(p-1)\frac{\pi}{2}} \right] \\ &= \frac{T e^{i(2n-1)\theta}}{2\pi(2n-1)} \times (-1)^{p(n+1)+1} \times i^p [i + (-1)^{-n}] \end{aligned} \quad (\text{A.12})$$

Si p est pair, soit $q \in \mathbb{N}^*$ tel que $p = 2q$:

$$Q_{2n,q} = \frac{T e^{i(2n-1)\theta}}{2\pi(2n-1)} \times (-1)^q \times [-i + (-1)^{n+1}] \quad (\text{A.13})$$

Annexe A. Calcul du signal détecté en considérant une modulation de phase sinusoïdale et un algorithme à 4 images adapté

Si p est impair, soit $q \in \mathbb{N}^*$ tel que $p = 2q - 1$:

$$Q_{2n,q} = \frac{T e^{i(2n-1)\theta}}{2\pi(2n-1)} \times (-1)^{q+1} \times [i + (-1)^{n+1}] \quad (\text{A.14})$$

On en déduit donc que $\forall p \in \mathbb{N}^*$:

$$Q_{2n,p} = \frac{T e^{i(2n-1)\theta}}{2\pi(2n-1)} \times (-1)^{\lfloor \frac{p}{2} \rfloor + 1} \times [(-1)^{p+1} \times i + (-1)^{n+1}] \quad , \quad (\text{A.15})$$

où la fonction $x \rightarrow \lfloor x \rfloor$ correspond à la partie entière du réel x .

L'intensité du champ, de la $p^{\text{ème}}$ image, modulé par une phase sinusoïdale s'écrit donc (d'après (A.9), (A.11) et (A.15)) :

$$\begin{aligned} I_p(r) = & \frac{T}{4} (I_b(r) + A(r) \cos(\phi(r)) J_0(r)) + \frac{A(r) T \cos(\phi(r))}{\pi} \times (-1)^p \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{4n-2}(\psi)}{2n-1} \sin(2\theta(2n-1)) \\ & + \frac{A(r) T \sin(\phi(r))}{\pi} \times (-1)^{\lfloor \frac{p}{2} \rfloor + 1} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} [(-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) + (-1)^{p+1} \cos((2n-1)\theta)] \end{aligned} \quad (\text{A.16})$$

On applique ensuite l'algorithme à 4 images utilisé afin d'extraire le signal utile $\Upsilon(r)$ qui correspond à la combinaison d'images suivante :

$$\Upsilon(r) = \sqrt{(I_1(r) - I_2(r))^2 + (I_3(r) - I_4(r))^2} \quad (\text{A.17})$$

$$\begin{aligned} \text{En posant } \begin{cases} \Gamma_u = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{4n-2}(\psi)}{2n-1} \sin(2\theta(2n-1)) \\ \Gamma_v = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} (-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) \end{cases} & \quad \text{on déduit de (A.16) que,} \\ \Upsilon(r) = \frac{2\sqrt{2}A(r)T}{\pi} \sqrt{[\Gamma_u \cos(\phi(r))]^2 + [\Gamma_v \sin(\phi(r))]^2} & \quad (\text{A.18}) \end{aligned}$$

Comme on l'a dit (voir la sous-section 2.2.4 du deuxième chapitre), on impose $I_1 = I_3$ de sorte à ce que l'algorithme soit indépendant de l'ordre dans lequel les images sont acquises. On doit donc satisfaire la relation suivante :

Soit $(\psi, \theta) \in \mathbb{R} \times [0; 2\pi[$, $\forall r \in \mathbb{R}$,

$$\begin{aligned}
 & - \frac{A(r)T \sin(\phi(r))}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} [(-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) + \cos((2n-1)\theta)] \\
 & = \frac{A(r)T \sin(\phi(r))}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} [(-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) + \cos((2n-1)\theta)] \\
 \Leftrightarrow & \quad \forall n \in \mathbb{N}^*, \quad \frac{J_{2n-1}(\psi)}{2n-1} [(-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) + \cos((2n-1)\theta)] = 0 \\
 \Leftrightarrow & \quad \forall n \in \mathbb{N}^*, \quad (-1)^{n+1} \sin((2n-1)\theta) + \cos((2n-1)\theta) = 0 \tag{A.19}
 \end{aligned}$$

Puisque $\forall x \in \mathbb{R}, \forall n \in \mathbb{N}$, $\begin{cases} \sin(x + n\pi) = (-1)^n \sin(x) \\ \cos(x) = \sin(x + \pi/2) \end{cases}$ alors

$$\begin{aligned}
 \text{Eq. (A.19)} \quad \Leftrightarrow & \quad \forall n \in \mathbb{N}^*, \quad \sin((2n-1)\theta + n\pi) = \sin((2n-1)\theta + \pi/2) \\
 \Leftrightarrow & \quad \forall n \in \mathbb{N}^*, \exists k \in \mathbb{Z} \text{ tel que } (2n-1)\theta + n\pi + \frac{\pi}{2} = 2k\pi \tag{A.20}
 \end{aligned}$$

On montre que $\theta = \pi/4$ et $\theta = 5\pi/4$ sont deux solutions de (A.20). Si $n = 1$, ces solutions sont les uniques solutions dans l'intervalle $[0; 2\pi[$. On en déduit donc que :

$$\forall n \in \mathbb{N}^*, \exists k \in \mathbb{Z} \text{ tel que } (2n-1)\theta + n\pi + \frac{\pi}{2} = 2k\pi \Leftrightarrow \left(\theta = \frac{\pi}{4} \text{ ou } \theta = \frac{5\pi}{4} \right) \tag{A.21}$$

D'autre part, d'après Eq. (A.18), S est proportionnel à A et indépendant de ϕ , si et seulement si $\Gamma_u = \Gamma_v$. Dans ce cas le signal détecté vaut :

$$\Upsilon(r) = A(r) \times \frac{2\sqrt{2}T\Gamma}{\pi}, \quad \text{avec } \Gamma = \Gamma_u = \Gamma_v \tag{A.22}$$

On cherche donc, d'après (A.21) et (A.22), le couple $(\theta_0, \psi_0) \in \{\pi/4, 5\pi/4\} \times \mathbb{R}$ tel que $\Gamma_u(\theta, \psi) = \Gamma_v(\theta, \psi)$ et qui maximise Γ . En simulant numériquement les expressions de Γ_u et Γ_v , on en déduit que $(\theta_0, \psi_0) = (\pi/4, 2,073)$ satisfait ces deux conditions et que $\Gamma = 0,37$.

Annexe B

Calcul de la fonction d'autocorrélation Γ en présence de différences de dispersion

On reprend les formules déjà mentionnées dans le chapitre 3, qui établissent l'expression de la densité spectrale de puissance, S , de la fonction d'autocorrélation, Γ , et de la phase induite par la traversée d'un milieu dispersion d'épaisseur, $2L$, puisque la lumière rétrodiffusée parcourt deux fois la distance L correspondant à l'épaisseur de l'échantillon :

$$S(\omega) = \exp \left[-4 \ln 2 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{\Delta\omega^2} \right] \quad (\text{B.1})$$

$$\Gamma(\tau) = \int_{-\infty}^{\infty} W_{12}(\omega) e^{-i\omega\tau} d\omega, \quad \text{avec} \quad W_{12}(\omega) = U_1(\omega)U_2(\omega) \quad (\text{B.2})$$

$$\begin{aligned} \Gamma(\tau) &= \int_{-\infty}^{\infty} U_1(\omega)U_1^*(\omega) e^{i\phi(\omega)} e^{-i\omega\tau} d\omega \\ &= \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) e^{-i\phi(\omega)} e^{-i\omega\tau} d\omega \end{aligned} \quad (\text{B.3})$$

$$\phi(\omega) = \left[\Phi_0 + \Phi_1(\omega - \omega_0) + \Phi_2 \frac{(\omega - \omega_0)^2}{2} \right] 2L + o(\omega - \omega_0)^2, \quad (\text{B.4})$$

où ω_0 est la pulsation moyenne du spectre considéré, $\Phi_1 = \left. \frac{dk(\omega)}{d\omega} \right|_{\omega=\omega_0}$ est la vitesse de groupe, et $\Phi_2 = \left. \frac{dk^2(\omega)}{d\omega^2} \right|_{\omega=\omega_0}$ correspond à la dispersion de la vitesse de groupe, qu'on nommera GVD (pour *group velocity dispersion* en anglais).

On suppose que le spectre utilisé est suffisamment étroit pour qu'on puisse identifier ϕ à son développement limité au deuxième ordre pour toutes les fréquences du spectres. En développant l'expression de la phase ϕ d'après l'équation (B.4), on obtient :

$$\Gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} \int_{-\infty}^{\infty} S(\omega) e^{-iL\Phi_2(\omega-\omega_0)^2} e^{-i(\omega-\omega_0)(\tau-2L\Phi_1)} d\omega \quad (\text{B.5})$$

En combinant les équations (B.1) et (B.6), on obtient :

$$\Gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} \int_{-\infty}^{\infty} \exp\left[-4\ln 2 \frac{(\omega-\omega_0)^2}{\Delta\omega^2}\right] e^{-iL\Phi_2(\omega-\omega_0)^2} e^{-i(\omega-\omega_0)(\tau-2L\Phi_1)} d\omega \quad (\text{B.6})$$

En utilisant la propriété des transformées de Fourier stipulant que :

$$TF\left[\sigma_\tau \exp\left(\frac{-\sigma_\tau^2 \omega^2}{4\pi}\right)\right] = \exp\left[-\pi \frac{t}{\sigma_\tau^2}\right] \quad (\text{B.7})$$

On en déduit donc l'égalité suivante :

$$\begin{aligned} \Gamma(\tau) &= e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left[-\pi \frac{(\tau-2L\Phi_1)^2}{4\pi \left(\frac{4\ln 2}{\Delta\omega^2} + iL\Phi_2\right)}\right] \\ &= e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left[-\frac{1}{4} \frac{(\tau-2L\Phi_1)^2}{\left(\frac{4\ln 2 \Delta\tau^2}{(8\ln 2)^2} + i\Phi_2 L\right)}\right] \quad \text{puisque} \quad \Delta\tau = \frac{8\ln 2}{\Delta\omega} \quad (\text{Eq. (3.4)}) \\ &= e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left[\frac{-4\ln 2}{\Delta\tau^2 + i16\ln 2\Phi_2 L} (\tau-2L\Phi_1)^2\right] \\ &= e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left[\frac{-\Delta\tau^2}{\Delta\tau^4 + (16\ln 2\Phi_2 L)^2} 4\ln 2 (\tau-2L\Phi_1)^2\right] \exp\left[i \frac{(8\ln 2)^2 L (\tau-2L\Phi_1)^2}{\Delta\tau^4 + (16\ln 2\Phi_2 L)^2}\right] \end{aligned} \quad (\text{B.8})$$

et donc finalement :

$$\Gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left[-\frac{\Delta\tau^2}{\Delta\tau^4 + (16\ln 2\Phi_2 L)^2} 4\ln 2 \tau^2\right] \exp[i\Psi(\tau-2L\Phi_1)^2] \quad (\text{B.9})$$

$$\text{en posant } \Psi = \frac{(8\ln 2)^2 L}{\Delta\tau^4 + (16\ln 2\Phi_2 L)^2}$$

En réécrivant Γ de sorte à faire ressortir sa nouvelle largeur à mi-hauteur $\Delta\tau_s$, on calcule la modification de l'enveloppe, et de la résolution axiale Δz due à la présence de différence de dispersion :

$$\Gamma(\tau) = e^{-i\omega_0\tau} e^{i2L\Phi_0} * \exp\left(-\frac{4\ln 2 \tau^2}{\Delta\tau_s^2}\right) \exp[i\Psi(\tau-2L\Phi_1)^2], \quad \text{avec} \quad \Delta\tau_s^2 = \frac{\Delta\tau^4 + (16\ln 2\Phi_2 L)^2}{\Delta\tau^2} \quad (\text{B.10})$$

Puisque $\Delta z = c\Delta\tau/2$ on en déduit la relation suivante :

$$\Delta z_d^2 = \Delta z^2 + \frac{(4c^2 \ln 2 \Phi_2 L)^2}{\Delta z^2} \quad (\text{B.11})$$

Exprimons désormais le terme de dispersion de la vitesse de groupe Φ_2 qui est définie par la relation $\Phi_2 = d^2\omega/dk^2$. On rappelle la définition de la vitesse de groupe $v_g = d\omega/dk$ qui peut s'exprimer en fonction de la vitesse de phase de la façon suivante :

$$\begin{aligned} v_g &= \frac{d(kv_\phi)}{dk} = v_\phi + k \frac{dv_\phi}{dk} = \frac{c}{n} + \frac{2\pi}{\lambda} \frac{dv_\phi}{d\lambda} \frac{d\lambda}{dk} \\ \Leftrightarrow v_g &= \frac{c}{n} - \lambda \frac{dv_\phi}{d\lambda} = \frac{c}{n} - c\lambda \frac{d(1/n)}{d\lambda} \end{aligned} \quad (\text{B.12})$$

En posant $n_g = n - \lambda \frac{dn}{d\lambda}$, il découle que $v_g = \frac{c}{n_g}$. Or, puisque $\Phi_2 = d^2k/d\omega^2$, cela implique que :

$$\Phi_2 = \frac{d(dk/d\omega)}{d\omega} \Big|_{\omega_0} = \frac{d\left(\frac{1}{v_g}\right)}{d\omega} \Big|_{\omega_0} \quad (\text{B.13})$$

D'après (B.12), on en déduit que

$$\begin{aligned} \Phi_2 &= \frac{1}{c} \frac{dn_g}{d\omega} \Big|_{\omega_0} = \frac{1}{c} \left(\frac{dn_g}{d\lambda} \Big|_{\lambda_0} \frac{d\lambda}{d\omega} \Big|_{\omega_0} \right) = -\frac{\lambda_0^2}{2\pi c^2} \left(\frac{dn_g}{d\lambda} \Big|_{\lambda_0} \right) \\ \Leftrightarrow \Phi_2 &= \frac{\lambda_0^3}{2\pi c^2} \frac{d^2n}{d\lambda^2} \quad \text{puisque} \quad \frac{dn_g}{d\lambda} = -\lambda_0 \frac{d^2n}{d\lambda^2} \end{aligned} \quad (\text{B.14})$$

En intégrant l'expression de la dispersion de la vitesse de groupe Φ_2 dans B.11, on calcule donc l'expression de la résolution axiale en présence d'une différence de dispersion Δz_d en fonction de la résolution axiale sans intervention de la dispersion Δz :

$$\Delta z_d^2 = \Delta z^2 + \left(\frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{d^2n}{d\lambda^2} \lambda_0^3 L \right)^2, \quad (\text{B.15})$$

où λ_0 est la longueur d'onde centrale du spectre et L l'épaisseur de l'échantillon dispersif.

Annexe C

Degré de cohérence spatiale

Afin d'introduire le degré de cohérence spatiale, noté g , on présente l'expérience classique des fentes d'Young, illuminées par une onde monochromatique et partiellement cohérente spatialement. En analysant le signal d'interférence et le contraste des franges il est alors possible de mettre en évidence le rôle de g :

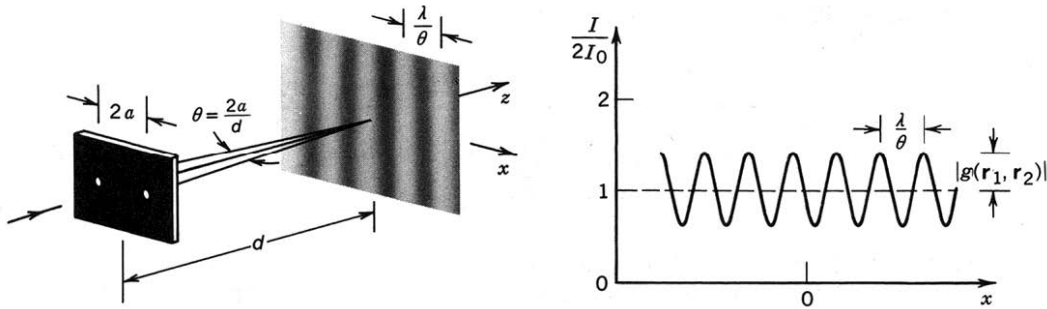


FIGURE C.1 – Schéma de l'expérience des fentes d'Young et figure d'interférences formée sur l'écran (ou détecteur).

L'onde issue de la source est diffractée par les deux trous A et B de l'écran opaque, localisés en $r = r_1$ et $r = r_2$ respectivement, qui génèrent chacun une onde sphérique, d'amplitudes notées U_A et U_B . L'intensité mesurée sur le détecteur s'exprime de la façon suivante :

$$I = \langle |U_A + U_B|^2 \rangle = \langle |U_A|^2 \rangle + \langle |U_B|^2 \rangle + \langle U_A U_B^* \rangle + \langle U_A^* U_B \rangle \quad , \quad (C.1)$$

où $\langle \quad \rangle$ dénote la moyenne temporelle intégrée par le détecteur. L'hypothèse d'ergodicité du champ l'identifie à une moyenne d'ensemble.

D'après les notations de la figure C.1, on montre par un calcul usuel qu'en supposant les deux ondes sphériques d'intensité I_0 , on peut écrire :

$$I(x) = 2I_0 \left[1 + |g(r_1, r_2)| \cos \left(\frac{2\pi\theta}{\lambda} x + \varphi \right) \right], \quad \text{avec} \quad g(r_1, r_2) = \frac{\langle U_A^*(r_1, t) U_B(r_2, t) \rangle}{I_0} \quad (C.2)$$

La fonction g détermine donc le contraste de l'interférogramme (voir Fig. C.1) qui dépend ainsi de la corrélation entre les ondes d'amplitude U_A et U_B . La fonction de corrélation entre deux signaux aléatoires que sont les champs électromagnétiques (qui sont aussi stationnaires et déterministes) est liée à la relation de phase entre les deux ondes concernées. Elle caractérise la capacité d'un point S de la source à envoyer des ondes de phases corrélées en A et B .

On définit alors le degré de cohérence spatiale de la lumière comme la fonction de corrélation normalisée du champ en deux points $r = r_1$ et $r = r_2$ séparés d'une distance $\Delta r = r_2 - r_1$. Ce degré de cohérence spatiale noté g s'écrit alors de la façon suivante :

$$g(r_1, r_2) = \frac{\langle U^*(r_1, t)U(r_2, t) \rangle}{\sqrt{I(r_1)I(r_2)}} \quad (\text{C.3})$$

Pour un point fixé A , situé en $r = r_1$, la zone de l'espace localisée par la position r telle que $|g(r, r_1)| \geq 1/2$ est alors appelée zone de cohérence autour du point A . Dans le cas d'une lumière strictement cohérente cette zone est infiniment étendue et elle est réduite à un point pour un champ totalement incohérent. Ces deux cas extrêmes sont rarement obtenus en pratique et on considère plutôt des champs partiellement cohérents spatialement.

Pour une source donnée, le degré de cohérence est alors lié à l'étendue spatiale de l'ouverture à travers laquelle la lumière est transmise : si cette ouverture est faible par rapport à la zone de cohérence, la lumière peut être considérée comme quasiment cohérente, alors que si elle est grande par rapport à cette zone définie, on considèrera le champ émis comme faiblement cohérent spatialement.

En prenant l'exemple d'une source carrée étendue sur la surface $(x, y) \in [-L_s/2, L_s/2]^2$, dans l'expérience des fentes d'Young, et positionnée à une distance D en amont des fentes, on peut montrer que le contraste de l'interférogramme et donc le degré de cohérence g_s suit l'équation (C.4) [Plu88]. Cette relation découle du théorème de Zernike et Van Cittert qui stipule que le degré de cohérence spatiale est proportionnel à la transformée de Fourier de la fonction caractérisant l'étendue de la source lumineuse.

$$g_s = \text{sinc} \left(\frac{2aL_s}{\lambda D} \right) \quad (\text{C.4})$$

On en déduit donc que plus l'étendue de la source L_s est faible, plus le degré de cohérence spatiale est important, pour des valeurs de a et D adaptées.

On précise que cette équation suppose une source usuelle non cohérente spatialement (*i.e.* hors laser par exemple) dont l'émission repose sur le processus d'émission spontanée de photons. Les champs émis par les différents points, notés S^p , sont donc décorrélés car il n'existe pas de relation de phase stable dans le temps entre les ondes qu'elles émettent qui sont totalement indépendantes sur les intervalles de temps considérés (*i.e.* temps d'intégration du détecteur). Cela se traduit par le fait, qu'en notant U_A^p l'amplitude de l'onde émise par le point S^p et diffractée par le point A , $\langle U_A^{p*} U_A^q \rangle = |U_A|^2 \delta_{pq}$ et $\langle U_A^{p*} U_B^q \rangle = \langle U_A^{p*} U_B^q \rangle \delta_{pq}$ où δ est la fonction de Dirac.

Avec un système d'illumination Köhler (voir Fig. 1.24), comme utilisé en OCT plein champ, il est donc possible de faire varier les propriétés de cohérence spatiale du champ incident en

modifiant la taille du diaphragme d'ouverture. Bien que la zone de cohérence d'une lampe thermique soit de l'ordre de λ^2 , et que l'illumination est souvent supposée incohérente ou faiblement cohérente, il est malgré tout possible d'observer un effet sur les propriétés de cohérence du champ d'illumination du fait de la modification du diamètre du diaphragme d'ouverture.

On distingue alors trois cas représentatifs : un diaphragme très fermé (approximé comme ponctuel), un diaphragme très ouvert et un cas intermédiaire d'ouverture. Dans le premier cas, le champ d'illumination peut-être assimilé à une onde plane et donc à un champ cohérent spatialement, alors que dans les autres cas le champ incident est une superposition d'une multitude d'ondes planes d'inclinaisons différentes (champ incohérent ou partiellement cohérent selon l'ouverture).

On précise que dans le cas d'un système d'imagerie interférométrique qui utilise un objectif de microscope dans le bras échantillon, si une illumination faiblement cohérente spatialement est employée, comme c'est le cas en OCT plein champ, il est nécessaire de disposer un objectif également dans le bras référence.

En effet, dans le cas contraire, un rayon lumineux issu d'un point de la source hors axe serait détecté par un pixel différent selon qu'il soit réfléchi par l'échantillon ou la surface de référence, et aucune interférence constructive ne serait alors détectée.

On peut également expliquer cela en soulignant qu'un pixel hors axe détecterait deux photons issus de deux points de la source différents sans, par conséquent, produire d'interférences contrastées étant donnée la longueur de cohérence spatiale restreinte. Ce type d'arrangement est par contre possible en holographie numérique qui utilise une source laser, cohérente spatialement.

Annexe D

Fonction de transfert optique

En considérant un signal d'entrée, représenté par la fonction f_i , il existe une relation mathématique qui le relie au signal de sortie, noté f_s , correspondant au signal détecté après la traversé d'un système optique par l'intermédiaire d'une fonction appelée réponse impulsionnelle (RI) et qui caractérise le système :

$$f_s(x, y) = [RI * f_i]_{(x,y)}, \quad \text{où } * \text{ représente le produit de convolution} \quad (\text{D.1})$$

La fonction de transfert optique (notée FTO) est alors définie comme la transformée de Fourier de la RI du système et rend compte de la faculté de ce dernier à transmettre les signaux en fonction de leurs fréquences spatiales (k_x, k_y) .

A partir de là, il est nécessaire de distinguer le cas d'un champ cohérent spatialement, pour lequel la formulation de l'Optique de Fourier s'applique aux amplitudes des signaux, avec celui d'un champ incohérent spatialement pour lequel on considère les intensités puisque le champ résultant est une superposition incohérente d'ondes planes. En considérant un système d'imagerie limité par la diffraction et dont la fonction pupillaire, distante de d du plan image, est notée p , on peut établir les relations suivantes [Gha78], en notant U l'amplitude et I l'intensité du champ.

$$\begin{array}{l} \text{Illumination} \\ \text{cohérente spatialement} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} U_s = h_{coh} * U_i \\ \tilde{U}_s = H_{coh} \times \tilde{U}_i \\ I = |h_{coh} * U_i|^2, \end{array} \right. \text{ avec } \begin{array}{l} h_{coh}(x, y) \simeq \tilde{p} \left(\frac{x}{\lambda d}, \frac{y}{\lambda d} \right) \\ H_{coh}(k_x, k_y) \simeq p(\lambda d k_x / (2\pi), \lambda d k_y / (2\pi)) \end{array} \\ \\ \text{Illumination} \\ \text{incohérente spatialement} \end{array} \left\{ \begin{array}{l} I_s = h * I_i \\ \tilde{I}_s = H \times \tilde{I}_i, \end{array} \right. \text{ avec } \begin{array}{l} h = |h_{coh}|^2 \\ H = \tilde{h} \end{array}$$

Il est alors usuel de désigner H_{coh} comme la fonction de transfert cohérente et H comme la fonction de transfert optique dont le module $|H|$ est appelé fonction de transfert de modulation (notée FTM). On remarque donc que la réponse du système dépend du degré de cohérence spatiale d'illumination. Si cette dernière est partiellement cohérente, la FTO n'est plus simplement l'autocorrélation de la fonction pupillaire mais fait également intervenir la densité spectrale de l'intensité lumineuse [Plu88].

Afin d'étudier l'allure de ces fonctions caractérisant un système d'imagerie, on considère le cas d'une pupille circulaire (de rayon a), comme cela est fréquent en pratique. La réponse impulsionnelle incohérente h s'identifie alors à la fonction tache d'Airy bien connue des opticiens et c'est cette fonction h qui est la plupart du temps considérée comme réponse impulsionnelle du système. On présente en figure D.1, l'allure des réponses impulsionnelles et des FTM dans trois situations de cohérence spatiale différentes : cohérent, partiellement cohérent, incohérent.

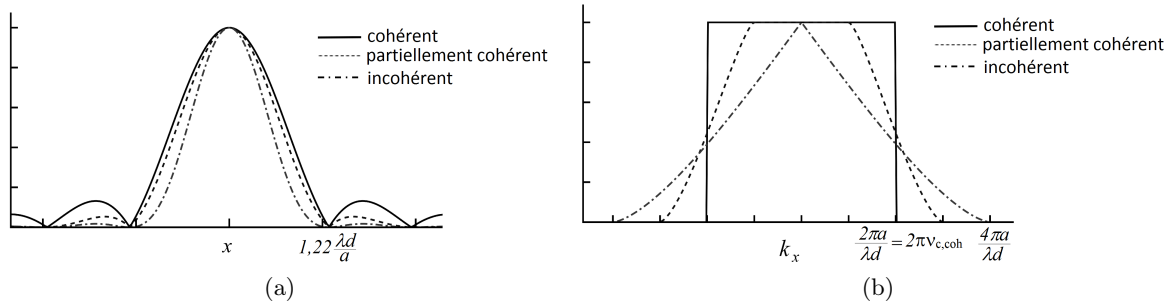


FIGURE D.1 – Réponse impulsionnelle (a) et fonction de transfert de modulation (b) d'un système d'imagerie limité par diffraction dont la fonction pupillaire est un disque de rayon a . d/a est l'ouverture numérique du système.

On observe donc qu'un système optique se comporte comme un filtre passe-bas des fréquences spatiales avec une fréquence de coupure doublée dans le cas incohérent par rapport à celle du cas cohérent, notée $\nu_{c,coh}$. Cela correspond à une résolution spatiale plus importante (*i.e.* une largeur à mi-hauteur de la réponse impulsionnelle réduite (voir Fig. D.1a)). En revanche l'amplitude de la FTM variant selon la fréquence k_x , le contraste des images est détérioré par rapport à la configuration d'une illumination cohérente pour laquelle l'amplitude de la FTM est constante.

La dépendance de l'allure de la FTM selon la cohérence spatiale du champ peut s'expliquer par une schématisation de la diffraction des rayons incidents par un échantillon diffusant, si l'on suppose des rayons proches de l'axe optique du système. En décomposant en séries de Fourier le profil spatial de l'échantillon, qui est une fonction continue de l'espace, on peut assimiler ce dernier à une superposition de fonctions sinusoïdales de fréquences Ω_i , chacune diffractant l'onde plane. Une sinusoïde de fréquence Ω_i diffractera alors une onde plane, parallèle à l'axe optique, dans deux directions symétriques dont l'angle θ_i avec l'axe optique est proportionnel à Ω_i (voir le schéma en figure D.2).

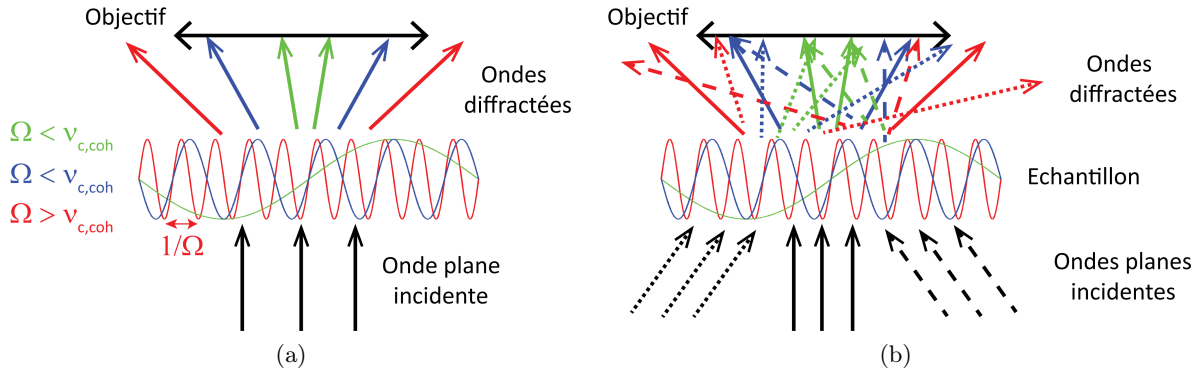


FIGURE D.2 – (a) : cas d'un champ d'illumination cohérent spatialement, assimilable à une onde plane qui est ensuite diffractée par les structures de l'échantillon de fréquence Ω_i variées. La transmission des fréquences spatiales est binaire. (b) : cas d'un champ d'illumination incohérent spatialement, représentable par une superposition d'ondes planes d'inclinaisons différentes. Des fréquences spatiales plus élevées sont transmises mais avec un contraste associé réduit du fait de la perte d'une partie des ondes diffractés.

La direction de l'onde diffractée dépendant de la fréquence de la modulation sinusoïdale, en considérant une unique onde plane incidente, compte tenu de l'ouverture limitée de la pupille de l'objectif, au-delà d'une certaine fréquence $\nu_{c,coh}$ de la sinusoïde, aucun vecteur d'onde n'est collecté. Cependant, si l'on considère plusieurs ondes planes d'inclinaisons différentes, certaines ondes diffractées par une sinusoïde de fréquence supérieure à Ω_c sont en partie collectées par la pupille de l'objectif et donc détectées. Ainsi il n'y a pas dans ce cas de rupture stricte entre les fréquences spatiales transmises. Puisqu'un champ cohérent spatialement correspond à une onde plane unique (*i.e.* un seul vecteur d'onde) et qu'un champ incohérent peut être décomposé en une superposition d'une multitude d'ondes planes de vecteurs d'ondes différents, ce schéma illustre bien ces deux configurations et donne une interprétation simple de la forme de la FTM d'un système optique selon le degré de cohérence spatiale du champ.

Comme illustré par le schéma, si le champ d'illumination est cohérent spatialement $\forall \Omega_i < \nu_{c,coh}$ (rayons verts et bleus) toutes les ondes diffractées sont collectées par l'objectif de diamètre a . Cela se traduit donc par une amplitude unitaire de la FTM pour ces fréquences. En revanche, si $\Omega_i > \nu_{c,coh}$ (rayons rouges), plus aucun vecteur d'onde n'est transmis et l'amplitude de la FTM est nulle. Dans la situation d'un champ incohérent spatialement, plus les fréquences Ω_i sont faibles plus la proportion des ondes diffractées transmises est importante mais non de façon binaire. Ainsi, quelques ondes diffractées par la sinusoïde de fréquence $\Omega_i > \nu_{c,coh}$ (rayons rouges) sont partiellement transmises. En revanche, des ondes diffractées par la sinusoïde de fréquence $\Omega_i < \nu_{c,coh}$ (rayons bleus) ne sont également transmises que partiellement. Cela rend donc compte d'une part de la fréquence de coupure plus élevée de la FTM, dans le cas d'un champ incohérent spatialement, et d'autre part de sa décroissance progressive.

Bibliographie

- [Abd12] I. Abdulhalim. “Spatial and temporal coherence effects in interference microscopy and full-field optical coherence tomography”. *Annalen der Physik*, 524(12) 787–804, 2012.
- [Ada13] M. J. Adams, S. A. Johnson, P. Lefevre, V. Levesque, V. Hayward, T. Andre, and J. L. Thonnard. “Finger pad friction and its role in grip and touch”. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(80), 2013.
- [Adl04] D. Adler, T. Ko, P. Herz, and J. Fujimoto. “Optical coherence tomography contrast enhancement using spectroscopic analysis with spectral autocorrelation”. *Optics express*, 12(22) 5487–5501, 2004.
- [Agu03] A. Aguirre, P. Hsiung, T. Ko, I. Hartl, and J. Fujimoto. “High-resolution optical coherence microscopy for high-speed, in vivo cellular imaging”. *Optics letters*, 28(21) 2064–2066, 2003.
- [Agu06] A. Aguirre, N. Nishizawa, J. Fujimoto, W. Seitz, M. Lederer, and D. Kopf. “Continuum generation in a novel photonic crystal fiber for ultrahigh resolution optical coherence tomography at 800 nm and 1300 nm”. *Optics Express*, 14(3) 1145–1160, 2006.
- [Agu08] A. Aguirre and J. G. Fujimoto. “Optical coherence microscopy”. In *Optical Coherence Tomography*, pages 505–542. Springer, 2008.
- [Akn14] S. Aknoun. *Analyse quantitative d’images de phase obtenues par interférométrie à décalage de phase obtenues par interférométrie à décalage quadri-latéral. Applications en biologie*. Ph.D. thesis, Université d’Aix Marseille, 2014.
- [Akn15] S. Aknoun, P. Bon, J. Savatier, B. Wattellier, and S. Monneret. “Quantitative retardance imaging of biological samples using quadriwave lateral shearing interferometry”. *Opt. Express*, 23(12) 16383–16406, 2015.
- [All81] R. D. Allen, N. S. Allen, and J. L. Travis. “Video-enhanced contrast, differential interference contrast (avec-dic) microscopy : A new method capable of analyzing microtubule-related motility in the reticulopodial network of *allogromia laticollaris*”. *Cell motility*, 1(3) 291–302, 1981.
- [Ann09] T. Anna, C. Shakher, and D. S. Mehta. “Simultaneous tomography and topography of silicon integrated circuits using full-field swept-source optical coherence tomography”. *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics*, 11(4) 045501, 2009.

- [Ann11] T. Anna, V. Srivastava, D. S. Mehta, and C. Shakher. “High-resolution full-field optical coherence microscopy using a mirau interferometer for the quantitative imaging of biological cells”. *Applied optics*, 50(34) 6343–6351, 2011.
- [Apt10] F. Aptel, N. Olivier, A. Deniset-Besseau, J.-M. Legeais, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire. “Multimodal nonlinear imaging of the human cornea”. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(5) 2459–2465, 2010.
- [Bas05] A. Bashkatov, E. Genina, V. Kochubey, and V. Tuchin. “Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm”. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 38(15) 2543, 2005.
- [Bay12] M. D. Bayleyegn, H. Makhlof, C. Crotti, K. Plamann, and A. Dubois. “Ultrahigh resolution spectral-domain optical coherence tomography at 1.3 μm using a broadband superluminescent diode light source”. *Optics Communications*, 285(24) 5564–5569, 2012.
- [Bea98] E. Beaurepaire, A. C. Boccara, M. Lebec, L. Blanchot, and H. Saint-Jalmes. “Full-field optical coherence microscopy”. *Optics letters*, 23(4) 244–246, 1998.
- [Bha13] B. Bhaduri, K. Tangella, and G. Popescu. “Fourier phase microscopy with white light”. *Biomedical optics express*, 4(8) 1434–1441, 2013.
- [Bie94] J. Biegen. “Determination of the phase change on reflection from two-beam interference”. *Optics letters*, 19(21) 1690–1692, 1994.
- [Bla09] M. Blavier, L. Blanco, M. Glanc, F. Pouplard, S. Tick, I. Maksimovic, L. Mugnier, G. Chènégros, G. Rousset, F. Lacombe, et al. “Adding the third dimension on adaptive optics retina imager thanks to full-field optical coherence tomography”. In *SPIE BiOS : Biomedical Optics*, pages 71630G–71630G. International Society for Optics and Photonics, 2009.
- [Boh08] C. F. Bohren and D. R. Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley & Sons, 2008.
- [Bon10] T. Bonin, G. Franke, M. Hagen-Eggert, P. Koch, and G. Hüttmann. “In vivo fourier-domain full-field oct of the human retina with 1.5 million a-lines/s”. *Optics letters*, 35(20) 3432–3434, 2010.
- [Bor02] E. Bordenave, E. Abraham, G. Jonusauskas, N. Tsurumachi, J. Oberle, C. Rulliere, P. Minot, M. Lassegues, and J. Bazeille. “Wide-field optical coherence tomography : imaging of biological tissues”. *Applied optics*, 41(10) 2059–2064, 2002.
- [Bou95] B. Bouma, G. J. Tearney, S. A. Boppart, M. R. Hee, M. E. Brezinski, and J. G. Fujimoto. “High-resolution optical coherence tomographic imaging using a mode-locked ti-al₂o₃ laser source”. *Optics Letters*, 20(13) 1486–1488, 1995.
- [Cam01] P. J. Campagnola, H. A. Clark, W. A. Mohler, A. Lewis, and L. M. Loew. “Second-harmonic imaging microscopy of living cells”. *Journal of Biomedical Optics*, 6(3) 277–286, 2001.

- [Che85] Y.-Y. Cheng and J. C. Wyant. “Multiple-wavelength phase-shifting interferometry”. *Applied optics*, 24(6) 804–807, 1985.
- [Cho03] M. Choma, M. Sarunic, C. Yang, and J. Izatt. “Sensitivity advantage of swept source and fourier domain optical coherence tomography”. *Optics Express*, 11(18) 2183–2189, 2003.
- [Cho07] W. Choi, C. Fang-Yen, K. Badizadegan, S. Oh, N. Lue, R. R. Dasari, and M. S. Feld. “Tomographic phase microscopy”. *Nature methods*, 4 717–719, 2007.
- [Cho10] W. J. Choi, D. I. Jeon, S.-G. Ahn, J.-H. Yoon, S. Kim, and B. H. Lee. “Full-field optical coherence microscopy for identifying live cancer cells by quantitative measurement of refractive index distribution”. *Optics express*, 18(22) 23285–23295, 2010.
- [Cot13] Y. Cotte, F. Toy, P. Jourdain, N. Pavillon, D. Boss, P. Magistretti, P. Marquet, and C. Depeursinge. “Marker-free phase nanoscopy”. *Nature Photonics*, 7(2) 113–117, 2013.
- [Cre88] K. Creath. “Phase-measurement interferometry techniques”. *Progress in optics*, 26(26) 349–393, 1988.
- [Cuc99] E. CuChe, P. Marquet, and C. Depeursinge. “Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of fresnel off-axis holograms”. *Applied optics*, 38(34) 6994–7001, 1999.
- [Das93] B. Das, K. Yoo, and R. Alfano. “Ultrafast time-gated imaging in thick tissues : a step toward optical mammography”. *Optics letters*, 18(13) 1092–1094, 1993.
- [Dav02] C. Davis, J. Bowles, R. Leathers, D. Korwan, T. V. Downes, W. Snyder, W. Rhea, W. Chen, J. Fisher, P. Bissett, et al. “Ocean phills hyperspectral imager : design, characterization, and calibration”. *Optics Express*, 10(4) 210–221, 2002.
- [Déb06] D. Débarre, A.-M. Pena, W. Supatto, T. Boulesteix, M. Strupler, M.-P. Sauviat, J.-L. Martin, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire. “Microscopies multiharmoniques pour l’imagerie structurale de tissus intacts”. *médecine/sciences*, 22(10) 845–852, 2006.
- [dG95] P. de Groot and L. Deck. “Surface profiling by analysis of white-light interferograms in the spatial frequency domain”. *Journal of Modern Optics*, 42(2) 389–401, 1995.
- [dG04] P. de Groot, X. Colonna de Lega, et al. “Signal modeling for low-coherence height-scanning interference microscopy”. *Applied Optics*, 43(25) 4821–4830, 2004.
- [Din06] H. Ding, J. Q. Lu, W. A. Wooden, P. J. Kragel, and X.-H. Hu. “Refractive indices of human skin tissues at eight wavelengths and estimated dispersion relations between 300 and 1600 nm”. *Physics in medicine and biology*, 51(6) 1479, 2006.
- [Dre99] W. Drexler, U. Morgner, F. Kärtner, C. Pitris, S. Boppart, X. Li, E. Ippen, and J. Fujimoto. “In vivo ultrahigh-resolution optical coherence tomography”. *Optics letters*, 24(17) 1221–1223, 1999.

- [Dre08] W. Drexler and J. G. Fujimoto. *Optical coherence tomography : technology and applications*. Springer Science & Business Media, 2008.
- [Dub00] A. Dubois, J. Selb, L. Vabre, and A.-C. Boccara. “Phase measurements with wide-aperture interferometers”. *Applied Optics*, 39(14) 2326–2331, 2000.
- [Dub01a] A. Dubois. “Phase-map measurements by interferometry with sinusoidal phase modulation and four integrating buckets”. *Journal of the Optical Society of America a-Optics Image Science and Vision*, 18(8) 1972–1979, 2001.
- [Dub01b] A. Dubois, L. Vabre, and A. Boccara. “Sinusoidally phase-modulated interference microscope for high-speed high-resolution topographic imagery”. *Optics letters*, 26(23) 1873–1875, 2001.
- [Dub02] A. Dubois, L. Vabre, A. C. Boccara, and E. Beaufrepair. “High-resolution full-field optical coherence tomography with a linnik microscope”. *Applied Optics*, 41(4), 2002.
- [Dub04] A. Dubois, G. Moneron, K. Grieve, and A. C. Boccara. “Three-dimensional cellular-level imaging using full-field optical coherence tomography”. *Physics in Medicine and Biology*, 49(7), 2004.
- [Dub06] A. Dubois, G. Moneron, and C. Boccara. “Thermal-light full-field optical coherence tomography in the 1.2 μm wavelength region”. *Optics Communications*, 266(2), 2006.
- [Dub07] S. K. Dubey, T. Anna, C. Shakher, and D. S. Mehta. “Fingerprint detection using full-field swept-source optical coherence tomography”. *Applied Physics Letters*, 91(18) 181106, 2007.
- [Dub08] A. Dubois, J. Moreau, and C. Boccara. “Spectroscopic ultrahigh-resolution full-field optical coherence microscopy”. *Optics Express*, 16(21), 2008.
- [Ell07] A. K. Ellerbee, T. L. Creazzo, and J. A. Izatt. “Investigating nanoscale cellular dynamics with cross-sectional spectral domain phase microscopy”. *Optics Express*, 15(13) 8115–8124, 2007.
- [Fab05] D. J. Faber, E. G. Mik, M. C. Aalders, and T. G. van Leeuwen. “Toward assessment of blood oxygen saturation by spectroscopic optical coherence tomography”. *Optics letters*, 30(9) 1015–1017, 2005.
- [Fer95] A. F. Fercher, C. K. Hitzenberger, G. Kamp, and S. Y. El-Zaiat. “Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry”. *Optics Communications*, 117(1) 43–48, 1995.
- [Fer01] A. Fercher, C. Hitzenberger, M. Sticker, R. Zawadzki, B. Karamata, and T. Lasser. “Numerical dispersion compensation for partial coherence interferometry and optical coherence tomography”. *Optics Express*, 9(12) 610–615, 2001.
- [Fer02] A. Fercher, C. Hitzenberger, M. Sticker, R. Zawadzki, B. Karamata, and T. Lasser. “Dispersion compensation for optical coherence tomography depth-scan signals by a numerical technique”. *Optics Communications*, 204(1) 67–74, 2002.

- [Fuj95] J. G. Fujimoto, M. E. Brezinski, G. J. Tearney, S. A. Boppart, B. Bouma, M. R. Hee, J. F. Southern, and E. A. Swanson. “Optical biopsy and imaging using optical coherence tomography”. *Nature medicine*, 1(9) 970–972, 1995.
- [Gha78] A. K. Ghatak and K. Thyagarajan. “Fourier optics ii. optical transfer functions”. In *Contemporary Optics*, pages 223–242. Springer, 1978.
- [Ghi98] D. C. Ghiglia and M. D. Pritt. *Two-dimensional phase unwrapping : theory, algorithms, and software*, volume 4. Wiley New York, 1998.
- [Ghi13] Y.-S. Ghim, H.-G. Rhee, H.-S. Yang, and Y.-W. Lee. “Thin-film thickness profile measurement using a mirau-type low-coherence interferometer”. *Measurement Science and Technology*, 24(7) 075002, 2013.
- [Gog10] A. Gogoi, A. Choudhury, and G. A. Ahmed. “Mie scattering computation of spherical particles with very large size parameters using an improved program with variable speed and accuracy”. *Journal of Modern Optics*, 57(21) 2192–2202, 2010.
- [Gol88] R. Goldstein, H. Zebker, and C. Werner. “Satellite radar interferometry- two-dimensional phase unwrapping”. *Radio science*, 23(4) 713–720, 1988.
- [Gol05] J. A. Goldsmith, Y. Li, M. R. Chalita, V. Westphal, C. A. Patil, A. M. Rollins, J. A. Izatt, and D. Huang. “Anterior chamber width measurement by high speed optical coherence tomography”. *Ophthalmology*, 112(2) 238–244, 2005.
- [Goo05] J. W. Goodman. *Introduction to Fourier optics*. Roberts and Company Publishers, 2005.
- [Gre51] D. S. Grey. “Computed aberrations of spherical schwarzschild reflecting microscope objectives”. *JOSA*, 41(3) 183–192, 1951.
- [Gre12a] A. A. Grebenyuk and V. P. Ryabukho. “Coherence effects of thick objects imaging in interference microscopy”. In *SPIE Photonics Europe*, pages 84271M–84271M. International Society for Optics and Photonics, 2012.
- [Gre12b] A. A. Grebenyuk and V. P. Ryabukho. “Numerical correction of coherence gate in full-field swept-source interference microscopy”. *Optics letters*, 37(13) 2529–2531, 2012.
- [Gre12c] A. A. Grebenyuk and V. P. Ryabukho. “Theoretical model of volumetric objects imaging in a microscope”. In *SPIE Photonics Europe*, pages 84301B–84301B. International Society for Optics and Photonics, 2012.
- [Gre14] A. Grebenyuk, A. Federici, V. Ryabukho, and A. Dubois. “Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination”. *Applied optics*, 53(8) 1697–1708, 2014.
- [Gri04] K. Grieve, M. Paques, A. Dubois, J. Sahel, C. Boccara, J.-F. Le Gargasson, et al. “Ocular tissue imaging using ultrahigh-resolution, full-field optical coherence tomography”. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(11) 4126–4131, 2004.

- [Gri05] K. Grieve, A. Dubois, M. Simonutti, M. Paques, J. Sahel, J.-F. Le Gargasson, and C. Boccara. “In vivo anterior segment imaging in the rat eye with high speed white light full-field optical coherence tomography”. *Optics express*, 13(16) 6286–6295, 2005.
- [Gru12] I. Grulkowski, J. J. Liu, B. Potsaid, V. Jayaraman, C. D. Lu, J. Jiang, A. E. Cable, J. S. Duker, and J. G. Fujimoto. “Retinal, anterior segment and full eye imaging using ultrahigh speed swept source oct with vertical-cavity surface emitting lasers”. *Biomedical Optics Express*, 3(11) 2733–2751, 2012.
- [Gus05] M. G. L. Gustafsson. “Nonlinear structured-illumination microscopy : Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(37) 13081–13086, 2005.
- [Gus08] M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, and J. W. Sedat. “Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination”. *Biophysical Journal*, 94(12) 4957–4970, 2008.
- [Har14] F. Harms, E. Dalimier, and A. C. Boccara. “En-face full-field optical coherence tomography for fast and efficient fingerprints acquisition”. *Proc. SPIE*, 9075 90750E–90750E–7, 2014.
- [Hee95] M. R. Hee, J. A. Izatt, E. A. Swanson, D. Huang, J. S. Schuman, C. P. Lin, C. A. Puliafito, and J. G. Fujimoto. “Optical coherence tomography of the human retina”. *Archives of ophthalmology*, 113(3) 325–332, 1995.
- [Hee98] M. R. Hee, C. A. Puliafito, J. S. Duker, E. Reichel, J. G. Coker, J. R. Wilkins, J. S. Schuman, E. A. Swanson, and J. G. Fujimoto. “Topography of diabetic macular edema with optical coherence tomography”. *Ophthalmology*, 105(2) 360–370, 1998.
- [Hel94] S. W. Hell and J. Wichmann. “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated-emission - stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy”. *Optics Letters*, 19(11) 780–782, 1994.
- [Hir02] A. Hirabayashi, H. Ogawa, and K. Kitagawa. “Fast surface profiler by white-light interferometry by use of a new algorithm based on sampling theory”. *Applied optics*, 41(23) 4876–4883, 2002.
- [Hit92] C. K. Hitzenberger. “Measurement of corneal thickness by low-coherence interferometry”. *Applied optics*, 31(31) 6637–6642, 1992.
- [Hit99] C. K. Hitzenberger, A. Baumgartner, W. Drexler, and A. F. Fercher. “Dispersion effects in partial coherence interferometry : Implications for intraocular ranging”. *Journal of Biomedical Optics*, 4(1) 144–151, 1999.
- [Hua91] D. Huang, E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, C. A. Puliafito, et al. “Optical coherence tomography”. *Science*, 254(5035) 1178–1181, 1991.
- [Ito82] K. Itoh. “Analysis of the phase unwrapping algorithm”. *Appl. Opt*, 21(14) 2470, 1982.

- [Ito83] S. Ito and K. Jimbow. “Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in hair and melanomas.” *Journal of Investigative Dermatology*, 80(4) 268–272, 1983.
- [Iza08] J. Izatt and M. Choma. “Theory of optical coherence tomography”. In *Optical coherence tomography*, pages 47–72. Springer, 2008.
- [Kar04] B. Karamata, P. Lambelet, M. Laubscher, R. Salathe, and T. Lasser. “Spatially incoherent illumination as a mechanism for cross-talk suppression in wide-field optical coherence tomography”. *Optics letters*, 29(7) 736–738, 2004.
- [Kar05] B. Karamata, P. Lambelet, M. Leutenegger, M. Laubscher, S. Bourquin, and T. Lasser. “Multiple scattering in optical coherence tomography. ii. experimental and theoretical investigation of cross talk in wide-field optical coherence tomography”. *JOSA A*, 22(7) 1380–1388, 2005.
- [Ked12] S. Kedenburg, M. Vieweg, T. Gissibl, and H. Giessen. “Linear refractive index and absorption measurements of nonlinear optical liquids in the visible and near-infrared spectral region”. *Optical Materials Express*, 2(11) 1588–1611, 2012.
- [Kim99] S.-W. Kim and G.-H. Kim. “Thickness-profile measurement of transparent thin-film layers by white-light scanning interferometry”. *Applied Optics*, 38(28) 5968–5973, 1999.
- [Kim08] D.-S. Kim and Y.-J. Cho. “3-d surface profile measurement using an acousto-optic tunable filter based spectral phase shifting technique”. *Journal of the Optical Society of Korea*, 12(4) 281–287, 2008.
- [Kim10] M. K. Kim. “Principles and techniques of digital holographic microscopy”. *Journal of Photonics for Energy*, pages 018005–018005, 2010.
- [Ko04] T. Ko, D. Adler, J. Fujimoto, D. Mamedov, V. Prokhorov, V. Shidlovski, and S. Yakubovich. “Ultrahigh resolution optical coherence tomography imaging with a broadband superluminescent diode light source”. *Optics Express*, 12(10) 2112–2119, 2004.
- [Kum13] A. Kumar, W. Drexler, and R. A. Leitgeb. “Subaperture correlation based digital adaptive optics for full field optical coherence tomography”. *Optics express*, 21(9) 10850–10866, 2013.
- [Lab09] S. Labiau, G. David, S. Gigan, and A. Boccarda. “Defocus test and defocus correction in full-field optical coherence tomography”. *Optics letters*, 34(10) 1576–1578, 2009.
- [Lar96] K. G. Larkin. “Efficient nonlinear algorithm for envelope detection in white light interferometry”. *JOSA A*, 13(4) 832–843, 1996.
- [Lat09] G. Latour, G. Georges, L. Siozade, C. Deumié, and J.-P. Echard. “Study of varnish layers with optical coherence tomography in both visible and infrared domains”. In *SPIE Europe Optical Metrology*, pages 73910J–73910J. International Society for Optics and Photonics, 2009.

Bibliographie

- [Lau02] B. Laude, A. De Martino, B. Drevillon, L. Benattar, and L. Schwartz. “Full-field optical coherence tomography with thermal light”. *Applied Optics*, 41(31), 2002.
- [Lei04] R. Leitgeb, W. Drexler, A. Unterhuber, B. Hermann, T. Bajraszewski, T. Le, A. Stingl, and A. Fercher. “Ultrahigh resolution fourier domain optical coherence tomography”. *Optics Express*, 12(10) 2156–2165, 2004.
- [Lei06] R. Leitgeb, M. Villiger, A. Bachmann, L. Steinmann, and T. Lasser. “Extended focus depth for fourier domain optical coherence microscopy”. *Optics letters*, 31(16) 2450–2452, 2006.
- [Lia11] H. Liang, R. Lange, H. Howard, and J. Spooner. “Non-invasive investigations of a wall painting using optical coherence tomography and hyperspectral imaging”. In *SPIE Optical Metrology*, pages 80840F–80840F. International Society for Optics and Photonics, 2011.
- [Lia13] H. Liang, R. Lange, B. Peric, and M. Spring. “Optimum spectral window for imaging of art with optical coherence tomography”. *Applied Physics B*, 111(4) 589–602, 2013.
- [Lim08] D. Lim, K. K. Chu, and J. Mertz. “Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy”. *Optics Letters*, 33(16) 1819–1821, 2008.
- [Mak12] H. Makhlof, K. Perronet, G. Dupuis, S. Lévêque-Fort, and A. Dubois. “Simultaneous optically sectioned fluorescence and optical coherence microscopy with full-field illumination”. *Optics letters*, 37(10) 1613–1615, 2012.
- [Mar03] D. L. Marks, A. L. Oldenburg, J. J. Reynolds, and S. A. Boppart. “Digital algorithm for dispersion correction in optical coherence tomography for homogeneous and stratified media”. *Applied optics*, 42(2) 204–217, 2003.
- [Mar05] T. Martin, R. Brubaker, P. Dixon, M. A. Gagliardi, and T. Sudol. “640x512 ingaas focal plane array camera for visible and swir imaging”. *Infrared Technology and Applications XXXI, Pts 1 and 2*, 5783 12–20, 2005.
- [Mar07] D. L. Marks, T. S. Ralston, S. A. Boppart, and P. S. Carney. “Inverse scattering for frequency-scanned full-field optical coherence tomography”. *JOSA A*, 24(4) 1034–1041, 2007.
- [Min61] M. Minsky. “Microscopy apparatus”, 1961. US Patent 3,013,467.
- [Mis02] M. I. Mishchenko, L. D. Travis, and A. A. Lacis. *Scattering, absorption, and emission of light by small particles*. Cambridge university press, 2002.
- [Mon06a] G. Moneron. *Microscopie tridimensionnelle à très haute résolution par tomographie par cohérence optique*. Ph.D. thesis, Paris 6, 2006.
- [Mon06b] F. Montfort, T. Colomb, F. Charrière, J. Kühn, P. Marquet, E. Cuche, S. Herminjard, and C. Depeursinge. “Submicrometer optical tomography by multiple-wavelength digital holographic microscopy”. *Applied optics*, 45(32) 8209–8217, 2006.

- [Mon07] G. Moneron, A.-C. Boccara, and A. Dubois. “Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography”. *Optics letters*, 32(14) 2058–2060, 2007.
- [Mor00] U. Morgner, W. Drexler, F. Kärtner, X. Li, C. Pitris, E. Ippen, and J. Fujimoto. “Spectroscopic optical coherence tomography”. *Optics letters*, 25(2) 111–113, 2000.
- [Mor12] A. Morin. *“Spectroscopie par tomographie d’optique cohérente : application à l’analyse des pigments des couches picturales”*. Ph.D. thesis, Université Pierre et Marie Curie, 2012.
- [Mul06] M. Muller. *Introduction to confocal fluorescence microscopy*, volume 69. SPIE press, 2006.
- [Nad12] G. Nadorff and F. DeWitt. “Refluxicon objectives for imaging”. In *SPIE Optical Engineering+ Applications*, pages 84860C–84860C. International Society for Optics and Photonics, 2012.
- [Nak02] A. Nakano. “Spinning-disk confocal microscopy - a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic”. *Cell Structure and Function*, 27(5) 349–355, 2002.
- [Nis04] N. Nishizawa, Y. Chen, P. Hsiung, E. P. Ippen, and J. G. Fujimoto. “Real-time, ultrahigh-resolution, optical coherence tomography with an all-fiber, femtosecond fiber laser continuum at 1.5 μm ”. *Optics Letters*, 29(24) 2846–2848, 2004.
- [Ohb11] K. Ohbayashi, D. Choi, H. Hiro-Oka, A. Kubota, T. Ohno, R. Ikeda, and K. Shimizu. “Ultra-high speed real-time 4d display system installed in ultra-high speed parallel oct system at a volume rate of 12 volumes/sec”. In *SPIE BiOS*, pages 78891Z–78891Z. International Society for Optics and Photonics, 2011.
- [Oli10] N. Olivier, F. Aptel, K. Plamann, M.-C. Schanne-Klein, and E. Beaurepaire. “Harmonic microscopy of isotropic and anisotropic microstructure of the human cornea”. *Optics express*, 18(5) 5028–5040, 2010.
- [Par01] M.-C. Park and S.-W. Kim. “Compensation of phase change on reflection in white-light interferometry for step height measurement”. *Optics letters*, 26(7) 420–422, 2001.
- [Paw06] J. Pawley. *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, volume 236. Springer Science & Business Media, 2006.
- [Plu88] M. Pluta. *Advanced light microscopy : Principles and basic properties. Vol. 1. Advanced light microscopy / Maksymilian Pluta*. Polish Scientific Publishers, 1988. ISBN 9788301076078.
- [Pop04] G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari, and M. S. Feld. “Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics”. *Optics letters*, 29(21) 2503–2505, 2004.
- [Pov02] B. Povazay, K. Bizheva, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, A. F. Fercher, W. Drexler, A. Apolonski, W. Wadsworth, J. Knight, et al. “Submicrometer axial resolution optical coherence tomography”. *Optics letters*, 27(20) 1800–1802, 2002.

- [Pov06] B. Považay, A. Unterhuber, B. Hermann, H. Sattmann, H. Arthaber, and W. Drexler. “Full-field time-encoded frequency-domain optical coherence tomography”. *Optics express*, 14(17) 7661–7669, 2006.
- [Pri95] J. Primot and L. Sogno. “Achromatic three-wave (or more) lateral shearing interferometer”. *JOSA A*, 12(12) 2679–2685, 1995.
- [Raj95] M. Rajadhyaksha, M. Grossman, D. Esterowitz, R. H. Webb, and R. R. Anderson. “In vivo confocal scanning laser microscopy of human skin : melanin provides strong contrast”. *Journal of Investigative Dermatology*, 104(6) 946–952, 1995.
- [Ral07] T. S. Ralston, D. L. Marks, P. S. Carney, and S. A. Boppart. “Interferometric synthetic aperture microscopy”. *Nature Physics*, 3(2) 129–134, 2007.
- [Red11] B. Redding, M. A. Choma, and H. Cao. “Spatially incoherent random lasers for full field optical coherence tomography”. In *Quantum Electronics and Laser Science Conference*, page PDPC7. Optical Society of America, 2011.
- [Res12] S. G. Resink, A. C. Boccara, and W. Steenbergen. “State-of-the art of acousto-optic sensing and imaging of turbid media”. *Journal of biomedical optics*, 17(4) 0409011–04090110, 2012.
- [Rev11] J.-L. Reverchon, J. Decobert, A. Djedidi, J.-L. Gentner, O. Huet, N. Lagay, A. Rouvié, J.-A. Robo, J.-P. Truffer, E. Costard, et al. “High dynamic solutions for short-wavelength infrared imaging based on ingaas”. *Optical Engineering*, 50(6) 061014–061014, 2011.
- [Ric59] B. Richards and E. Wolf. “Electromagnetic diffraction in optical systems. ii. structure of the image field in an aplanatic system”. In *Proceedings of the Royal Society of London A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, volume 253, pages 358–379. The Royal Society, 1959.
- [Sac08] D. Sacchet, J. Moreau, P. Georges, and A. Dubois. “Simultaneous dual-band ultra-high resolution full-field optical coherence tomography”. *Optics Express*, 16(24), 2008.
- [Sac10] D. Sacchet. *"Tomographie par cohérence optique plein champ linéaire et non linéaire"*. Ph.D. thesis, Institut d’Optique Graduate School, 2010.
- [Saf12] A. Safrani and I. Abdulhalim. “Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography using spatial coherence gating and quasi-monochromatic illumination”. *Optics letters*, 37(4) 458–460, 2012.
- [Sch97] J. Schmitt, S. Lee, and K. Yung. “An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue”. *Optics Communications*, 142(4) 203–207, 1997.
- [Sch02] U. Schnars and W. P. Jüptner. “Digital recording and numerical reconstruction of holograms”. *Measurement science and technology*, 13(9) R85, 2002.
- [Sch07] J. Schmit, K. Creath, and J. Wyant. “Surface profilers, multiple wavelength, and white light interferometry”. *Optical Shop Testing*, 667755, 2007.

-
- [Sel02] J. Selb. *Source virtuelle acousto-optique pour l'imagerie des milieux diffusants*. Ph.D. thesis, Université Paris, 2002.
- [She95] C. Sheppard and K. Larkin. “Effect of numerical aperture on interference fringe spacing”. *Applied optics*, 34(22) 4731–4734, 1995.
- [Sim98] C. R. Simpson, M. Kohl, M. Essenpreis, and M. Cope. “Near-infrared optical properties of ex vivo human skin and subcutaneous tissues measured using the monte carlo inversion technique”. *Physics in medicine and biology*, 43(9) 2465, 1998.
- [Sri07] K. Srinivasan and O. Painter. “Linear and nonlinear optical spectroscopy of a strongly coupled microdisk–quantum dot system”. *Nature*, 450(7171) 862–865, 2007.
- [Sti01] M. Sticker, C. K. Hitzenberger, R. Leitgeb, and A. F. Fercher. “Quantitative differential phase measurement and imaging in transparent and turbid media by optical coherence tomography”. *Optics Letters*, 26(8) 518–520, 2001.
- [Sur96] Y. Surrel. “Design of algorithms for phase measurements by the use of phase stepping”. *Applied optics*, 35(1) 51–60, 1996.
- [Tao07] Y. K. Tao, M. Zhao, and J. A. Izatt. “High-speed complex conjugate resolved retinal spectral domain optical coherence tomography using sinusoidal phase modulation”. *Optics letters*, 32(20) 2918–2920, 2007.
- [Tsa14] C.-C. Tsai, C.-K. Chang, K.-Y. Hsu, T.-S. Ho, M.-Y. Lin, J.-W. Tjiu, and S.-L. Huang. “Full-depth epidermis tomography using a mirau-based full-field optical coherence tomography”. *Biomedical optics express*, 5(9) 3001–3010, 2014.
- [Vil10] M. Villiger, C. Pache, and T. Lasser. “Dark-field optical coherence microscopy”. *Optics letters*, 35(20) 3489–3491, 2010.
- [Wan95] X. Wang, R. Dhond, W. Sorin, J. Nelson, S. Newton, and T. Milner. “Characterization of human scalp hairs by optical low-coherence reflectometry”. *Optics letters*, 20(6) 524–526, 1995.
- [Wan03] X. Wang, Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica, and L. V. Wang. “Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain”. *Nature biotechnology*, 21(7) 803–806, 2003.
- [Wat08] Y. Watanabe and M. Sato. “Three-dimensional wide-field optical coherence tomography using an ultrahigh-speed cmos camera”. *Optics Communications*, 281(7) 1889–1895, 2008.
- [Wax01] A. Wax, C. Yang, R. R. Dasari, and M. S. Feld. “Measurement of angular distributions by use of low-coherence interferometry for light-scattering spectroscopy”. *Optics Letters*, 26(6) 322–324, 2001.
- [Xia14] J. Xia, J. Yao, and L. H. V. Wang. “Photoacoustic tomography : Principles and advances (invited review)”. *Progress In Electromagnetics Research*, 147 1–22, 2014.

Bibliographie

- [Xie02] C. Xie, M. A. Dinno, and Y.-q. Li. “Near-infrared raman spectroscopy of single optically trapped biological cells”. *Optics letters*, 27(4) 249–251, 2002.
- [Yan01] C. Yang, A. Wax, R. R. Dasari, and M. S. Feld. “Phase-dispersion optical tomography”. *Optics Letters*, 26(10) 686–688, 2001.
- [Yas06] Y. Yasuno, J.-i. Sugisaka, Y. Sando, Y. Nakamura, S. Makita, M. Itoh, and T. Yatagai. “Non-iterative numerical method for laterally superresolving fourier domain optical coherence tomography”. *Optics express*, 14(3) 1006–1020, 2006.
- [Yin06] L. Ying. “Phase unwrapping”. *Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering*, 2006.
- [Yu04] L. F. Yu and M. K. Kim. “Full-color three-dimensional microscopy by wide-field optical coherence tomography”. *Optics Express*, 12(26), 2004.
- [Yu05] L. Yu and M. K. Kim. “Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method”. *Optics letters*, 30(16) 2092–2094, 2005.

Liste des publications

A. Federici and A. Dubois, “Three-band, 1.9- μm axial resolution full-field optical coherence microscopy over a 530-1700 nm wavelength range using a single camera”, *Optics Letters*, 39(6), 1374-1377, 2014.

A. Grebenyuk, A. Federici, V. Ryabukho, and A. Dubois, “Numerically focused full-field swept-source optical coherence microscopy with low spatial coherence illumination”, *Applied Optics* 53(8), 1697-1708, 2014.

A. Federici, H.S. Gutierrez da Costa, J. Ogien, A.K. Ellerbee, and A. Dubois, “Wide-field full-field optical coherence microscopy for high axial resolution phase and amplitude imaging”, *soumis à Applied Optics*, 2015.

A. Federici and A. Dubois, “Full-field optical coherence microscopy with optimized ultra-high spatial resolution”, *soumis à Optics Letters*, 2015.

A. Federici and A. Dubois, “Color high resolution full-field optical coherence microscopy for contrast-enhanced imaging”, *Biophotonics : Photonic Solutions for Better Health Care Iv* 9129, 2014.

Titre : Développement de systèmes de microscopie par cohérence optique plein champ étendus spatialement et spectralement

Mots clés : Tomographie par cohérence optique, Microscopie, Interférométrie

Résumé : La tomographie par cohérence optique plein champ (OCT plein champ) est une technique de microscopie interférométrique basée sur l'utilisation d'une source de lumière faiblement cohérente, telle qu'une lampe halogène. Elle permet de réaliser, de façon non invasive, des images tomographiques à plusieurs centaines de micromètres de profondeur dans les tissus biologiques et avec une résolution spatiale de l'ordre de $1\mu\text{m}$.

Ces travaux de thèse concernent le développement de plusieurs systèmes d'OCT plein champ, dans le but de proposer de nouvelles performances et de nouveaux contrastes destinés à l'imagerie en trois dimensions de tissus biologiques.

Nous avons dans un premier temps exploité la large bande spectrale d'émission d'une lampe halogène, afin d'apporter une information spectroscopique et d'être capable de distinguer et de caractériser des zones d'un échantillon qui seraient sinon indiscernables.

Puis nous avons optimisé la résolution spatiale d'un montage d'OCT plein champ pour atteindre une valeur record de $0,5\mu\text{m}$ (dans l'eau) dans les trois directions de l'espace, notamment grâce à l'utilisation d'une bande spectrale adaptée à l'imagerie de tissus, tels que la peau.

Un montage dont le champ de vision est élargi à $18\text{mm} \times 18\text{mm}$ a ensuite été développé et appliqué à l'imagerie du signal d'amplitude, ainsi qu'à la mesure quantitative du signal de phase résolu en profondeur.

Enfin un système utilisant un laser à balayage spectral comme source de lumière combiné à un traitement numérique de correction de la focalisation a été mis en œuvre. Nous avons ainsi démontré la possibilité de réaliser des images en trois dimensions avec une résolution latérale relativement élevée, sans utiliser le moindre déplacement mécanique durant l'acquisition.

Title : Development of full-field optical coherence microscopy systems with extended spatial and spectral properties

Keywords : Optical coherence tomography, Microscopy, Interferometry

Abstract : Full-field optical coherence tomography (FF-OCT) is an optical technology based on low-coherence interference microscopy for tomographic imaging of semitransparent samples. Non-invasive three-dimensional imaging can be performed with an isotropic spatial resolution of the order of $1\mu\text{m}$.

During the PhD thesis, several FF-OCT systems have been reported achieving extended performances or contrast enhanced images relevant for biological tissues imaging.

Firstly, a three-band, $1,9\text{-}\mu\text{m}$ axial resolution FF-OCT system has been implemented to perform spectroscopic contrast enhanced imaging of biological tissues over a $530\text{-}1700\text{nm}$ wavelength range.

Then, a study of the FF-OCT axial response has been carried out for maximizing the axial

resolution of the system. An isotropic spatial resolution of $0,5\mu\text{m}$ (in water) has been obtained by combining $1,2\text{-NA}$ microscope objectives with an optimized broad spectral band adapted to biological tissues imaging, such as skin samples.

A set-up with an extended field of view of $18\text{mm} \times 18\text{mm}$ has been also designed and applied to amplitude signal detection as well as depth-resolved quantitative phase signal measurement.

At last, we developed a technique based on the combination of full-field swept-source optical coherence tomography (FF-SSOCT) with low spatial coherence illumination and a special numerical processing that allows numerically focused mechanical motion-free three-dimensional imaging.

