



# Imagerie multimodale optique, élastique et photo-thermique des tissus biologiques par OCT plein champ

Amir Nahas

► **To cite this version:**

Amir Nahas. Imagerie multimodale optique, élastique et photo-thermique des tissus biologiques par OCT plein champ. Autre [cond-mat.other]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. <NNT : 2014PA066680>. <tel-01232302>

**HAL Id: tel-01232302**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01232302>**

Submitted on 23 Nov 2015

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THÈSE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

**Optique physique expérimentale**

(ED 389 - La Physique de la Particule à la Matière Condensée)

Préparée à l'INSTITUT LANGEVIN - ONDES ET IMAGES

Présentée par

**Amir NAHAS**

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Sujet de la thèse :

**Imagerie multimodale optique, élastique et  
photo-thermique des tissus biologiques  
par OCT plein champ**

Version avant soutenance

devant le jury composé de :

Mme.	Sentennac	Anne	Rapporteur
M.	Lasser	Théo	Rapporteur
Mme.	Maître	Agnès	Examineur
M.	Roux	Stéphane	Examineur
M.	Querleux	Bernard	Examineur
M.	Tanter	Mickaël	Directeur de thèse
M.	Boccara	Claude	Co-directeur de thèse



L'OCT plein champ est une technique d'imagerie permettant de faire de la microscopie des milieux diffusants à une profondeur donnée à l'aide d'un système interférométrique. L'un des principaux objectifs qui ont motivé le développement de l'OCT plein champ ces dernières années a été de pouvoir fournir au chirurgien, durant les opérations des images similaires aux coupes histologiques mais en temps réel. Actuellement, les diagnostics effectués à partir des images d'OCT plein champ donnent de bons résultats, notamment dans le cas de certaines pathologies mammaires. Cependant, la différence majeure entre les coupes histologiques et les images d'OCT plein champ est qu'en OCT plein champ le contraste est uniquement un contraste morphologique et que dans certains cas, ce contraste seul ne suffit pas pour faire le diagnostic. Au cours des travaux de recherche décrits dans cette thèse nous sommes attachés à développer de nouvelles approches tomographiques, conduisant à de nouvelles formes de contraste susceptibles d'enrichir les images d'OCT plein champ pour une meilleure qualité du diagnostic. Plus précisément, nous avons travaillé sur la détection optique et photo-thermique de nanoparticules d'or par OCT plein champ et la cartographie des propriétés mécaniques par trois méthodes dans le but de développer de nouveaux types de contrastes qui pourront permettre d'améliorer le diagnostic.

**Mots clés : Imagerie Biomédicale, Tomographie de cohérence Optique Plein champ, Elastographie, Photo-thermie, Interférométrie, agents de contrastes.**



---

## Abstract

---

Full Field OCT (FF-OCT) is an imaging technic use to do microscopy inside scattering media at a given depth using an interferometric setup. One of the main objectives that motivated the development of FF-OCT was to provide during surgery to the surgeon images similar to histological slices but in real time. Currently, diagnostic made from FF-OCT images gives good results, especially in the case of some breast disease. However, the major difference between the histological and FF-OCT is that FF-OCT has only a morphological contrast and in some cases, this contrast is not enough to make the diagnosis. In the research described in this thesis we are committed to developing new tomographic approaches, leading to new forms of contrast may enhance images of FF- OCT for a better quality of diagnosis. Specifically, we worked on the optical and photothermal detection of gold nanoparticles by FF-OCT and the mechanical properties mapping by three methods in order to develop new types of contrasts that will help improve the diagnosis.

**Keywords :Biomedical Imaging, Full field Optical Coherence Tomography, Elastography, Photo-thermal imaging, Interferometry, contrasts agents.**



# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>ix</b>
<b>I Imagerie optique biomédicale et contraste optique</b>	<b>1</b>
<b>1 Imagerie des milieux biologiques</b>	<b>3</b>
1.1 Ondes en milieu biologique et grandeurs optiques moyennes . . . . .	4
1.1.1 L'indice de réfraction . . . . .	4
1.1.2 Le coefficient d'absorption . . . . .	5
1.1.3 Le coefficient de diffusion . . . . .	6
1.1.4 Le facteur d'anisotropie . . . . .	7
1.1.5 Le coefficient d'extinction . . . . .	7
1.2 Techniques d'imagerie optique des milieux biologiques . . . . .	8
1.2.1 Imagerie des photons multi-diffusés . . . . .	9
1.2.2 Imagerie des photons balistiques . . . . .	10
<b>2 OCT plein champ et contrastes accessibles</b>	<b>15</b>
2.1 Principe de la tomographie de cohérence optique . . . . .	16
2.1.1 Interférométrie et cohérence temporelle . . . . .	16
2.1.2 Tomographie de cohérence optique « classique » . . . . .	19
2.1.3 Différentes approches de tomographie de cohérence optique à balayage	21
2.2 L'OCT plein champ . . . . .	22
2.2.1 Principe . . . . .	22
2.2.2 Performances . . . . .	24
2.2.3 OCT plein champ dans les milieux biologiques . . . . .	26
2.2.4 Applications . . . . .	26
2.3 OCT plein champ : contrastes optiques accessibles . . . . .	27
2.3.1 Polarisation et biréfringence . . . . .	27
2.3.2 Mesure des indices de réfraction locaux . . . . .	27
2.3.3 Mesure des coefficients de diffusion locaux . . . . .	28
<b>3 Les nanoparticules d'or : nouvel agent de contraste pour l'OCT plein champ</b>	<b>33</b>
3.1 Propriétés optiques des nanoparticules d'or . . . . .	34
3.1.1 Résonance de plasmon localisé de nanoparticules sphériques : absorption et diffusion . . . . .	34
3.1.2 Les nanoparticules d'or comme source thermique locale . . . . .	37

3.2	Détection de nanoparticules d'or unique par OCT plein champ à 2 longueurs d'ondes . . . . .	38
3.2.1	Principe . . . . .	38
3.2.2	Montage expérimental . . . . .	38
3.2.3	Résultats . . . . .	40
3.3	Modulation locale de l'indice de réfraction par chauffage de nanoparticules d'or . . . . .	43
3.3.1	Principe . . . . .	43
3.3.2	Montage expérimental . . . . .	45
3.3.3	Résultats . . . . .	47
<b>II</b>	<b>Contraste mécanique</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>Mécanique dans les milieux biologiques</b>	<b>55</b>
4.1	Introduction à la mécanique des milieux élastiques mous . . . . .	56
4.1.1	Les modules mécaniques . . . . .	56
4.1.2	Propagation d'ondes mécaniques . . . . .	58
4.2	Elastographie et imagerie biomédicale . . . . .	59
4.2.1	Méthodes statiques . . . . .	59
4.2.2	Méthodes quasi-statiques . . . . .	61
4.2.3	Méthodes dynamiques . . . . .	61
<b>5</b>	<b>Elastographie statique par corrélation d'image numérique</b>	<b>63</b>
5.1	Principe de la corrélation d'images . . . . .	64
5.1.1	Corrélation et estimation du déplacement . . . . .	65
5.1.2	Méthode locale de corrélation d'images . . . . .	65
5.1.3	Méthode globale de corrélation numérique 3D . . . . .	66
5.1.4	Quelques mots sur les performances . . . . .	67
5.2	Montage et méthode expérimentaux . . . . .	68
5.2.1	Montage expérimental . . . . .	68
5.2.2	Méthode expérimentale . . . . .	69
5.3	Résultats expérimentaux . . . . .	72
5.3.1	Corrélation d'images 2D classique . . . . .	72
5.3.2	Corrélation d'images 3D basée sur une méthode d'éléments finis . . . . .	74
5.3.3	Vers une amélioration du montage d'élastographie statique . . . . .	80
<b>6</b>	<b>Elastographie quasi-statique par modulation des interférences locales</b>	<b>83</b>
6.1	Mesure de déplacements par interférométrie LASER homodyne . . . . .	84
6.1.1	Principe de l'interférométrie homodyne . . . . .	85
6.1.2	Mesure de petits déplacements . . . . .	86
6.1.3	Mesure de déplacements quelconques . . . . .	88
6.1.4	Quelques mots sur l'interférométrie hétérodyne . . . . .	89
6.2	Mesure de déplacement par OCT plein champ . . . . .	90
6.2.1	Problématique . . . . .	90

6.2.2	Solutions proposées . . . . .	92
6.2.3	Simulations numériques et résultats expérimentaux . . . . .	97
6.3	Application à l'élastographie . . . . .	104
6.3.1	Résultats sur échantillons fins : déformation globale . . . . .	105
6.3.2	Résultats avec une modulation magnétique <i>in situ</i> : déformation locale . . . . .	106
<b>7</b>	<b>Elastographie par suivi de la propagation des ondes de cisaillement par OCT plein champ</b>	<b>113</b>
7.1	Estimation du module de cisaillement à partir du film de la propagation de l'onde . . . . .	114
7.1.1	Etat de l'art . . . . .	115
7.1.2	Les ondes guidées . . . . .	117
7.1.3	Cas de l'OCT plein champ . . . . .	118
7.2	Montage expérimental et génération de l'onde de cisaillement . . . . .	120
7.2.1	Génération d'onde de cisaillement par pression de radiation . . . . .	120
7.2.2	Montage expérimental . . . . .	122
7.2.3	Performances . . . . .	123
7.2.4	Méthode . . . . .	124
7.3	Détection de l'onde de cisaillement par OCT plein champ et mesure de la vitesse locale . . . . .	125
7.3.1	Détection de l'onde de cisaillement par OCT plein champ . . . . .	125
7.3.2	Estimation de la vitesse locale . . . . .	126
7.3.3	Quelle résolution attendre? . . . . .	127
7.4	Résultats expérimentaux . . . . .	127
7.4.1	Résultats sur les échantillons tests . . . . .	127
7.4.2	Résultat sur des échantillons biologiques : échantillons de cerveau de rat <i>ex vivo</i> . . . . .	129
	<b>Conclusion et Perspectives</b>	<b>133</b>
	<b>Références</b>	<b>137</b>



---

## Introduction

---

Les méthodes optiques connaissent un développement spectaculaire dans le cadre de l'imagerie biomédicale. Parmi ces méthodes l'OCT (pour Optical Coherence Tomography) a joué un rôle particulier : dès les années 1995 cette méthode publiée en 1991 faisait l'objet d'un développement commercial et équipait les premiers hôpitaux (par exemple l'hôpital des XV – XX à Paris). Ce développement concernait l'ophtalmologie et plus précisément les diagnostics rétiniens.

De nombreuses équipes ont tenté d'étendre le champ de l'OCT à d'autres diagnostics en dermatologie et en cancérologie. Pour ces tissus très diffusants le chemin était plus périlleux et les résultats ne font pas encore partie des méthodes utilisées de façon routinière à l'hôpital.

A l'institut Langevin (Paris) a été développée une approche particulière de l'OCT : l'OCT Plein Champ (FF-OCT pour Full Field OCT). Cette approche se démarque de l'OCT traditionnelle par sa résolution qui est supérieure de plus d'un ordre de grandeur dans les trois dimensions. Cette résolution est de l'ordre du micromètre. Elle est très voisine de celle que les pathologistes utilisent pour analyser les lames d'histologie. De ce fait, depuis quelques années, l'institut Langevin et la startup LLTech ont entrepris de nombreuses études en collaboration avec des hôpitaux français ou étrangers pour réaliser des « coupes virtuelles » dans des tissus sains ou pathologiques de différents organes<sup>1</sup>.

Les résultats obtenus sont plus qu'encourageants en termes de sensibilité et de spécificité. Les sensibilités et spécificités atteignent des valeurs comprises entre 80 et plus de 90 %. Cependant, pour introduire une nouvelle méthode apte à susciter l'intérêt du monde médical il faut pouvoir faire beaucoup mieux que les méthodes actuelles. Si c'est le cas en ce qui concerne le temps de mesure (par rapport aux coupes histologiques) les pourcentages de sensibilité et de spécificité doivent être encore améliorés.

Au cours des travaux de recherche décrits dans cette thèse nous nous sommes attachés à développer de nouvelles approches tomographiques, conduisant à de nouvelles formes de contraste susceptible d'enrichir les images d'OCT plein champ pour une meilleure qualité du diagnostic.

Plus précisément, nous avons travaillé sur la détection optique et photo-thermique de na-

---

1. Voir par exemple <http://www.lltechimaging.com/>

nanoparticules d'or par OCT plein champ et la cartographie des propriétés mécaniques par trois méthodes dans le but de développer de nouveaux types de contrastes qui pourront permettre d'améliorer le diagnostic.

## Première partie

Imagerie optique biomédicale des  
tissus biologiques et nouveaux  
contrastes optiques pour l'OCT plein  
champ



# CHAPITRE 1

---

## Imagerie des milieux biologiques

---

### Table des matières

---

1.1	Ondes en milieu biologique et grandeurs optiques moyennes . . . . .	4
1.1.1	L'indice de réfraction . . . . .	4
1.1.2	Le coefficient d'absorption . . . . .	5
1.1.3	Le coefficient de diffusion . . . . .	6
1.1.4	Le facteur d'anisotropie . . . . .	7
1.1.5	Le coefficient d'extinction . . . . .	7
1.2	Techniques d'imagerie optique des milieux biologiques . . . . .	8
1.2.1	Imagerie des photons multi-diffusés . . . . .	9
1.2.2	Imagerie des photons balistiques . . . . .	10

---

Utiliser la lumière afin d'étudier les milieux biologiques est une idée qui remonte à plusieurs siècles. Au 19<sup>e</sup> siècle de premières études en transmission ont été effectuées sur des tissus testiculaires et mammaires. Cependant, ce n'est que depuis une vingtaine d'année que l'application de l'optique à l'imagerie médicale fait l'objet d'une recherche intensive. Malgré de nombreuses avancées, il n'existe actuellement que peu de méthodes optiques utilisées de manière courante par les médecins. Pour les examens médicaux ils préfèrent l'utilisation de méthodes comme l'échographie acoustique, l'imagerie à résonance magnétique (IRM) ou les rayons X.

Cette difficulté d'application de l'optique à l'imagerie médicale vient de la complexité de la propagation des ondes électromagnétiques aux longueurs d'onde du visible ou proche infra-rouge dans les milieux biologiques. En effet, les milieux biologiques possèdent une très grande variété de structures aux tailles et propriétés optiques différentes (cellules, noyaux cellulaires, organelle, protéines, collagènes, *etc.*). Chacune de ces structures va absorber et diffuser la lumière de manière différente. Cette différence rend difficile la description exacte de la propagation des ondes lumineuses dans les tissus biologiques.

Dans ce chapitre, nous allons tout d'abord introduire les grandeurs qui rendent compte de la propagation des ondes dans les tissus : l'absorption, la diffusion et son anisotropie. Ces grandeurs sont essentielles pour décrire statistiquement l'optique des milieux biologiques. Ensuite, nous présenterons brièvement les principales méthodes d'imagerie optique actuellement développées pour les milieux biologiques.

## 1.1 Ondes en milieu biologique et grandeurs optiques moyennes

La description exacte de la propagation de la lumière dans les milieux biologiques est un problème très complexe. Afin de simplifier la description de ces milieux la démarche communément utilisée est de considérer uniquement le flux d'énergie qui se propage dans le milieu et de décrire cette propagation grâce à principalement 4 coefficients décrivant les propriétés moyennes du milieu : l'indice de réfraction, le coefficient d'absorption, le coefficient de diffusion et le coefficient d'anisotropie.

### 1.1.1 L'indice de réfraction

L'indice de réfraction  $n$  est une grandeur sans dimension dépendante de la longueur d'onde. Sa partie réelle décrit la vitesse de phase de la propagation la lumière dans un milieu. Cette grandeur est importante, elle permet notamment de définir la notion de chemin optique. Dans les milieux biologiques qui sont principalement composés d'eau,

pour les longueurs d'onde du visible et du proche infra-rouge, l'indice optique est compris entre 1,33 (l'indice de l'eau) et 1,5 pour les tissus peu hydratés [1].

### 1.1.2 Le coefficient d'absorption

L'absorption caractérise le phénomène par lequel un milieu prélève de l'énergie de manière irréversible au flux d'énergie incident. Afin de décrire ce transfert d'énergie du faisceau incident au milieu on définit le coefficient d'absorption pour un milieu homogène par :

$$\forall \lambda, \mu_a(\lambda) = \frac{dp(\lambda)}{dl} \quad (1.1)$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde,  $p$  la probabilité qu'un photon soit absorbé et  $l$  l'épaisseur du milieu traversé. La quantité  $\mu_a$  s'exprime donc comme l'inverse d'une longueur.

Ainsi, on peut écrire la variation d'un flux de photons  $\phi$  se propageant dans un milieu absorbant comme :

$$\forall \lambda, \frac{d\phi(\lambda)}{\phi(\lambda)} = -\mu_a(\lambda)dl \quad (1.2)$$

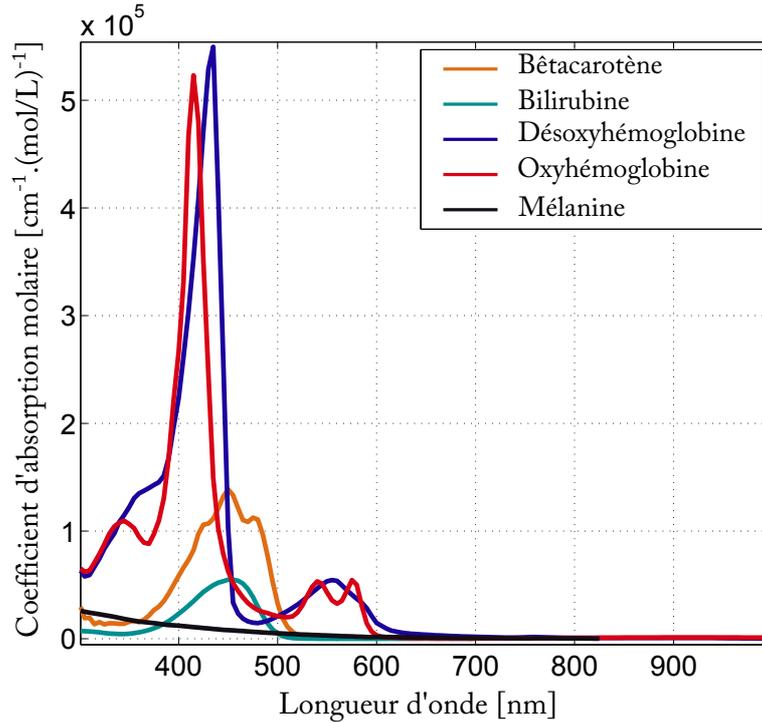
L'intégrale sur l'épaisseur de milieu traversé de cette équation donne pour un milieu homogène la loi d'atténuation exponentielle de Beer-Lambert :

$$\forall \lambda, \phi(\lambda) = \phi_0(\lambda)e^{-\mu_a(\lambda).l} \quad (1.3)$$

avec  $\phi_0$  le flux incident et  $\phi$  le flux transmis.

Ainsi, le coefficient d'absorption  $\mu_a$  correspond à l'inverse d'une longueur caractéristique de l'absorption. Cette grandeur est nommée le libre parcours moyen d'absorption  $l_a$ . Il correspond à la distance moyenne parcourue tel que le flux incident soit divisé par  $e$ .

Dans les milieux biologiques, la composante principale est l'eau. L'eau absorbe très fortement l'ultra-violet (pour des longueurs d'ondes inférieures à 250 nm) et l'infrarouge avec des libres parcours moyens d'absorption inférieurs à 100  $\mu m$ . La figure 1.1 est le tracé du coefficient d'absorption molaire des principaux absorbeurs biologiques. Il est représenté dans le domaine spectral où l'eau n'est pas l'absorbeur dominant [2, 3]. En général, dans les tissus biologiques, le coefficient d'absorption peut aller de 0,1 à 10  $cm^{-1}$ . Pour des longueurs d'ondes supérieures à 700 nm, l'absorption des tissus biologiques est très faible. Elle reste faible jusqu'à environ 1300 nm où l'eau recommence à absorber. Cet intervalle de longueur d'onde correspond à des coefficients d'absorption des tissus biologiques de l'ordre de 0,1 à 0,5  $cm^{-1}$ . Il a été baptisé par J. Parrish et R. Anderson comme « la fenêtre thérapeutique ».



**Figure 1.1** – Coefficient d'absorption molaire en fonction de la longueur d'onde des principaux absorbeurs biologiques (Données issues du site internet [4]).

### 1.1.3 Le coefficient de diffusion

La diffusion<sup>1</sup> caractérise le phénomène par lequel un milieu va dévier une fraction de l'énergie d'un flux incident initialement dans une direction vers une autre direction sans l'absorber. A l'échelle locale, le phénomène de diffusion peut être décrit comme l'interférence entre le champ électromagnétique incident et le champ électromagnétique généré par l'oscillation locale des charges due au champ incident. Ainsi, le phénomène de diffusion est étroitement lié à la géométrie du diffuseur ainsi qu'à son indice de réfraction. De la même manière que pour l'absorption, le coefficient de diffusion  $\mu_d$  est défini comme la probabilité  $p_d$  qu'un photon soit dévié de la direction d'incidence  $\vec{u}$  après avoir traversé une épaisseur  $l$  de milieu tel que :

$$\forall \lambda, \mu_d(\lambda) = \frac{dp_d(\lambda)}{dl} \quad (1.4)$$

La quantité  $\mu_d$  s'exprime comme l'inverse d'une longueur.

Dans le cas de milieu *peu diffusant*, c'est-à-dire où l'on peut négliger l'énergie revenant par diffusion dans la direction initiale, on peut écrire, comme pour l'absorption, une loi d'atténuation exponentielle des photons balistiques de Beer-Lambert tel que :

$$\forall \lambda, \phi_u(\lambda) = \phi_{u0}(\lambda)e^{-\mu_d(\lambda).l} \quad (1.5)$$

1. En français, le terme diffusion est ambigu. Il désigne à la fois le phénomène que nous décrivons dans ce paragraphe mais aussi la propagation suivant l'équation de diffusion comme par exemple la diffusion de la chaleur.

avec  $\phi_{u0}$  le flux d'énergie incident selon la direction  $\vec{u}$  et  $\phi_u$  le flux d'énergie transmis selon la direction  $\vec{u}$ .

Ainsi, le coefficient de diffusion  $\mu_d$  correspond à l'inverse d'une longueur caractéristique de diffusion nommée libre parcours moyen de diffusion  $l_d$ . Il correspond à la distance moyenne entre deux évènements de diffusion.

A l'aide du libre parcours moyen de diffusion, en fonction de l'épaisseur du milieu traversé  $L$  on peut distinguer trois régimes de propagation dans les milieux diffusant :

$L \ll l_d$  : **régime balistique** : le flux d'énergie incident est très peu dévié de sa direction initiale. L'optique géométrique s'applique et les méthodes d'imagerie classique peuvent être utilisées.

$L \sim l_d$  : **régime de diffusion simple**

$L \gg l_d$  : **régime de diffusion multiple** : les photons subissent plusieurs évènements de diffusion. Dans ce cas, la répartition de l'énergie dans le milieu peut être calculée de manière simplifiée par la résolution d'une équation de diffusion.

Dans les tissus biologiques le coefficient de diffusion  $\mu_d$  varie en général de 50 à 500  $cm^{-1}$  (sauf dans certains cas particuliers comme l'œil).

### 1.1.4 Le facteur d'anisotropie

Afin de compléter la description du phénomène de diffusion, on définit communément le facteur d'anisotropie d'une diffusion. En effet, le coefficient de diffusion  $\mu_d$  ne décrit pas de quelle manière est dévié le flux incident. Ainsi, le facteur d'anisotropie  $g$  est défini comme :

$$\forall \lambda, g(\lambda) = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} \vec{u} \cdot \vec{u}' p_{uu'}(\vec{u} \cdot \vec{u}', \lambda) d\Omega \quad (1.6)$$

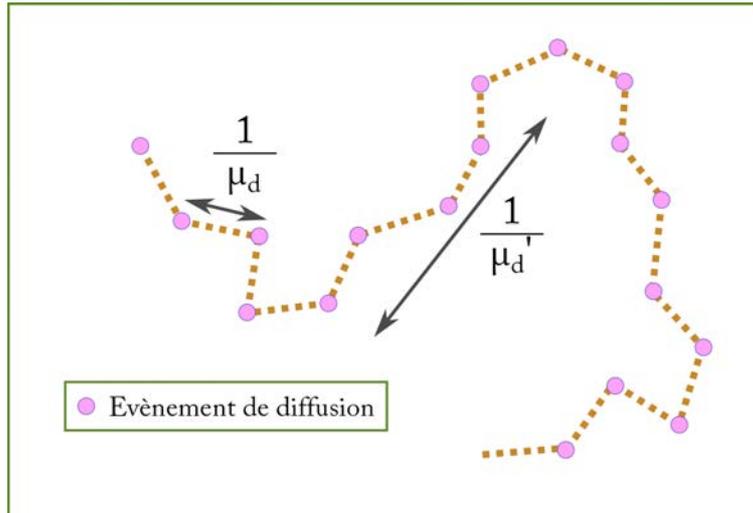
avec  $\Omega$  l'angle solide,  $p_{uu'}$  la probabilité qu'un photon arrivant selon la direction  $\vec{u}$  soit dévié selon la direction  $\vec{u}'$ .

Ainsi, pour une diffusion parfaitement isotrope, le facteur d'anisotropie  $g$  est nul. Celui-ci vaut 1 dans le cas d'une diffusion totalement vers l'avant. A l'aide de ce facteur d'anisotropie on peut calculer un coefficient de diffusion réduit  $\mu'_d$  tel que  $\mu'_d = \mu_d(1 - g)$ . Son inverse  $l'_d$  est appelé libre parcours moyen de transport. Il correspond à la distance moyenne parcourue par un photon avant de perdre complètement sa direction initiale de propagation. La figure 1.2 schématise la différence entre le coefficient de diffusion et le coefficient de diffusion réduit. Dans les milieux biologiques, la diffusion est majoritairement vers l'avant avec des facteurs d'anisotropie  $g$  compris entre 0,7 et 0,9.

### 1.1.5 Le coefficient d'extinction

Les milieux biologiques sont à la fois diffusants et absorbants. Afin de décrire l'atténuation du flux d'énergie incident  $\phi_0$  lors de la traversée du milieu, on définit le coefficient d'extinction  $\mu_e$  tel que l'atténuation du flux incident s'écrive :

$$\forall \lambda, \phi(\lambda) = \phi_0(\lambda) e^{-\mu_e(\lambda) \cdot l} \quad (1.7)$$



**Figure 1.2** – Représentation schématique de la différence entre le coefficient de diffusion  $\mu_d$  et le coefficient de diffusion réduit  $\mu'_d$ .

Selon le régime de diffusion, la définition du coefficient d'extinction  $\mu_e$  est différente. Dans le cas de la diffusion multiple, c'est-à-dire  $l \gg l_d$ , il est nécessaire de prendre en compte les photons qui, après plusieurs évènements de diffusion, retrouvent leur direction initiale de propagation. Ainsi,  $\mu_e$  est défini par les équations suivantes [5] :

$$\begin{cases} \mu_e = \mu_d + \mu_a & \text{en régime peu diffusant} \\ \mu_e = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_d)} & \text{en régime de diffusion multiple} \end{cases} \quad (1.8)$$

La décroissance exponentielle du flux incident, due principalement à la diffusion, est une limitation forte pour l'imagerie optique en profondeur. En effet, pour un milieu caractérisé par des coefficients ( $\mu_a = 0,05 \text{ cm}^{-1}$ ,  $\mu_s = 50 \text{ cm}^{-1}$ ,  $g = 0,8$ ) typique des tissus biologiques, après  $1 \text{ cm}$  de milieu traversé le signal balistique est divisé par  $10^{22}$  et le signal diffus est par environ 10.

## 1.2 Techniques d'imagerie optique des milieux biologiques

De nombreuses méthodes optiques ont été développées afin de pouvoir imager à l'intérieur des milieux diffusants comme les milieux biologiques. Ces méthodes peuvent être distinguées en 2 grands groupes. Le premier groupe rassemble les méthodes qui utilisent les photons multi-diffusés afin de construire une image dans le milieu. Le second groupe utilise les méthodes qui cherchent à sélectionner uniquement les photons qui n'ont été diffusés qu'une seule fois. Cela permet d'utiliser l'optique géométrique et des méthodes d'imagerie «classique». Dans ce chapitre nous allons faire un bref inventaire des principales méthodes existantes.

### 1.2.1 Imagerie des photons multi-diffusés

#### Tomographie et spectroscopie optique diffuse

La Tomographie Optique Diffuse (DOT) [6] est une technique purement optique. Son principe est de cartographier le coefficient de diffusion réduit  $\mu'_d$  et le coefficient d'absorption  $\mu_a$  à l'intérieur du milieu diffusant. Cette cartographie s'effectue à partir de la mesure de la réflectance en surface ou parfois de la transmittance. Ensuite l'estimation des deux coefficients s'effectue habituellement par la résolution d'un problème inverse à partir de l'Equation de Transfert Radiatif (ETR) ou de l'une de ses approximations comme l'équation de diffusion. A l'aide de ce type de méthode, la résolution accessible est une fraction de la profondeur d'imagerie (par exemple, une résolution de 1 cm à 5 cm de profondeur). Cette résolution est moins bonne que celle des techniques comme l'IRM ou l'échographie mais l'avantage est de pouvoir accéder aux propriétés optiques. Notamment, cette méthode s'applique bien à la localisation de sources de fluorescence. Couplée à de la spectroscopie (Spectroscopie Optique Diffuse (DOS)) elle permet de faire de l'imagerie fonctionnelle. Elle est très utilisée dans le cas du cerveau [7], notamment en mesurant localement le taux d'oxygénation de l'hémoglobine.

#### Imagerie multimodale : optique/acoustique

Comme nous l'avons mentionné, l'un des principaux désavantages de la tomographie optique diffuse est le fait que la résolution est dégradée avec la profondeur. Afin d'améliorer la résolution en profondeur, des approches multimodales ont été développées (avec notamment l'acousto-optique et la photo-acoustique). L'idée de ces méthodes est de coupler l'optique à l'acoustique. Le but est d'accéder aux propriétés optiques dans les milieux diffusants avec une résolution donnée par l'acoustique (typiquement du millimètre à 5 cm dans les tissus biologiques).

**L'acousto-optique** Le principe de l'imagerie acousto-optique a été introduit par D. Dolfi et F. Micheron [8] en 1989. L'idée est d'utiliser les ultrasons afin de marquer les photons passant par le point focal ultrasonore et de les détecter de manière optique. En effet, les photons passant par le point focal acoustique vont subir une modulation de leur phase. Cette modulation est due, d'une part, à l'effet Doppler engendré par le déplacement des diffuseurs et d'autre part, à la modulation locale de l'indice de réfraction due aux cycles de compression-détente à la fréquence acoustique de l'onde ultrasonore. Ainsi, en ne détectant que les photons décalés en fréquence, il est possible d'obtenir une résolution millimétrique (donnée par la tâche focale acoustique) avec un contraste optique à des profondeurs allant jusqu'à 5 cm. Cependant, la difficulté principale de cette méthode réside dans la détection sélective des photons modulés. Les techniques développées à cette fin sont nombreuses, une revue complète de ces techniques est disponible aux références [9,10].

**La photo-acoustique** De la même manière que pour l'imagerie acousto-optique, l'imagerie photo-acoustique a pour but de tirer avantage de la bonne résolution acoustique en

profondeur tout en ayant accès à un contraste optique. Le principe est basé sur l'effet photo-acoustique connu depuis les années 1880 [11]. Cet effet décrit comment, lorsqu'un milieu est illuminé de manière non-stationnaire, les absorbeurs présents dans le milieu (qui convertissent la majorité de l'énergie absorbée en chaleur) engendrent localement une élévation de température et donc une dilatation locale du milieu qui génère une onde acoustique détectable à l'aide d'un transducteur acoustique. Ainsi, cette méthode permet de détecter de manière acoustique un contraste optique d'absorption avec la résolution de l'acoustique. De plus, la simplicité de la détection acoustique a grandement aidé au développement de cette technique. A l'heure actuelle elle est de loin la plus développée en optique diffuse avec notamment de très bons résultats *in vivo* [12].

### 1.2.2 Imagerie des photons balistiques

La seconde approche communément utilisée afin de faire l'imagerie optique des tissus diffusants est de sélectionner uniquement les photons balistiques (en transmission ou bien rétrodiffusés une fois).

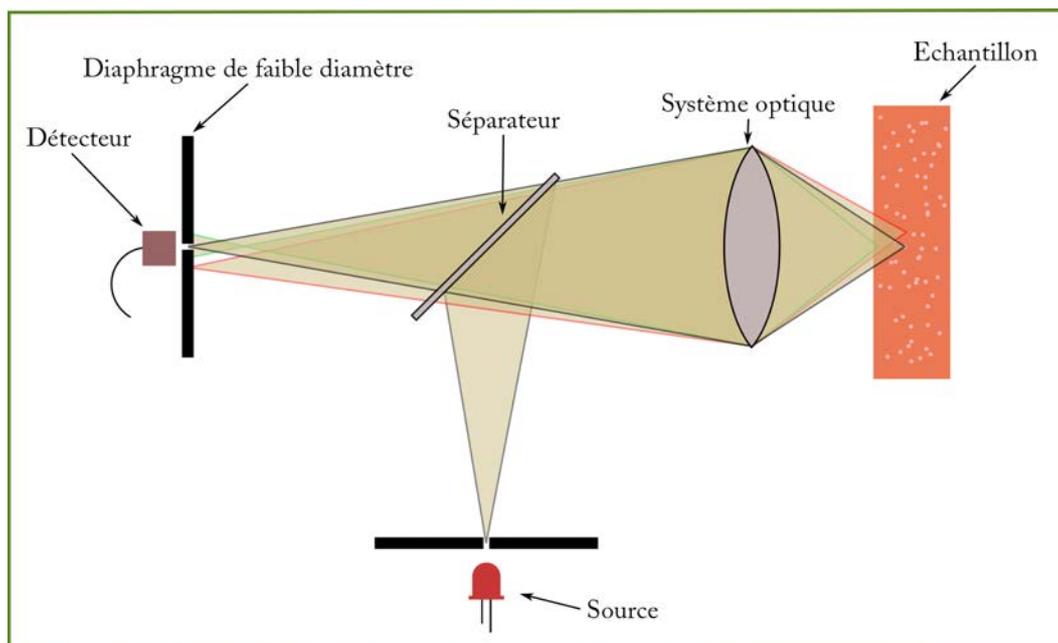
Sélectionner les photons balistiques permet d'appliquer les lois de l'optique géométrique et ainsi de pouvoir réaliser de l'imagerie avec une résolution microscopique. Cependant, ces méthodes sont basées sur la détection des photons balistiques. Leur profondeur de pénétration est limitée à quelques libre parcours moyen de diffusion. Dans le cas des milieux biologiques cette pénétration est typiquement d'environ 1 mm.

Dans cette partie, nous présentons les principales méthodes de microscopie optique des tissus biologiques en distinguant les méthodes utilisant un filtrage spatiale des méthodes utilisant un filtrage temporel.

#### Sélection spatiale des photons balistiques

**Microscopie confocale** Le principe de l'imagerie confocale a été introduit dans les années 1950 par M. Minsky [13]. L'idée est de séparer la lumière provenant de la zone du point focal objet d'un système optique (typiquement un objectif de microscope) de la lumière provenant du reste de l'objet. La lumière hors du volume focal est filtrée spatialement par l'utilisation d'un diaphragme de faible diamètre conjugué avec le point focal du système optique. La figure 1.3 représente un schéma de principe d'un microscope confocal en réflexion.

Le diaphragme permet de sélectivement mesurer les photons provenant du volume focal du système optique et ainsi de limiter spatialement la mesure dans les 3 dimensions d'espace. Ensuite, en balayant un plan ou un volume de l'échantillon il est possible de reconstruire une image 3D de celui-ci. Il existe de nombreuses configurations de microscope confocal basé sur ce principe. A l'heure actuelle, cette technique est de loin la technique la plus utilisée en biologie, notamment car elle est bien adaptée à l'imagerie de fluorescence. La résolution de ce type de microscope dépend fortement de l'ouverture numérique du système optique utilisé. Typiquement, des ouvertures numériques supérieures à 0,8 sont utilisées. Elles correspondent à des résolutions latérales inférieures à 1  $\mu\text{m}$  et des résolutions axiales d'environ 2  $\mu\text{m}$ . Elles permettent une pénétration de 5 à 200  $\mu\text{m}$  dans les



**Figure 1.3** – Schéma de principe d'un microscope confocal en réflexion.

tissus biologiques. Les calculs détaillés de la résolution et d'autres points techniques sont disponibles à la référence [14].

**Microscopie en illumination structurée** En plus de ses propriétés de super-résolution, l'illumination structurée permet de faire une imagerie plein champ des milieux diffusants par filtrage spatial des photons extérieurs à la zone de mise au point [15, 16].

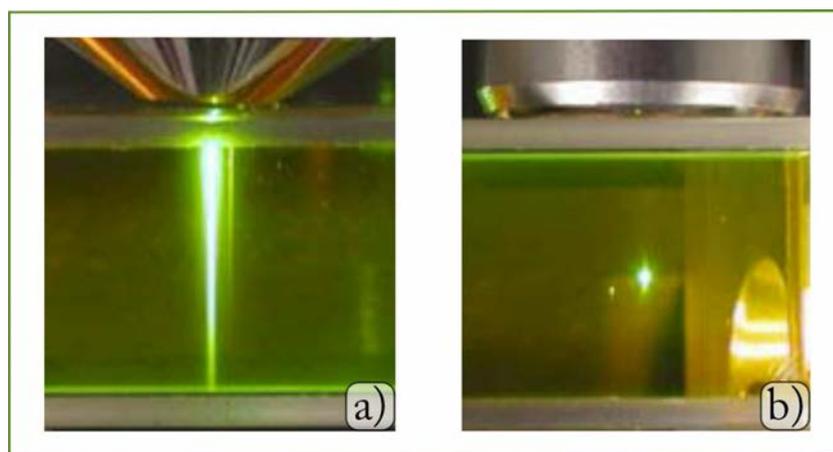
Le principe est de moduler l'éclairage dans le plan de mise au point en y projetant l'image d'une grille<sup>2</sup> (1D ou 2D) de fréquence spatiale connue. L'image de la grille de fréquence spatiale connue n'est nette que sur une certaine épaisseur correspondant à la profondeur de champ de cette fréquence spatiale. Ainsi, seulement cette épaisseur sera modulée spatialement par l'illumination. A l'aide de plusieurs images prises pour différentes positions de la grille il est possible de reconstruire l'image de cette épaisseur de l'échantillon [14]. Typiquement, dans son utilisation pour l'imagerie des tissus diffusants, la microscopie en illumination structurée a des performances similaires à la microscopie confocale. Et comme l'imagerie confocale, l'illumination structurée permet à la fois de mesurer de la rétrodiffusion ou de la fluorescence.

**Microscopie non-linéaire** Une autre méthode couramment utilisée afin de faire l'imagerie des milieux diffusants est d'utiliser des propriétés non-linéaires endogènes ou exogènes. Les deux exemples principaux sont la génération de second (ou troisième) harmonique ou la fluorescence à plusieurs photons. Nous ne détaillerons pas ces techniques ici mais elles sont détaillées à la référence [14]. Dans ce paragraphe nous mentionnons simplement la manière dont l'utilisation de phénomènes non-linéaires permet de réaliser un

2. L'utilisation de grille simplifie la reconstruction mais en pratique l'utilisation d'autres motifs est possible comme par exemple une figure de tavelure optique [17]

filtrage spatial des photons en provenance du plan de mise au point.

En effet, le principe de base est que les phénomènes non-linéaires sont sensibles au carré (ou à une puissance supérieure) de la densité de puissance contrairement au phénomène linéaire. Cette dépendance non-linéaire a pour effet de localiser ces effets au point focal où l'intensité est maximale. La figure 1.4 illustre bien ce confinement. L'image a correspond à la fluorescence linéaire dans un milieu peu diffusant et l'image b correspond à la fluorescence à 2 photons. Dans le cas non-linéaire l'effet est mieux confiné au point focal. En pratique, les méthodes non-linéaires sont très efficaces et présentent des performances supérieures à la microscopie confocale.



**Figure 1.4** – Illustration du confinement spatial des phénomènes non-linéaires (ici de la fluorescence à 2 photons dans un échantillon de fluorescéine). L'image a correspond à la fluorescence linéaire. L'image b correspond à la fluorescence à 2 photons [18].

### Sélection temporelle des photons balistiques

Les seconds types de méthodes utilisées sont les méthodes de mesure de temps de vol pour lesquelles le filtrage n'est plus spatial mais temporel. De manière similaire à l'échographie acoustique, ces méthodes localisent les diffuseurs en mesurant le temps de vol des photons.

**Mesure directe de temps de vol** La première approche est la mesure directe du temps de vol. A cause de la grande vitesse de la lumière, cette mesure directe est difficile. Elle est cependant réalisable avec l'utilisation de détecteur ultra-rapide comme les photodiodes à avalanche ou d'effets non-linéaires qui puissent réaliser un fenêtrage temporel comme par exemple l'effet Kerr [19] ou la diffusion de Raman stimulé [20]. Bien que faisables, ces méthodes nécessitent en général des dispositifs optiques et électroniques lourds pour des performances inférieures aux autres méthodes. C'est pour cela qu'en pratique, à ces méthodes sont préférées les méthodes de filtrage spatial ou les méthodes interférométriques.

**Tomographie par cohérence optique** Une autre approche consiste à utiliser un interféromètre illuminé par une source large bande afin de pouvoir localiser les diffuseurs

en fonction du temps de vol des photons diffusés. Cette approche a été introduite en 1991 par J. G. Fujimoto sous le nom de Tomographie de Cohérence Optique (OCT) [21]. Cette méthode permet de faire une imagerie *in vivo* dans les milieux biologiques avec une profondeur de pénétration de typiquement 1 mm et une résolution de 1 à 20  $\mu\text{m}$  [22]. Ces performances ont permis à l'OCT de connaître en moins de 10 ans un transfert du laboratoire à l'hôpital et d'être à l'heure actuelle un outil indispensable aux ophtalmologistes. Dans le chapitre suivant, nous présenterons en détails le principe de l'OCT et l'OCT plein champ que nous développons au laboratoire.

## Conclusion

A l'heure actuelle, l'imagerie optique biomédicale est un domaine de recherche très actif, notamment avec les nouveaux développements des techniques multimodales comme l'acousto-optique et la photo-acoustique permettant de limiter le compromis entre la profondeur de pénétration et la résolution des techniques d'imagerie optique classique des milieux diffusants.

Les techniques optiques d'imagerie médicale peuvent être classées en deux catégories. La première catégorie regroupe les techniques d'imagerie des photons balistiques comme la microscopie confocale ou l'OCT. Ces techniques permettent d'accéder à la surface des échantillons avec une très bonne résolution (typiquement à des profondeurs inférieures à 1 mm). La deuxième catégorie rassemble les techniques d'imagerie des photons diffus. Elles permettent de pénétrer plus en profondeur (typiquement à des profondeurs de 5 à 10 cm) mais la résolution se dégrade fortement avec la profondeur (sauf pour les techniques multimodales que nous avons mentionnées pour lesquelles la résolution est donnée par la résolution ultrasonore (typiquement 1 mm<sup>3</sup>)).



---

OCT plein champ et contrastes accessibles

---

**Table des matières**

---

2.1	Principe de la tomographie de cohérence optique . . . . .	<b>16</b>
2.1.1	Interférométrie et cohérence temporelle . . . . .	16
2.1.2	Tomographie de cohérence optique « classique » . . . . .	19
2.1.3	Différentes approches de tomographie de cohérence optique à balayage . . . . .	21
2.2	L'OCT plein champ . . . . .	<b>22</b>
2.2.1	Principe . . . . .	22
2.2.2	Performances . . . . .	24
2.2.3	OCT plein champ dans les milieux biologiques . . . . .	26
2.2.4	Applications . . . . .	26
2.3	OCT plein champ : contrastes optiques accessibles . . . . .	<b>27</b>
2.3.1	Polarisation et biréfringence . . . . .	27
2.3.2	Mesure des indices de réfraction locaux . . . . .	27
2.3.3	Mesure des coefficients de diffusion locaux . . . . .	28

---

Dans ce chapitre, nous allons présenter la technique d'imagerie par OCT plein champ et les principales techniques utilisées afin d'ajouter aux images d'OCT plein champ des informations optiques comme l'indice de réfraction, la polarisation ou le coefficient de diffusion local.

L'OCT plein champ telle que nous la décrirons est une technique d'imagerie introduite en 2001 [23] au laboratoire d'optique de l'ESPCI (actuellement l'institut Langevin). Cette technique est dérivée de l'OCT classique qui a été développée durant les années 1990 par J. Fujimoto [21] et A. F. Fercher [24]. L'idée était d'utiliser les propriétés interférométriques en lumière faiblement cohérente (temporellement) afin d'accéder aux images de manière similaire à l'échographie acoustique et à la tomographie des milieux diffusants par mesure du temps de vol des photons rétrodiffusés.

Ainsi, nous allons tout d'abord présenter les bases de l'interférométrie en introduisant la notion centrale de cohérence temporelle. Ensuite, nous présenterons l'OCT classique ainsi que ses principales déclinaisons présentes dans la littérature. Enfin, nous présenterons l'OCT plein champ ainsi que les principaux contrastes optiques utilisés pour enrichir les images d'OCT plein champ.

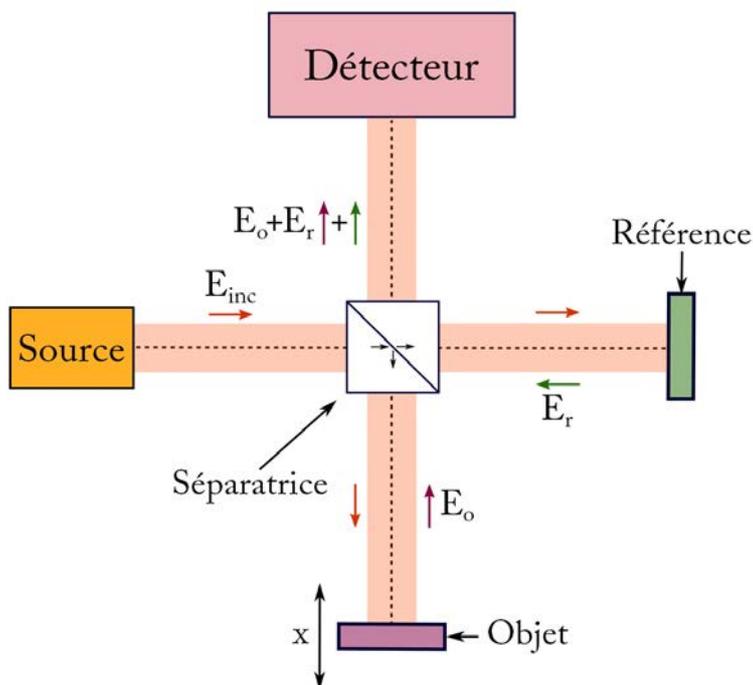
## 2.1 Principe de la tomographie de cohérence optique

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'OCT est une technique d'imagerie tirant avantage de l'interférométrie. Elle utilise notamment le fait qu'un interféromètre (par exemple de type Michelson) réalise intrinsèquement la comparaison (*i.e.* calcule la corrélation) entre un faisceau de référence et le faisceau objet de l'interféromètre. Dans cette partie nous présentons les bases de l'interférométrie qui nous permettront d'introduire la notion de longueur de cohérence. La longueur de cohérence définit la résolution axiale des méthodes OCT, c'est-à-dire, leur capacité à sélectionner optiquement une profondeur donnée dans un milieu diffusant.

### 2.1.1 Interférométrie et cohérence temporelle

Dans cette partie, nous présentons les phénomènes d'interférences dans le cas d'un interféromètre de Michelson qui est la configuration la plus utilisée en OCT et celle que nous utilisons pour notre montage d'OCT plein champ. La figure 2.1 est le schéma de principe de l'interféromètre de Michelson. Dans ce type d'interféromètre, l'illumination incidente est séparée en amplitude par un séparateur de faisceau qui distribue l'illumination dans le bras de référence et le bras objet de l'interféromètre. Ensuite, la lumière rétrodiffusée

ou réfléchi dans les différents bras de l'interféromètre est superposée après un nouveau passage par le séparateur de faisceau et cette superposition des deux champs provenant des deux bras de l'interféromètre est mesurée à l'aide d'un détecteur.



**Figure 2.1** – Schéma de principe de l'interféromètre de Michelson.

Dans la très grande majorité des cas, le temps d'exposition des détecteurs optiques est très grand par rapport à la période de la lumière (typiquement environ  $10^{-14}$  s dans le visible). Ainsi, l'intensité  $I$  mesurée en sortie de l'interféromètre de Michelson dans le cas d'une illumination stationnaire peut s'écrire comme la valeur moyenne temporelle de l'énergie, tel que :

$$\forall \tau, I(\tau) = \langle | E_o(t + \tau) + E_r(t) |^2 \rangle_t \quad (2.1)$$

avec  $\langle \cdot \rangle_t$  la moyenne temporelle sur le temps d'intégration du détecteur et  $\tau$  le décalage temporel entre les champs causé par la différence de marche tel que  $\tau = \frac{\delta z}{c}$  où  $\delta z$  correspond à la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre et  $c$  la vitesse de la lumière.

En développant l'équation 2.1 on obtient :

$$\forall \tau, I(\tau) = \langle | E_o(t + \tau) |^2 \rangle_t + \langle | E_r(t) |^2 \rangle_t + 2\Re \langle E_o(t + \tau) E_r^*(t) \rangle_t \quad (2.2)$$

avec  $\Re$  la partie réelle et  $*$  le complexe conjugué.

En posant  $I_0$  l'intensité correspondant à la somme des intensités issues de chaque bras de l'interféromètre pris séparément tel que  $I_0 = \langle |E_o(t + \tau)|^2 \rangle_t + \langle |E_r(t)|^2 \rangle_t$ . L'équation 2.2 peut se réécrire comme :

$$\forall \tau, I(\tau) = I_0 + 2\Re(C(\tau)) \quad (2.3)$$

avec  $C$  la fonction de corrélation croisée des champs  $E_r$  et  $E_o$  tel que :

$$\forall \tau, C(\tau) = \langle E_o(t + \tau)E_r^*(t) \rangle_t \quad (2.4)$$

Ainsi, un interféromètre de Michelson permet de réaliser optiquement le calcul de la partie réelle de la corrélation temporelle des champs issus des bras de l'interféromètre à une constante près.

En échographie acoustique, la corrélation entre l'onde émise et l'onde reçue est réalisée en un post-traitement afin d'estimer un temps de vol. De manière similaire, un interféromètre permet de réaliser le calcul de la corrélation du champ objet avec le champ de référence. La résolution temporelle de la mesure de temps de vol par corrélation croisée (correspondant à la cohérence temporelle de l'illumination) est donnée par la largeur à mi-hauteur de la fonction de corrélation  $C$  et peut être directement reliée à la densité spectrale de la puissance de l'illumination incidente par le théorème de Wiener-Khinchin.

En pratique, en considérant une illumination incidente monochromatique, on peut écrire les champs issus du bras objet et référence de l'interféromètre comme respectivement :

$$\begin{cases} \forall z, t > 0, E_o(z, t) = a_o e^{i\phi_o(z, t)} \\ \forall z, t > 0, E_r(z, t) = a_r e^{i\phi_r(z, t)} \end{cases} \quad (2.5)$$

avec  $z$  la variable spatiale selon l'axe de propagation,  $a_o$ ,  $\phi_o$  et  $a_r$ ,  $\phi_r$  respectivement l'amplitude et la phase de l'onde issue du bras objet et référence de l'interféromètre.

L'intensité mesurée s'écrit à partir de l'équation 2.3 comme :

$$\forall \delta z, I(\delta z) = I_0 + 2a_o a_r \cos(2\pi\sigma\delta z) \quad (2.6)$$

avec  $\sigma$  le nombre d'onde.

Dans le cas d'une illumination polychromatique de densité spectrale normalisée  $\sigma \mapsto s(\sigma)$ , l'interférogramme est la somme des contributions des différentes longueurs d'onde tel que :

$$\forall \delta z, I(\delta z) = I_0 + 2a_o a_r \int_{\sigma} s(\sigma) \cos(2\pi\sigma\delta z) d\sigma \quad (2.7)$$

Soit en faisant apparaître la transformée de Fourier de la densité spectrale  $TF[s]$  :

$$\boxed{\forall \delta z, I(\delta z) = I_0 + 2a_o a_r \cdot TF[s](\delta z) \cdot \cos(2\pi\sigma_0 \cdot \delta z)} \quad (2.8)$$

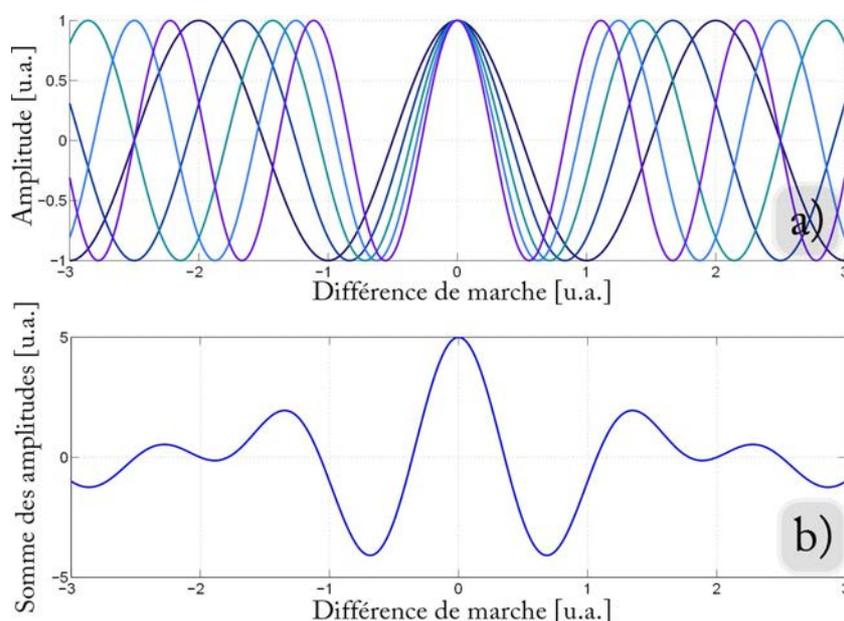
avec  $\sigma_0$  le nombre d'onde central de l'illumination.

A partir de l'équation 2.8, la longueur de cohérence  $L_c$  est définie comme la différence de marche maximale pour laquelle les interférences sont visibles [25]. Cette longueur se définit directement à partir de la transformée de Fourier de la densité spectrale. Pour une

densité spectrale gaussienne, la longueur de cohérence  $L_c$  s'écrit comme :

$$L_c = \frac{2 \ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} \quad (2.9)$$

avec  $\lambda_0$  la longueur d'onde centrale et  $\Delta \lambda$  la largeur spectrale à mi-hauteur. Plus le spectre d'illumination est large plus la longueur de cohérence (et la cohérence temporelle) est petite. Afin d'illustrer ce phénomène, nous avons tracé à la figure 2.2a cinq sinusoïdes de fréquence différente (de  $f$  à  $f/2$ ) en phase pour une différence de marche nulle. A la figure 2.2b la somme de ces sinusoïdes est tracée. En phase, pour une différence de marche nulle, les signaux de fréquences différentes se superposent de manière constructive alors que pour des différences de marche non nulles, la somme se brouille.

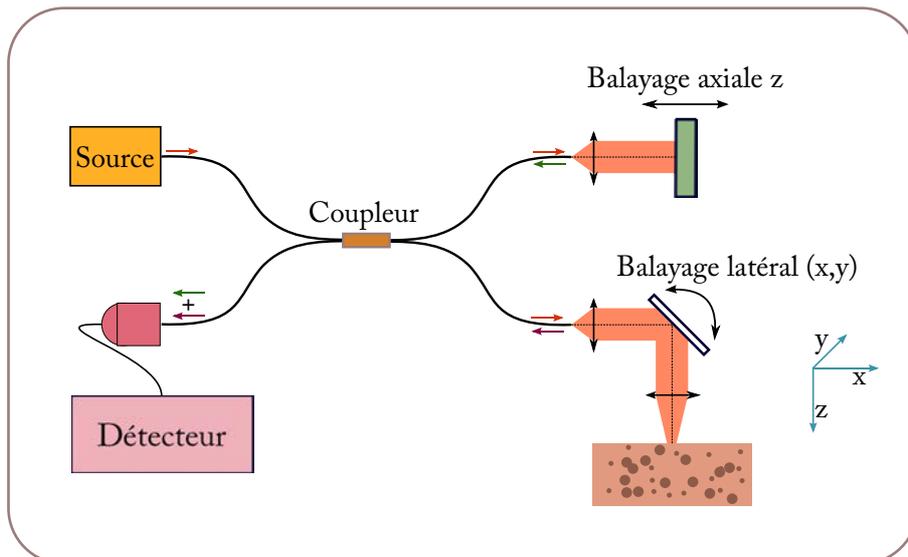


**Figure 2.2** – Illustration de la cohérence temporelle. L'image a correspond aux amplitudes de cinq sinusoïdes et l'image b correspond à la somme cohérente de ces sinusoïdes.

### 2.1.2 Tomographie de cohérence optique « classique »

Le principe de l'OCT est de tirer avantage des propriétés interférométriques que nous avons décrites afin de tomographier les hétérogénéités d'indice dans les milieux diffusants. La figure 2.3 représente un dispositif fibré typique d'OCT classique temporelle (désigné sous l'acronyme de TD-OCT avec TD pour *time domain*).

L'idée est de focaliser une illumination large bande dans l'échantillon afin d'obtenir un petit *volume de cohérence*. Ce volume est défini par l'extension latérale de la tâche focale d'illumination et axialement par la longueur de cohérence de l'illumination. En balayant ce *volume de cohérence* il est possible de réaliser la tomographie 3D de l'échantillon. Pour illustrer cette tomographie, voici le cas d'un milieu constitué de  $N$  réflecteurs ponctuels de position  $r_i$  ( $i \in \{1, 2, \dots, N\}$ ). En notant,  $R_r$  la réflectivité du miroir,  $R_i$  la réflectivité de



**Figure 2.3** – Représentation schématique d'un montage d'OCT temporelle (TD-OCT) utilisant un interféromètre de Michelson fibré.

la particule  $i$ ,  $I_0$  la somme des intensités issues de chaque bras de l'interféromètre pris séparément et  $F$  la répartition spatiale de lumière, l'équation 2.8 exprimant l'intensité  $I$  mesurée par le capteur (généralement un détecteur mono-élément) peut être réécrite comme :

$$\forall \delta z, I(x, y, \delta z) = I_0 + 2\alpha R_r \sum_{i=1}^N R_i \cdot TF[s](\delta z - \delta z_i) \cdot F(r_i) \cdot \cos(2\pi\sigma_0 \cdot (\delta z - \delta z_i)) \quad (2.10)$$

avec  $\alpha$  une constante dépendante de l'intensité d'illumination et  $\delta z_i$  la différence de marche correspondant à la position du diffuseur  $i$ .

Ainsi, en balayant axialement le miroir de référence, il est possible de faire un profil de la réflectivité locale en fonction de la profondeur (à un facteur près). La résolution transverse est directement reliée à la largeur spectrale de l'illumination. La résolution axiale est directement dépendante de répartition spatiale de l'illumination. Pour finir, un balayage latéral permet de reconstruire une tomographie 3D.

## Performances

**Résolution axiale :** Comme mentionné précédemment, la résolution axiale est directement liée à l'étendue (et à la forme) du spectre d'illumination. Les sources utilisées en général sont les lasers (femtoseconde), les diodes superluminescentes (SLD), les diodes électroluminescentes (LED) et les ampoules quartz-halogènes. Ces sources permettent d'accéder à des résolutions axiales allant de 1 à 10  $\mu m$ .

**Résolution latérale :** La résolution latérale est indépendante de la résolution axiale<sup>1</sup>.

1. Le découplage entre résolution axiale et latérale est une propriété très intéressante de l'OCT. Elle permet à l'OCT d'adapter indépendamment les résolutions axiale et latérale selon les applications. Il

En OCT classique, la résolution latérale est directement liée à la répartition spatiale de l'illumination et donc au système optique utilisé (et en particulier à son ouverture numérique). De plus, soulignons que la profondeur d'exploration en OCT doit être voisine de la profondeur de champ du système optique. Ainsi, le choix de la résolution latérale influe sur la profondeur d'imagerie. On notera que certaines approches utilisant par exemple des faisceaux de Bessel permettent une augmentation de la profondeur de champ et donc la profondeur d'imagerie en conservant une bonne résolution latérale [26]. Typiquement, pour les systèmes à application médicale oculaires, les résolutions latérales sont comprises entre 10 et 20  $\mu\text{m}$ .

**Sensibilité :** Un paramètre important pour caractériser les performances d'un système d'OCT est la plus petite réflectivité mesurable par le système (*i.e.* tel que le rapport signal sur bruit soit de 1). En général, les systèmes d'OCT permettent d'accéder à des réflectivités de  $10^{-9}$  à  $10^{-10}$  notamment grâce à l'amplification du signal par le champ de référence. En pratique, les effets de diffusion multiple ne permettent pas d'atteindre ces niveaux.

### 2.1.3 Différentes approches de tomographie de cohérence optique à balayage

L'OCT temporelle a été le premier type d'OCT développé. Depuis, de nombreuses approches ont été étudiées. Nous présentons brièvement dans ce paragraphe, de manière non exhaustive, les principales approches proposées. Une présentation complète des différentes méthodes et de leur performances est disponible aux références suivantes [22, 27].

#### OCT spectrale

L'OCT spectrale est une approche d'OCT pour laquelle il n'est pas nécessaire de balayer la différence de marche afin de sonder l'échantillon en profondeur [28, 29]. Le principe est de mesurer l'interférogramme en fonction du nombre d'onde  $\sigma \mapsto I(\sigma)$  à la place de mesurer l'interférogramme en fonction de la différence de marche  $\delta z \mapsto I(\delta z)$ . Comme on peut le remarquer sur l'équation 2.6, le nombre d'onde et la différence de marche sont deux variables conjuguées. Ainsi, le calcul de la transformée de Fourier de l'interférogramme en fonction du nombre d'onde donne accès à  $\delta z \mapsto I(\delta z)$  et donc à un profil en profondeur sans balayage mécanique de la différence de marche. Cette approche a beaucoup de succès car, d'une part, elle permet d'augmenter la vitesse d'acquisition (seul un balayage latéral est nécessaire pour obtenir une image 3D) et d'autre part, l'acquisition de toutes les profondeurs simultanément permet d'augmenter la sensibilité en diminuant le bruit de mesure [30, 31]. En pratique, l'acquisition se fait majoritairement de deux manières : soit par l'utilisation d'un prisme ou d'un réseau de diffraction puis la détection sur une barrette CCD, soit par l'utilisation d'un laser accordable balayant à haute fréquence la longueur d'onde (dans ce dernier cas la méthode est appelée *swept source OCT*).

---

faut noter que ce découplage n'est vrai que dans le cas où la longueur de cohérence est inférieure à la profondeur de champ du système optique utilisé.

## OCM

Le principe de la microscopie de cohérence optique (OCM) a été introduit en 1994 [26, 32]. L'idée est d'utiliser le principe de l'OCT dans une configuration de microscopie confocale. L'objectif est d'améliorer les performances en ajoutant au sectionnement optique dû à la profondeur de champ celui dû à la cohérence temporelle. De plus, la détection interférométrique permet d'amplifier les signaux issus de réflecteur dans le volume de cohérence, augmentant ainsi la sensibilité de la mesure.

## 2.2 L'OCT plein champ

L'OCT plein champ est une approche de l'OCT qui a été développée au laboratoire d'optique de l'ESPCI (actuellement l'institut Langevin) [33]. Cette approche permet de réaliser de manière plein champ une imagerie d'OCT dans les milieux diffusants sans avoir à balayer latéralement.

### 2.2.1 Principe

Le principe de l'OCT plein champ est de réaliser de la microscopie dite « en face » dans les échantillons diffusants à une profondeur sélectionnée par le principe de l'OCT (cohérence temporelle de l'illumination).

La figure 2.4 présente le schéma typique d'un montage d'OCT plein champ dans une configuration d'un interféromètre de Linnik<sup>2</sup> (interféromètre de Michelson avec un objectif de microscope dans chaque bras de l'interféromètre).

L'interféromètre est illuminé à l'aide d'une source large bande et incohérente spatialement (comme par exemple une lampe halogène ou une LED). Pour faire une imagerie plein champ, deux objectifs de microscope sont utilisés afin de conjuguer l'image du miroir de référence et l'image du plan d'imagerie du capteur 2D. Le capteur est typiquement une caméra CCD (Charged-Coupled Device) ou CMOS (Complementary Metal-Oxyde-Semiconducteur) permettant d'enregistrer sans balayage une image 2D du champ d'interférence.

Le signal mesuré sur la caméra est le signal interférométrique que nous avons décrit à l'équation 2.8 qui est multiplexé par les objectifs de microscope sur chaque pixel de la caméra. Ainsi, en notant  $I_{ij}$  le signal mesuré par le pixel  $ij$  le signal mesuré par la caméra peut s'écrire comme :

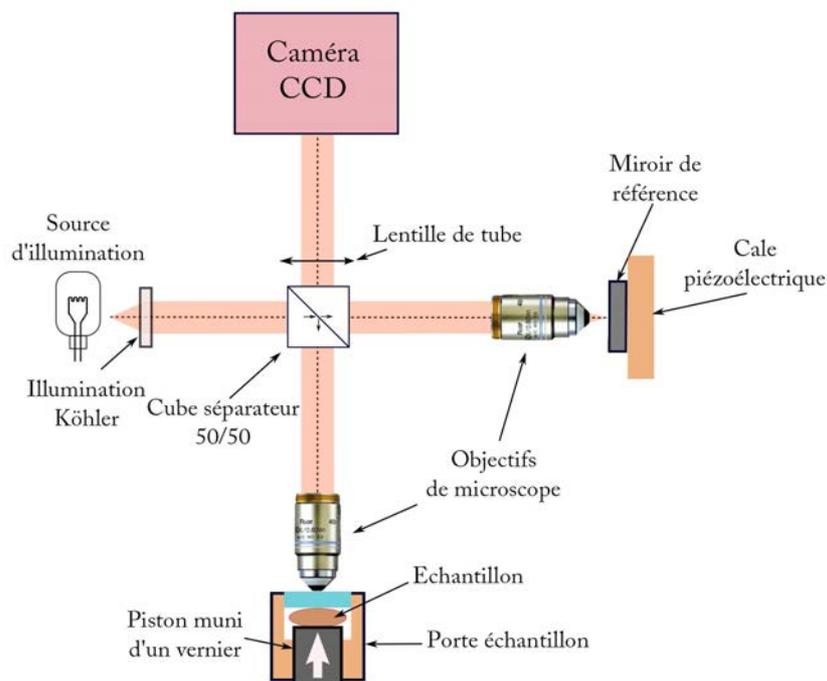
$$I_{ij} = I_0^{ij} [R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij})] \quad (2.11)$$

avec :

- $I_0^{ij}$  : une constante dépendante de l'intensité de l'illumination du pixel  $ij$ .
- $R_r$  : la réflectivité du miroir de référence supposée constante sur tout le champ image.

---

2. Il existe d'autres configurations de montage d'OCT plein champ notamment celles basées sur l'interféromètre de Michelson ou l'interféromètre de Mirau [34,35]. Cependant, contrairement à l'interféromètre de Linnik, ces configurations ont tendance à introduire de forte aberration à haute ouverture numérique.



**Figure 2.4** – Représentation schématique d'un montage d'OCT plein champ dans une configuration d'interféromètre de Linnik.

- $R_o^{ij}$  : la réflectivité du volume de cohérence définie à la profondeur de cohérence par la surface de l'image conjuguée du pixel  $ij$  sur l'échantillon et d'épaisseur égale à la longueur de cohérence (en supposant la longueur de cohérence comme inférieure à la profondeur de champ).
- $R_{inc}^{ij}$  : correspond à la lumière captée par le pixel  $ij$  provenant d'en dehors du volume de cohérence ou de réflexions parasites.
- $\phi_{ij}$  : la phase du signal d'interférence. Dans le cas d'un diffuseur unique dans le volume de cohérence, cette phase est égale à la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre soit  $2\pi\sigma\delta z$ .

L'objectif est de réaliser la tomographie des échantillons. Ici cela consiste à extraire du signal mesuré par la caméra un signal proportionnel à la racine de la réflectivité du volume de cohérence  $R_o^{ij}$ . Afin de réaliser cette extraction, il existe plusieurs méthodes basées sur la modulation de la différence de marche (*i.e.* du terme  $\phi_{ij}$ ). La méthode la plus utilisée consiste à moduler la différence de marche en déplaçant légèrement le miroir de référence à l'aide d'une cale piézoélectrique dans la profondeur de champ de l'objectif de microscope. Ce déplacement peut être réalisé de manière continue ou discrète. Nous ne décrivons ici que la méthode de modulation discrète par 4 sauts de phases nommée *méthode 4 phases*. Il s'agit de la méthode que nous avons principalement utilisée lors de nos travaux. L'extraction à partir d'une modulation continue ou par sauts de phases (pour un nombre de phases supérieur à 3) est décrite aux références [23, 33, 36–38].

La méthode 4 phases est la méthode donnant lieu aux calculs les plus simples. L'idée est d'acquérir 4 images déphasées de  $\pi/2$  en déplaçant le miroir de référence afin que la différence de marche  $\delta z_{4phases}$  induite soit tel que  $2\pi n\sigma_0\delta z_{4phases} = \pi/2$  (avec  $n$  l'indice de réfraction). Ainsi, 4 images  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  et  $I_4$  sont mesurées tel que le signal mesuré par le pixel  $ij$  s'écrive :

$$\begin{cases} I_1^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij} + 0 \times \Phi)] \\ I_2^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij} + 1 \times \Phi)] \\ I_3^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij} + 2 \times \Phi)] \\ I_4^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij} + 3 \times \Phi)] \end{cases} \quad (2.12)$$

avec  $\Phi$  le déphasage induit par le déplacement du miroir de référence et  $\forall ij$ ,  $R_{inc}^{ij}$  et  $R_o^{ij}$  supposés constants lors de la modulation de phase.

Dans le cas  $\Phi = \pi/2$  l'équation 2.12 devient :

$$\begin{cases} I_1^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij})] \\ I_2^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} - 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \sin(\phi_{ij})] \\ I_3^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} - 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \cos(\phi_{ij})] \\ I_4^{ij} = I_0^{ij}[R_r + R_o^{ij} + R_{inc}^{ij} + 2\sqrt{R_r R_o^{ij}} \sin(\phi_{ij})] \end{cases} \quad (2.13)$$

A partir de ces 4 images, l'image d'OCT plein champ  $I_{OCTpleinchamp}$  est calculée comme :

$$\begin{cases} I_{OCTpleinchamp} = \sqrt{(I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_4)^2} \\ \forall ij, I_{OCTpleinchamp}^{ij} = 4I_0^{ij} \sqrt{R_r R_o^{ij}} \end{cases} \quad (2.14)$$

Ainsi, l'image d'OCT plein champ obtenue est proportionnelle à l'amplitude du champ rétrodiffusé par la zone de cohérence.

## 2.2.2 Performances

**Résolution axiale :** De manière similaire à l'OCT classique, la résolution axiale de l'OCT plein champ dépend du spectre de la lumière mesurée par le détecteur qui dépend du spectre de l'illumination et de la réponse spectrale de la détection et de l'échantillon. Typiquement, pour les montages que nous avons utilisés au court de nos travaux, les résolutions axiales vont d'environ  $1 \mu m$  pour les montages avec une illumination par lampe halogène ou lampe à arc au Xénon et de 3 à 6  $\mu m$  pour les montages avec une illumination par LED.

**Résolution latérale :** La résolution latérale est directement donnée par la résolution optique du microscope, c'est-à-dire, par le choix des objectifs de microscope, de la lentille de tube et de la taille des pixels de la caméra. Dans tous les montages que nous avons utilisés, nous nous sommes arrangés pour que la résolution latérale soit environ égale à 1,5  $\mu m$ , pour cela nous avons choisi des objectifs dont l'ouverture numérique est voisine de 0,3.

**Champ de vue :** Comme la résolution latérale, le champ de vue d'imagerie est défini par le microscope utilisé, c'est-à-dire, le grandissement du système optique et la taille du capteur. Au cours de nos travaux nous avons travaillé principalement avec des champs de vue de  $800 \times 800 \mu m^2$ .

**Profondeur d'imagerie :** La profondeur d'imagerie dépend beaucoup du type d'échantillon observé. En effet, trois effets vont majoritairement limiter la profondeur d'imagerie. Le premier est l'extinction du signal balistique. Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, le signal balistique décroît rapidement et rend très difficile la détection des photons balistiques après quelques libre parcours moyen d'extinction. Le deuxième est la diffusion multiple. En effet, un photon détecté avec un temps de vol  $\tau$  peut avoir subi plusieurs événements de diffusion. A mesure que l'intensité du signal balistique décroît, la proportion de signal venant des photons ayant subi plusieurs événements de diffusion croît jusqu'à devenir dominante et brouiller l'image. Le dernier effet est les aberrations induites par l'échantillon. Ces effets dus aux aberrations sont d'autant plus prononcés que l'ouverture numérique du système est grande. En OCT plein champ qui utilise de grande ouverture numérique cet effet est très limitant, même pour des échantillons homogènes, pour lesquels souvent une correction de la mise au point en profondeur est nécessaire [39, 40].

Typiquement, dans les tissus biologiques comme le cerveau ou la peau, avec des ouvertures optiques de 0,3, l'OCT plein champ permet de faire des images bien résolues jusqu'à environ  $200 \mu m$  de profondeur.

**Vitesse d'imagerie :** A l'heure actuelle, la vitesse d'imagerie est uniquement limitée par la fréquence d'acquisition de la caméra. Dans le cas de l'imagerie 4 phases, 4 images sont nécessaires pour réaliser une image d'OCT plein champ. Actuellement, les systèmes commerciaux, comme ceux de la société LLTech, permettent de faire une imagerie d'OCT plein champ à une fréquence de  $35 Hz$  et devraient d'ici peut multiplier par 10 la fréquence d'acquisition grâce au développement d'une caméra rapide adaptée à l'OCT plein champ (*i.e.* bon échantillonnage des niveaux de gris et grande profondeur de puits).

**Sensibilité :** La sensibilité est définie en OCT plein champ comme le plus petit coefficient de réflectivité  $R_{min}$  mesurable, c'est-à-dire, pour un rapport signal sur bruit (SNR) égal à 1. Elle dépend (sans prise en compte de la multidiffusion et des aberrations) de la réflectivité incohérente de l'échantillon  $R_{inc}$ , de la réflectivité du miroir de référence  $R_r$ , de la capacité de puits des pixels de la caméra au travers du nombre de photoélectrons que peut mesurer un pixel avant saturation  $N_{sat}$  et du bruit de mesure. En supposant que le bruit soit uniquement un bruit de photons tel que  $B = \sqrt{N_{sat}}$  [41], le rapport signal sur bruit peut s'écrire comme :

$$SNR = \frac{4N_0\sqrt{R_r R_o}}{\sqrt{N_{sat}}} \quad (2.15)$$

Dans le cas le plus souvent rencontré en OCT où  $R_r + R_{inc} \gg R_o$ , l'équation 2.15 devient :

$$SNR = \frac{4\sqrt{N_{sat}R_rR_o}}{R_r + R_{inc}} \quad (2.16)$$

D'où le plus petit coefficient de réflectivité  $R_{min}$  mesurable tel que :

$$R_{min} = \frac{(R_r + R_{inc})^2}{16R_rN_{sat}} \quad (2.17)$$

Typiquement, pour une caméra CCD « Dalsa 1M60 » dont  $N_{sat} = 150000$  photoélectrons, un miroir de référence en silicium immergé dans l'huile de réflectivité  $R_r = 0,175$  et un échantillon tel que  $R_{inc} = 0,04$ , on obtient  $R_{min} = 1,1 \cdot 10^{-7}$  pour une accumulation.

### 2.2.3 OCT plein champ dans les milieux biologiques

Les milieux biologiques que nous étudions sont des milieux complexes, avec des structures multi-échelles et très diffusants. Dans la majorité des cas, chaque volume de cohérence contient plusieurs diffuseurs aléatoirement positionnés. Ainsi, l'amplitude rétrodiffusée, qui est la somme cohérente des signaux issus des diffuseurs du volume de cohérence, possède une amplitude et une phase aléatoire pour chaque volume de cohérence. Cette somme de signaux aléatoirement déphasés donne aux images d'OCT plein champ une granularité caractéristique des méthodes d'imageries cohérentes des milieux diffusants.

Ainsi, le contraste d'une image d'OCT plein champ, dans les milieux très diffusants comme les milieux biologiques, n'est pas simplement dû aux hétérogénéités locales d'indice de réfraction. Il trouve son origine dans une somme cohérente des amplitudes rétrodiffusées par les diffuseurs du volume de cohérence qui est fortement dépende de la nature, du nombre et de la position de ces diffuseurs locaux.

De plus, la décorrélation de cette figure d'interférence locale au cours du temps (essentiellement due aux déplacements des diffuseurs dans le volume de cohérence) rend assez difficiles les applications *in vivo* de l'OCT plein champ. Cependant, les développements actuels de prototypes de caméra rapide adaptée à l'OCT plein champ laissent espérer dans un futur proche de grande amélioration de l'imagerie *in vivo* par OCT plein champ.

### 2.2.4 Applications

L'application principale qui a motivé le développement de l'OCT plein champ ces dernières années est l'aide au diagnostic durant les chirurgies. En effet, la haute résolution des images d'OCT plein champ permet d'obtenir des images comparables à celles obtenues par l'histologie classique [42,43]. En général, lors des chirurgies actuelles, afin de déterminer si un tissu tumoral est bénin ou malin ou afin de déterminer les marges d'une tumeur, le chirurgien prélève un morceau de tissu et le fait analyser en anatomopathologie. Cette étape est relativement longue. Pour la préparation des lames d'histologie il faut trancher l'échantillon, dans lequel la paraffine a remplacé l'eau, très finement (des tranches d'environ  $5 \mu m$ ) puis colorer à l'aide de différents colorants suivant le contraste recherché. Par exemple, pour observer les noyaux et le cytoplasme un colorant à base d'hématoxyline et d'éosine est utilisé. Cette étape dure environ une vingtaine de minutes si elle est réalisée durant la chirurgie sur des coupes cryogéniques. Dans la majorité des cas, les analyses

sont réalisées après la chirurgie et nécessitent 1 à 2 semaines de délai avant de savoir si le patient doit être réopéré.

La technique d'OCT plein champ pourrait permettre d'obtenir durant les chirurgies des images similaires aux images d'histologie mais en temps réel. Cependant, la différence majeure entre l'OCT plein champ et l'histologie est qu'en OCT plein champ le contraste est uniquement un contraste morphologique et que dans certains cas le contraste morphologique seul n'est pas suffisant pour réaliser le diagnostic [43–45].

*C'est la raison pour laquelle nous avons travaillé dans le cadre de cette thèse à l'ajout de nouveaux contrastes à l'OCT plein champ afin d'aider les anatomopathologistes dans leur diagnostic.*

## 2.3 OCT plein champ : contrastes optiques accessibles

En plus du contraste classique de l'OCT plein champ, cette technique permet d'accéder à des propriétés optiques locales comme la biréfringence, l'indice de réfraction ou le coefficient de rétrodiffusion locale. Dans ce paragraphe, nous présentons qualitativement ces trois contrastes optiques accessibles par OCT plein champ.

### 2.3.1 Polarisation et biréfringence

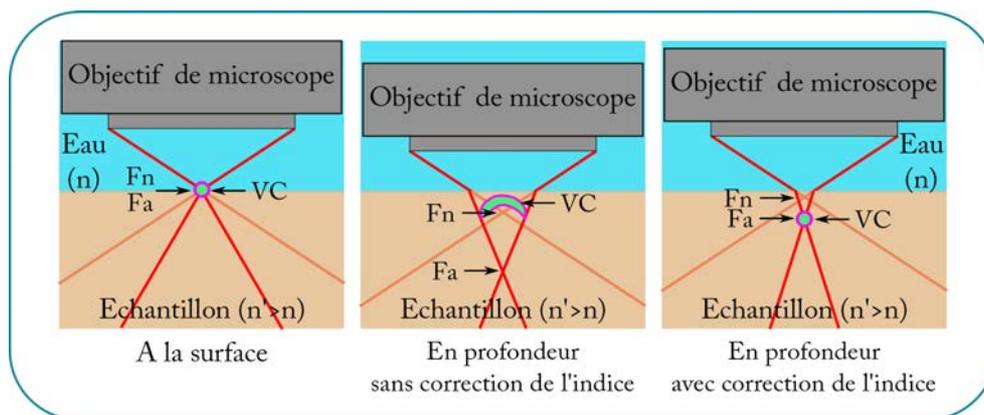
L'étude de la propagation d'une lumière polarisée dans les milieux biologiques permet d'accéder à des informations supplémentaires qui peuvent enrichir les images d'OCT plein champ et aider au diagnostic [46].

Durant la thèse de G. Moneron au laboratoire d'optique de l'ESPCI (actuellement l'institut Langevin), un montage d'OCT plein champ permettant une mesure de la biréfringence des tissus biologiques a été développé [47].

La mesure des propriétés de biréfringence des tissus permet, d'une part, la détection des tissus biréfringents comme le collagène ou les fibres musculaires et d'autre part, elle renseigne sur l'état des tissus comme dans le cas de la cornée où certaines pathologies peuvent modifier la biréfringence des feuillets de collagène.

### 2.3.2 Mesure des indices de réfraction locaux

L'OCT plein champ permet (comme l'OCT [48]) de réaliser une mesure de l'indice de réfraction dans les milieux diffusants. Cette méthode a été introduite en OCT plein champ durant la thèse de J. Binding au laboratoire d'optique de l'ESPCI (actuellement l'institut Langevin). Elle a été appliquée à la mesure de l'indice de réfraction dans le cerveau de rat [40]. La figure 2.5 illustre le principe de la méthode. Elle tire avantage du fait que la distance focale et la position du volume de cohérence ne sont pas modifiées de la même manière par l'introduction dans un milieu d'indice  $n'$  différent de l'indice  $n$  pour lequel le microscope est réglé.



**Figure 2.5** – Représentation schématique du principe de mesure par OCT plein champ de l'indice de réfraction. Les notations prises correspondent à  $VC$  pour volume de cohérence,  $F_n$  pour point focal dans un milieu uniforme d'indice  $n$  et  $F_a$  pour point focal réel.

L'idée est de replacer le volume de cohérence au milieu de la profondeur de champ de l'objectif. La procédure consiste à maximiser le signal d'OCT plein champ en modifiant à la fois la longueur du bras de référence et la position de l'objectif de microscope dans le bras objet. Ensuite, à partir du déplacement qu'il a fallu appliquer au bras de référence, l'indice de réfraction est déduit. Cette méthode est décrite en détail dans les références suivantes [40, 48].

### 2.3.3 Mesure des coefficients de diffusion locaux

Un autre contraste optique accessible par OCT plein champ est le coefficient de diffusion. En effet, en négligeant les effets de la diffusion multiple et des aberrations, l'amplitude du signal d'OCT plein champ va décroître en fonction de la profondeur dans un milieu homogène comme l'intensité du faisceau balistique. Au chapitre précédent nous avons vu que l'intensité du faisceau balistique suit une loi de décroissance exponentielle en fonction du coefficient d'extinction (*cf.* équation 1.7) et que ce coefficient d'extinction peut être exprimé comme la somme du coefficient d'absorption et de diffusion (*cf.* équation 1.8). En outre, comme en général dans les milieux biologiques, il est possible de négliger les effets d'absorption par rapport à ceux de diffusion. Ainsi, la mesure de la décroissance du signal en profondeur nous renseigne directement sur le coefficient d'extinction et donc sur le coefficient de diffusion.

#### Mesure des coefficients de diffusion locaux sur un foie de veau

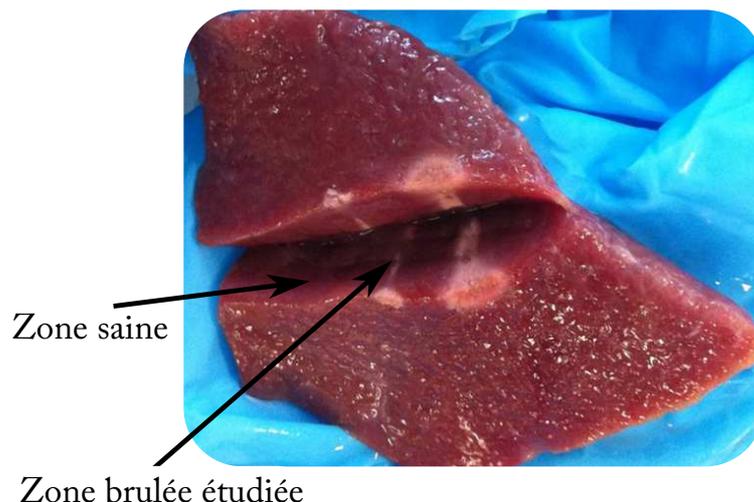
En collaboration avec Y. Younan doctorante à l'institut Langevin et J.-F. Aubry chercheur à l'institut Langevin dans l'équipe médicale, nous avons appliqué cette méthode à des échantillons de foie de veau *ex vivo* ayant subi une brûlure induite par ultrason focalisé (HIFU). La technique d'HIFU est une technique de thérapie qui consiste à brûler les tumeurs en les chauffant grâce à un faisceau ultrasonore focalisé. Une des difficultés de cette

méthode est de contrôler la zone qui a été brûlée. Pour réaliser ce contrôle, la méthode la plus utilisée est de contrôler durant le traitement l'élévation de température par IRM. L'objectif de cette étude a été de savoir si l'OCT plein champ (et plus particulièrement la mesure du coefficient de diffusion) peut permettre de quantifier l'état de brûlure d'un tissu.

Pour cette étude, nous avons utilisé un système d'OCT plein champ classique comme celui présenté à la figure 2.4. La caméra utilisée est une caméra CCD « Dalsa 1M60 ». Elle possède  $1024 \times 1024$  *pixels* codés sur 12 *bits*, une fréquence d'acquisition de 50 *Hz* et une profondeur de puits de 150000 électrons. La source utilisée est une lampe halogène « SCHOTT-KT 1500 » couplée à une illumination Köhler afin d'obtenir une illumination la plus homogène possible. Afin que son spectre corresponde à la réponse spectrale souhaitée qui minimise la diffusion, l'illumination traverse un filtre passe haut à 610 nm et un filtre passe bas à 1000 nm qui évite l'échauffement de l'échantillon. Le spectre effectif est centré autour de 710 nm avec une largeur approximative de 150 nm. Ceci permet d'obtenir une résolution axiale d'environ  $1 \mu\text{m}$ . Les objectifs utilisés sont deux objectifs identiques :  $10\times$  à immersion dans l'eau (de la société Olympus) avec une ouverture numérique de 0,3 fournissant une résolution latérale d'environ  $1,4 \mu\text{m}$  et un champ de vue d'environ  $1 \text{mm}^2$ .

Afin de mesurer le coefficient de diffusion local nous avons enregistré pour chaque échantillon une pile en profondeur de 10 images d'OCT plein champ espacées d' $1 \mu\text{m}$  les unes des autres. A partir de cette pile d'images nous avons estimé le coefficient de diffusion en mesurant la pente du logarithme du signal d'OCT plein champ en fonction de la profondeur. De plus, afin de limiter les fluctuations nous avons effectué ce calcul sur une fenêtre glissante (sur l'image plein champ) de  $5 \times 5$  pixels.

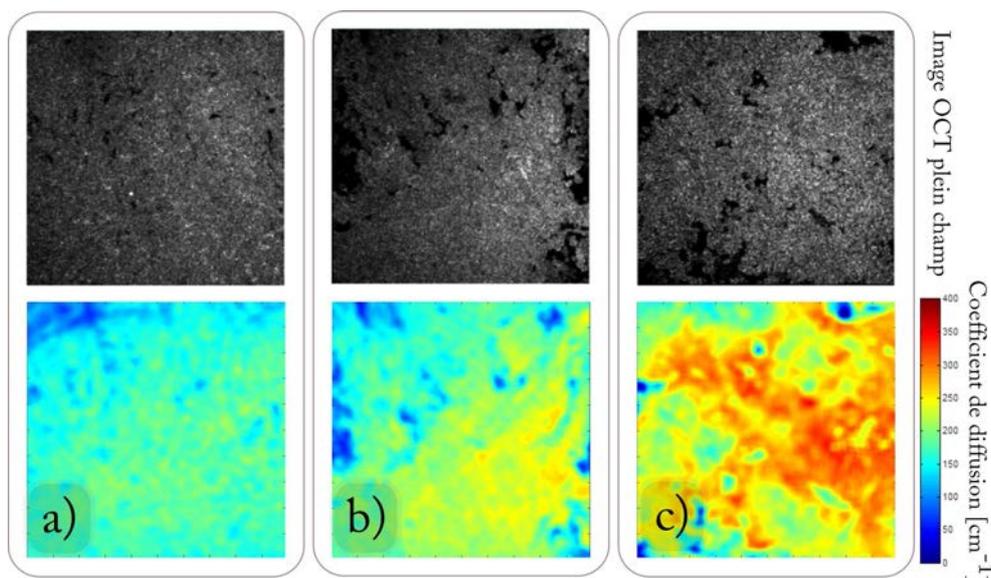
La figure 2.6 présente une photographie typique d'un échantillon de foie ayant subi une brûlure par HIFU.



**Figure 2.6** – Photographie d'un échantillon de foie ayant subi une brûlure par HIFU.

A l'œil nous remarquons clairement que le tissu brûlé semble avoir perdu sa coloration rouge. La figure 2.7 représente les résultats que nous avons obtenus sur un échantillon de

foie traité à une profondeur de  $10 - 15 \mu\text{m}$ .



**Figure 2.7** – Résultats obtenus pour un échantillon de foie brûlé par HIFU. L'image a correspond à une zone saine de l'échantillon, l'image b correspond à une zone en bordure de la zone brûlée et l'image c correspond à une zone au centre de la brûlure. Sur chaque image est présentée en haut l'image d'OCT plein de la zone et en bas la carte de coefficient de diffusion calculé.

On remarque clairement sur la figure 2.7 que le coefficient de diffusion local permet de distinguer la zone traitée de la zone non traitée, alors que sur les images d'OCT plein champ il n'est pas possible de les différencier. Les valeurs de coefficient de diffusion mesuré sont reproductibles sur les 3 échantillons que nous avons étudiés. De plus, au bord de la brûlure (figure 2.7b) on observe une variation continue du coefficient de diffusion qui laisse espérer que le coefficient de diffusion puisse être un indicateur de la qualité de la thérapie. Cette première étude menée sur des échantillons de foie est très prometteuse. Elle semble indiquer un lien direct entre la modification du coefficient de diffusion et l'état de brûlure du foie. L'étape suivante est de vérifier si la mesure de coefficient de diffusion correspond aux mesures de température mesurée par IRM et aux mesures d'élastographie acoustique.

## Conclusion

L'OCT est une technique d'imagerie médicale qui a connu depuis son invention un développement spectaculaire. Elle est notamment devenue indispensable en ophtalmologie où elle permet de dépister de manière non invasive d'éventuelle pathologie de la rétine. L'OCT plein champ, quant à elle, est une approche d'OCT permettant de réaliser une imagerie plein champ avec une résolution 3D du micromètre. Cette haute résolution de l'OCT plein champ permet d'obtenir des images comparables aux images d'histologie en temps réel et sans préparation préalable des échantillons. Cette capacité à fournir rapidement des images similaires aux images d'histologie font de l'OCT plein champ un bon candidat afin d'aider les chirurgiens dans les blocs opératoires. Elle pourrait leur fournir

un premier retour rapide sur l'état pathologique des biopsies qu'ils ont effectuées. Cependant, la grande différence entre les images d'OCT plein champ et les images d'histologie classique est que le contraste en OCT plein champ est un contraste uniquement morphologique. Dans les cas où la pathologie modifie fortement la morphologie des échantillons, comme pour certains types de tumeur cancéreuse, l'OCT plein champ donne de très bons résultats [43]. Mais, dans d'autres cas, le contraste morphologique seul n'est pas suffisant. Afin d'aider les anatomopathologistes dans leur diagnostic nous avons travaillé, dans le cadre de cette thèse, à l'ajout de nouveaux contrastes à l'OCT plein champ.



---

Les nanoparticules d'or : nouvel agent de contraste pour l'OCT  
plein champ

---

**Table des matières**

---

3.1	Propriétés optiques des nanoparticules d'or . . . . .	<b>34</b>
3.1.1	Résonnance de plasmon localisé de nanoparticules sphériques : absorption et diffusion . . . . .	34
3.1.2	Les nanoparticules d'or comme source thermique locale . . . . .	37
3.2	Détection de nanoparticules d'or unique par OCT plein champ à 2 longueurs d'ondes . . . . .	<b>38</b>
3.2.1	Principe . . . . .	38
3.2.2	Montage expérimental . . . . .	38
3.2.3	Résultats . . . . .	40
3.3	Modulation locale de l'indice de réfraction par chauffage de nanopar- ticules d'or . . . . .	<b>43</b>
3.3.1	Principe . . . . .	43
3.3.2	Montage expérimental . . . . .	45
3.3.3	Résultats . . . . .	47

---

Les nanoparticules d'or ont fait l'objet ces dernières années d'une recherche très intense dans des domaines aussi variés que l'optique, la catalyse, l'électronique, la biologie ou la médecine où les propriétés de l'or aux dimensions nanométriques se sont révélées très intéressantes et prometteuses. En optique biomédicale, l'utilisation des nanoparticules d'or présente de multiples avantages. D'une part, l'or possède des propriétés intrinsèques précieuses comme la biocompatibilité, la non-toxicité, une bonne stabilité chimique et une chimie bien connue [49]. D'autre part, les propriétés de l'or apparaissant aux échelles nanométriques sont étonnantes, comme notamment la résonance de plasmon localisé aux propriétés optiques remarquables.

Dans ce chapitre nous allons présenter les travaux que nous avons menés afin d'utiliser les nanoparticules d'or comme nouvel agent de contraste pour l'OCT plein champ. Ainsi, dans une première partie nous introduisons brièvement les propriétés optiques des nanoparticules d'or. Ensuite, nous présentons deux manières d'utiliser la résonance de plasmon afin de détecter par OCT plein champ les nanoparticules d'or dans un milieu diffusant.

*Publication associé au chapitre :*

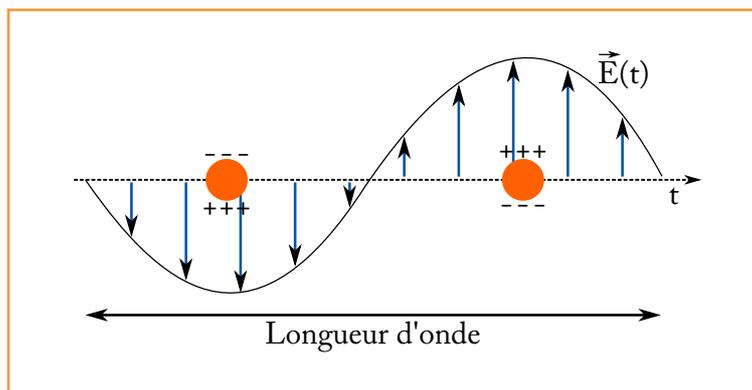
- Amir Nahas, Mariana Varna, Emmanuel Fort et A. Claude Boccara. "Detection of plasmonic nanoparticles with full field-OCT : optical and photothermal detection." *Biomedicaloptics express* 5.10 (2014) : 3541-3546.

## 3.1 Propriétés optiques des nanoparticules d'or

A l'heure actuelle, la bonne maîtrise de la réalisation et de la chimie des nanoparticules d'or permettent la fabrication de nanoparticules allant de quelques nanomètres à plusieurs centaines de nanomètres. De nombreuses géométries sont possibles dont les plus communes sont les sphères, les ellipsoïdes et les bâtonnets. La forme et la taille des nanoparticules vont conditionner leurs propriétés optiques.

### 3.1.1 Résonance de plasmon localisé de nanoparticules sphériques : absorption et diffusion

A l'échelle nanométrique, les particules d'or présentent une exaltation de leurs propriétés de diffusion et d'absorption pour certaines longueurs d'onde. Dans le cas des particules de taille inférieure à l'épaisseur de peau et petite devant la longueur d'onde, ces propriétés résonnantes de diffusion et d'absorption peuvent être décrites dans l'approximation quasi-statique. Cette approximation suppose un champ électrique incident homogène à l'échelle de la particule comme schématisé à la figure 3.1 (aux longueurs d'ondes du visible les effets magnétiques sont négligés).



**Figure 3.1** – Schéma illustrant la distribution des charges dans une nanoparticule sous l'influence d'un champ électrique incident dans les conditions de l'approximation quasi-statique.

Dans cette approximation, la nanoparticule est modélisée comme un dipôle électrique avec un nuage électronique chargé négativement oscillant autour du corps de la nanoparticule chargée positivement. On peut alors décrire la polarisabilité  $\vec{p}$  de la particule comme :

$$\forall \lambda, \vec{p}(\lambda) = \alpha_0(\lambda) \cdot \vec{E}(\lambda) \quad (3.1)$$

avec  $\lambda$  la longueur d'onde associée à l'onde incidente,  $\vec{E}$  le champ électrique incident et  $\alpha_0$  la polarisabilité de la particule.

La polarisabilité  $\alpha_0$  est une grandeur importante qui permet de rendre compte de l'action du champ incident  $\vec{E}$  sur la particule. Pour une particule sphérique, dans le cas de l'approximation quasi-statique il est possible d'exprimer directement la polarisabilité  $\alpha_0$  de la particule en fonction de la permittivité diélectrique de celle-ci  $\varepsilon_p$  et de la permittivité diélectrique du milieu autour de la nanoparticule  $\varepsilon_m$  tel que [50] :

$$\forall \lambda, \alpha_0(\lambda) = 4\pi r_p^3 \frac{\varepsilon_m(\lambda) - \varepsilon_d(\lambda)}{\varepsilon_m(\lambda) + 2\varepsilon_d(\lambda)} \quad (3.2)$$

avec  $r_p$  le rayon de la nanoparticule.

Certaines valeurs de la permittivité diélectrique de la nanoparticule annulent la partie réelle du dénominateur de l'expression 3.2, ce qui entraîne une divergence de la polarisabilité de la nanoparticule. Cette divergence correspond à un accord des oscillations du nuage électronique autour du corps de la particule avec les oscillations temporelles du champ électromagnétique incident. Elle correspond à la résonance du plasmon localisé de la particule.

De plus, à partir de cette expression de la polarisabilité de la particule, il est possible de déduire les sections efficaces d'absorption  $\sigma_a$  et de diffusion  $\sigma_d$  et d'ainsi observer l'effet de la résonance de plasmon de surface localisé sur les sections efficaces tel que [50] :

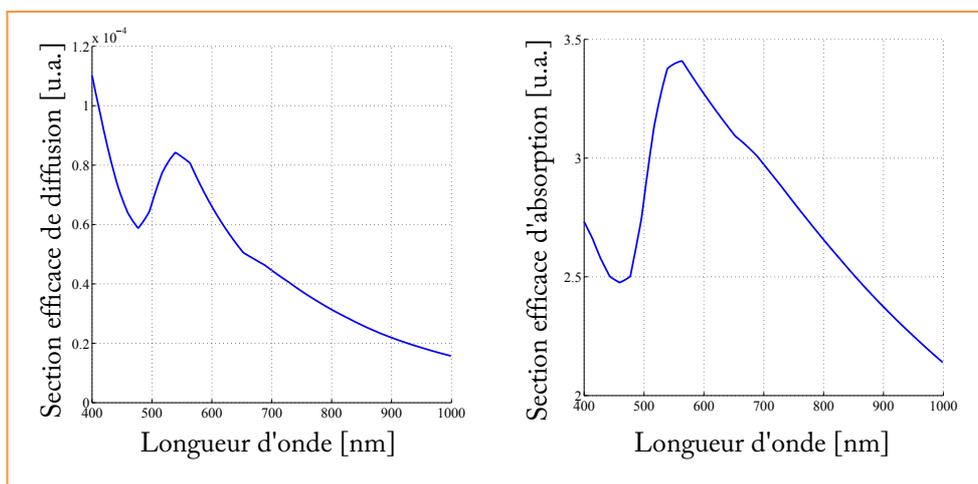
$$\begin{cases} \forall \lambda, \sigma_a(\lambda) = k \cdot \Im(\alpha_0(\lambda)) \\ \forall \lambda, \sigma_d(\lambda) = \frac{k^4}{6\pi} \cdot |\alpha_0(\lambda)|^2 \end{cases} \quad (3.3)$$

soit avec l'équation 3.2,

$$\begin{cases} \sigma_a = 4\pi r_p^3 k \Im \left( \frac{\varepsilon_m - \varepsilon_d}{\varepsilon_m + 2\varepsilon_d} \right) \\ \sigma_d = \frac{8}{3}\pi r_p^6 k^4 \cdot \left| \frac{\varepsilon_m - \varepsilon_d}{\varepsilon_m + 2\varepsilon_d} \right|^2 \end{cases} \quad (3.4)$$

avec  $\Im$  la partie imaginaire.

Ainsi, pour les particules sphériques de taille inférieure à l'épaisseur de peau et petite devant la longueur d'onde de l'onde incidente, nous pouvons calculer les sections efficaces d'absorption et de diffusion connaissant leur perméabilité diélectrique. A titre d'exemple, nous avons tracé sur figure 3.2 les sections efficaces d'absorption et de diffusion calculées pour une particule d'or de 5 nm en solution aqueuse. Sur cette figure, nous observons bien la résonance en absorption et diffusion aux alentours de 550 nm, typique des nanoparticules d'or sphériques de petites tailles.



**Figure 3.2** – Sections efficaces d'absorption et de diffusion calculées à l'aide de l'équation 3.3 pour une nanoparticule sphérique d'or de 5 nm de diamètre.

Ainsi, grâce à l'approximation quasi-statique, il est possible de décrire facilement le comportement de petites particules. Cependant, il faut garder à l'esprit que pour une illumination aux longueurs d'ondes visible/proche infra-rouge, l'approximation quasi-statique n'est valide que pour des particules d'une taille inférieure à 5 nanomètres (correspondant à l'épaisseur de peau de l'or). Ce n'est pas le cas des nanoparticules cœur-coquille de 170 nm de diamètre que nous utilisons dans cette étude. Pour ce type de particules, l'approximation dipolaire n'est plus valable. Bien que les tailles de particule soient supérieures à la profondeur de peau l'approximation dipolaire permet d'apprécier grossièrement le comportement résonnant des nanoparticules que nous étudions. Afin de décrire avec exactitude leur comportement, il faut recourir à des descriptions plus complexes comme une description multipolaire [51] ou la théorie de Mie dont les calculs sont développés à la référence suivante [50].

### 3.1.2 Les nanoparticules d'or comme source thermique locale

Une partie importante de notre étude est la détection de la présence de nanoparticules d'or au travers de leur utilisation comme source de chaleur locale. En effet, les nanoparticules cœur-coquille or/silice que nous utilisons possèdent leur résonnance de plasmon localisé autour de  $780 \text{ nm}$ . A cette longueur d'onde, les tissus biologiques absorbent peu la lumière. Dans cette étude préliminaire, nous avons considéré, d'une part, que les nanoparticules sont les seules absorbeurs et, d'autre part, que les concentrations en nanoparticules sont suffisamment faibles pour considérer le chauffage d'une particule unique. Ainsi, dans ce paragraphe, nous allons expliciter la solution de l'équation de la chaleur pour une illumination de chauffe en échelon<sup>1</sup> [52].

En considérant l'équation de la chaleur suivante, en milieu homogène infini :

$$\forall(\vec{r}, t > 0), \frac{\partial T(\vec{r}, t)}{\partial t} - D\Delta T(\vec{r}, t) = \frac{P_{vol}(\vec{r}, t)}{\rho c_p} \quad (3.5)$$

avec  $T(\vec{r}, t)$  la température à la position  $\vec{r}$  au temps  $t$ ,  $D$  le coefficient de diffusivité thermique,  $P_{vol}$  une puissance par unité de volume,  $\rho$  la masse volumique du milieu et  $c_p$  la capacité thermique massique.

Cette équation possède une fonction de Green  $G$  définie tel que :

$$\forall(\vec{r}, t > 0), \frac{\partial G(\vec{r}, t)}{\partial t} - D\Delta G(\vec{r}, t) = \delta(\vec{r})\delta(t) \quad (3.6)$$

de la forme :

$$\forall(\vec{r}, t > 0), G(\vec{r}, t) = H(t) \frac{1}{(4\pi Dt)^{3/2}} e^{-\frac{r^2}{4Dt}} \quad (3.7)$$

avec  $H$  la fonction de Heaviside et  $\delta(\vec{r})$  nul pour tout  $\vec{r}$  sauf pour  $\vec{r} = \vec{0}$  où il est égal à 1. Ainsi, le champ de température  $T$  peut s'écrire comme :

$$\forall(\vec{r}, t > 0), T(\vec{r}, t) = G(\vec{r}, t) \otimes_t \frac{P_{vol}(\vec{r}, t)}{\rho c_p} \quad (3.8)$$

avec  $\otimes_t$  le produit de convolution selon la variable temporelle.

Dans le cas d'une chauffe localisée à puissance constante continue tel que  $P_{vol}(\vec{r}, t) = P_0 \cdot \delta(\vec{r}) \cdot H(t)$ , on peut écrire le champ de température  $T$  comme :

$$\forall(\vec{r}, t > 0), T(\vec{r}, t) = \frac{P_0}{\rho c_p} \frac{1}{4\pi D} \frac{1}{r} \left[ 1 - \frac{1}{\sqrt{\pi}} \int_0^{\frac{r^2}{4Dt}} \frac{e^{-u}}{\sqrt{u}} du \right] \quad (3.9)$$

De cette façon, cette équation nous permet d'accéder au champ de température issu d'une chauffe en échelon pour une particule ponctuelle. En considérant une relation affine entre la température et l'indice optique, nous utilisons dans la suite cette solution afin de simuler les variations d'indice optique causées par l'échauffement de nanoparticules. Plus particulièrement, nous en déduisons les variations du signal d'OCT plein champ en

---

1. Les calculs de ce paragraphe nous ont été fournis par Emmanuel Bossy, enseignant-chercheur à l'Institut Langevin - ESPCI

intégrant les variations d'indice le long du chemin optique.

## 3.2 Détection de nanoparticules d'or unique par OCT plein champ à 2 longueurs d'ondes

La première méthode que nous présentons a pour objectif de détecter les particules individuelles dans un milieu diffusant. Pour cela nous utilisons la haute résolution de l'OCT plein champ ainsi que les propriétés résonantes de la section efficace de rétrodiffusion des nanoparticules cœur-coquille d'or.

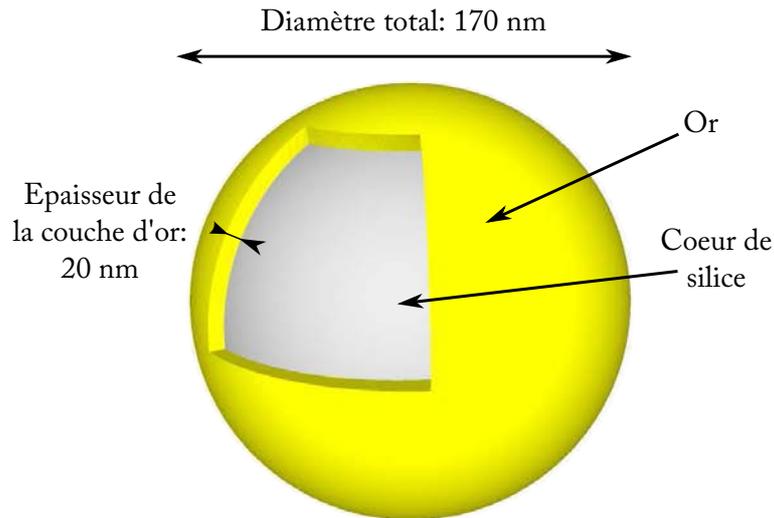
### 3.2.1 Principe

Le principe à la base de cette méthode que nous avons mise en place est d'utiliser la résonance de la section efficace de rétrodiffusion des nanoparticules cœur-coquille d'or. Le but est de séparer les signaux provenant des particules d'or de ceux provenant des autres diffuseurs non-résonnants. En effet, la théorie de Mie (dont nous avons brièvement parlé au chapitre 1) établit que dans le cas de particules non-résonnantes, petites ou grandes (devant la longueur d'onde de l'illumination), la section efficace de rétrodiffusion évolue comme une fonction décroissante ou quasi constante en fonction de la longueur d'onde [53]. *A contrario*, près de leur résonance de plasmon localisé, les particules résonnantes présentent une forte augmentation de leur section efficace de diffusion en fonction de la longueur d'onde. Ainsi, en exploitant cet effet et la haute résolution de l'OCT plein champ, nous pouvons détecter une nanoparticule unique contrairement à l'OCT classique [54–58]. A partir d'une méthode de spectroscopie de rétrodiffusion à deux longueurs d'ondes, nous proposons ici de détecter dans un tissu diffusant des nanoparticules d'or individuelles. Une longueur d'onde est choisie à la résonance de la particule cible et l'autre est prise juste avant la résonance. Ainsi, les objets non-résonnants verront leur rétrodiffusion décroître alors que les signaux des particules résonnantes vont croître. La simple observation de la variation des signaux OCT plein champ permet de distinguer les particules résonnantes des non-résonnantes.

### 3.2.2 Montage expérimental

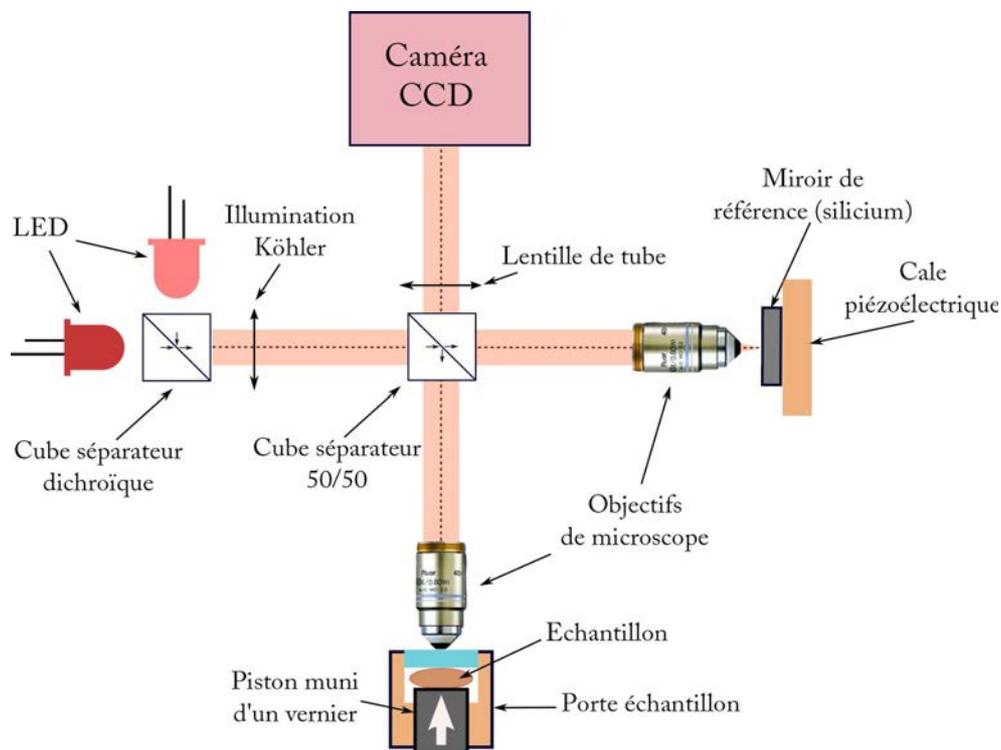
Les nanoparticules d'or que nous avons utilisées sont des nanoparticules cœur-coquille d'or enrobées de Polyéthylène glycol de la société Nanospectra Biosciences™. Elles sont composées d'un cœur de silice de  $130\text{ nm}$  ( $\pm 20\text{ nm}$ ) et d'une coquille d'or de  $20\text{ nm}$  ( $\pm 10\text{ nm}$ ), comme présenté sur le schéma figure 3.3. Pour cette géométrie, la résonance de plasmon est large et centrée autour de  $780\text{ nm}$  [59, 60].

Le montage que nous avons utilisé est un montage d'OCT plein champ classique comme nous l'avons décrit au chapitre précédent. La figure 3.4 présente un schéma du montage utilisé. La caméra est une caméra CCD « Dalsa 1M60 ». Cette caméra possède  $1024 \times 1024$  pixels codés sur 12 bits, une fréquence d'acquisition de  $50\text{ Hz}$  et une profondeur de puits de 150000 électrons. Les objectifs utilisés sont deux objectifs identiques :



**Figure 3.3** – Schéma des nanoparticules cœur-coquille utilisées pour cette étude. Les nanoparticules sont constituées d'un cœur de silice de  $130\text{ nm}$  ( $\pm 20\text{ nm}$ ) de diamètre recouvert d'une couche d'or de  $20\text{ nm}$  ( $\pm 10\text{ nm}$ ).

$10\times$  à immersion dans l'eau (de la société Olympus) avec une ouverture numérique de 0,3.



**Figure 3.4** – Schéma du montage d'OCT plein champ utilisé pour cette étude. La particularité de ce montage est la possibilité d'éclairer à deux longueurs d'ondes différentes.

La particularité de ce montage est que l'illumination est assurée par deux LED de la société ThorLabs™. La première LED (Thorlabs - M780L2) est centrée à la résonance

de plasmon des nano-coquille d'or autour de  $780\text{ nm}$ . La seconde est choisie à  $625\text{ nm}$ , juste avant la résonance de plasmon des nanoparticules. A l'aide de ce montage, pour respectivement les LED à  $625$  et  $780\text{ nm}$ , nous obtenons une résolution latérale de  $1,3$  et  $1,6\ \mu\text{m}$  et une coupe optique mesurée d'environ  $6$  et  $5\ \mu\text{m}$  respectivement.

### 3.2.3 Résultats

Nous avons tout d'abord testé notre méthode sur des échantillons de gel à base d'agarose. Les échantillons sont réalisés à partir de trois substances. La première est l'agarose (Agarose – Sigma-Aldrich™), la seconde des particules d'oxyde de zinc (2005532 Sigma-Aldrich™) à une concentration de  $20\text{ mg/g}$ , et la dernière des nanoparticules d'or cœur-coquille (Nanospectra Biosciences™) à une concentration de  $4.10^8\text{ np/ml}$ . Cette concentration correspond à un libre parcours moyen d'environ  $150\ \mu\text{m}$ . Il s'agit d'un ordre de grandeur proche de celui des milieux biologiques. L'objectif de cette étude est de montrer, qu'à partir des deux images d'OCT plein champ à différentes longueurs d'ondes, nous sommes capables de différencier les particules non-résonantes d'oxyde de zinc (d'un diamètre de  $1$  à  $5\ \mu\text{m}$ ) des nanoparticules d'or résonantes.

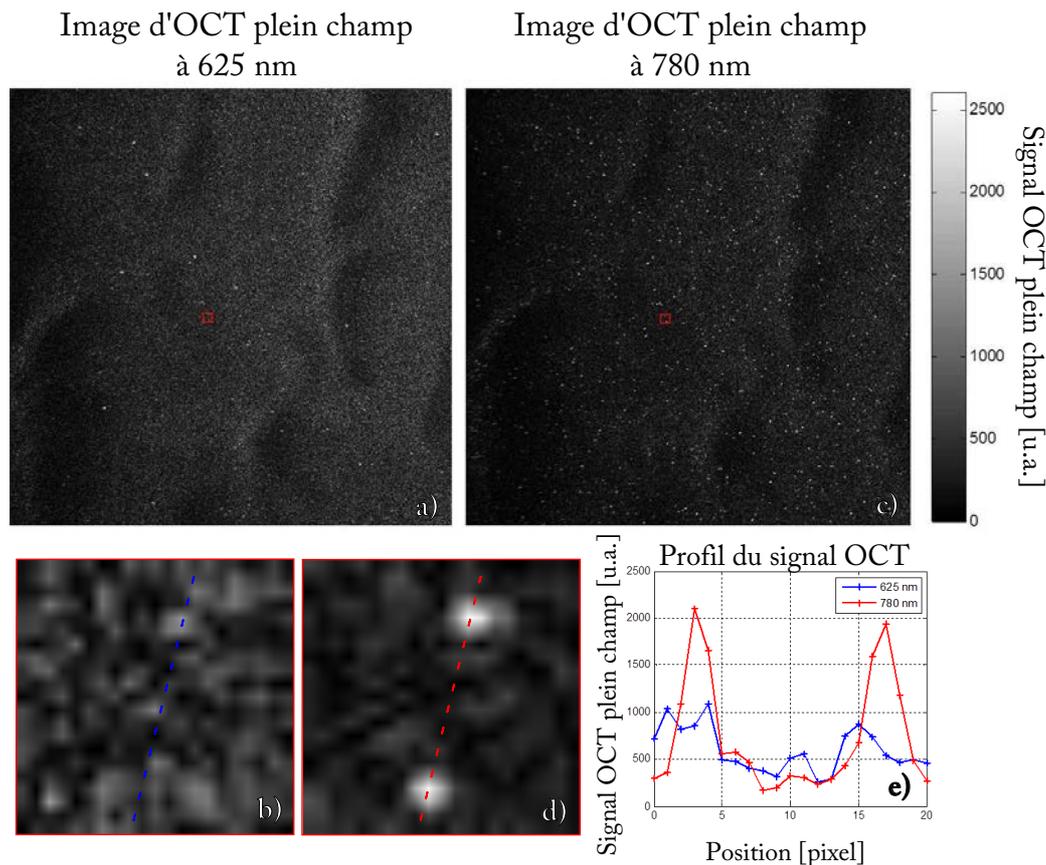
La figure 3.5 présente les résultats obtenus pour un gel avec uniquement des nanoparticules d'or. Les figures 3.5a et c sont les images OCT plein champ prises à  $15\ \mu\text{m}$  de profondeur respectivement aux longueurs d'ondes de  $625$  et  $780\text{ nm}$ . Les figures 3.5b et d sont des agrandissements respectivement des carrés rouges présents sur les images a et c. La figure 3.5e est le profil du signal OCT plein champ extrait des lignes en pointillé des images b et d, respectivement les courbes bleue et rouge.

Sur cette figure, on observe que, comme attendu, le signal rétrodiffusé par les nanoparticules d'or est plus grand à la résonance bien que la longueur d'onde soit plus grande : le signal OCT plein champ est environ 2 fois plus important.

La figure 3.6 présente les résultats obtenus pour un gel avec uniquement des particules d'oxyde de zinc. De manière similaire à la figure précédente, les figures 3.6a et c sont les images d'OCT plein champ prises à  $15\ \mu\text{m}$  de profondeur respectivement aux longueurs d'ondes de  $625$  et  $780\text{ nm}$ . Les figures 3.6b et d sont des agrandissements respectivement des images a et c correspondant aux carrés rouges. La figure 3.6e est le profil du signal OCT plein champ de deux lignes en pointillé de deux images : respectivement l'image b pour la courbe bleue et l'image d pour la courbe rouge.

Le signal OCT plein champ est directement relié au signal rétrodiffusé. Cette fois, comme attendu, nous observons bien une décroissance du signal OCT plein champ en fonction de la longueur d'onde.

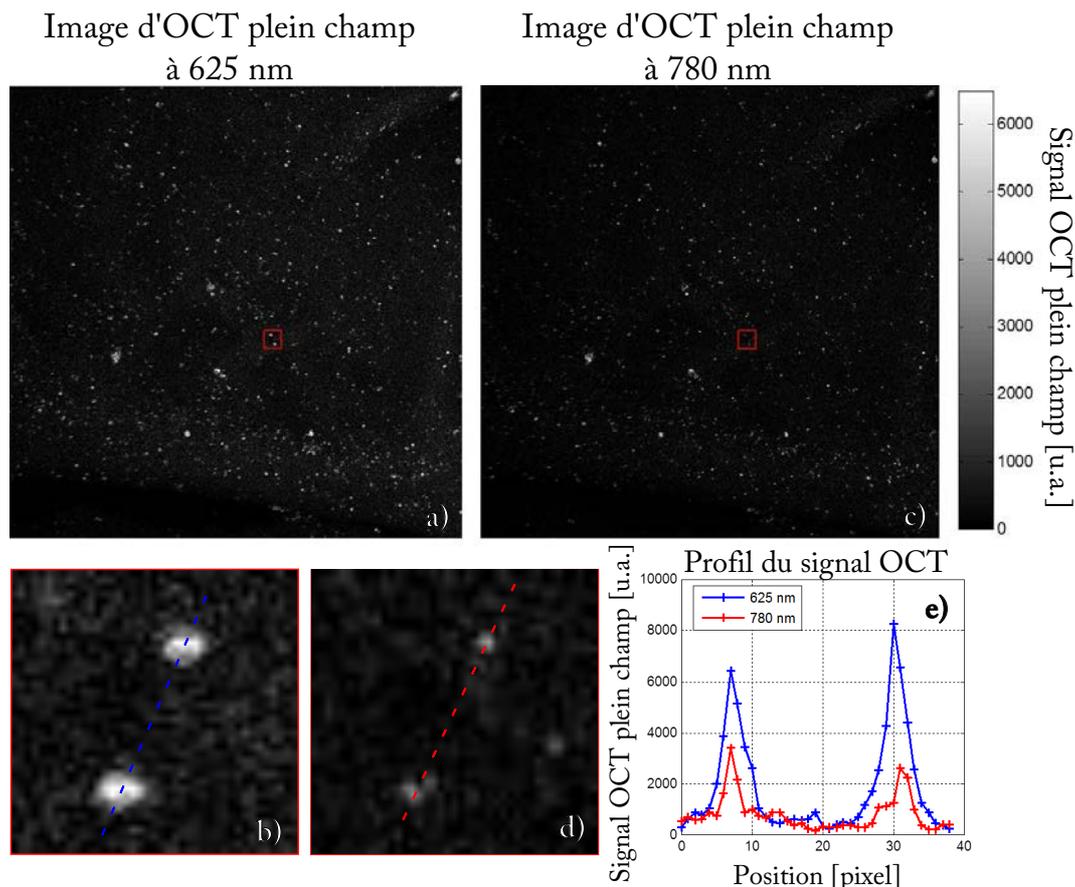
Enfin, la figure 3.7 présente les résultats obtenus pour un gel avec des particules d'oxyde de zinc ainsi que des nanoparticules d'or. De manière similaire à la figure précédente, les figures 3.7a et c sont les images d'OCT plein champ prises à  $15\ \mu\text{m}$  de profondeur respectivement aux longueurs d'ondes de  $625$  et  $780\text{ nm}$ . Les figures 3.7b et d sont des respectivement des images a et c correspondant aux carrés rouges. La figure 3.7e est le profil du signal OCT plein champ selon respectivement la ligne en pointillé sur la figure



**Figure 3.5** – Images d'OCT plein champ d'un gel d'agarose contenant uniquement des nanoparticules cœur-coquille d'or à 625 and 780 nm. Les images a et c correspondent respectivement aux images de l'échantillon à 625 et 780 nm avec un champ de vue de  $800 \times 800 \mu\text{m}^2$ . Les images b et d sont des agrandissements des images a et c correspondant aux carrés rouges. L'image e est le tracé de : en bleu, le profil selon la ligne en pointillé bleue sur l'image b et, en rouge, le profil selon la ligne en pointillé rouge sur l'image d.

b pour la courbe bleue et la ligne en pointillé sur la figure d pour la courbe rouge. La simple observation d'une des deux images d'OCT plein champ ne permet pas de distinguer les deux types de particules. Mais, comme prévu, en observant la variation du signal OCT plein champ il est facile de détecter les nanoparticules d'or (*cf.* figure e).

Ainsi, en tirant avantage du caractère résonant des nanoparticules d'or, nous sommes capables de différencier les nanoparticules d'or des autres diffuseurs. Notre objectif est la détection des nanoparticules d'or dans les milieux biologiques afin de fournir à l'OCT plein champ un nouvel agent de contraste. Cette méthode est prometteuse. Cependant, elle présente un inconvénient majeur qui empêche son utilisation en l'état pour les milieux biologiques. En effet, les milieux biologiques sont des milieux très diffusants. Dans la plupart des cas, plusieurs diffuseurs sont présents dans le volume de cohérence. Ainsi, le signal mesuré est la somme cohérente des signaux rétrodiffusés par les diffuseurs dans le volume de cohérence. C'est ce qui donne une allure granulaire aux images d'OCT. Cette somme étant différente pour chaque longueur d'onde, entre une ac-

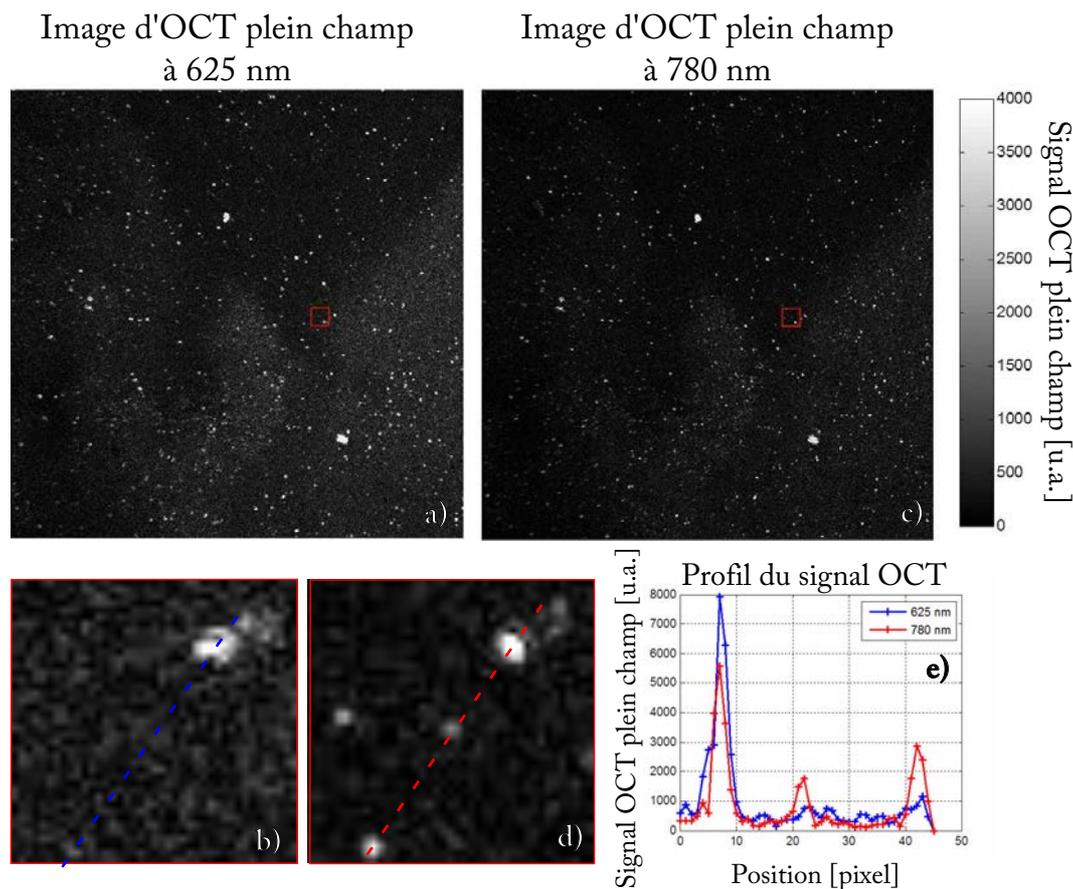


**Figure 3.6** – Images d'OCT plein champ d'un gel d'agarose contenant uniquement des particules d'oxyde de zinc à 625 et 780 nm. Les images a et c correspondent respectivement aux images de l'échantillon à 625 et 780 nm avec un champ de vue de  $800 \times 800 \mu\text{m}^2$ . Les images b et d sont des agrandissements des images a et c correspondant aux carrés rouges. L'image e est le tracé de : en bleu, le profil selon la ligne en pointillé bleue sur l'image b et, en rouge, le profil selon la ligne en pointillé rouge sur l'image d.

quisition à 625 nm et une à 780 nm, le signal OCT plein champ va fortement fluctuer (de manière non contrôlée). Dans les milieux biologiques, ces fluctuations dominent largement le signal des nanoparticules.

Une solution est de lisser ces fluctuations : par exemple en prenant plus d'images à différentes longueurs d'ondes. Dans ce cas, les fluctuations peuvent être réduites comme la racine carrée du nombre d'acquisitions non-corrélées alors que le signal provenant des nanoparticules suivra simplement sa dépendance spectrale.

Dans notre cas, afin de détecter les nanoparticules dans les milieux diffusants, nous avons choisi d'utiliser une méthode plus simple à mettre en œuvre. Elle est basée sur la détection des nanoparticules par modulation locale de l'indice de réfraction par chauffage de nanoparticules d'or.



**Figure 3.7** – Images d'OCT plein champ d'un gel d'agarose contenant des nanoparticules cœur-coquille d'or et des particules d'oxyde de zinc à 625 et 780 nm. Les images a et c correspondent respectivement aux images de l'échantillon à 625 et 780 nm avec un champ de vue de  $800 \times 800 \mu m^2$ . Les images b et d sont des agrandissements des images a et c correspondant aux carrés rouges. L'image e est le tracé de : en bleu, le profil selon la ligne en pointillé bleue sur l'image b et en rouge, le profil selon la ligne en pointillé rouge sur l'image d.

### 3.3 Modulation locale de l'indice de réfraction par chauffage de nanoparticules d'or

#### 3.3.1 Principe

##### Modulation du signal interférométrique par effet photo-thermique

L'objectif de cette étude est de détecter et de localiser la présence de nanoparticules d'or dans un tissu biologique. Nous avons vu au paragraphe précédent qu'une démarche basée sur la rétrodiffusion d'une particule unique est difficile à cause de la granularité des images d'OCT plein champ dans les milieux biologiques. Dans cette partie, nous avons utilisé les propriétés d'absorption des nanoparticules d'or à la résonance de plasmon afin de chauffer localement. Ainsi, en chauffant le milieu à partir de la nanoparticule d'or, l'indice de réfraction du milieu est localement modifié. Le résultat de cet échauffement

est alors de moduler la figure d'interférence mesurée par OCT plein champ. En effet, l'intensité optique  $I$  reçue par chaque pixel de la caméra peut s'écrire comme :

$$I = I_0 + \alpha \cdot \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda_0} \delta_z + \phi_i\right) \quad (3.10)$$

avec  $I_0$  l'intensité optique qui serait mesurée sans interférence,  $\delta_z$  la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre (qui est le produit de l'indice de réfraction  $n$  et de la différence de marche  $\delta_0$  pour un milieu d'indice 1),  $\alpha$  un facteur directement relié à l'amplitude rétrodiffusée par l'échantillon (à la profondeur observée) et la phase initiale  $\phi_i$ . Ces grandeurs sont différentes pour chaque pixel de la caméra.

Il faut noter que l'indice de réfraction  $n$  est un indice moyen du milieu traversé par le faisceau de lumière et non un indice local.

Ainsi, nous remarquons que modifier l'indice de réfraction du milieu modifie la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre, de la même manière que si, par exemple, le miroir de référence était déplacé.

Lorsqu'une nanoparticule d'or absorbe de la lumière, la majeure partie de l'énergie absorbée est convertie en chaleur. Cet effet transforme la nanoparticule en source thermique ponctuelle à partir de laquelle une onde thermique se propage. En ce propageant, l'onde thermique modifie localement l'indice local du milieu. Ainsi, la présence de nanoparticules d'or dans le milieu peut être détectée simplement en observant la perturbation de la figure locale d'interférence mesurée par l'OCT plein champ. De plus, la dépendance temporelle du signal va aussi nous renseigner sur la position des sources thermiques.

### Détection de l'onde thermique par OCT plein champ

Afin d'observer la perturbation de la figure d'interférence par l'onde thermique, nous utilisons un film de l'évolution temporelle de l'interférogramme sans modulation du bras de référence. A ce film, nous avons soustrait le signal avant chauffage. Ainsi, nous obtenons un film de la propagation de la perturbation où le signal de chaque pixel  $I_{diff}$  peut s'écrire comme :

$$\forall t > 0, I_{diff}(t) = \alpha \cdot (\cos\left(\frac{2\pi}{\lambda_0} \delta_z(t) + \phi_i\right) - \cos(\phi_i)) \quad (3.11)$$

soit :

$$\forall t > 0, I_{diff}(t) = -2\alpha \cdot \sin\left(\frac{\pi}{\lambda_0} \cdot \delta_0 \cdot n(t)\right) \cdot \sin\left(\frac{\pi}{\lambda_0} \cdot \delta_0 \cdot n(t) + \phi_i\right) \quad (3.12)$$

De cette façon, les signaux de chaque pixel sont constants (au bruit près) jusqu'au moment où la différence de marche est modifiée par le passage de l'onde thermique. Cela nous permet, d'une part, de détecter s'il y a échauffement du milieu et, d'autre part, cela nous donne accès à l'évolution temporelle de la valeur moyenne de l'indice de réfraction traversé par le faisceau de lumière utilisé pour former l'image d'OCT plein champ.

### Localisation des sources

A partir de l'évolution temporelle du signal d'OCT plein champ, nous avons commencé à développer une méthode nous permettant de localiser la position des nanoparticules. Le principe est de comparer (au sens des moindres carrés) l'évolution temporelle des signaux expérimentaux avec des signaux simulés pour différentes localisations de nanoparticules à partir de l'équation 3.9. Bien que nous soyons au début de l'étude, les résultats que nous présentons sont prometteurs et ils nous donnent confiance en cette méthode.

En pratique, le signal expérimental utilisé est le carré de la moyenne spatiale du signal  $I_{diff}$  sur plusieurs pixels de phase initiale décorrélée, de telle manière que :

$$\langle \sin^2\left(\frac{\pi}{\lambda_0} \cdot \delta_0 \cdot n(t) + \phi_i\right) \rangle_{x,y} \sim 0,5 \quad (3.13)$$

Ainsi, le signal pour chaque pixel moyenné peut s'écrire comme :

$$\forall t > 0, \langle (I_{diff})^2 \rangle_{x,y}(t) \approx 2\beta \cdot \sin^2\left(\frac{\pi}{\lambda_0} \cdot \delta_0 \cdot n(t)\right) \quad (3.14)$$

avec  $\beta$  un facteur directement relié à l'amplitude rétrodiffusée par l'échantillon (à la profondeur observée).

On remarquera que cette méthode n'est efficace que pour des milieux désordonnés, comme la plupart des milieux biologiques, pour lesquels les figures d'interférences sont décorréelées les unes par rapport aux autres.

A l'heure actuelle, nous n'avons pas encore étudié dans le détail la question de la résolution spatiale de la localisation. Mais, il est clair que cette résolution est inférieure à la résolution de l'OCT plein champ et qu'elle dépend fortement de la fréquence d'acquisition de la caméra utilisée, de la puissance de l'illumination chauffant les nanoparticules et de la distance entre la particule et le plan d'imagerie (étalement du champ thermique due à la diffusion).

A partir du film des interférogrammes, cette méthode nous permet ainsi, à la fois, de détecter la présence de nanoparticules d'or et, aussi, de les localiser (même si elles sont localisées plus profondément que la zone accessible par l'OCT plein champ).

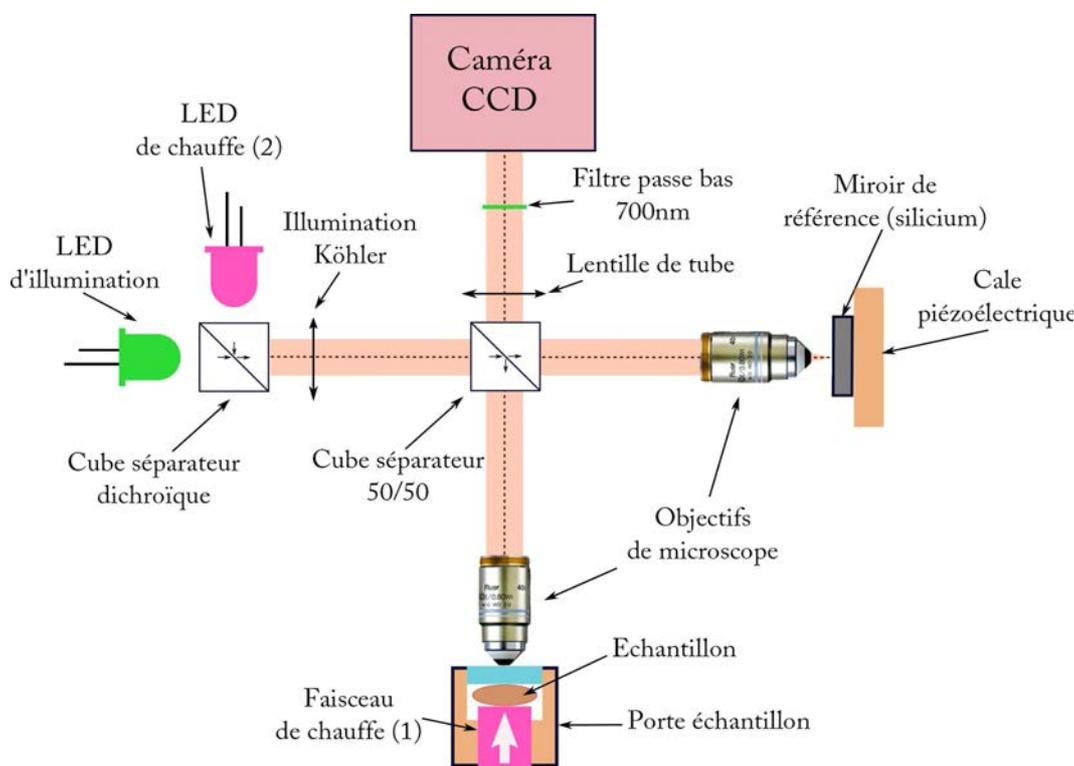
### 3.3.2 Montage expérimental

Pour cette étude, nous avons utilisé les mêmes nanoparticules cœur-coquille d'or (présentées à la figure 3.3) enrobées de Polyéthylène glycol (de la société Nanospectra Biosciences<sup>TM</sup>), déjà utilisé pour la méthode de détection à 2 longueurs d'ondes.. Comme nous l'avons dit, ces particules possèdent une résonance plasmon large et centrée autour de  $780 \text{ nm}$  [59,60]. Cette résonance est bien adaptée à notre méthode de chauffage pour deux raisons :

- D'une part, la résonance de plasmon localisé de ces particules se trouve dans la zone spectrale où les tissus biologiques absorbent peu (aussi appelée fenêtre thérapeutique). Ainsi, les effets thermiques dus au chauffage des nanoparticules sont dominants par rapport aux effets thermiques dues aux autres chromophores du milieu.
- D'autre part, la largeur de la résonance plasmon nous permet d'utiliser efficacement

une illumination de chauffage par LED divergente avec large bande (environ  $30\text{ nm}$ ), contrairement aux autres méthodes photo-thermiques développées en OCT classique qui utilisent des LASER focalisés [61–66] (adaptés aux méthodes à balayage mais pas à l'OCT plein champ) dans des milieux très diffusants.

Le montage que nous avons utilisé est un montage d'OCT plein champ classique (comme nous l'avons décrit précédemment). La figure 3.8 en présente un schéma. La caméra utilisée est une caméra CCD « Dalsa 1M60 ». Cette caméra possède  $1024 \times 1024$  *pixels* codés sur 12 *bits*, une fréquence d'acquisition de 50 *Hz* et une profondeur de puits de 150000 *électrons*. La source utilisée est une LED ThorLabs™– M530L3) dont le spectre est centré autour de  $530\text{ nm}$  (couplée à une illumination Köhler afin d'obtenir une illumination la plus homogène possible et permettant une coupe OCT plein champ mesurée d'environ  $3\text{ }\mu\text{m}$ ). Les objectifs utilisés sont deux objectifs identiques :  $10\times$  à immersion dans l'eau (de la société Olympus) avec une ouverture numérique de 0,3.



**Figure 3.8** – Schéma du montage d'OCT plein champ utilisé pour cette étude. La particularité de ce montage est d'ajouter une illumination de chauffe en dessous (1) ou au-dessus (2) de l'échantillon.

La particularité de ce montage est l'ajout d'une illumination de chauffe réalisée par une LED ThorLabs™– M780L2) dont le spectre est centré autour de  $780\text{ nm}$ . Sur la figure 3.8 sont représentées les deux configurations possibles pour une illumination de chauffe par le dessous (1) ou par le dessus (2). Les résultats présentés au paragraphe suivant ont tous été réalisés avec une illumination de chauffe par le dessous mais dans le cas d'échantillon plus épais une illumination par le dessus est nécessaire.

### 3.3.3 Résultats

Afin de tester notre méthode, nous l'avons appliquée à des échantillons *ex vivo* de peau de souris sans poil, récemment excisée. Chaque échantillon est séparé en deux morceaux : l'un est utilisé comme témoin et l'autre est injecté d'une solution aqueuse de nanoparticules cœur-coquille d'or enrobées de Polyéthylène glycol de concentration  $2,5 \times 10^9$  np/ml.

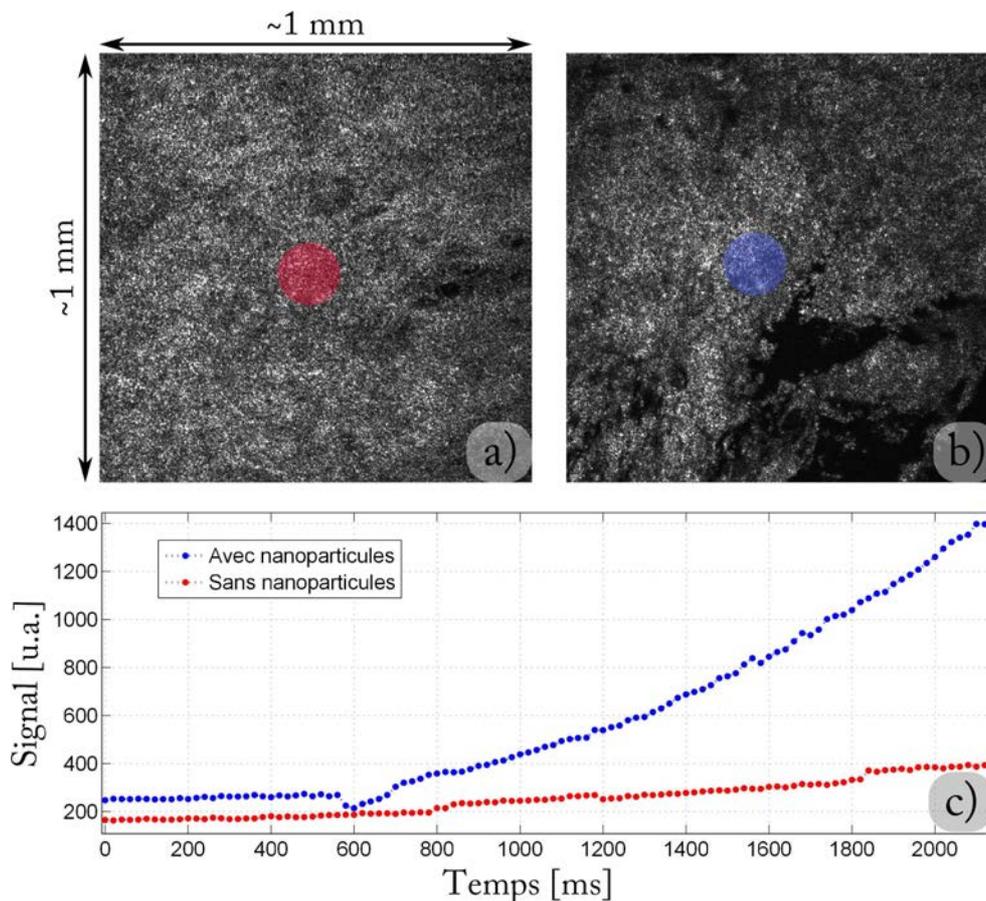
#### Détection de la présence de nanoparticules

La figure 3.9 présente les résultats obtenus pour un échantillon avec et sans nanoparticules. Les figures 3.9a et b sont les images d'OCT plein champ prises à  $20 \mu m$  de profondeur dans l'échantillon, respectivement sans nanoparticule et avec nanoparticules. Comme prévu, les nanoparticules ne sont pas observables sur l'image d'OCT plein champ. Sur la figure 3.9c nous avons tracé les évolutions temporelles des signaux donnés par l'équation 3.14 moyennés sur la zone rouge de l'image a (courbe rouge) et sur la zone bleue de l'image b (courbe bleue). Ainsi, on remarque que, même en absence de nanoparticules, le tissu biologique chauffe un peu (surement dû à l'illumination dans le vert utilisée pour faire l'image) mais cet échauffement est faible devant l'échauffement en présence de nanoparticules d'or, même aux faibles concentrations utilisées.

Ainsi, la présence ou l'absence de nanoparticules peut être révélée par l'évolution temporelle du signal d'OCT plein champ.

#### Vers une localisation des nanoparticules.

Comme nous en avons discuté, l'approche temporelle que nous avons choisie nous permet, en plus de détecter la présence de nanoparticules, de pourvoir les localiser. Nous les localisons au travers d'une comparaison expérience/simulation en localisant les sources thermiques. Nous présentons ici (figure 3.10) un résultat sur un échantillon *ex vivo* de peau de souris. La figure 3.10a est une représentation schématique de la configuration de l'échantillon que nous avons étudiée. Nous nous sommes intéressés à deux zones : la zone 1 où les nanoparticules (en jaune) sont proches de l'endroit où la coupe d'OCT plein champ est faite et la zone 2 où les nanoparticules sont plus en profondeur. La figure 3.10b est l'image d'OCT plein champ de l'échantillon à  $20 \mu m$  de profondeur. La zone 1 étudiée est en cyan et la zone 2 en rouge. A la figure 3.10c nous avons tracé (par des croix cyans et rouges) les évolutions temporelles des signaux expérimentaux (normalisés à 1) de respectivement les zones cyan et rouge de l'image b. De plus, sur la même figure, nous avons tracé la simulation de l'évolution temporelle normalisée de la différence de marche. Nous nous sommes placé dans le cas d'une illumination de chauffe par échelon d'une particule ponctuelle dans un milieu possédant une diffusivité thermique homogène et égale à  $10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$  (typique des milieux biologiques). Ainsi, cette comparaison, nous permet de localiser approximativement les sources thermiques à environ  $32 \mu m$  pour la zone cyan et à environ  $900 \mu m$  pour la zone rouge. Ces premiers résultats sur tissus biologiques nous semblent très prometteurs. En effet, l'utilisation des effets thermiques issus de la chauffe des nanoparticules, même à faible concentration, nous permet, à la fois, de détecter et,



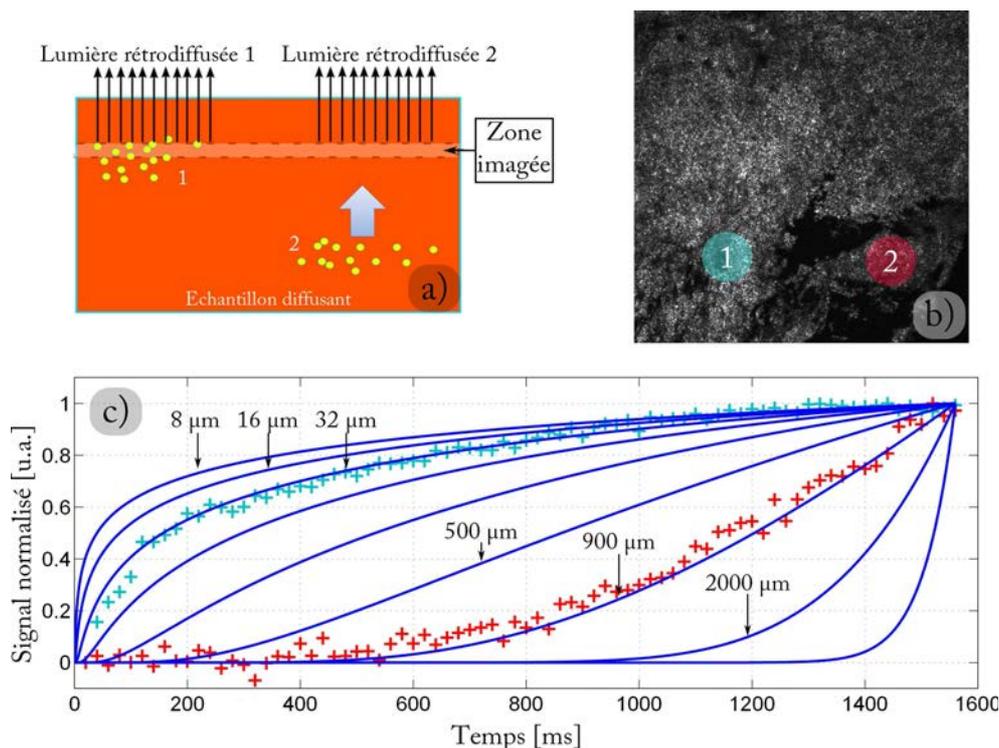
**Figure 3.9** – Comparaison entre un échantillon de peau de souris *ex vivo* avec et sans nanoparticules. Les images a et b sont les images d'OCT plein champ de respectivement l'échantillon sans et avec nanoparticules. La figure b représente les tracés des évolutions temporelles des signaux donnés par l'équation 3.14 moyennés sur la zone rouge de l'image a (courbe rouge) et sur la zone bleue de l'image b (courbe bleue).

en plus, de localiser les nanoparticules dans les milieux biologiques telle que la peau de souris *ex vivo*.

## Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté deux manières de détecter la présence de nanoparticules d'or dans les milieux diffusants. Ces deux méthodes sont basées sur l'exploitation des propriétés étonnantes des nanoparticules d'or : notamment la forte augmentation de la section efficace de diffusion et d'absorption à la résonance de plasmon localisé.

La première méthode que nous avons proposée est basée sur l'imagerie à deux longueurs d'onde (en dehors et à la résonance de plasmon localisé). Cette méthode nous a permis de détecter sélectivement les particules d'or dans des gels polymères. Cependant, notre objectif est de proposer un nouvel agent de contraste pour l'imagerie biomédicale par l'OCT plein champ et il s'est avéré que cette méthode n'est pas applicable telle quelle aux milieux très diffusants comme les milieux biologiques. En effet, d'une part, le signal des



**Figure 3.10** – Localisation de nanoparticules dans un échantillon de peau *ex vivo* de souris. La figure a est un schéma de la configuration de l'échantillon que nous étudions. L'image b est l'image d'OCT plein champ de l'échantillon à  $20 \mu\text{m}$  de profondeur. On définit une zone 1 en cyan et une zone 2 en rouge. Sur la figure c sont tracés, les évolutions temporelles des signaux expérimentaux normalisés (croix cyans et rouges correspondant respectivement aux zones 1 et 2) ainsi que les signaux normalisés simulés pour différentes profondeurs, dans le cas d'une illumination de chauffe par échelon d'une particule ponctuelle dans un milieu possédant une diffusivité thermique homogène et égale à  $10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$ .

nanoparticules est du même ordre de grandeur que les signaux dans les tissus biologiques et d'autre part, dans les milieux biologiques plusieurs diffuseurs sont présents dans le volume de cohérence et le signal issu de la somme des signaux des diffuseurs varie fortement en fonction de la longueur d'onde.

C'est pour cela que nous proposons une seconde méthode permettant de détecter et de localiser les nanoparticules d'or dans les milieux biologiques. Cette seconde méthode est basée sur l'utilisation des nanoparticules d'or comme source de chaleur ponctuelle. Elle repose sur l'effet photo-thermique et la détection de la perturbation d'indice engendrée par la propagation de l'onde de chaleur issue des nanoparticules. Les résultats que nous avons obtenus avec cette méthode sont préliminaires mais ils semblent indiquer que non seulement nous sommes capables de détecter la présence de nanoparticules mais qu'en plus une localisation des nanoparticules est possible même dans le cas où celles-ci sont à des profondeurs inaccessibles à l'OCT plein champ.



## Deuxième partie

# Contraste élastographique par OCT plein champ



Depuis les tous débuts de la médecine, les propriétés mécaniques des tissus ont été utilisées afin d'établir des diagnostics, notamment au travers la pratique de la palpation. On retrouve systématiquement cette pratique dans tous les types de médecine : traditionnel ou moderne et nous en retrouvons des traces dans toutes les civilisations connues.

En effet, les organes, les tissus et les cellules qui constituent les organismes biologiques possèdent des propriétés mécaniques intrinsèques liées à leurs structures et leurs fonctions. Un changement de leurs propriétés mécaniques peut refléter leur état de santé.

L'ajout du contraste mécanique aux images morphologiques d'OCT plein champ semble un bon candidat afin d'aider au diagnostic. D'autant plus que ce contraste est endogène et qu'il s'est révélé précieux au cours de ces dix dernières années à l'échelle du millimètre notamment en échographie et en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) où l'information mécanique contribue grandement au diagnostic final.

Qu'en est-il à l'échelle du micromètre auquel nous donne accès l'OCT plein champ ?



## CHAPITRE 4

---

### Mécanique dans les milieux biologiques

---

#### Table des matières

---

4.1	Introduction à la mécanique des milieux élastiques mous . . . . .	<b>56</b>
4.1.1	Les modules mécaniques . . . . .	56
4.1.2	Propagation d'ondes mécaniques . . . . .	58
4.2	Elastographie et imagerie biomédicale . . . . .	<b>59</b>
4.2.1	Méthodes statiques . . . . .	59
4.2.2	Méthodes quasi-statiques . . . . .	61
4.2.3	Méthodes dynamiques . . . . .	61

---

Depuis le début des années 80, la recherche sur l'ajout du contraste d'élastographie à l'imagerie médicale est très intense. Depuis leurs débuts en IRM et en acoustique [67, 68], les méthodes associées à ces recherches ont connu un grand succès. Elles ont notamment démontré que l'ajout d'information mécanique aux modalités d'imagerie classique aide les médecins dans leur diagnostic à l'échelle du millimètre [69, 70]. Toutes les méthodes qui ont été développées reposent sur la caractérisation mécanique des échantillons et l'observation de leurs réactions lors d'une sollicitation mécanique. Afin de pouvoir au mieux appréhender ces recherches nous allons présenter dans ce chapitre les bases de mécanique du solide permettant la caractérisation de milieux en définissant notamment les modules mécaniques principaux. Ensuite, dans le cas simple des milieux infinis, homogènes, isotropes et non visqueux, nous montrerons le lien entre la propagation d'une onde mécanique et les modules mécaniques. Et enfin, nous dresserons un bref état de l'art des techniques qui ont été développées afin d'ajouter ces informations mécaniques aux différentes modalités d'imagerie médicale.

## 4.1 Introduction à la mécanique des milieux élastiques mous

La mécanique du solide est un vaste sujet très avancé qui fait l'objet de nombreux champs d'applications dans des domaines aussi différents que l'aéronautique ou le biomédical et d'une recherche très intense. Dans cette partie, nous allons présenter brièvement les principes permettant la caractérisation des matériaux en ne s'intéressant qu'à l'élasticité des matériaux dans le cas simple de matériaux infinis, homogènes, isotropes et non visqueux.

### 4.1.1 Les modules mécaniques

L'expérience montre que si la déformation d'un matériau est suffisamment faible, celui-ci reprend son état primitif non déformé lors de la suppression des efforts extérieurs ayant provoqué sa déformation. Le comportement élastique parfait correspond à une réversibilité mécanique parfaite. Ainsi, dans le cas élastique, il est possible de relier le tenseur des déformations  $\underline{\underline{\varepsilon}}$  au tenseur des contraintes  $\underline{\underline{\sigma}}$  par une loi de comportement bijective [71]. Typiquement, dans le cas linéaire et non visqueux, le comportement élastique peut être décrit par la loi de Hooke généralisée tel que :

$$\underline{\underline{\sigma}} = \underline{\underline{C}} \cdot \underline{\underline{\varepsilon}} \quad (4.1)$$

avec  $\overline{\overline{C}}$  le tenseur d'ordre 4 des constantes mécaniques. Dans le cas de l'élasticité linéaire et isotrope, on peut montrer que les propriétés mécaniques d'un matériau peuvent être décrites entièrement par 2 modules élastiques.

Dans la littérature, on trouve de nombreuses définitions des modules élastiques. Nous présentons ici les principales avec les lois de comportement correspondantes.

**Module d'Young et coefficient de Poisson** Introduit par Young lors de ses travaux sur les propriétés mécaniques de la cornée, le module d'Young  $E$  définit le coefficient de proportionnalité entre une contrainte uniaxiale appliquée  $\sigma$  et la déformation induite selon l'axe d'application de la contrainte  $\varepsilon$ , tel que :

$$E = \frac{\varepsilon}{\sigma} \quad (4.2)$$

Poisson complète cette analyse en constatant que l'allongement selon l'axe de contrainte est accompagné d'un raccourcissement selon les axes perpendiculaires à la contrainte. Ainsi, il introduit le coefficient de Poisson, noté  $\eta$ , qui correspond au rapport entre la déformation selon un axe perpendiculaire à la contrainte et la déformation selon la contrainte.

A partir de ces deux modules élastiques, il est possible de réécrire l'équation 4.1 comme :

$$E\overline{\overline{\varepsilon}} = -\eta Tr(\overline{\overline{\sigma}}).\overline{\overline{I}} + (1 + \eta).\overline{\overline{\sigma}} \quad (4.3)$$

avec  $\overline{\overline{I}}$  le tenseur identité.

**Module de Lamé** Le premier module de Lamé  $\lambda$  et le module de cisaillement  $\mu$  ont été introduits par Lamé alors qu'il s'intéressait à la propagation des ondes acoustiques. La relation contrainte-déformation peut s'écrire alors comme :

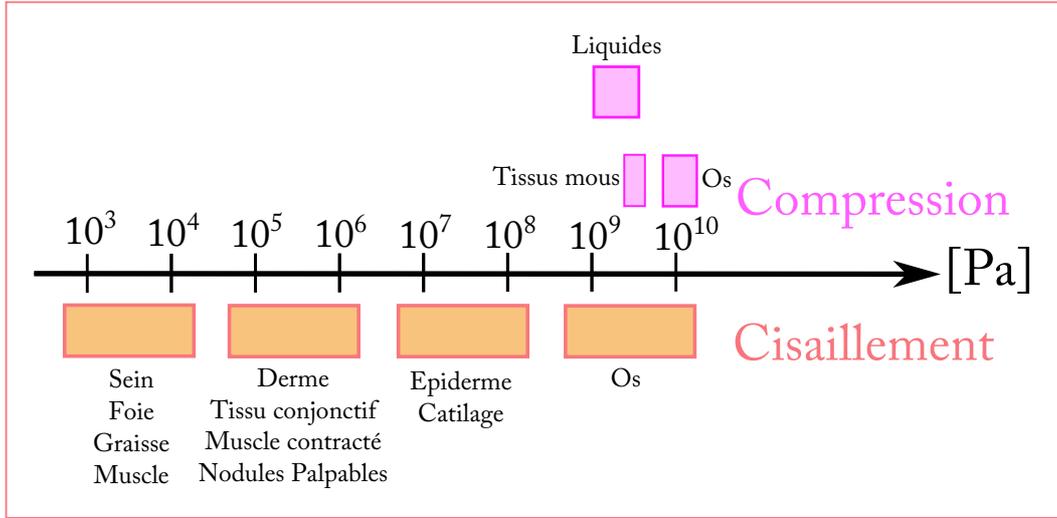
$$\overline{\overline{\sigma}} = \lambda Tr(\overline{\overline{\varepsilon}}).\overline{\overline{I}} + 2\mu.\overline{\overline{\varepsilon}} \quad (4.4)$$

Nous verrons dans la partie suivante comment ces 2 modules interviennent dans l'équation de propagation d'onde.

**Modules de compressibilité et de cisaillement** Les modules de compressibilité  $K$  et de cisaillement  $\mu$  correspondent respectivement à un changement de volume à forme constante et un changement de forme à volume constant. A partir de ces deux modules, on peut réécrire la relation contrainte-déformation tel que :

$$\begin{cases} Tr(\overline{\overline{\sigma}}).\overline{\overline{I}} = 3K.Tr(\overline{\overline{\varepsilon}}).\overline{\overline{I}} \\ \overline{\overline{\sigma}} - \frac{Tr(\overline{\overline{\sigma}})}{3}.\overline{\overline{I}} = 2\mu(\overline{\overline{\varepsilon}} - \frac{Tr(\overline{\overline{\varepsilon}})}{3}.\overline{\overline{I}}) \end{cases} \quad (4.5)$$

Ces deux derniers modules nous permettent de par leur sens physique d'apprécier les propriétés mécaniques des milieux élastiques. La figure 4.1 présente les ordres de grandeur des modules de compressibilité et de cisaillement pour les tissus biologiques [72].



**Figure 4.1** – Ordre de grandeur des modules de compression et de cisaillement dans les tissus biologiques.

Ainsi, les tissus biologiques possèdent des modules de compression très grands par rapport à leurs modules de cisaillement, une particularité qui nous permet de les considérer comme des milieux quasi-incompressibles dans la majorité des cas. De plus, sur la figure 4.1 on remarque bien que les tissus biologiques possèdent une grande variété de modules de cisaillement alors que la compressibilité des tissus varie peu. Cette grande variété des modules de cisaillement justifie l'intérêt de l'ajout d'un contraste sensible au module de cisaillement dans les modalités d'imageries médicales.

### 4.1.2 Propagation d'ondes mécaniques

L'équation de propagation d'ondes dans les milieux isotropes, infinis et homogènes se déduit directement à partir du principe fondamental de la dynamique [73] qui s'écrit localement comme :

$$\vec{div}(\vec{\sigma}) = \rho \vec{a} \quad (4.6)$$

avec  $\rho$  la densité volumique et  $\vec{a}$  l'accélération. En utilisant l'équation 4.4 nous obtenons :

$$\vec{div}(\lambda Tr(\vec{\varepsilon}) \cdot \vec{I}) + \vec{div}(2\mu \vec{\varepsilon}) = \rho \frac{\partial^2 \vec{u}}{\partial t^2} \quad (4.7)$$

Dans le cas d'un milieu homogène où les coefficients de Lamé ne varient pas spatialement nous avons :

$$\lambda \vec{div}(Tr(\vec{\varepsilon}) \cdot \vec{I}) + \mu \vec{div}(2\vec{\varepsilon}) = \rho \frac{\partial^2 \vec{u}}{\partial t^2} \quad (4.8)$$

Et en exprimant le tenseur de déformation comme la partie symétrique du gradient du vecteur  $\vec{u}$  tel que  $\vec{\varepsilon} = \vec{grad}(\vec{u}) + {}^t\vec{grad}(\vec{u})$ , nous obtenons l'équation de Lamé :

$$\boxed{(\lambda + \mu) \vec{grad}(\vec{div}(\vec{u})) + \mu \Delta \vec{u} = \rho \frac{\partial^2 \vec{u}}{\partial t^2}} \quad (4.9)$$

En décomposant le champ de déplacements en un champ de déplacements longitudinaux  $\vec{u}_L$  (correspondant à une onde de compression-traction où les déplacements locaux sont selon l'axe de propagation) et un champ de déplacements transversaux  $\vec{u}_T$  (correspondant à une onde de cisaillement où les déplacements locaux sont perpendiculaires à l'axe de propagation) tel que :

$$\begin{cases} \text{rot}(\vec{u}_L) = 0 \\ \text{div}(\vec{u}_T) = 0 \end{cases} \quad (4.10)$$

l'équation 4.9 peut s'écrire :

$$\begin{cases} (\lambda + 2\mu)\Delta\vec{u}_L = \rho\frac{\partial^2\vec{u}}{\partial t^2} \\ \mu\Delta\vec{u}_T = \rho\frac{\partial^2\vec{u}}{\partial t^2} \end{cases} \quad (4.11)$$

Et nous pouvons en déduire les vitesses des ondes longitudinales  $c_L$  et transversales  $c_T$  :

$$\begin{cases} c_L = \sqrt{\frac{\lambda + 2\mu}{\rho}} \\ c_T = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}} \end{cases} \quad (4.12)$$

Nous observons d'emblée une propriété intéressante qui est le lien direct entre la vitesse de propagation des ondes de cisaillement et le module de cisaillement. C'est-à-dire que, connaissant la vitesse de propagation des ondes de cisaillement, il est possible de calculer de manière quantitative le module de cisaillement du milieu. Ceci n'est toutefois exact que dans le cas d'un solide isotrope, infini, homogène et non visqueux.

Dans le cas des milieux biologiques qui sont des milieux anisotropes, de dimension finie, hétérogènes et visqueux, l'utilisation de cette propriété de la propagation des ondes de cisaillement s'avère beaucoup moins directe, et nécessite souvent des hypothèses complémentaires restrictives ou une approche conduisant à une résolution de problème inverse : nous verrons par exemple au chapitre 7 comment la simple présence d'une surface perturbe fortement la vitesse de l'onde de cisaillement.

## 4.2 Elastographie et imagerie biomédicale

Afin d'ajouter un contraste d'élastographie aux images médicales des tissus ou des organes, on trouve principalement dans la littérature 3 types de méthodes. Ces méthodes sont distinguées par le type de sollicitations mécaniques utilisées : statiques, quasi-statiques et dynamiques.

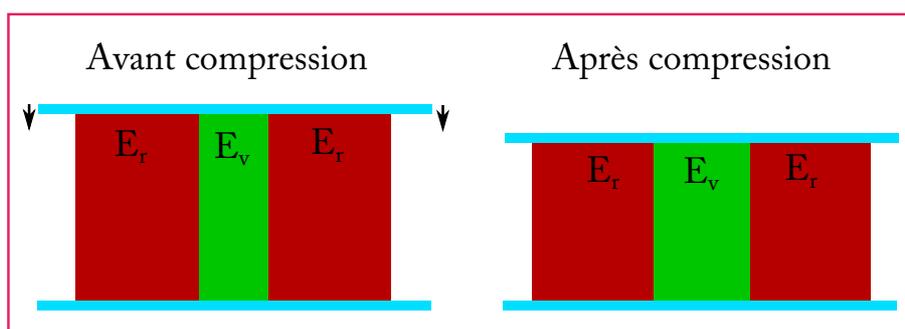
### 4.2.1 Méthodes statiques

Les méthodes statiques ont été introduites par J. Ophir et son équipe [68, 74] au début des années 90 en échographie acoustique. Elles ont connu un grand succès notamment grâce à leur simplicité de mise en œuvre et leur adaptation facile à toutes les tech-

niques d'imagerie comme par exemple à l'OCT classique expérimentée en 1998 par J. Schmitt [75].

Les méthodes statiques correspondent à une sollicitation mécanique statique des échantillons. Typiquement, une image de l'échantillon est prise avant et après la sollicitation mécanique et, à partir de ces paires d'images, les déplacements locaux sont estimés dans l'échantillon. A partir de cette carte de déplacements, est calculée la carte des déformations locales dans l'échantillon. En règle générale le contraste ajouté aux images est un contraste de déformation, et non d'élasticité, ce qui rend ces méthodes très similaires à une palpation locale.

Bien que ces méthodes aient du succès et qu'elles soient utilisées sur certains appareils commerciaux d'imagerie, elles possèdent de fortes limitations. La première est que cette technique est très dépendante de la manière avec laquelle sont appliquées les contraintes. La seconde, plus restrictive, est que l'information de déformation ne donne pas accès à une information physique comme un module élastique. Afin d'améliorer ce type de méthodes, de nombreux groupes travaillent sur l'inversion du problème afin de pouvoir estimer un module élastique à partir de la mesure des déformations [76–78]. Cependant, dans des milieux multi-échelles et fortement hétérogènes comme les milieux biologiques, ces problèmes d'inversion sont complexes et parfois insolubles. Pour illustrer les limitations de cette méthode statique, voici un cas simple représenté en figure 4.2. Nous avons un milieu vert entouré d'un milieu rouge (symétrie cylindrique), tous deux homogènes, isotropes et incompressibles. On définit pour le milieu vert un module de cisaillement  $\mu_v$  et pour le milieu rouge un module de cisaillement  $\mu_r$  avec  $\mu_v \neq \mu_r$ . Dans la configuration largement utilisée, que nous utiliserons au chapitre 5, où la déformation est appliquée par le déplacement de deux plaques rigides (en bleues sur la figure 4.2) il est impossible de différencier ces deux milieux à partir de la cartographie locale des déformations.



**Figure 4.2** – Schéma illustrant une des limitations des méthodes statiques. En rouge et vert deux milieux homogènes, isotropes, incompressibles mais possédant deux modules de cisaillement différents, respectivement  $\mu_r$  et  $\mu_v$ .

Dans le chapitre 5 nous mentionnerons d'autres types d'artefact et nous détaillerons les moyens mis en place pour limiter leurs effets.

### 4.2.2 Méthodes quasi-statiques

Les méthodes quasi-statiques correspondent à une sollicitation mécanique périodique et de basse fréquence (typiquement inférieure à 50 Hz). L'utilisation d'une basse fréquence de sollicitations ne conduit pas à la génération d'ondes acoustiques et rend ainsi ce type de méthodes très similaire aux méthodes statiques. De la même manière, les déplacements sont mesurés, et à partir de ces déplacements, les déformations locales sont déduites. Ces deux méthodes possèdent les mêmes limitations, mais la méthode quasi-statique permet en plus d'accéder aux effets viscoélastiques dépendant de la fréquence de sollicitation. La méthode quasi-statique s'adapte particulièrement aux procédures utilisant des particules magnétiques pour induire des déplacements locaux dans les échantillons. Les premiers résultats en OCT classique se sont révélés très prometteurs [79, 80]. Dans le chapitre 6, nous montrerons comment nous avons adapté ces méthodes afin de pouvoir réaliser de l'élastographie quasi-statique et utiliser des nanoparticules magnétiques comme sondes locales en OCT plein champ. En outre, nous décrirons en détail ce qu'une méthode quasi-statique apporte de plus qu'une méthode statique dans le cas de l'OCT plein champ.

### 4.2.3 Méthodes dynamiques

Les méthodes précédentes s'intéressent à l'étude de la déformation globale d'un échantillon. Les méthodes dites dynamiques correspondent à l'étude de la propagation d'ondes mécaniques dans les échantillons et à l'estimation des modules élastiques. On distingue principalement deux types de méthode dynamique.

**Les méthodes dites stationnaires** : Une sollicitation mécanique monochromatique d'une centaine de Hertz génère dans le milieu une onde stationnaire couplée en compression et en cisaillement dont les propriétés sont liées aux propriétés mécaniques de l'échantillon. En acoustique, ces méthodes stationnaires sont appelées "sono-élastographie" [81] et en IRM "élastographie NMR" [82]. L'accès aux propriétés élastiques nécessite une inversion. L'inversion est difficile en acoustique où la mesure du champ de déplacement se fait dans un plan. Elle est plus simple en IRM [83] car il est possible d'accéder directement au champ de déplacement en 3 dimensions.

**Les méthodes dites impulsionnelles** : La sollicitation mécanique est à large spectre et, dans ce cas, on s'intéresse à la propagation d'ondes mécaniques (principalement d'ondes de cisaillement). Ce type de méthodes a été tout d'abord introduit en IRM par l'équipe du Professeur Sarvazyan en 1998 [72]. Cette équipe proposait d'utiliser le lien étroit entre la vitesse de propagation des ondes de cisaillement et les propriétés élastiques des milieux biologiques. La méthode impulsionnelle avec une avancée supersonique de la focalisation a été ensuite introduite en acoustique, à l'Institut Langevin (Paris), avec la thèse de J. Bercoff en 2004 [84, 85]. Durant cette thèse, la méthode a été couplée à l'échographie rapide développée à l'Institut. Ces travaux ont conduit à une amélioration notable de l'élastographie ultrasonore et à des résultats très prometteurs notamment pour le diagnostic du cancer du sein [69]. Actuellement, les méthodes d'élastographie dynamique commencent à être développées en OCT classique et font l'objet de nombreuses publications [86–91].

## Conclusion

Ce chapitre nous a permis d'introduire les bases de la mécanique et les différentes techniques d'élastographie utilisées en imagerie biomédicale.

Dans les prochains chapitres, nous présentons trois méthodes différentes que nous avons développées afin d'ajouter le contraste d'élastographique aux images d'OCT plein champ : une méthode statique basée sur la corrélation d'images (chapitre 5), une méthode quasi-statique basée sur la mesure de déplacements par interférométrie (chapitre 6) et une méthode dynamique basée sur le suivi de la propagation des ondes de cisaillement par OCT plein champ (chapitre 7).

---

## Elastographie statique par corrélation d'image numérique

---

### Table des matières

---

5.1	Principe de la corrélation d'images . . . . .	<b>64</b>
5.1.1	Corrélation et estimation du déplacement . . . . .	65
5.1.2	Méthode locale de corrélation d'images . . . . .	65
5.1.3	Méthode globale de corrélation numérique 3D . . . . .	66
5.1.4	Quelques mots sur les performances . . . . .	67
5.2	Montage et méthode expérimentaux . . . . .	<b>68</b>
5.2.1	Montage expérimental . . . . .	68
5.2.2	Méthode expérimentale . . . . .	69
5.3	Résultats expérimentaux . . . . .	<b>72</b>
5.3.1	Corrélation d'images 2D classique . . . . .	72
5.3.2	Corrélation d'images 3D basée sur une méthode d'éléments finis	74
5.3.3	Vers une amélioration du montage d'élastographie statique . .	80

---

Dans ce chapitre nous allons présenter la première méthode que nous avons mise en place afin d'ajouter le contraste d'élastographie aux images d'OCT plein champ. Cette méthode est une méthode statique. Son fonctionnement repose sur l'estimation des déplacements par corrélation d'images numériques 2D et 3D.

L'estimation des déplacements par corrélation d'images numériques est une technique utilisée dès les années 80 afin d'analyser les propriétés mécaniques des matériaux [92]. Au cours des dernières années, cette technique a bénéficié de la croissance exponentielle des capacités de calcul des ordinateurs avec notamment l'avènement du calcul parallèle sur carte graphique. Ainsi, l'explosion des puissances de calcul et, en parallèle, les développements technologiques en imagerie optique, ont permis à ces techniques de devenir des outils incontournables et très puissants en mécanique. Ces méthodes permettent l'estimation locale des déplacements par corrélation d'images. A des échelles dépendantes de la technique d'imagerie utilisée, elles sont utilisées avec grand succès en mécanique des fluides et du solide pour la caractérisation *in situ* de matériaux complexes.

Dans ce chapitre, nous allons présenter les travaux que nous avons menés afin de montrer que les méthodes de corrélation d'images numériques s'adaptent bien à l'imagerie OCT plein champ. Nous montrerons que ces méthodes permettent d'ajouter de nouvelles informations au contraste morphologique fourni par l'OCT plein champ. Elles permettent l'obtention d'informations mécaniques comme la déformation locale mais aussi des estimations de l'anisotropie mécanique et de la compressibilité locale des tissus.

Ainsi, nous présenterons tout d'abord brièvement le principe de la corrélation d'images numériques. Ensuite, nous présenterons le montage expérimental que nous avons mis en place. Enfin, nous présenterons les résultats obtenus en 2D et 3D sur des échantillons polymères et biologiques.

*Publications associées au chapitre :*

- [Amir Nahas](#), Morgane Bauer, Stéphane Roux et A. Claude Boccara. "3D static elastography at the micrometer scale using Full Field OCT." *Biomedicaloptics express* 4.10 (2013) : 2138-2149.
- Simon Chatelin, Miguel Bernal, Thomas Deffieux, Clément Papadacci, Patrice Flaud, [Amir Nahas](#), Claude Boccara, Jean-Luc Gennisson, Mickael Tanter, Mathieu Pernot. "Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel phantom for shear wave elastography in fibrous biological soft tissue : a multimodality characterization." *Phys. Med. Biol.*, accepted.

## 5.1 Principe de la corrélation d'images

Le principe à la base de la corrélation d'images est de capter le mouvement à partir d'images prises à des instants différents. Pour cela, on exploite la texture de l'image qui permet de « reconnaître » d'une image à l'autre le déplacement d'objets. Dans cette par-

tie, nous allons présenter brièvement les bases de la corrélation d'images. Plus de détails sont disponibles dans la référence [93].

### 5.1.1 Corrélation et estimation du déplacement

La corrélation d'images repose sur l'hypothèse que la texture des images considérées est passivement advectée lors de la déformation du milieu. Ainsi, il est possible de relier l'image initiale  $f$  à l'image déformée en fonction du champ de déplacements  $\vec{u}$  par l'équation suivante :

$$\forall \vec{x}, f(\vec{x}) = g(\vec{x} + \vec{u}(\vec{x})) + \beta(\vec{x}) \quad (5.1)$$

où  $\vec{x}$  correspond à la position du pixel et  $\beta$  représente une fonction représentant le bruit. Ainsi, estimer le champ de déplacements local  $\vec{u}$  peut se faire en minimisant une fonctionnelle  $\Gamma$  par rapport à un champ de déplacements connu  $\vec{u}$ . Avec la norme définie par  $\|f\|^2 = \int |f(\vec{x})|^2 d\vec{x}$ , la fonctionnelle  $\Gamma$  s'exprime comme la différence entre les fonctions  $\vec{x} \mapsto f(\vec{x})$  et  $\vec{x} \mapsto g(\vec{x} + \vec{u}(\vec{x}))$  tel que :

$$\forall \vec{u}, \Gamma(\vec{u}) = \left\| f(\vec{x}) - g(\vec{x} + \vec{u}(\vec{x})) \right\|^2 \quad (5.2)$$

Notons que le problème de l'estimation du champ de déplacements  $u$  à partir de la seule connaissance des images initiale  $f$  et déformée  $g$  est un problème mal posé. Afin d'être résolu, ce problème nécessite des hypothèses quant à la régularité du champ de déplacements.

Dans la littérature, on trouve principalement 2 approches afin de résoudre ce problème de minimisation : l'approche locale et l'approche globale. Nous les présentons aux paragraphes suivants.

### 5.1.2 Méthode locale de corrélation d'images

L'approche locale est basée sur le fait que dans le cas d'une translation de corps rigide, minimiser la fonctionnelle  $\Gamma$  revient à maximiser l'inter-corrélation des fonctions  $f$  et  $g$ . En effet, si l'on considère une translation de vecteur  $\vec{d}$ , tel que  $\forall \vec{x}, \vec{u}(\vec{x}) = \vec{d}$  alors la fonctionnelle  $\Gamma$  peut s'écrire :

$$\forall \vec{u}, \Gamma(\vec{u}) = \|f(\vec{x})\|^2 + \|g(\vec{x} - \vec{u})\|^2 - 2 \|f(\vec{x}) \times g(\vec{x} - \vec{u})\|^2 \quad (5.3)$$

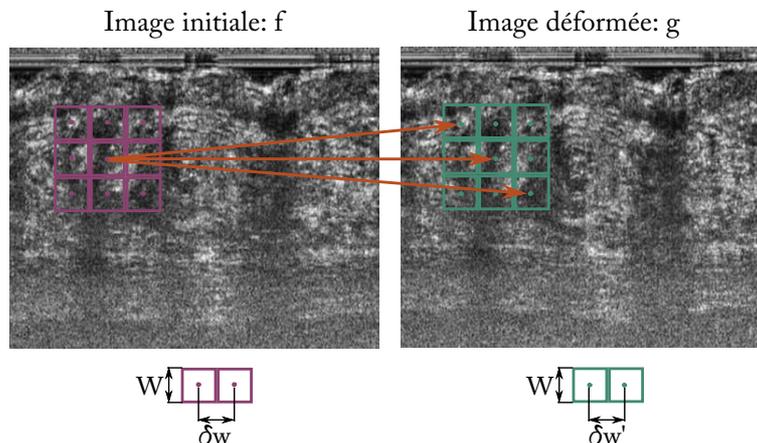
Et comme  $\vec{x} \mapsto \|f(\vec{x})\|^2$  et  $\vec{x} \mapsto \|g(\vec{x} - \vec{u})\|^2$  sont des termes constants dans ce cas, minimiser la fonctionnelle  $\Gamma$  revient à maximiser le terme  $\vec{x} \mapsto \|f(\vec{x}) \times g(\vec{x} - \vec{u})\|^2$  qui n'est autre que l'inter-corrélation des fonctions  $f$  et  $g$ . Ainsi :

$$\min_{\vec{u}}(\Gamma) = \max_{\vec{u}}((f \star g)(\vec{u})) \quad (5.4)$$

avec le symbole  $\star$  représentant l'inter-corrélation.

En pratique (dans l'approche locale), l'image est découpée en de petites sous-images dont

le déplacement est supposé être une simple translation (une déformation homogène des sous-images est souvent autorisée). Ainsi, en maximisant l'inter-corrélation entre chaque sous-image de l'image initiale par rapport à celles de l'image déformée il est possible d'estimer le déplacement local de chaque sous-image indépendamment les uns des autres et d'en déduire le champ de déplacements entre l'image initiale et l'image déformée. Le schéma figure 5.1 présente, dans le cas 2D, le principe de cette méthode locale. Les per-



**Figure 5.1** – Schéma de principe de la méthode locale de corrélation d'images. Les images initiale et déformée sont découpées en sous-images (ici les carrés violets et verts). Par calcul de l'inter-corrélation entre les sous-images de l'image initiale et les sous-images de l'image déformée (schématisé ici par les flèches oranges) on peut estimer quelles sous-images de l'image déformée correspondent à celles de l'image initiale et ainsi estimer le champ de déplacements.

formances de ce type de méthode vont fortement dépendre du choix de la taille des sous-images  $W$ , de la distance entre les sous-images dans l'image initiale  $\delta w$  et de la distance entre les sous-images dans l'image déformée  $\delta w'$ . Les performances seront discutées plus en détail au paragraphe suivant.

L'approche locale est largement utilisée dans de nombreux domaines de la physique. Elle est appréciée pour sa simplicité de mise en œuvre. Cependant, dans la majorité des cas le champ de déplacements ainsi estimé est fortement discontinu et nécessite d'être filtré notamment lorsqu'une estimation de la déformation locale est recherchée. Cette étape de filtrage *a posteriori* rend difficile l'évaluation des performances de l'estimation. Concernant ce dernier point, l'approche globale, décrite ensuite, permet de choisir la régularité du champ de déplacements estimé et donne des résultats plus aisément exploitables.

### 5.1.3 Méthode globale de corrélation numérique 3D

L'approche globale consiste à estimer le champ de déplacements dans son ensemble. Tel quel, le problème de minimisation donné par l'équation 5.2 est fortement non-linéaire ; afin de pouvoir le résoudre, une résolution itérative est employée. Elle consiste en une linéarisation locale du problème par un développement de Taylor et une correction successive de l'image  $g$ . Ainsi, près du minimum, une méthode de Newton-Raphson est appliquée. En

écrivait  $\forall \vec{x}, \tilde{g}(\vec{x}) = g(\vec{x} + \vec{u}(\vec{x}))$ , la correction  $\delta \vec{u}$  au champ de déplacements  $\vec{u}$  est estimée pour chaque itération par la minimisation de la fonctionnelle linéarisée  $\Gamma_0$  tel que :

$$\forall \delta \vec{u}, \Gamma_0(\delta \vec{u}) = \left\| \tilde{g}(\vec{x}) - f(\vec{x}) - \vec{grad}f(\vec{x}) \cdot \delta \vec{u} \right\|^2 \quad (5.5)$$

Cette approximation linéaire est valide pour de petites valeurs de correction du champ de déplacements. Ainsi, en corrigeant du déplacement estimé le champ de déplacements  $\vec{u}$  tel que  $\vec{u} \leftarrow \vec{u} + \delta \vec{u}$  et l'image  $\tilde{g}$ , l'algorithme converge vers une estimation du champ de déplacements.

De plus, afin de permettre la résolution du problème de minimisation, le champ de déplacements  $\vec{u}$  est exprimé sur une base de fonctions propres  $\Psi_k$  de type éléments finis tel que :

$$\forall \vec{x}, \vec{u}(\vec{x}) = \sum_k \vec{u}_k \cdot \Psi_k(\vec{x}) \quad (5.6)$$

où  $k$  est l'indice du nœud de maillage et  $\vec{u}_k$  la valeur du déplacement au nœud  $k$ .

Ainsi, la résolution de ce problème de minimisation se réduit à la résolution d'un système linéaire à  $N$  inconnues,  $N$  étant le nombre de nœuds du maillage choisi tel que :

$$M_{ij} \delta u_j = b_i \quad (5.7)$$

avec :

$$\begin{cases} M_{ij} = \int [gradf(\vec{x}) \cdot \Psi_i(\vec{x})][gradf(\vec{x}) \cdot \Psi_j(\vec{x})] d\vec{x} \\ b_i = \int [gradf(\vec{x}) \cdot \Psi_i(\vec{x})][\tilde{g}(\vec{x}) - f(\vec{x})] d\vec{x} \end{cases} \quad (5.8)$$

La résolution de ce système d'équations permet d'estimer le champ de déplacements local. D'une part, on notera que, par définition, le champ de déplacements estimé aura la même régularité que les fonctions propres choisies. D'autre part, ce type d'algorithme présente l'avantage d'être très souple tant sur le choix des fonctions de type éléments finis que sur la géométrie du maillage.

### 5.1.4 Quelques mots sur les performances

Les méthodes de corrélation d'images que nous avons présentées permettent d'estimer des déplacements très fins de l'ordre de 1/10 à 1/100 de pixel [94]. Cependant, la résolution spatiale du champ de déplacements estimé dépend fortement du contraste, de la texture du milieu imagé et du bruit d'imagerie. En particulier, de manière similaire, la taille des sous-images (méthode locale) et la finesse du maillage (méthode globale) vont jouer un rôle clef. Un maillage fin (respectivement de petites sous-images) permet d'obtenir une bonne résolution spatiale du champ de déplacements mesuré mais au détriment d'une grande incertitude sur la valeur des déplacements. Inversement, un maillage large (respectivement de grandes sous-images) permet d'estimer le champ de déplacements avec une faible incertitude mais uniquement pour des variations spatiales relativement lentes. Ainsi, le choix de la taille des sous-images ou de la finesse du maillage est un compromis : il dépend de la qualité de l'image et de la résolution souhaitée.

## 5.2 Montage et méthode expérimentaux

### 5.2.1 Montage expérimental

Le montage d'OCT plein champ utilisé pour ces expériences est un montage classique basé sur un interféromètre de Linnik (que nous avons déjà présenté au chapitre 2). La caméra utilisée est une caméra CCD « Dalsa 1M60 ». Cette caméra possède  $1024 \times 1024$  *pixels* codés sur 12 *bits*, une fréquence d'acquisition de 50 *Hz* et une profondeur de puits de 150000 *photoélectrons*. La source utilisée est une lampe halogène « SCHOTT-KT 1500 » couplée à une illumination Köhler afin d'obtenir une illumination la plus homogène possible. Afin que son spectre corresponde à la réponse spectrale qui minimise la diffusion, l'illumination traverse un filtre passe haut à 610 nm et un filtre passe bas à 1000 nm qui évite l'échauffement de l'échantillon. Le spectre effectif est centré autour de 710 nm avec une largeur approximative de 150 nm. Ceci permet d'obtenir une résolution axiale d'environ 1  $\mu\text{m}$ . Comme décrit au chapitre 2, les objectifs utilisés sont deux objectifs identiques :  $10\times$  à immersion dans l'eau (de la société Olympus) avec une ouverture numérique de 0,3 fournissant une résolution latérale d'environ 1,4  $\mu\text{m}$ . De plus, nous avons développé un porte échantillon permettant la compression contrôlée (en déplacement) des échantillons sur une fenêtre de silice d'une épaisseur de 1 mm (la perturbation introduite par cette fenêtre de silice est par ailleurs compensée dans le bras de référence de l'interféromètre). La figure 5.2 représente un schéma du montage d'OCT plein champ utilisé.

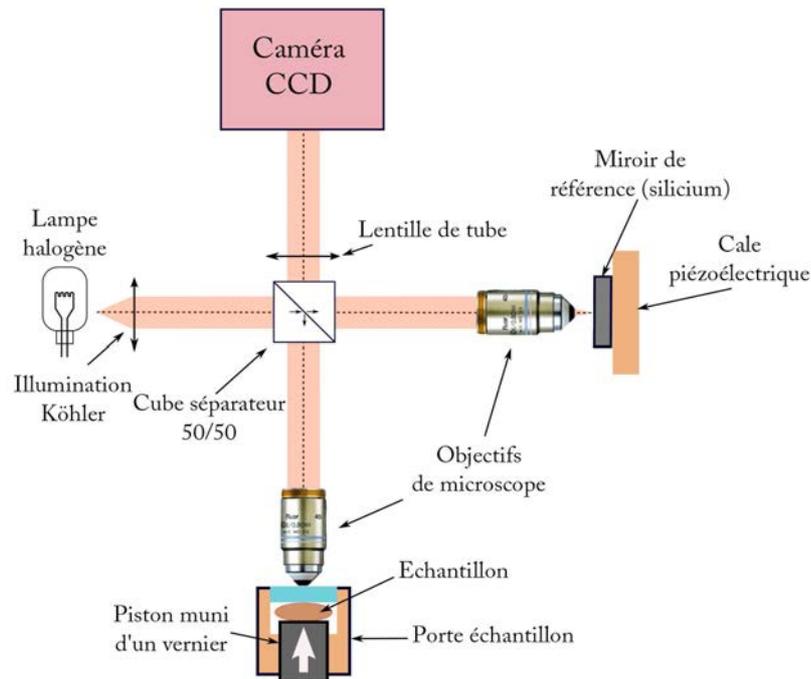
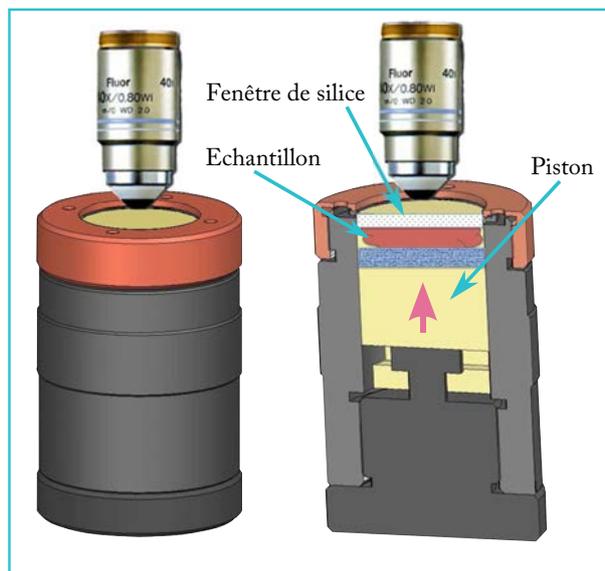


Figure 5.2 – Schéma du montage d'OCT utilisé pour cette étude.

Un équivalent du porte échantillon que nous avons utilisé en laboratoire a été développé par la société LLTech. Au cours de cette étude ceci nous a permis d'appliquer notre méthode au montage commercial *LightCT*<sup>TM</sup> de la société LLTech et nous avons réalisé des premières expériences en vue de diagnostic peropératoire avec les hôpitaux Tenon et Curie (Paris). La figure 5.3 présente le porte échantillon développé par la société LLTech.



**Figure 5.3** – Schéma du porte échantillon développé par la société LLTech.

### 5.2.2 Méthode expérimentale

Nous avons utilisé le montage expérimental décrit ci-dessus afin de faire l'acquisition des images 3D des échantillons avant et après compression axiale. A partir de ces deux images volumiques, deux algorithmes ont été employés : un algorithme de corrélation d'images locale 2D ainsi qu'un algorithme de corrélation d'images globale 3D. L'objectif est d'estimer le champ de déplacements local dans les échantillons observés.

#### Méthode locale 2D

Nous avons commencé par développer en *Matlab*<sup>TM</sup> un algorithme local de corrélation d'images 2D. Comme présenté dans la partie précédente, cet algorithme est basé sur la maximisation du coefficient de corrélation entre des sous-images. En pratique, l'estimation du champ de déplacements local se fait en deux étapes :

#### A : Choix des paramètres

- Choix de la taille des sous-images  $W$  ainsi que de l'espacement entre les sous-images de l'image de référence  $\delta w$  et de l'espacement entre celles de l'image déformée  $\delta w'$ .

- Choix du déplacement maximal  $d_{max}$  à considérer afin de restreindre les calculs de corrélation aux sous-images se trouvant à une distance inférieure à  $d_{max}$  de la sous-image considérée.

### B : Calcul de la corrélation

- Calcul du coefficient de corrélation entre chaque sous-image de l'image de référence et toutes les sous-images de l'image déformée présentes à une distance inférieure à  $d_{max}$ .
- Le déplacement du centre de chaque sous-image de l'image de référence est estimé via le maximum de corrélation trouvé. Afin d'améliorer l'estimation de la position du maximum de corrélation, une interpolation Lagrangienne est utilisée.

Cet algorithme est rapide et facile à mettre en œuvre mais il faut garder à l'esprit qu'une méthode 2D n'est pas adaptée à l'OCT plein champ. D'une part, bien que 2D, cette méthode nécessite l'acquisition d'images 3D. Afin d'obtenir une coupe dans la profondeur d'un échantillon, en OCT plein champ, nous devons faire l'acquisition de l'image plein champ de chaque profondeur. De nombreuses données sont enregistrées bien que peu d'entre elles soient utilisées avec la méthode 2D. D'autre part, l'image 2D utilisée est une coupe d'une image volumique. Les échantillons biologiques étant quasi-incompressibles, la compression axiale va engendrer des déplacements latéraux non négligeables et par conséquent l'apparition d'artefacts dus à la disparition de certaines structures entre l'image de référence et l'image comprimée. C'est pour ces deux raisons que nous nous sommes rapidement dirigés vers une méthode de corrélation 3D.

### Méthode globale 3D

L'algorithme de corrélation d'images globale 3D utilisé est un algorithme développé à l'ENS Cachan par Stéphane Roux et son équipe au laboratoire de mécanique LMT [95]. Dans cet algorithme, la base de fonctions propres de type éléments finis sont des hexaèdres à 8 nœuds linéaires par morceaux dans les directions  $x$ ,  $y$  et  $z$ , le maillage est cubique régulier et uniforme.

Afin de contrôler la qualité de l'estimation du champ de déplacements, un facteur de qualité  $R$  est défini : il s'exprime comme la racine carrée de la fonctionnelle  $\Gamma$  à la convergence, normalisée par la dynamique de l'image de référence tel que :

$$R = \frac{\|\tilde{g} - f\|}{\max(f) - \min(f)} \quad (5.9)$$

avec  $\max(f)$  et  $\min(f)$  respectivement le maximum et le minimum du niveau de gris dans l'image de référence. Lors de nos études, une estimation est considérée comme valide pour un facteur  $R$  inférieur à 2 %.

### Du déplacement à la déformation

Les méthodes décrites permettent d'estimer les déplacements locaux dans l'échantillon. A partir du champ de déplacements, nous pouvons calculer les composantes du tenseur

local de déformation comme la partie symétrique du gradient du champ de déplacements tel que :

$$\bar{\varepsilon} = \frac{1}{2}(\vec{grad}(\vec{u}) + {}^t\vec{grad}(\vec{u})) \quad (5.10)$$

soit,

$$\varepsilon_{ij} = \frac{1}{2}(\partial_i u_j + \partial_j u_i) \quad (5.11)$$

### De la déformation à l'information mécanique

Dans le cas que nous avons le plus étudié de la corrélation d'images 3D, l'estimation des déplacements selon les 3 composantes spatiales donne accès à la totalité du tenseur de déformation pour chaque pixel. A partir du tenseur de déformation locale, il est possible de déduire plusieurs grandeurs donnant accès à des informations sur les propriétés mécaniques du milieu étudié. Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à 3 grandeurs permettant d'ajouter de nouveaux contrastes mécaniques : l'amplitude de déformation, l'anisotropie mécanique et l'incompressibilité.

**L'amplitude de déformation** Afin de quantifier l'amplitude de déformation locale subie par les échantillons, nous avons utilisé la déformation équivalente de Von Mises, définie comme :

$$\forall \vec{x}, \varepsilon_{eq}(\vec{x}) = \sqrt{\frac{2}{3}tr(\bar{\varepsilon}(\vec{x})^2)} \quad (5.12)$$

Cette quantité est invariante selon la base dans laquelle est exprimé le tenseur des déformations. Elle est empruntée au domaine de la plasticité et permet d'apprécier quantitativement la déformation locale de l'échantillon dans le cas de milieux essentiellement incompressible comme les milieux biologiques étudiés ici.

**L'anisotropie mécanique** L'accès à la totalité du tenseur des déformations permet de trouver ses valeurs propres ainsi que ses vecteurs propres. Ceci présente de nombreux intérêts : la direction principale de la déformation et les valeurs relatives des différentes valeurs propres peuvent notamment permettre de détecter l'anisotropie mécanique. Il faut garder à l'esprit que bien que la compression de l'échantillon se fasse selon l'axe  $z$ , le champ des contraintes locales est complexe et inconnu (dans le cas d'échantillons hétérogènes). La déformation est directement liée à la contrainte. Il est difficile de quantifier l'anisotropie mais nous pouvons tout de même faire apparaître des contrastes d'anisotropie. Nous le verrons dans la partie expérimentale : on utilise la direction principale de déformation et l'anisotropie fractionnelle  $FA$ . Cette dernière nous permet de quantifier le poids des différentes valeurs propres entre elles. Elle est définie comme :

$$FA = \sqrt{\frac{3}{2} \frac{\sqrt{(\varepsilon_1 - \bar{\varepsilon})^2 + (\varepsilon_2 - \bar{\varepsilon})^2 + (\varepsilon_3 - \bar{\varepsilon})^2}}{\sqrt{\varepsilon_1^2 + \varepsilon_2^2 + \varepsilon_3^2}}} \quad (5.13)$$

avec  $\varepsilon_1$ ,  $\varepsilon_2$  et  $\varepsilon_3$  les valeurs absolues des trois valeurs propres du tenseur de déformation et  $\bar{\varepsilon}$  la moyenne des valeurs absolues des valeurs propres du tenseur des déformations. L'anisotropie fractionnelle est d'autant plus élevé que le matériau est

anisotrope, c'est-à-dire que l'écart entre les valeurs propres est grand.

**L'incompressibilité** L'incompressibilité locale est une grandeur facilement quantifiable à partir du tenseur des déformations locales. En effet, un milieu incompressible se traduit par la nullité de la trace du tenseur de déformation. Ainsi, afin de quantifier l'incompressibilité de nos échantillons nous avons défini la grandeur  $I_{comp}$  comme :

$$I_{comp} = \frac{Tr(\bar{\varepsilon})}{\varepsilon_{eq}} \quad (5.14)$$

Les tissus biologiques sont considérés comme des milieux quasi-incompressibles car constitués très majoritairement d'eau. Au cours de cette thèse, nous nous sommes posé la question du lien entre hydratation du tissu biologique et compressibilité.

### Corrélation d'images et imagerie cohérente

Bien que l'OCT plein champ utilise des sources d'illumination peu cohérentes afin de réaliser le sectionnement optique, l'OCT plein champ est une modalité d'imagerie cohérente. Sur les images d'OCT plein champ ce caractère cohérent est traduit par une granularité caractéristique. Cette granularité provient des différents chemins optiques possibles dans le volume de cohérence (environ  $2 \mu m^3$  dans notre cas). Dans les tissus biologiques *ex vivo*, cette figure granulaire n'est stable que quelques minutes et que pour de faibles déformations (inférieures à 1 %). Cette décorrélation de la figure granulaire est problématique dans notre cas. En effet, chaque acquisition d'une image volumique d'OCT plein champ prend environ 15 minutes (5 pour le système commercial de LLTech). Ce temps d'acquisition ne nous permet pas d'utiliser cette granularité comme une information supplémentaire. Entre l'image initiale et l'image déformée elle sera décorrélée. En outre, cette décorrélation va engendrer des artefacts de corrélation. Afin de limiter cet effet, les images sont filtrées avant d'effectuer les calculs de corrélation. Le filtre est Gaussien de 2 pixels d'extension spatiale. Pour le montage utilisée, où la taille des grains correspond environ à la taille d'un pixel, cela revient à moyenniser 4 grains dans le cas 2D et 8 grains dans le cas 3D.

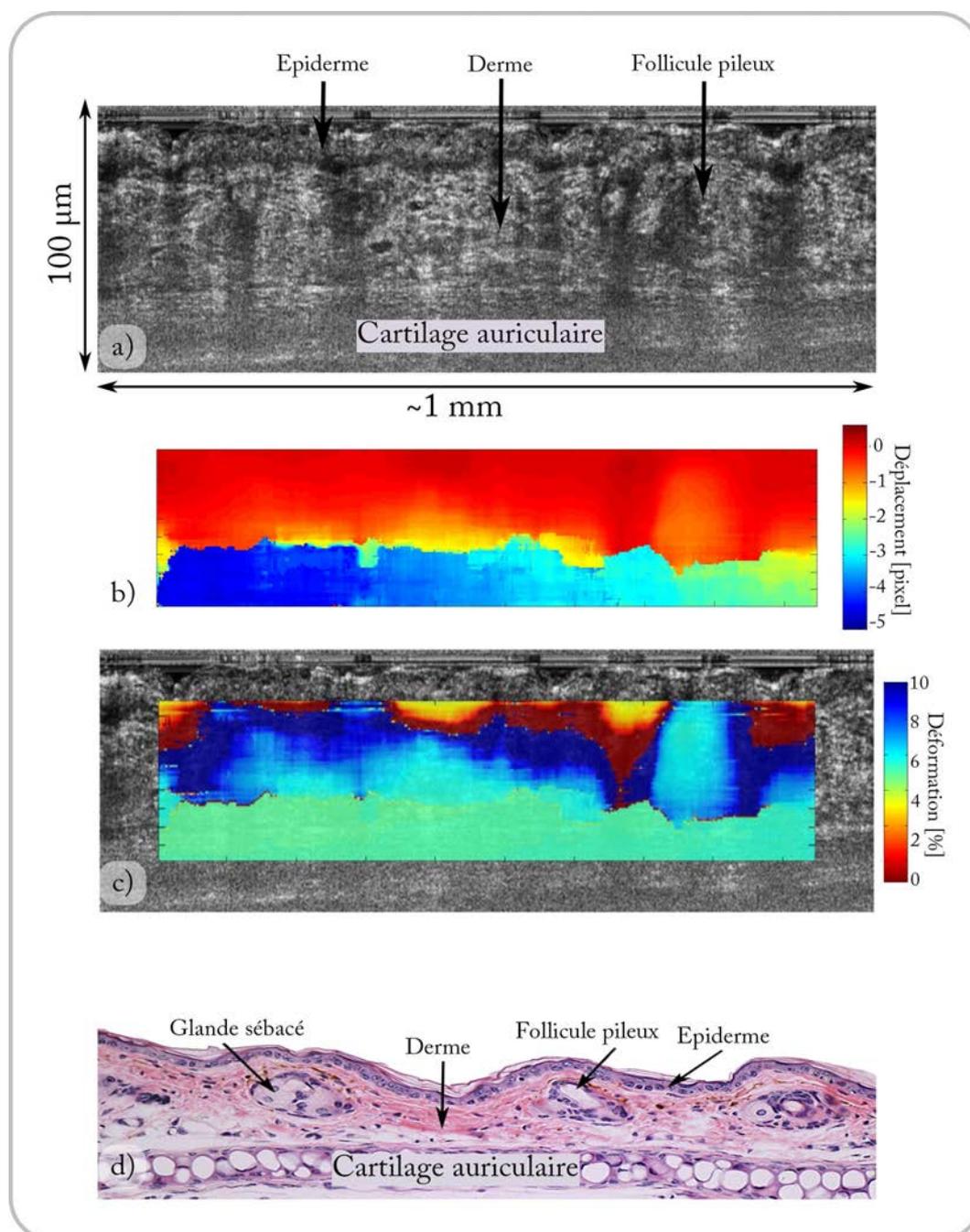
## 5.3 Résultats expérimentaux

### 5.3.1 Corrélation d'images 2D classique

La méthode 2D a permis d'obtenir les premiers résultats d'élastographie statique par OCT plein champ.

Les premières études menées ont été faites sur tissus *ex vivo* de souris récemment excisés. Les corrélations sont effectuées sur des coupes en profondeur des images volumiques d'OCT plein champ avant et après compression. Les déplacements latéraux créés lors de la compression ne permettent pas d'utiliser des tranches de 1 pixel de l'image volumique. En effet, même pour de faibles déformations (inférieures à 1 %) les pertes de structures dues aux déplacements latéraux induisent de nombreux artefacts. Afin de limiter cet effet,

une moyenne de 4 tranches adjacentes a été utilisée comme image. En réduisant fortement les artefacts, cette méthode a permis d'obtenir des résultats tels que ceux présentés figure 5.4.



**Figure 5.4** – Résultats obtenus avec la méthode de corrélation 2D sur un échantillon d'oreille de souris *ex vivo*. L'image a correspond à la coupe en profondeur de l'image volumique d'OCT plein champ de référence utilisée pour cette estimation du champ de déplacements. L'image b correspond au déplacement local selon l'axe  $z$  estimé pour des tailles de sous-images de  $16 \times 16$  pixels et une distance entre chaque sous-image de 1 pixel. L'image c est la superposition de l'image d'OCT plein champ et de la cartographie de l'élément du tenseur de déformation  $\varepsilon_{zz}$ . Enfin, l'image d est une coupe histologique d'une oreille de souris (ne correspondant pas à l'image d'OCT plein champ) [96].

La figure 5.4 présente les résultats obtenus sur une oreille de souris. La figure 5.4a est la coupe en profondeur de l'image volumique d'OCT plein champ de l'échantillon avant compression. Sur cette coupe d'OCT plein champ, on distingue bien l'épiderme, le derme et le cartilage. Plus difficilement, on distingue aussi à droite une forme ronde correspondant à un follicule pileux. La figure 5.4b représente le tracé des déplacements selon l'axe  $z$ . Ils ont été estimés à l'aide de l'algorithme de corrélation 2D pour des tailles de sous-images de  $16 \times 16$  pixels et une distance entre chaque centre des sous-images de 1 pixel (c'est-à-dire un recouvrement des sous-images d'environ 94 %). La figure 5.4c est le tracé de l'élément du tenseur de déformation  $\varepsilon_{zz}$  défini comme  $\varepsilon_{zz} = \frac{\partial u_z}{\partial z}$  avec  $u(z)$  le déplacement estimé selon l'axe  $z$ . Afin de calculer la dérivée du déplacement selon l'axe  $z$ , nous avons utilisé une méthode de régression linéaire glissante sur 5 pixels. Cela permet d'estimer la pente du déplacement selon l'axe  $z$  sans être trop sensible aux erreurs d'estimation à haute fréquence. La cartographie de la déformation  $\varepsilon_{zz}$  ainsi obtenue nous permet d'observer que l'épiderme se déforme très peu, le cartilage se déforme un peu plus et le derme, lui, se déforme beaucoup. La géométrie de l'oreille de souris étant structurée en couches successives 1D, on observe que l'épiderme est plus rigide que le cartilage, lui-même plus rigide que les tissus du derme. De plus, sur cette image, nous remarquons que le contraste de déformation permet non seulement de distinguer les différents types de tissus mais aussi de faire nettement apparaître une inclusion à droite de l'image. Celle-ci se déforme moins : il s'agit d'un follicule pileux difficilement observable sur l'image d'OCT plein champ.

Pour la première fois à notre connaissance, cette méthode de corrélation 2D a permis d'ajouter un contraste d'élastographie statique aux images d'OCT plein champ. Comme mentionné précédemment, une méthode 2D n'est pas très adaptée à l'OCT plein champ car il est nécessaire d'acquérir tout un volume d'images afin d'en extraire les tranches 2D. Nous nous sommes par conséquent dirigés vers une méthode 3D permettant d'exploiter au maximum les images d'OCT plein champ.

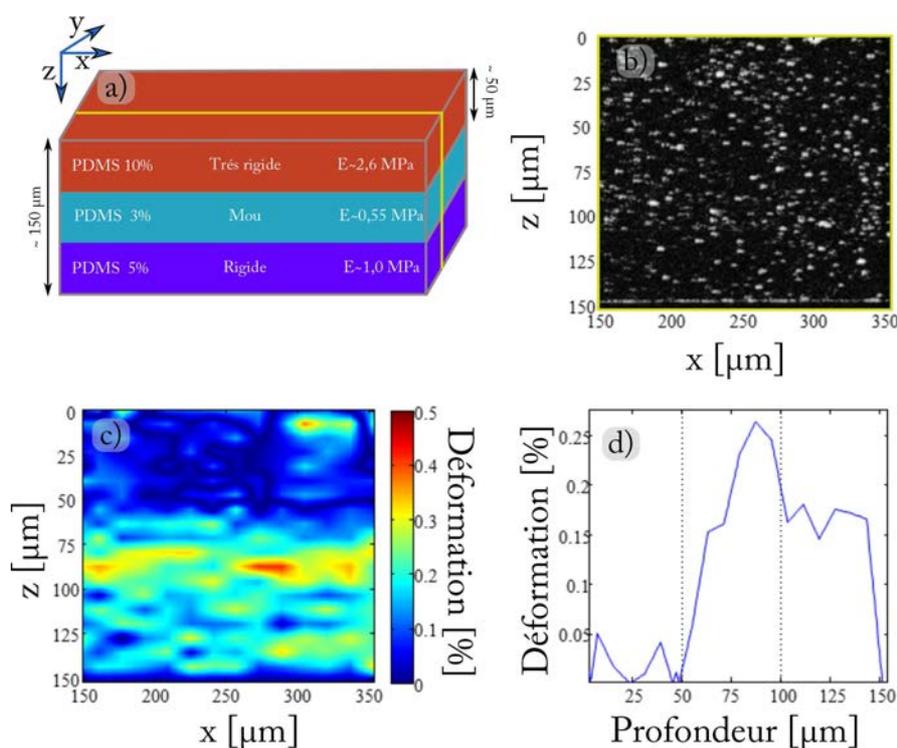
### 5.3.2 Corrélation d'images 3D basée sur une méthode d'éléments finis

#### Preuve de concept sur des échantillons polymères

##### Polydiméthylsiloxane

Dans un premier temps, la méthode a été testée sur des échantillons tests polymères optiquement homogènes et mécaniquement hétérogènes. Les échantillons testés sont des polymères de polydiméthylsiloxane (PDMS Sylgard 184) dans lesquels sont dispersés des particules d'oxyde de zinc (ZnO - 205532 Sigma-Aldrich). Les particules d'oxyde de zinc permettent de rendre les échantillons diffusants, de manière contrôlée. Le polydiméthylsiloxane contrôle la rigidité de l'échantillon (la rigidité dépend du taux de réticulation). La figure 5.5 présente les résultats pour un échantillon possédant une concentration en particules d'oxyde de zinc de  $0,2 \text{ mg/g}$  et constitué d'un empilement de 3 couches de polydiméthylsiloxane, de rigidité différente, déposées par centrifugation. La première couche est une couche de polydiméthylsiloxane réticulée à 10 % correspondant à un module de

Young d'environ  $2,6 \text{ MPa}$  [97]. La deuxième couche est réticulée à 3 % correspondant à un module de Young d'environ  $0,55 \text{ MPa}$  [97]. La dernière couche est réticulée à 5 % correspondant à un module de Young d'environ  $1,03 \text{ MPa}$  [97]. Les résultats obtenus pour cet échantillon sont présentés à la figure 5.5. La figure 5.5a donne une représentation de l'échantillon utilisé. Une coupe de l'image volumique d'OCT plein champ obtenue est présentée en figure 5.5b. La figure 5.5c présente la carte des déformations correspondant à l'image b, la déformation  $\varepsilon_{eq}$  est la déformation équivalente de Von Mises définie par l'équation 5.12. Enfin, la figure 5.5d représente le profil de la déformation mesurée en fonction de la profondeur et moyennée selon l'axe  $y$ .



**Figure 5.5** – Résultats obtenus avec la méthode de corrélation 3D sur un échantillon test de polydiméthylsiloxane. L'image a correspond à une représentation de l'échantillon utilisé constitué de 3 couches de polymères de rigidité différente. L'image b correspond à la coupe en profondeur de l'image volumique d'OCT plein champ de référence. L'image c correspond à la carte des déformations correspondant à l'image b. Enfin, l'image d est le profil de la déformation mesurée en fonction de la profondeur et moyennée selon l'axe  $y$ .  $W = 16 \text{ voxels}$  et  $R = 0,1 \%$ .

Avec cette géométrie en couches 1D de l'échantillon, on peut à la fois distinguer clairement les trois couches sur la carte des déformations (qui ne peuvent pas être distinguées sur l'image d'OCT plein champ) mais aussi, avoir accès à une valeur relative de la rigidité. Le rapport entre la déformation des deuxième et troisième couches est égal à 1,53. Cette valeur se rapproche du rapport des modules de Young égal à 1,87 prévu par le niveau de réticulation. Etant beaucoup plus rigide que ses voisines, la première couche subit une très faible déformation, difficilement mesurable.

Pour calculer cette carte de déformation, nous avons utilisé des fonctions de base d'extension spatiale  $W$  de 16 voxels. Cette taille a été choisie parce que 16 voxels est approximativement la distance entre deux particules d'oxyde de zinc et qu'entre les particules d'oxyde de zinc le signal d'OCT plein champ n'est pas suffisant pour pouvoir effectuer le calcul de corrélation. Le résidu  $R$  défini par l'équation 5.9 est de 0,1 %, ce qui est une valeur extrêmement faible.

### Alcool polyvinylique : étude de l'anisotropie

En collaboration avec Simon Chatelin, post-doctorant à l'institut Langevin (Paris), nous avons pu tester et valider la méthode de corrélation d'images 3D sur des gels d'alcool polyvinylique mécaniquement anisotropes.

L'alcool polyvinylique est un polymère qui réticule via des cycles de congélations successives. En l'absence de contraintes, lors des différents cycles de congélation, le polymère possède des propriétés mécaniques isotropes. Cependant, l'application d'une contrainte mécanique lors des cycles de congélation orientera les fibres de polymère et rendra les propriétés mécaniques du gel anisotropes [98]<sup>1</sup>.

La figure 5.6 présente les résultats obtenus pour deux gels d'alcool polyvinylique : l'un aux propriétés mécaniques isotropes, l'autre anisotropes. Les deux gels ont été préparés à partir d'une solution d'alcool polyvinylique à 5 % de la société Sigma-Aldrich™. Pour polymériser, ces gels ont subi 5 cycles de congélation de 12h. De plus, afin de rendre mécaniquement anisotrope l'un des deux gels, celui-ci est étiré durant les 3 derniers cycles de congélation. Les figures 5.6a-b sont les images d'OCT plein champ des deux gels, respectivement isotrope et anisotrope. On remarque qu'il est difficile de différencier les deux gels sur les images d'OCT plein champ (une certaine orientation des fibres pour l'échantillon anisotrope peut être remarquée). Sur les figures 5.6c-d, nous avons tracé l'angle que fait la projection dans le plan  $(x, y)$  du vecteur de déformation principale par rapport à l'axe  $x$ . On observe clairement que pour l'échantillon isotrope (image c) il existe une grande variété de directions de déformation alors que pour l'échantillon anisotrope (image d) une direction prédomine. Pour ces échantillons, nous avons tracé l'anisotropie fractionnelle en figures 5.6e-f, respectivement pour l'échantillon isotrope et anisotrope. Comme attendu, l'échantillon anisotrope possède une anisotropie fractionnelle plus élevée que l'échantillon isotrope ; ce qui rend bien compte d'une anisotropie plus forte.

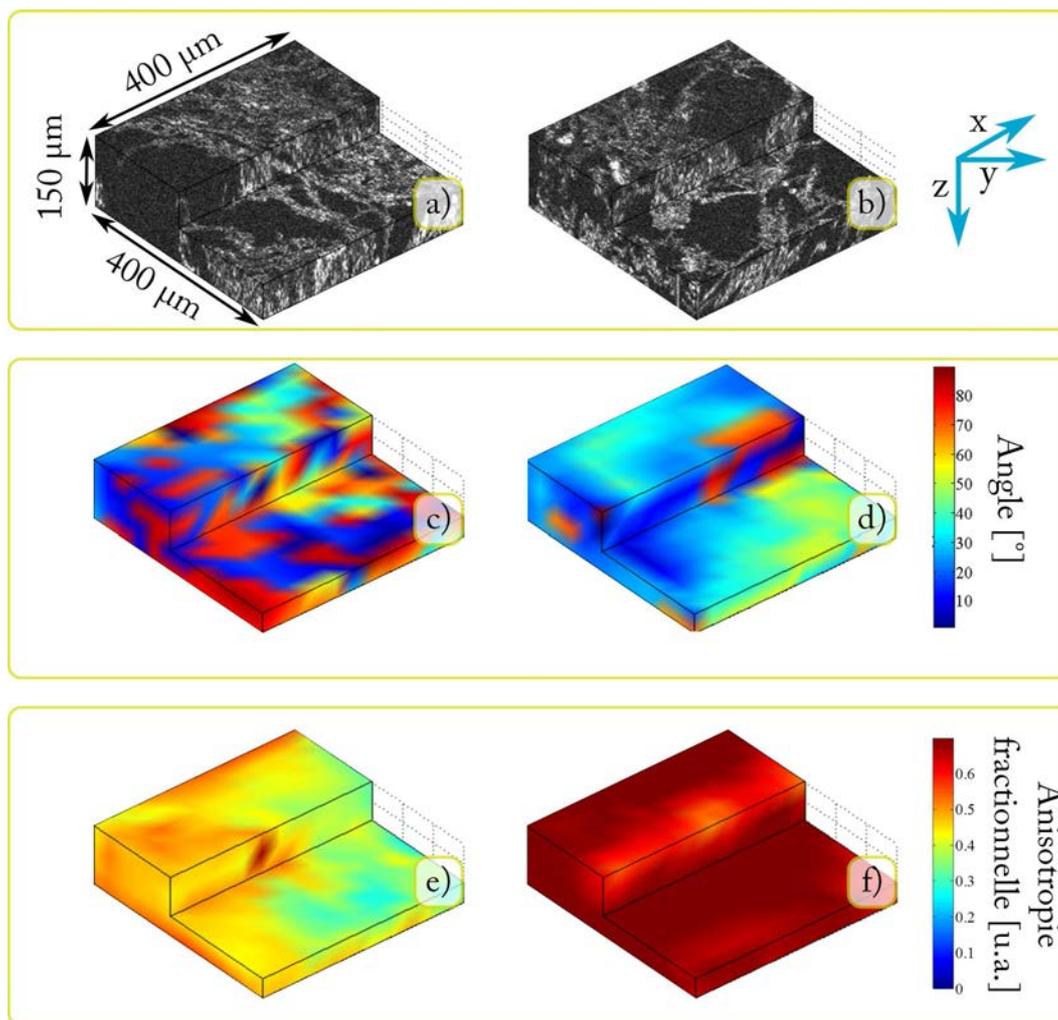
Pour calculer la carte de déformation, nous avons utilisé des fonctions de base d'extension spatiale  $W$  de 32 voxels. Cette taille relativement grande a été choisie afin de limiter les artefacts dus aux zones sans signal d'OCT plein champ où l'algorithme peine à converger. Le résidu  $R$  défini par l'équation 5.9 est de 0,3 %, ce qui est une valeur très faible.

### Résultats sur tissus biologiques *ex vivo*

L'objectif de cette étude est de faciliter le diagnostic en complétant les images d'OCT plein champ. Nous présentons ici les résultats préliminaires obtenus sur tissus biologiques

---

1. Plus de détails sur la fabrication de ce type de polymère sont donnés à la référence [99].



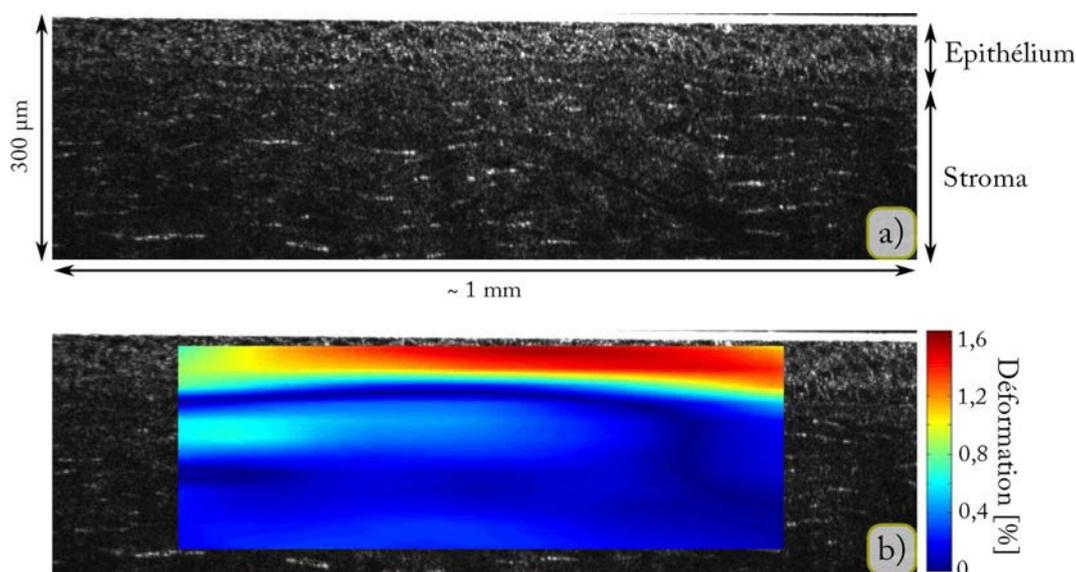
**Figure 5.6** – Résultats obtenus avec la méthode de corrélation 3D sur un échantillon test d'alcool polyvinylique. Les images a-b sont les images d'OCT plein champ des deux gels d'alcool polyvinylique, respectivement le gel isotrope et anisotrope. Les images c-d correspondent aux tracés de l'angle que fait la projection dans le plan  $(x, y)$  du vecteur de déformation principale par rapport à l'axe  $x$ . Enfin, les images e-f correspondent au tracé de l'anisotropie fractionnelle de respectivement l'échantillon isotrope et anisotrope.  $W = 32 \text{ voxels}$  et  $R = 0,3 \%$ .

*ex vivo* récemment excisés. Le premier échantillon est une cornée porcine, le deuxième un tissu mammaire humain et le troisième un cœur de rat.

### Cornée porcine

Les cornées humaines et animales ont déjà été étudiées en OCT plein champ [100]. En collaboration avec Morgane Bauer, doctorante au LMT à l'ENS Cachan, la méthode a été testée sur une cornée porcine. Les tissus cornéens se prêtant très bien à la corrélation d'images : les propriétés mécaniques entre l'épithélium et le stroma sont très différentes, la géométrie est simple et la texture de l'image d'OCT plein champ présente de nombreux détails qui permettent à l'algorithme de converger facilement. De plus, la mesure et la compréhension des propriétés mécaniques de la cornée sont des enjeux importants : elles

pourraient, par exemple, aider au dépistage de certaines pathologies comme le glaucome. Le résultat présenté ici a pour but de mettre en évidence que la méthode de corrélation 3D fonctionne. Elle permet de détecter la différence de contraste mécanique entre l'épithélium et le stroma. La figure 5.7 présente les résultats obtenus. La figure 5.7a est une coupe en profondeur de l'image 3D d'OCT plein champ. On remarque que le contraste morphologique de l'OCT plein champ permet de bien distinguer l'épithélium du stroma : l'épithélium est constitué de cellules assez rondes alors que le stroma est constitué de feuillets de collagène. Sur la figure 5.7b, la tranche correspondante de la carte 3D de l'amplitude de déformation  $\varepsilon_{eq}$  a été superposée à l'image d'OCT plein champ. Sur cette image, on observe clairement que les deux couches présentent des propriétés mécaniques différentes. L'épithélium se déforme environ trois fois plus que le stroma.



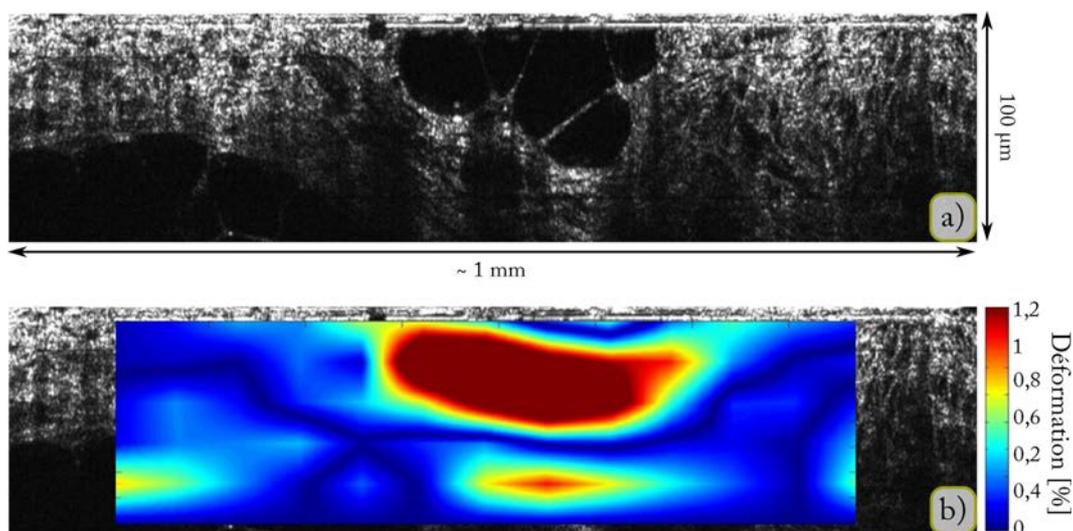
**Figure 5.7** – Résultats obtenus avec la méthode de corrélation 3D sur un échantillon de cornée porcine *ex vivo*. L'image a est une coupe en profondeur de l'image 3D d'OCT plein champ. L'image b est un tracé de la tranche de la carte 3D de l'amplitude de déformation  $\varepsilon_{eq}$  correspondant à la coupe en profondeur de l'image a.  $W = 8 \text{ voxels}$  et  $R = 0,8 \%$ .

Pour calculer la carte de déformation, nous avons utilisé des fonctions de base d'extension spatiale  $W$  de 8 voxels. Le résidu  $R$  défini par l'équation 5.9 est de 0,8 %, ce qui est une valeur encore une fois remarquablement faible.

### Tissu mammaire humain

En partenariat avec l'Institut Langevin (Paris), la société LLTech a récemment travaillé sur des tissus mammaires *ex vivo*. Lors de ces travaux, une bonne correspondance entre les lames d'histologie et les images d'OCT plein champ ont notamment été mis en évidence [43]. Ces études ont montré un très bon accord entre les diagnostics basés sur l'histopathologie et les images d'OCT plein champ acquises uniquement avec un contraste morphologique (avec une sensibilité de 93 % et une spécificité de 75 %). Notre objectif est d'améliorer la sensibilité et la spécificité en ajoutant, en plus de l'information morphologique, des informations mécaniques. Nous présentons ici les résultats préliminaires obtenus

à l'hôpital Tenon (Paris) sur des tissus mammaires humains *ex vivo*. La figure 5.8 présente un des résultats obtenus. La figure 5.8a est une coupe en profondeur de l'image 3D d'OCT plein champ. On remarque que le contraste morphologique de l'OCT plein champ permet de bien distinguer les tissus adipeux (grosses cellules noires) des tissus fibreux adjacents. Sur la figure 5.8b, la tranche correspondante de la carte 3D de l'amplitude de déformation  $\varepsilon_{eq}$  a été superposée à l'image d'OCT plein champ. Sur cette image, on observe clairement que les cellules adipeuses se déforment bien plus que les tissus fibreux.

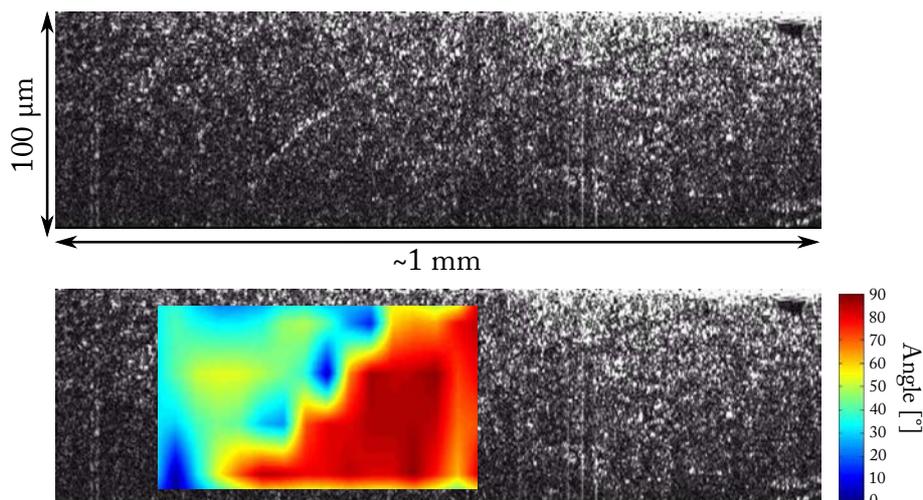


**Figure 5.8** – Résultats obtenus avec la méthode de corrélation 3D sur un échantillon de tissu mammaire humain *ex vivo*. L'image a est une coupe en profondeur de l'image 3D d'OCT plein champ. L'image b est un tracé de la tranche de la carte 3D de l'amplitude de déformation  $\varepsilon_{eq}$  correspondant à la coupe en profondeur de l'image a.  $W = 32 \text{ voxels}$  et  $R = 1,1 \%$ .

Pour calculer la carte de déformation, nous avons utilisé des fonctions de base d'extension spatiale  $W$  de 32 voxels. Cette taille relativement grande a été choisie afin de limiter les artefacts due aux zones sans signal d'OCT plein champ où l'algorithme peine à converger (notamment à l'intérieur des adipocytes). Le résidu  $R$  défini par l'équation 5.9 est de 1,1 %.

### Cœur de rat

La méthode de détection d'anisotropie mécanique a aussi été testée sur un échantillon de cœur de rat *ex vivo*. En effet, le cœur est constitué de couches successives présentant des orientations de fibres musculaires différentes [101, 102]. Cet échantillon présente ainsi une forte anisotropie mécanique. La figure 5.9 regroupe les résultats obtenus sur cet échantillon. La figure 5.9a est une coupe en profondeur de l'image 3D d'OCT plein champ à la jonction entre deux couches musculaires de différentes orientations. Sur l'image d'OCT plein champ, on remarque qu'il est difficile de faire la différence entre les deux couches. Par contre, en traçant l'angle que fait la projection du vecteur de déformation principale dans le plan  $(x, y)$  par rapport à l'axe  $x$  (voir figure 5.9b), il est possible de distinguer les deux couches. Cet angle est en effet indirectement relié à l'orientation des fibres musculaires.



**Figure 5.9** – Résultats obtenus avec la méthode de corrélation 3D sur un échantillon de cœur de rat *ex vivo*. L'image a est une coupe en profondeur de l'image 3D d'OCT plein champ. L'image b correspond aux tracés de l'angle que fait la projection du vecteur de déformation principale dans le plan  $(x, y)$ , par rapport à l'axe  $x$ , pour la coupe en profondeur de l'image a.  $W = 32 \text{ voxels}$  et  $R = 1,05 \%$ .

Pour calculer la carte de déformation, nous avons utilisé des fonctions de base d'extension spatiale  $W$  de 32 voxels. Le résidu  $R$  défini par l'équation 5.9 est de 1,05 %.

### 5.3.3 Vers une amélioration du montage d'élastographie statique

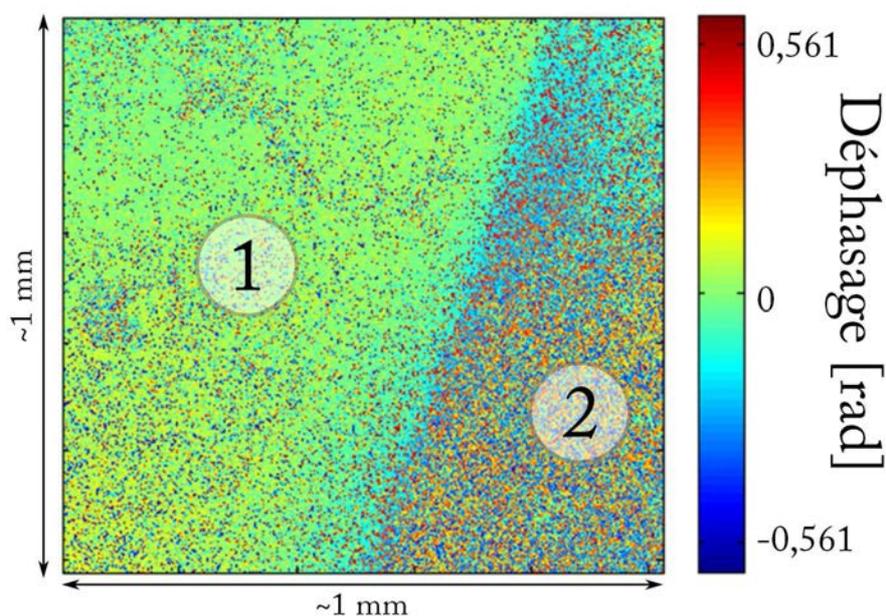
Au cours de cette thèse nous avons développé un montage d'élastographie statique par OCT plein champ. Il a permis de cartographier avec succès le champ de déformation locale dans les échantillons étudiés. Cependant, comme nous l'avons vu au chapitre 4, le contraste de déformation ne reflète la rigidité du matériau que dans certain cas de géométrie régulière (comme par exemple la cornée à l'échelle de la dizaine de micromètre). Dans la majorité des cas, les échantillons biologiques possèdent des géométries complexes pour lesquelles il n'est pas possible d'établir, *a priori*, de lien clair entre la déformation locale et la rigidité locale.

Afin d'améliorer notre montage d'élastographie statique nous étudions actuellement deux approches pour relier la déformation et la rigidité. La première approche consiste à résoudre un problème inverse permettant d'estimer la rigidité relative dans le tissu à partir de la cartographie des déformations. Dans cette direction, nous collaborons avec l'équipe du professeur H. Hammari du département de mathématiques appliquées (DMA) de l'ENS Ulm (Paris) sur l'estimation du module de cisaillement à partir des estimations de déformation locale [103]. Les premiers résultats de simulation semblent très prometteurs bien que les temps de calculs en 3D soient importants.

En parallèle à ces travaux, nous avons développé un capteur de force locale basé sur une couche fine de polymère déposée sur la lame de silice contre laquelle l'échantillon est comprimé. Les propriétés de cette couche polymère étant connues, sa déformation donne

directement accès à la contrainte locale au travers de l'équation 4.1. L'utilisation d'un capteur de force locale en surface présente de multiples avantages. L'objectif premier de ce capteur de force était de nous permettre de différencier facilement le cas de deux solides juxtaposés comme dans le cas présenté figure 4.2. En effet, lors des études que nous avons menées aux hôpitaux Tenon et Curie, nous avons souvent rencontré cette configuration, notamment dans le cas des micro-biopsies<sup>2</sup>. De plus, dans le cas d'un milieu 1D, comme la cornée, la connaissance de la contrainte en surface devrait permettre une détermination quantitative du module élastique.

En pratique, nous avons utilisé une couche de  $100\ \mu\text{m}$  d'ecoflex<sup>TM</sup> déposée par centrifugation. Afin d'estimer le déplacement de la surface en contact avec l'échantillon, nous nous plaçons dans le cas de petits déplacements (inférieurs à la longueur d'onde centrale de l'illumination) et nous utilisons la différence de phase du signal avant et après la compression. Cette différence nous donne accès directement au déplacement de la surface avec une précision d'une dizaine de nanomètres. Connaissant l'épaisseur et les propriétés mécaniques de la couche polymère, on peut estimer la contrainte locale. La figure 5.10 présente les résultats préliminaires obtenues en utilisant comme échantillon deux polydiméthylsiloxane juxtaposés réticulés respectivement à 3 et 5%. La différence de phase du signal OCT plein champ permet d'accéder au déplacement local de la surface et nous permet de différencier les deux polymères.



**Figure 5.10** – Déphasage mesuré à l'interface entre la couche de  $100\ \mu\text{m}$  d'épaisseur d'ecoflex et l'échantillon constitué de deux polydiméthylsiloxane juxtaposés réticulés à 3 et 5% correspondant respectivement à la zone 1 et 2 de l'image.

Ces deux approches sont prometteuses. Elles devraient permettre d'améliorer et de

2. Les micro-biopsies sont des prélèvements cylindriques d'environ  $1\ \text{mm}$  de diamètre et d'environ  $1\ \text{cm}$  de longueur, souvent réalisés à l'interface entre la tumeur et le tissu sain (souvent rigide / mou).

simplifier les résultats que nous pouvons obtenir en élastographie statique par OCT plein champ.

## Conclusion et discussions

Les résultats que nous avons obtenus dans ce chapitre montrent que nous sommes capables de fournir à partir d'images d'OCT plein champ une cartographie précise des déplacements dans des tissus biologiques à l'échelle du micromètre avec de très bons résidus. A partir de cette cartographie des déplacements nous calculons les tenseurs des déformations locales qui nous permettent d'accéder à des paramètres reflétant les propriétés mécaniques des échantillons comme la déformation locale, l'anisotropie mécanique ou la compressibilité. Cependant, l'absence de la connaissance de la contrainte locale dans l'échantillon rend cette méthode non quantitative. Mais bien que non quantitative, l'ajout du contraste de déformation pourrait aider au diagnostic. La prochaine étape de cette étude sera de déterminer si effectivement ce contraste est suffisant.

En parallèle, le développement du capteur de force basé sur une couche polymère aux propriétés mécanique contrôlées et le développement d'une résolution de problème inverse afin d'accéder directement aux modules élastique (relatif) devrait permettre de grandement améliorer cette technique et son potentiel d'aide au diagnostic médical. De plus, cette technique d'élastographie statique devrait en théorie facilement s'adapter au montage d'OCT plein champ endoscopique développé au laboratoire durant la thèse de A. Latrive [104]. Les premiers résultats obtenue avec cette endoscope sur des tissus *ex vivo* s'étant avérés très encourageant [105].

---

Elastographie quasi-statique par modulation des interférences  
locales

---

**Table des matières**

---

6.1	Mesure de déplacements par interférométrie LASER homodyne . . . . .	<b>84</b>
6.1.1	Principe de l'interférométrie homodyne . . . . .	85
6.1.2	Mesure de petits déplacements . . . . .	86
6.1.3	Mesure de déplacements quelconques . . . . .	88
6.1.4	Quelques mots sur l'interférométrie hétérodyne . . . . .	89
6.2	Mesure de déplacement par OCT plein champ . . . . .	<b>90</b>
6.2.1	Problématique . . . . .	90
6.2.2	Solutions proposées . . . . .	92
6.2.3	Simulations numériques et résultats expérimentaux . . . . .	97
6.3	Application à l'élastographie . . . . .	<b>104</b>
6.3.1	Résultats sur échantillons fins : déformation globale . . . . .	105
6.3.2	Résultats avec une modulation magnétique <i>in situ</i> : déformation locale . . . . .	106

---

Dans la méthode précédente de corrélation d'images digitales nous avons appliqué les transformations morphologiques induites aux images d'OCT plein champ par l'application d'une contrainte afin d'estimer les déplacements locaux qui ont lieu dans les échantillons étudiés avec une sensibilité de l'ordre du centième de pixel (pixel/100) et une résolution spatiale d'une dizaine de  $\mu m$ .

Dans ce chapitre, nous allons présenter des méthodes permettant de réaliser une cartographie 2D des déplacements locaux avec la résolution spatiale donnée par l'OCT plein champ. Contrairement à la méthode décrite dans le chapitre précédent où l'estimation des déplacements était réalisée à partir de la morphologie de l'image, ici nous proposons des méthodes qui exploitent la particularité des techniques d'OCT. Ces techniques sont des techniques d'imagerie **cohérente** avec lesquelles nous avons accès à la phase du signal en volume, quantité physique permettant la mesure de déplacements.

Ainsi, nous présenterons tout d'abord brièvement les méthodes classiques de mesure de déplacements par interférométrie LASER homodyne. Ensuite, nous présenterons 5 méthodes que nous avons étudiées au cours de cette thèse afin de réaliser une imagerie plein champ des déplacements locaux. Et enfin, nous verrons de quelle manière nous avons utilisé deux de ces méthodes afin d'accéder à des propriétés mécaniques quasi-statiques dans les milieux diffusant.

## 6.1 Mesure de déplacements par interférométrie LASER homodyne

La détection cohérente de déplacements est une technique très utilisée et bien connue dans les domaines de la métrologie et du contrôle non destructif. Elle offre une mesure rapide, sans contact et à distance de la vibration d'un objet. Elle permet notamment la détection d'onde acoustique et la calibration de transducteur.

Ces méthodes interférométriques ont pour but de mesurer les déplacements mécaniques d'une surface. Il s'agit de mesurer la variation de phase optique induite par la modulation du chemin optique due au déplacement de la surface. En effet, une onde optique se réfléchissant en incidence normale sur une surface se déplaçant d'une quantité  $u$  qui varie au cours du temps voit sa phase  $\phi$  modifiée d'une quantité  $\Delta\phi$  tel que :

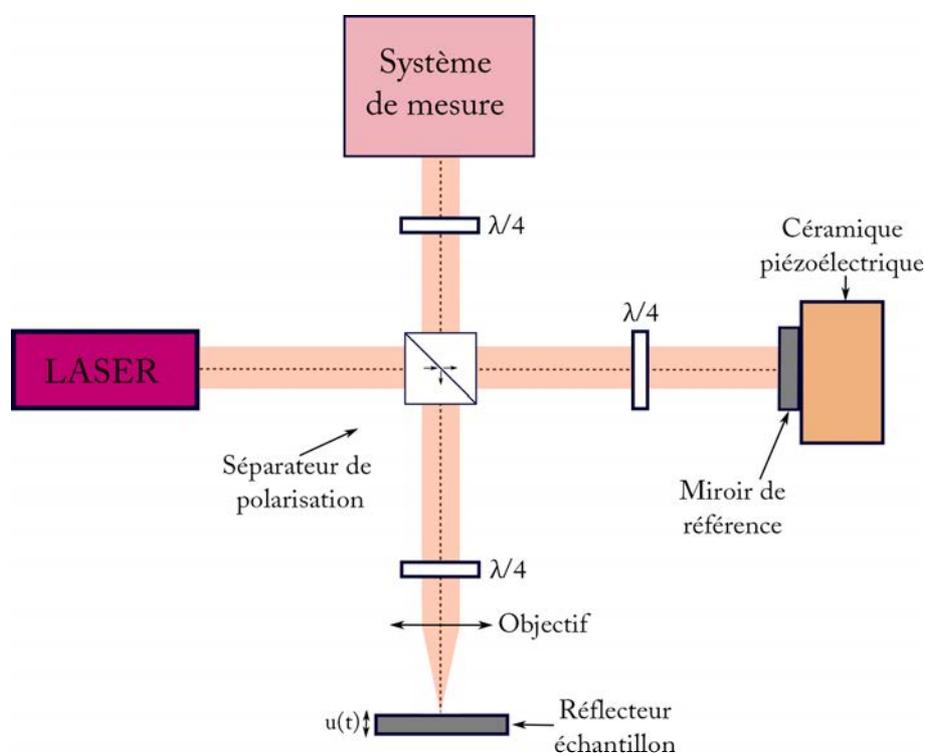
$$\Delta\phi = 2.k.u(t) \tag{6.1}$$

avec  $k$  le nombre d'onde tel que  $k = \frac{2\pi.n}{\lambda_0}$  avec  $\lambda_0$  la longueur d'onde dans le vide.

Afin de mesurer ce déphasage induit on trouve principalement dans la littérature 3 familles de méthodes interférométriques. Elles ont pour but de transformer cette modulation de phase inexploitable directement en une modulation d'intensité du faisceau que l'on pourra mesurer avec un détecteur : les méthodes homodynes, hétérodynes et de vélocimétrie doppler [106]. Dans ce chapitre, nous n'introduisons que la première méthode puisque les autres sont difficilement adaptables à l'imagerie d'OCT plein champ.

### 6.1.1 Principe de l'interférométrie homodyne

Le principe de la détection homodyne est d'avoir accès, grâce à un interféromètre (le plus souvent de type Michelson), à la phase de l'onde lumineuse et ainsi de pouvoir mesurer les variations de phases induites par le déplacement de l'objet observé.



**Figure 6.1** – Schéma de principe d'un montage classique de sonde homodyne

La figure 6.1 représente un schéma de principe d'un montage classique de sonde homodyne. Ce montage correspond à un montage d'interférence à deux ondes entre un faisceau signal d'amplitude  $E_s$  et un faisceau de référence  $E_r$  tel que :

$$\vec{E}_s = a_s \cdot e^{i(\Delta\phi + \phi_s)} e^{i\Omega t} (\vec{e}_x + i\vec{e}_y) \quad (6.2)$$

$$\vec{E}_r = a_r \cdot e^{i\phi_r} e^{i\Omega t} (\vec{e}_x - i\vec{e}_y) \quad (6.3)$$

avec  $\Omega$  la fréquence angulaire et  $\vec{e}_x$  et  $\vec{e}_y$  deux vecteurs de base orthonormés normaux à l'axe optique qui nous permettent de formaliser la polarisation circulaire gauche et droite de respectivement  $\vec{E}_s$  et  $\vec{E}_r$ .

Dans le cas où le système de mesure est un polariseur (suivant l'axe  $\vec{e}_x$ ) suivi d'un photorécepteur, alors l'intensité du courant délivré par ce photorécepteur  $I$  peut s'écrire comme :

$$I = S|\vec{E}_s \cdot \vec{e}_x + \vec{E}_r \cdot \vec{e}_x|^2 \quad (6.4)$$

soit

$$I = I_0 + \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \quad (6.5)$$

avec  $S$  le facteur de réponse du photodétecteur,  $I_0 = S(a_s^2 + a_r^2)$  et  $\alpha = 2 \cdot S \cdot a_s \cdot a_r$

Ainsi, la modulation de la différence de marche par le déplacement de la surface de l'objet se traduit par une modulation de la phase du cosinus et donc par une modulation de l'intensité reçue par le photorécepteur qui rend la détection du déplacement possible.

Afin de mesurer le déplacement  $u(t)$  plusieurs méthodes sont possibles à partir de ce montage. Selon la résolution que l'on recherche et le type de déplacement que l'on souhaite observer on peut opter pour un montage avec 1, 2 ou 4 photorécepteurs.

### 6.1.2 Mesure de petits déplacements

Dans le cas de petits déplacements où  $u(t) \ll 2k$  l'équation 6.5 peut être développée au deuxième ordre de telle manière que l'équation 6.5 devienne :

$$I = I_0 + \alpha \cdot \cos(\phi_s - \phi_r) - \alpha \cdot \cos(\phi_s - \phi_r) \cdot \frac{(2k \cdot u(t))^2}{2} - \alpha \cdot \sin(\phi_s - \phi_r) \cdot 2k \cdot u(t) \quad (6.6)$$

#### Méthode utilisant 1 photorécepteur

Cette méthode est la plus facile à mettre en œuvre. Le principe est de sélectionner les termes de l'équation 6.6 qui varient en fonction du déplacement par simple filtrage passe haut du signal temporel. Ainsi, l'équation 6.6 après filtrage devient :

$$I = \alpha \cdot \cos(\phi_s - \phi_r) \cdot \frac{(2k \cdot u(t))^2}{2} + \alpha \cdot \sin(\phi_s - \phi_r) \cdot 2k \cdot u(t) \quad (6.7)$$

A l'aide de la céramique piézoélectrique sur laquelle est fixé le miroir de référence, on peut contrôler la différence de phase  $\phi_s - \phi_r$  entre les deux bras de l'interféromètre. Typiquement, afin d'avoir une sensibilité maximale, cette différence de phase est choisie et asservie sur une zone linéaire du cosinus soit égale à  $\frac{\pi}{2} + 2n\pi$  avec  $n \in \mathbb{Z}$ . Ainsi, l'équation 6.7 devient :

$$I = \alpha \cdot 2k \cdot u(t) \quad (6.8)$$

Pour de petits déplacements nous pouvons de cette façon avoir accès à une mesure directe du déplacement d'un réflecteur.

- Avantages

- Cette méthode est facile à mettre en œuvre et elle permet une mesure directe de petits déplacements avec une résolution de typiquement quelques nanomètres.
- Cette méthode ne nécessite qu'un unique photorécepteur.

- Inconvénients

- Le rapport signal sur bruit est dominé par les fluctuations de puissance de la source LASER utilisée. Ces fluctuations limitent typiquement la sensibilité de ce type de montage à quelques nanomètres.
- Cette méthode ne convient qu'à la mesure de petits déplacements (inférieurs à  $\frac{\lambda}{8}$ ).
- Cette méthode nécessite une stabilisation et un asservissement de la différence de marche par une céramique piézoélectrique dans le bras de référence afin que la condition  $|\phi_s - \phi_r| = \frac{\pi}{2}$  reste valable au cours de l'acquisition du signal.

### Méthode utilisant 2 photorécepteurs

Cette méthode est semblable à la première méthode avec un système de détection modifié. La figure 6.2 montre le schéma de principe du système de détection utilisé pour cette méthode. La modification principale est qu'à l'aide d'un second photorécepteur on mesure simultanément le signal interférométrique issu de la polarisation selon  $e_x$  et selon  $e_y$  grâce à un cube séparateur de polarisation.

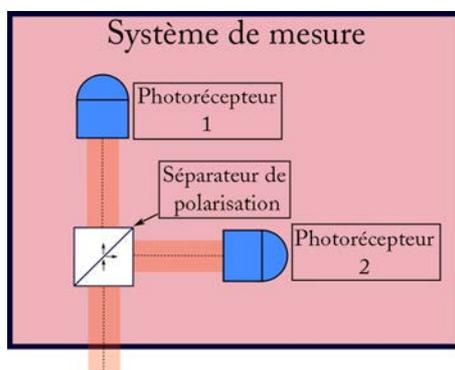


Figure 6.2 – Système de mesure à deux photorécepteurs

En supposant que les facteurs de réponse des photodétecteurs soient égaux, les courants  $I_1$  et  $I_2$  issus des deux photorécepteurs peuvent s'écrire comme :

$$\begin{cases} I_1 = I_0 + \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \\ I_2 = I_0 - \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \end{cases} \quad (6.9)$$

avec  $S$  le facteur de réponse des photodétecteurs,  $I_0 = S(a_s^2 + a_r^2)$  et  $\alpha = 2 \cdot S \cdot a_s \cdot a_r$ . En asservissant la différence de phase  $|\phi_s - \phi_r|$  à  $\frac{\pi}{2}$  cette équation devient :

$$\begin{cases} I_1 = I_0 + \alpha \cdot \sin(2k \cdot u(t)) \\ I_2 = I_0 - \alpha \cdot \sin(2k \cdot u(t)) \end{cases} \quad (6.10)$$

Dans le cas où  $u(t) \ll 2k$ , en développant comme pour la précédente méthode, on obtient :

$$I_2 - I_1 = 4\alpha.k.u(t) \quad (6.11)$$

Ainsi, comme la précédente, cette méthode, donne directement accès à une mesure de  $u(t)$  tout en s'affranchissant des fluctuations de puissance de la source LASER.

- **Avantages**

- Résolution sub-nanométrique des petit déplacements.
- Typiquement cette méthode est limitée par le bruit de photons.

- **Inconvénients**

- Cette méthode nécessite une stabilisation et un asservissement de la différence de marche par une céramique piézoélectrique dans le bras de référence afin que la condition  $|\phi_s - \phi_r| = \frac{\pi}{2}$  reste valable au cours de l'acquisition du signal.
- Nécessite 2 photorécepteurs.

### 6.1.3 Mesure de déplacements quelconques

La méthode que nous venons de présenter avec deux photorécepteurs donne accès à une mesure de  $2k.u(t) \pmod{2\pi}$ . A l'aide d'algorithme de déroulement de phase il est possible de reconstruire des déplacements plus grands que la longueur d'onde. Cette méthode permet donc en théorie une mesure de grands déplacements. Cependant, elle nécessite toujours un asservissement de la différence de phase  $|\phi_s - \phi_r| = \frac{\pi}{2}$  et est dépendante de la qualité du déroulement de phase. Dans cette partie, nous allons présenter une autre méthode permettant de mesurer des déplacements quelconques avec une sensibilité inférieure au nanomètre [107]. Elle est basée sur le même montage que précédemment en utilisant un système de mesure à 4 photorécepteurs comme présenté figure 6.3.

De la même manière que précédemment, on utilise les différentes polarisations afin d'ex-

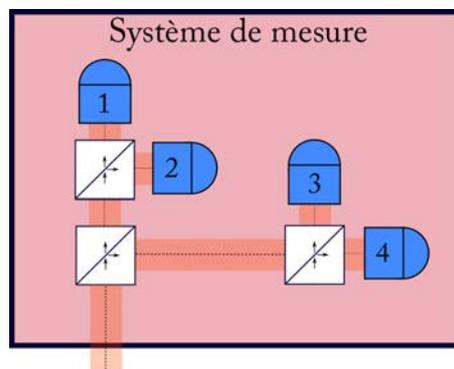


Figure 6.3 – Système de mesure à quatre photorécepteurs

traire un maximum d'information du montage interférométrique. En effet, en utilisant un système de mesure comme présenté figure 6.3 on peut mesurer simultanément le signal

interférométrique selon les polarisations  $\vec{e}_x$ ,  $\vec{e}_y$ ,  $\frac{\vec{e}_x + \vec{e}_y}{\sqrt{2}}$  et  $\frac{\vec{e}_x - \vec{e}_y}{\sqrt{2}}$  tel que le courant mesuré sur chaque photorécepteur (supposé identique)  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  et  $I_4$  s'écrit :

$$\begin{cases} I_1 = I_0 + \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \text{ selon } \vec{e}_x \\ I_2 = I_0 - \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \text{ selon } \vec{e}_y \\ I_3 = I_0 + \alpha \cdot \sin(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \text{ selon } \frac{\vec{e}_x + \vec{e}_y}{\sqrt{2}} \\ I_4 = I_0 - \alpha \cdot \sin(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \text{ selon } \frac{\vec{e}_x - \vec{e}_y}{\sqrt{2}} \end{cases} \quad (6.12)$$

Ainsi, il est possible d'isoler le signal en cosinus et en sinus :

$$\begin{cases} I_1 - I_2 = 2\alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \\ I_3 - I_4 = 2\alpha \cdot \sin(2k \cdot u(t) + \phi_s - \phi_r) \end{cases} \quad (6.13)$$

Le déplacement  $2k \cdot u(t)$  peut s'extraire directement du système d'équation 6.13 tel que :

$$2k \cdot u(\tau) = \int_0^\tau \frac{(I_1 - I_2) \frac{\partial I_3 - I_4}{\partial t} - (I_3 - I_4) \frac{\partial I_1 - I_2}{\partial t}}{(I_1 - I_2)^2 + (I_3 - I_4)^2} dt \quad (6.14)$$

En pratique, cette démodulation est réalisée soit de manière analogique, à l'aide d'un circuit dérivateur puis intégrateur, soit de manière numérique. Après démodulation, cette méthode permet donc une mesure directe de grands déplacements.

- Avantages

- |   |
|---|
| Résolution sub-nanométrique des déplacements allant jusqu'à quelques micromètres. |
|---|
- Typiquement cette méthode est limitée par le bruit de photons.

- Inconvénients

- Cette méthode nécessite 4 photorécepteurs.

### 6.1.4 Quelques mots sur l'interférométrie hétérodyne

Les techniques de mesure de déplacement par interférométrie LASER homodyne sont bien développées. Elles permettent la mesure à distance de déplacements très fins avec une très grande bande passante (limitée uniquement par la bande passante des photorécepteurs). Cependant, on notera un inconvénient majeur à l'utilisation de l'interférométrie homodyne qui est la grande sensibilité au bruit du laser sonde. Notamment, aux basses fréquences. C'est pour cela que la grande majorité des applications industrielles préfère aux méthodes homodynes les méthodes hétérodynes qui permettent de fortement limiter la contribution des bruits environnementaux ainsi que la bande passante [107]. Cependant, nous ne présenterons pas ici les méthodes d'interférométrie hétérodyne car elles nécessitent un décalage en fréquence du signal lumineux dans le bras de référence qui n'est pas adapté à l'illumination peu cohérente spatialement et temporellement que nous utilisons en OCT plein champ (mais serait tout à fait applicable aux techniques d'OCT

classiques utilisant des illuminations cohérentes [108]).

## 6.2 Mesure de déplacement par OCT plein champ

Comme nous l'avons détaillé au chapitre 2, l'OCT plein champ est, à la base, un interféromètre de Michelson homodyne en lumière peu cohérente. Dans chaque bras de l'interféromètre un objectif de microscope qui multiplex le signal interférométrique sur chaque pixel d'un photorécepteur 2D. Notre objectif dans cette partie est de montrer la faisabilité d'une imagerie plein champ des déplacements locaux dans un milieu diffusant.

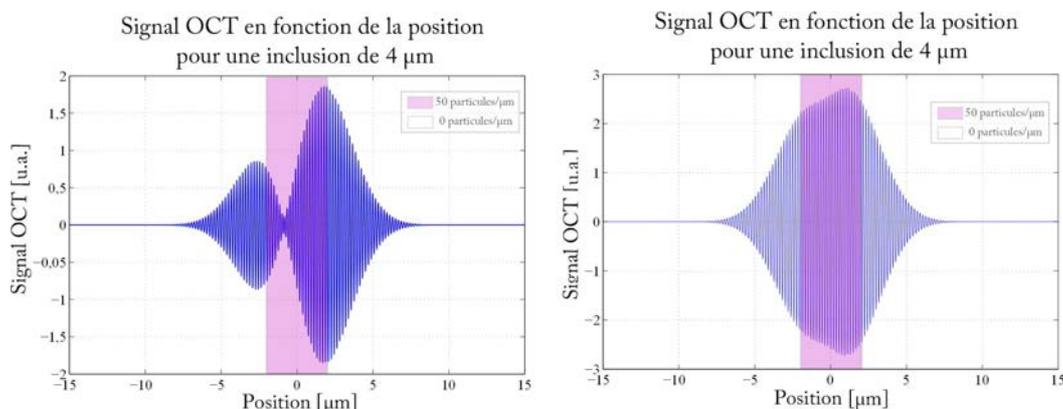
### 6.2.1 Problématique

Par rapport aux méthodes d'interférométrie LASER que nous avons présentées au début de ce chapitre, la mesure *in situ* par OCT plein champ de déplacements présente 3 difficultés majeurs : la faible longueur de cohérence de l'illumination utilisée, le caractère désordonné et diffusant des milieux observés et enfin le fait que la mesure n'est plus en surface mais dans le volume de l'échantillon.

**La longueur de cohérence :** contrairement aux sources LASER (à l'exception des LASER à modes synchronisés) qui possèdent des longueurs de cohérence allant de quelques centimètres à plusieurs mètres, les sources utilisées en OCT plein champ (sources halogènes, arc au Xénon ou LED) possèdent de faibles longueurs de cohérence. Cette faible longueur de cohérence permet le sectionnement optique, typiquement de 1 à 10  $\mu m$ , et elle limite les déplacements maximums d'un objet que l'on va pouvoir mesurer. Par exemple, pour une LED verte ThorLab<sup>TM</sup> (*M530L3*) la longueur de cohérence mesurée est d'environ 3  $\mu m$ . Dans le cas d'un objet unique, il sera très difficile de faire des mesures de déplacements supérieures à 3  $\mu m$  car le rapport signal sur bruit va chuter très rapidement au delà de la longueur de cohérence. Dans le cas où l'on observe, non pas un objet unique, mais un grand nombre d'objets constituant un milieu homogène du point de vue de la longueur de cohérence, alors théoriquement il est possible de mesurer de grands déplacements. Cependant, comme nous le verrons au paragraphe suivant cela présente peu d'intérêt pour nous car ces déplacements doivent avoir lieu à faible déformation.

**La nature désordonnée des échantillons (notamment biologiques) :** bien que les longueurs de cohérence soient très faibles en OCT plein champ, pour certains échantillons, notamment les échantillons biologiques, la densité d'objets diffusants est telle que le signal mesuré ne provient pas d'un objet unique mais de l'interférence cohérente du signal de tous les objets qui se trouvent dans un espace inférieur ou égal à la longueur de cohérence. La nature désordonnée du milieu engendre localement une figure d'interférence d'ondes lumineuses déphasées aléatoirement dont le signal est très dépendant de la position des objets diffusants présents dans la longueur de cohérence. Par exemple, nous pouvons simuler (ici en une dimension) le signal OCT pour une inclusion homogène possédant une densité de particules positionnées

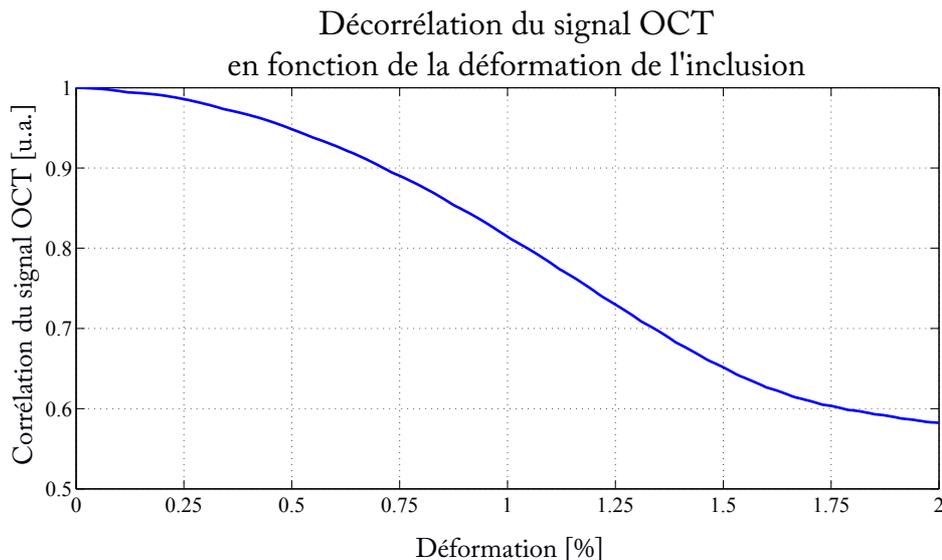
aléatoirement de 50 *particules*/ $\mu\text{m}$  dans 2 configurations de diffuseurs. Le résultat est présenté en figure 6.4. On remarque que, bien que l'inclusion soit homogène à l'échelle de la longueur de cohérence, le signal OCT est très dépendant de la position des diffuseurs ponctuels.



**Figure 6.4** – Signal OCT plein champ d'une inclusion homogène de 4  $\mu\text{m}$  pour deux configurations de diffuseurs avec une densité de particules de 50 *particules*/ $\mu\text{m}$ .

Cette propriété de la mesure OCT plein champ est centrale. Lorsque nous allons déformer les échantillons nous allons modifier localement la distance entre les diffuseurs locaux et donc très rapidement le risque est de décorrélérer la figure d'interférence. Nous avons vérifié sur des simulations à une dimension que pour des déformations inférieures à 1 % nous conservons une assez bonne corrélation de la figure d'interférence. La figure 6.5 est un tracé de la corrélation entre une figure d'interférence initiale et la figure d'interférence lorsque l'on déforme le milieu. Cette simulation a été obtenue pour un milieu homogène constitué de particules ponctuelles aléatoirement distribuées en position avec une densité de 50 *particules*/ $\mu\text{m}$ . Cette décorrélation des signaux d'OCT plein champ lors d'une déformation est une contrainte forte. Elle limite les mesures de déplacements à de faibles déformations et, couplée à la faible longueur de cohérence de l'illumination utilisée, elle nous contraint, soit d'utiliser des échantillons fins, soit d'appliquer des déformations de manière locale comme par exemple à l'aide de particules magnétiques.

**Les propriétés optiques des tissus :** au début de ce chapitre nous avons présenté quelques méthodes de mesures de déplacements par interférométrie LASER. Dans la majorité des cas nous avons vu que l'utilisation de polarisation et de détecteur en parallèle simplifie la mesure car elle permet notamment de s'affranchir des instabilités des sources LASER. Des montages à plusieurs détecteurs ont déjà été utilisés avec succès en OCT plein champ [109]. Bien que cela soit faisable, nous n'avons pas choisi d'utiliser un montage basé sur cette approche pour trois raisons principales : la complexité du montage OCT plein champ car il faut que les détecteurs 2D soit alignés au pixel près (ou à la tâche de diffraction près), le fait que les sources LED sont beaucoup plus stables que les sources LASER et enfin que la mesure OCT plein champ se fait à l'intérieur de l'échantillon, ce qui rend les conditions de polarisation très dépendantes du milieu traversé (notamment les milieux biologiques



**Figure 6.5** – Corrélation entre une figure d'interférence issue d'un milieu homogène constitué d'une densité de particules de  $50 \text{ particules}/\mu\text{m}$  et la figure d'interférence obtenue pour ce même milieu auquel nous avons fait subir une déformation.

souvent biréfringents rendent difficile l'utilisation de la polarisation).

### 6.2.2 Solutions proposées

Bien que nous ne puissions pas directement appliquer les méthodes utilisées en interférométrie LASER au cas de l'OCT plein champ, nous avons travaillé durant cette thèse à leur adaptation. Les méthodes inspirées de l'interférométrie LASER peuvent être classées en deux groupes : par mesure de déplacement quelconque et par mesure de déplacement harmonique. Nous présenterons aussi une méthode que nous avons développée, bien adaptée à l'OCT plein champ, basée sur le principe de l'imagerie 4 phases.

En OCT plein champ, l'intensité optique  $I$  reçue par chaque pixel de la caméra peut s'écrire comme :

$$I = I_0 + \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_i) \quad (6.15)$$

avec  $I_0$ ,  $\alpha$  et la phase initiale  $\phi_i$  différents pour chaque pixel.

#### Petits déplacements quelconques

Dans le cas des petits déplacements quelconques, comme le signal OCT plein champ est le plus souvent une mesure d'interférence entre ondes pseudo-aléatoirement déphasées, il est impossible d'utiliser les méthodes interférométriques qui nécessitent un contrôle de la phase initiale. En effet, les pixels de la caméra ne mesurent pas tous la même figure d'interférence locale. Ainsi, afin de déterminer le déplacement  $u(t)$  il est nécessaire de découpler le déphasage initial du déphasage dû au déplacement. Pour réaliser ce découplage, la méthode la plus simple est d'utiliser une méthode, comme pour l'imagerie classique, de modulation de phase (au moins 3 phases). Par souci de simplification des calculs, nous

avons choisi d'utiliser lors de nos études une modulation 4 phases. L'utilisation d'une méthode 4 phases implique que l'on suppose que durant le temps d'acquisition des 4 images, le terme  $2k.u(t)$  reste quasi-constant. Ceci implique que, soit la fréquence de la caméra soit très grande devant la fréquence du déplacement soit que le déplacement, soit périodique ce qui permet une approche stroboscopique. Dans les deux cas, l'objectif est de mesurer 4 films du déplacement  $I_1, I_2, I_3$  et  $I_4$  tel que :

$$\begin{cases} I_1 = I_0 + \alpha.\cos(2k.u(t) + \phi_i) \\ I_2 = I_0 + \alpha.\cos(2k.u(t) + \phi_i + \pi/2) \\ I_3 = I_0 + \alpha.\cos(2k.u(t) + \phi_i + \pi) \\ I_4 = I_0 + \alpha.\cos(2k.u(t) + \phi_i + 3\pi/2) \end{cases} \quad (6.16)$$

A partir de ces 4 films nous pouvons extraire le déplacement.

**Mesure de la phase** La mesure du déplacement à une constante près peut être réalisée par une simple mesure de la phase tel que :

$$\begin{cases} \phi(t) = \arg((I_1 - I_3) + i.(I_4 - I_2)) \\ \phi(t) - \phi(0) \equiv 2k.u(t) - 2k.u(0) \pmod{2\pi} \end{cases} \quad (6.17)$$

Ainsi, la mesure de  $\phi(t) - \phi(0)$  donne accès à une mesure du déplacement à une constante près *modulo*  $\frac{\pi}{k}$ . Si le déplacement est supérieur à  $\frac{\pi}{k}$  il faut alors utiliser un algorithme de déroulement de phase.

**Démodulation 4 phases** La mesure du déplacement peut aussi être réalisée avec la méthode de démodulation que nous avons présentée au début de ce chapitre. Nous pouvons mesurer le déplacement  $u(t)$  de la même manière que présenté en équation 6.14.

Si nous avons accès aux 4 films déphasés, ces deux méthodes permettent de déterminer des déplacements quelconques. Cependant, ces méthodes ne fonctionnent que pour des déplacements périodiques de période connue ou des déplacements lents devant la fréquence d'acquisition de la caméra. Dans notre cas, nous utilisons une caméra possédant une fréquence d'acquisition de 50 Hz, ce qui nous restreint beaucoup la vitesse des déplacements (dans le cas non-périodique) mais ces méthodes peuvent devenir très efficaces avec une fréquence acquisition plus rapide.

### Petits déplacements harmoniques

Dans le cas de petits déplacements harmoniques, nous présentons ici 2 méthodes inspirées de méthodes de vibrométrie LASER. Nous les avons développées pour mesurer par OCT plein champ l'amplitude de petits déplacements harmoniques dans les milieux diffusants.

**Méthode à une modulation** Dans cette première méthode nous écrivons le déplacement  $u(t)$  tel que :

$$u(t) = m.\cos(2\pi f_m t) \quad (6.18)$$

avec  $m$  l'amplitude de déplacement que nous cherchons à estimer et  $f_m$  la fréquence de la modulation que l'on suppose connue. Ainsi, l'équation 6.15 peut s'écrire comme :

$$I = I_0 + \alpha \cdot (\cos(\phi_i) \cos(2k \cdot m \cdot \cos(2\pi f_m t)) - \sin(\phi_i) \sin(2k \cdot m \cdot \cos(2\pi f_m t))) \quad (6.19)$$

En dérivant l'équation 6.19 selon la variable temporelle nous obtenons :

$$\frac{\partial I}{\partial t} = 2\pi f_m \alpha \beta \sin(2\pi f_m t) \cdot (\cos(\phi_i) \sin(\beta \cos(2\pi f_m t)) + \sin(\phi_i) \cos(\beta \cos(2\pi f_m t))) \quad (6.20)$$

avec  $\beta = 2k \cdot m$ .

Dans le cas des petits déplacements tel que  $\beta \ll 1$ , l'équation devient :

$$\begin{cases} \frac{\partial I}{\partial t} = 2\pi f_m \alpha \beta \cdot [E_{f_m} \sin(2\pi f_m t) + E_{2f_m} \sin(2\pi(2f_m)t) + E_{3f_m} \sin(2\pi(3f_m)t)] \\ E_{f_m} = \left(\frac{1-\beta^2}{4} + \frac{\beta^2}{8}\right) \sin(\phi_i) \\ E_{2f_m} = \beta \cos(\phi_i) \\ E_{3f_m} = -\frac{\beta^2}{8} \sin(\phi_i) \end{cases} \quad (6.21)$$

Par filtrage des fréquences  $f_m$ ,  $2f_m$  et  $3f_m$ , il est possible de séparer les 3 composantes  $E_{f_m}$ ,  $E_{2f_m}$  et  $E_{3f_m}$  et ainsi d'estimer l'amplitude de déplacement  $m$  tel que :

$$m = \frac{1}{2k \sqrt{\frac{|E_{f_m}|}{E_{3f_m}} + 1}} \quad (6.22)$$

Simplement à partir d'un film de l'interférogramme, cette méthode nous permet donc d'estimer l'amplitude d'un déplacement harmonique selon l'axe optique. Cependant, lors de l'utilisation de cette méthode, il faut garder à l'esprit que le rapport signal sur bruit est très dépendant du terme  $\sin(\phi_i)$  et donc de la phase initiale. C'est pour cela qu'en pratique nous imposons un seuil de manière à ce que le calcul de l'amplitude de déplacement ne se fasse que pour les pixels où les rapports signaux sur bruits sont suffisants. Dans la partie simulation, nous verrons plus en détail les effets du rapport signal sur bruit relativement à l'estimation de l'amplitude de déplacement.

**Méthode à deux modulations** Dans cette seconde méthode nous écrivons le déplacement  $u(t)$  tel que :

$$u(t) = m_s \cdot \cos(2\pi f_s t) + m_r \cdot \cos(2\pi f_r t) \quad (6.23)$$

avec  $m_r$  et  $m_s$  les amplitudes de déplacement respectivement dans le bras de référence et dans le bras contenant l'échantillon que nous cherchons à estimer.  $f_r$  et

$f_s$  sont les fréquences de modulation connues. Ainsi, l'équation 6.15 peut s'écrire comme :

$$\begin{cases} I = I_0 + \alpha.(I_p + I_i) \\ I_p = \cos(\phi_i)\cos(2k.(m_s.\cos(2\pi f_s t) + m_r.\cos(2\pi f_r t))) \\ I_i = -\sin(\phi_i)\sin(2k.(m_s.\cos(2\pi f_s t) + m_r.\cos(2\pi f_r t))) \end{cases} \quad (6.24)$$

Dans le cas de petits déplacements tel que  $2k.m_s \ll 1$  et  $2k.m_r \ll 1$ , l'équation devient :

$$\begin{cases} I = E_0 + E_{f_s}\cos(2\pi f_s t) + E_{f_r}\cos(2\pi f_r t) + E_{2f_s}\cos(4\pi f_s t) + \\ \quad E_{2f_r}\cos(4\pi f_r t) + E_{f_s+f_r}\cos(2\pi(f_s + f_r)t) + E_{f_s-f_r}\cos(2\pi(f_s - f_r)t) \\ E_0 = I_0 + \alpha\cos(\phi_i).(1 - k^2(m_s^2 + m_r^2)) \\ E_{f_s} = 2k.\alpha.\sin(\phi_i).m_s \\ E_{f_r} = 2k.\alpha.\sin(\phi_i).m_r \\ E_{2f_s} = -\alpha.\cos(\phi_i)k^2.m_s^2 \\ E_{2f_r} = -\alpha\cos(\phi_i)k^2.m_r^2 \\ E_{f_s+f_r} = -2\alpha.\cos(\phi_i)k^2.m_s m_r \\ E_{f_s-f_r} = -2\alpha.\cos(\phi_i)k^2.m_s m_r \end{cases} \quad (6.25)$$

De la même manière que pour la méthode précédente, par filtrage des fréquences dans l'espace de Fourier, nous sommes capables de sélectionner les différentes fréquences du signal et ainsi d'estimer l'amplitude du déplacement dans le bras contenant l'échantillon tel que :

$$m_s = 4 \frac{|E_{2f_s}|}{|E_{f_s+f_r}| + |E_{f_s-f_r}|} \times m_r \quad (6.26)$$

ou bien :

$$m_s = \sqrt{\frac{|E_{2f_s}|}{|E_{2f_r}|}} \times m_r \quad (6.27)$$

Ainsi, sans dérivation du signal mais en utilisant une seconde fréquence de modulation, il est possible d'accéder à l'amplitude de déplacement appliqué dans le bras contenant l'échantillon connaissant l'amplitude de déplacement dans le bras de référence.

Comme pour la méthode à une modulation, cette méthode a un rapport signal sur bruit très dépendant de la phase initiale au travers du terme  $\cos(\phi_i)$ . De même, en pratique, nous imposons un seuil de manière à ce que le calcul de l'amplitude de déplacement ne se fasse que pour les pixels de rapports signaux sur bruits suffisants.

### Méthode par modulation 4 phases de l'échantillon

La dernière méthode que nous présentons dans ce chapitre et une méthode que nous avons développée en parallèle des autres méthodes. L'objectif est de développer la méthode la plus simple à mettre en œuvre afin de pouvoir faire de l'élastographie quasi-statique. Cette méthode est directement dérivée de la méthode d'imagerie 4 phases classique utilisée en imagerie OCT plein champ. En imagerie classique nous utilisons une méthode 4 phases en créniaux afin d'extraire le signal interférométrique. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, en imagerie classique nous pouvons écrire le signal sur chaque pixel de la caméra avec chaque phase ( $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  et  $I_4$ ) s'exprimant de cette façon :

$$\begin{cases} I_1 = I_0 + \alpha \cdot \cos(\phi_i) \\ I_2 = I_0 + \alpha \cdot \cos(\phi_i + \phi_{modulation}) \\ I_3 = I_0 + \alpha \cdot \cos(\phi_i + 2\phi_{modulation}) \\ I_4 = I_0 + \alpha \cdot \cos(\phi_i + 3\phi_{modulation}) \end{cases} \quad (6.28)$$

Ainsi, si nous supposons que  $\alpha$  varie lentement par rapport au *cosinus*, le système d'équation 6.28 est un système de 4 équations à 4 inconnues. En imagerie la variable d'intérêt est  $\alpha$ . Elle est directement reliée à la réflectance de l'objet observé dans le plan de coupe de l'OCT plein champ.

Il est intéressant de remarquer que comme nous avons accès aux 4 inconnues nous avons aussi accès à  $\phi_{modulation}$ . Dans le cas classique où le déphasage est appliqué par le déplacement du miroir de référence à l'aide d'une céramique piézoélectrique cela a peu d'intérêt. Par contre, si ce déphasage n'est plus appliqué dans le bras de référence mais par une compression quasi-statique de l'échantillon alors la variable  $\phi_{modulation}$  devient directement reliée au déplacement local des diffuseurs dans l'échantillon.

Nous mesurons simplement et rapidement le déphasage  $\phi_{modulation}$  pour chaque pixel en utilisant la relation suivante :

$$\begin{cases} \frac{\sin(3\phi_{modulation})}{\sin(\phi_{modulation})} = \frac{(I_1 - I_4)}{(I_2 - I_3)} \\ \phi_{modulation} = 2k \cdot \delta \end{cases} \quad (6.29)$$

avec  $\delta$  le déplacement.

Comme la fonction  $x \mapsto \frac{\sin(3x)}{\sin(x)}$  est bijective sur  $[0; \frac{\pi}{2}[$  nous pouvons facilement estimer  $\phi_{modulation}$  à partir du rapport  $\frac{\sin(3\phi_{modulation})}{\sin(\phi_{modulation})}$  et ainsi mesurer localement le déplacement des diffuseurs  $\delta$ . Il faut remarquer que les performances de cette méthode sont étroitement liées à la valeur de la différence  $I_2 - I_3$  car la division rend instable l'estimation pour de petites valeurs de cette différence. En pratique, nous imposons que l'estimation ne se fasse que pour les pixels où la différence  $(I_2 - I_3)$  est suffisamment grande.

### 6.2.3 Simulations numériques et résultats expérimentaux

Dans cette partie, nous présentons pour les 5 méthodes introduites dans la partie précédente des résultats de simulations et des résultats expérimentaux de preuve de concept.

#### Simulation numérique

Les simulations numériques sont effectuées à partir d'un programme *Matlab*<sup>TM</sup> que nous avons mis en œuvre durant cette thèse. Ici, nous utiliserons une version 1D simplifié avec un seul diffuseur qui ne prend pas en compte l'ouverture numérique du système. Le nombre de photoélectrons  $N_{simulation}$  simulés captés par un pixel de la caméra s'écrit comme :

$$N_{simulation} = N_0[R_r + R_{obj} + R_{inc} + 2\sqrt{R_r R_{obj}}.G(\delta).cos(k\delta + \phi_i)] + N_b \quad (6.30)$$

avec :

- $R_r$  : la réflectance de la référence. Dans notre cas une interface huile de silicone d'indice 1.41 et un miroir de silicium, soit  $R_r = 0.175$ .
- $R_{obj}$  : la réflectance de l'objet qui interfère de manière cohérente avec la référence. Nous avons choisi de prendre  $R_{obj} = 10^{-6}$  qui est une valeur typique dans les milieux biologiques.
- $R_{inc}$  : la réflectance de l'objet qui n'interfère pas de manière cohérente avec la référence, aussi appelé fond diffus.
- $\delta$  : la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre.
- $G$  : une fonction de la différence de marche  $\delta$ . C'est une gaussienne qui modélise la cohérence temporelle de l'illumination.
- $\phi_i$  : correspond à une phase réglable.
- $N_0$  : nous supposons que le système travaille près de la saturation et que le signal de la référence est largement dominant dans le signal mesuré tel que :  $N_{sat} \simeq N_0 R_r$  avec  $N_{sat} = 150000$  photoélectrons pour les caméras Dalsa 1M60 que nous utilisons expérimentalement. Ainsi,  $N_0 \simeq 850000$  photoélectrons.
- $N_b$  : modélise le bruit de mesure que nous avons supposé exclusivement comme un bruit de photons [110]. Ainsi  $N_b$  est un bruit blanc de variance  $\sqrt{N_0 R_r}$ .

L'objectif de ces simulations est de tester nos méthodes d'estimation sur un système bien contrôlé et d'évaluer les performances de nos estimations.

#### Montage expérimental

Les résultats expérimentaux que nous présentons dans la suite ont été obtenus avec le même montage d'OCT plein champ qu'au chapitre précédent. La source d'illumination est une LED verte à 530 nm (M530L3, *Thorlabs*<sup>TM</sup>). Elle permet une coupe OCT plein champ mesurée d'environ  $3 \mu m$  et le bras contenant l'échantillon est muni d'une céramique piézoélectrique afin de pouvoir solliciter mécaniquement celui-ci.

## Résultats

Nous présentons ici les résultats pour les 5 méthodes que nous avons présentées : la mesure de phase, la démodulation 4 phases, la méthode basée sur une modulation harmonique, la méthode basée sur 2 modulations harmoniques et la méthode de modulation 4 phases de l'échantillon.

### 1) Mesure de la phase

**Simulation** La figure 6.6 présente les résultats des simulations pour la méthode de mesure directe de la phase par imagerie classique 4 phases. Les figures 6.6a-b sont issues de simulations non bruitées, les figures 6.6c-d sont les estimations obtenues avec prise en compte du bruit. Nous observons sur la figure 6.6c, qu'avec le signal sur bruit considéré, les déplacements supérieurs à  $4 \mu m$  ne sont pas mesurables. Comme nous l'attendions, la longueur de cohérence temporelle de l'illumination limite bien l'estimation des grands déplacements. De plus, on note sur la figure 6.6d que l'estimation est faite à  $30 nm$  soit environ  $\frac{\lambda}{15}$ . On notera aussi que l'algorithme de déroulement de phase fourni par Matlab<sup>TM</sup> semble étonnamment robuste au bruit.

**Expérience** Nous n'avons pas réalisé d'expérience avec cette méthode car avec une caméra à  $50 Hz$  elle ne présente que peu d'intérêt. Mais, comme nous l'avons déjà dit, avec une haute fréquence d'acquisition cette méthode serait très efficace.

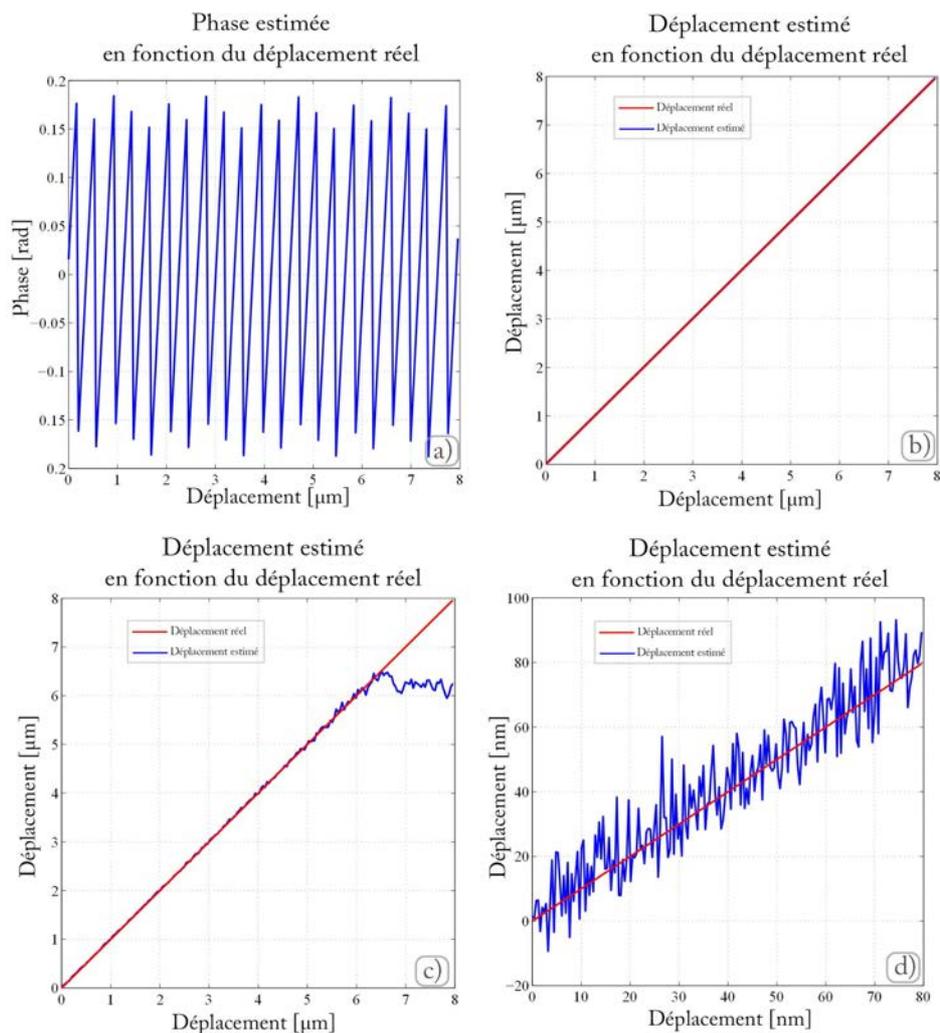
### 2) Démodulation 4 phases

**Simulation** La figure 6.7 présente les résultats de simulations pour la méthode basée sur la démodulation 4 phases. La figure 6.7a représente l'évolution du signal d'OCT plein champ en fonction du déplacement. La figure 6.7b présente une estimation sans bruit. Les figures c-d représentent les estimations à respectivement grands et petits déplacements. De la même manière que pour la méthode précédente, on observe sur la figure 6.7c le décrochement de l'estimation en raison de la longueur de cohérence et sur la figure 6.7d une résolution d'environ  $\frac{\lambda}{15}$ .

**Expérience** De même que pour la méthode précédente, nous n'avons pas réalisé d'expérience avec cette méthode car avec une caméra à  $50 Hz$  elle ne présente que peu d'intérêt. Mais, comme nous l'avons déjà dit, avec une haute fréquence d'acquisition cette méthode serait très efficace.

### 3) Méthode harmonique à une modulation

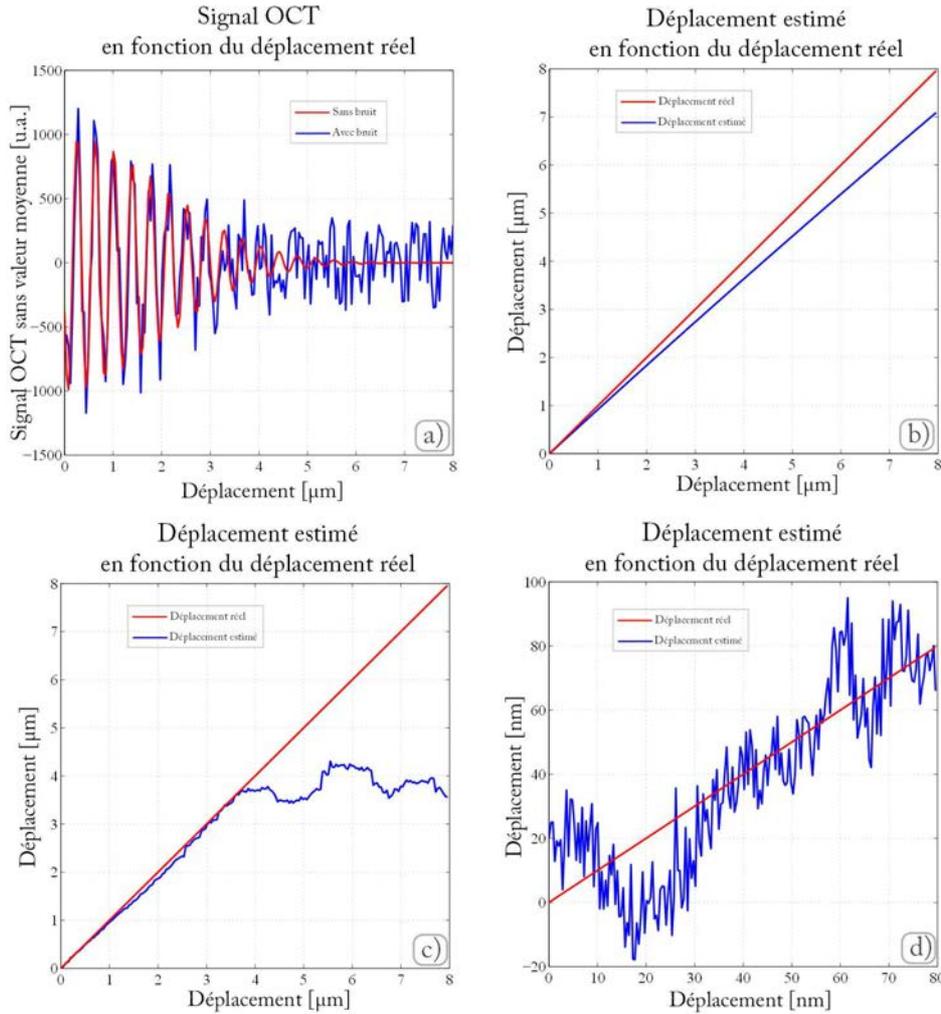
**Simulation** La figure 6.8 représente les résultats que nous avons obtenus par simulation avec la méthode à une modulation décrite précédemment. Un déphasage initial  $\phi_i$  égale à  $\frac{\pi}{2}$  a été considéré. La figure 6.8a représente l'amplitude de déplacement estimé en fonction de l'amplitude de déplacement appliqué. Comme nous l'avons dit, cette méthode fonctionne uniquement pour les petits déplacements. On observe bien sur cette simulation un biais à l'estimation qui croît avec l'amplitude du déplacement que l'on cherche à estimer. Pour un pixel, à une amplitude de déplacement de  $30 nm$ , la figure 6.8b montre la valeur absolue de la transformée de Fourier de



**Figure 6.6** – Résultats de simulations pour la méthode de mesure de phase directe par imagerie 4 phases. a) phase mesurée sans bruit avant déroulement de la phase, b) déplacement estimé à partir de la phase non bruitée en fonction du déplacement appliqué, c) et d) sont les estimations pour des signaux bruités respectivement pour les grands et petits déplacements.

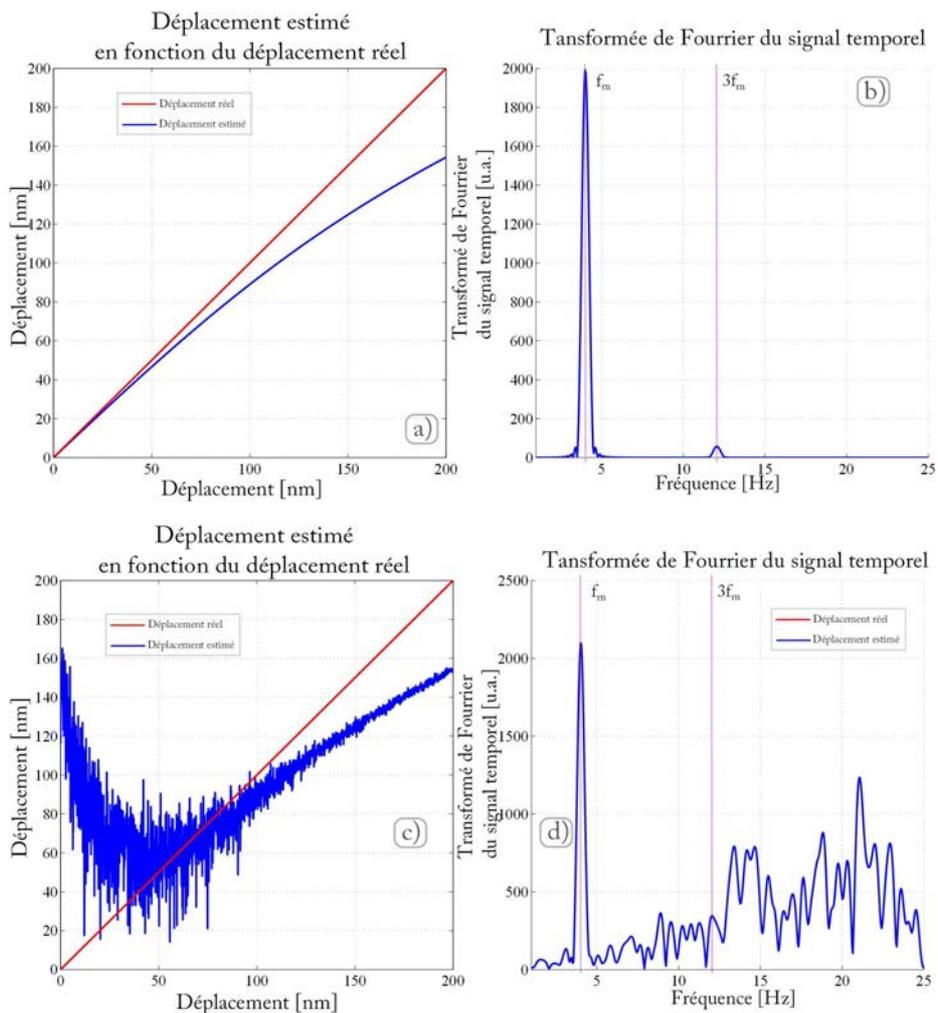
la dérivée temporelle du signal d'OCT plein champ. On retrouve bien les pics correspondant aux fréquences  $f_n$  et  $3f_n$  que nous utilisons afin d'estimer l'amplitude du déplacement. Les figures 6.8c-d correspondent aux figures 6.8 a-b mais en présence de bruit. Il est intéressant de noter que cette méthode est très sensible au bruit à petits déplacements. Au niveau de bruit considéré ici, on observe que pour des amplitudes de déplacements inférieurs à  $50\text{ nm}$  on a plus de 100% d'erreur sur l'estimation. Cette limite basse trouve son origine au moment où l'amplitude du pic correspondant à la fréquence  $3f_n$  correspond à l'amplitude du bruit dans le domaine spectral. Typiquement, pour  $30\text{ nm}$ , la figure 6.8d nous montre que nous ne sommes pas capables de distinguer le pic à la fréquence  $3f_n$ .

**Expérience** Afin de valider expérimentalement cette méthode nous avons déplacé une interface silice/air à l'aide d'une céramique piézoélectrique.



**Figure 6.7** – Résultats de simulations pour la méthode basée sur la démodulation 4 phases. a) évolution du signal d'OCT plein champ en fonction du déplacement, b) déplacement estimé à partir de signaux non bruités, c) et d) sont les estimations pour des signaux bruités respectivement pour les grands et petits déplacements.

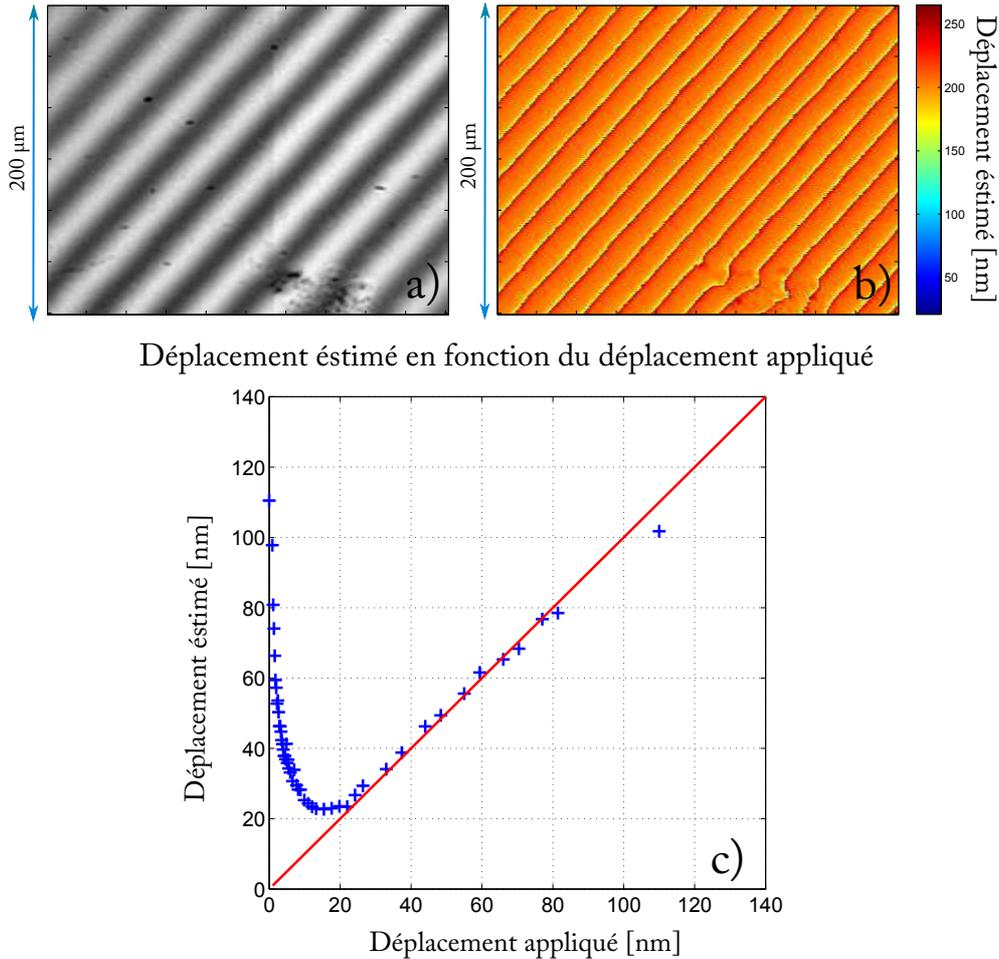
La figure 6.9a est l'image d'OCT plein champ de l'interface silice/air. Nous observons plusieurs franges d'interférences car cette interface n'est pas parallèle au réflecteur dans le bras de référence (ce qui induit un déphasage linéaire suivant l'axe perpendiculaire aux franges). Pour une amplitude de déplacement de  $200 \text{ nm}$ , la figure 6.9b représente une image du déplacement estimé à partir d'un film de 400 images. Comme prévu, nous observons bien que pour  $\phi_i \equiv 0 \pmod{2\pi}$  le rapport signal sur bruit chute à 0. Sur la figure 6.9b, ce phénomène correspond aux lignes « jaunes » où l'estimation du déplacement n'est pas bonne. La figure 6.9c est un tracé de la moyenne sur  $100 \times 100$  pixels pour différentes amplitudes de modulations. Cette courbe correspond très bien à ce que nous attendions. Ainsi, méthode donne de bons résultats et est un bon candidat pour l'application d'élastographie quasi-statique par OCT plein champ.



**Figure 6.8** – Résultats de simulations pour la méthode harmonique à une modulation. a) estimation des déplacements à partir de signaux non bruités, b) valeur absolue de la transformée de Fourier de la dérivée temporelle du signal OCT plein champ simulée sans bruit pour un déplacement de 30 nm, c) estimation des déplacements à partir de signaux bruités et d) valeur absolue de la transformée de Fourier de la dérivée temporelle du signal OCT plein champ simulée avec bruit pour un déplacement de 30 nm.

**4) Méthode harmonique à deux modulations** De la même manière que pour la méthode à une modulation nous présentons dans ce paragraphe les résultats pour la méthode modulée à la fois sur le bras de référence et sur le bras contenant l'échantillon (figure 6.10). Les fréquences sont respectivement  $f_1 = 4 \text{ Hz}$  et  $f_2 = 7 \text{ Hz}$ . L'amplitude de déplacement dans le bras de référence est de 50 nm.

**Simulation** Pour ces simulations la phase initiale est prise égale à 0. Les figures 6.10a, 6.10c et 6.10d représentent l'amplitude de déplacement estimé respectivement sans bruit, avec bruit et un signal bruité accumulé 10 fois. Dans le cas non bruité, comme pour la méthode précédente, on observe bien que cette méthode ne fonctionne que pour de petits déplacements. En ce qui concerne les estimations bruitées, d'emblée nous remarquons que l'estimation est beaucoup moins stable vis-à-vis du bruit que la méthode précédente. Ceci peut en partie s'expliquer par le fait que dans cette



**Figure 6.9** – Résultats expérimentaux pour la méthode harmonique à une modulation. a) image OCT plein champ de la zone où nous effectuons l'estimation, b) image des déplacements estimés pour un déplacement appliqué à l'interface silice/air de 200 nm et c) image correspondant à la moyenne sur toute la zone de l'estimation du déplacement pour différents déplacements appliqués.

méthode afin d'estimer l'amplitude du déplacement nous divisons par un terme du second ordre de faible amplitude qui rend instable le calcul. Sur la figure 6.10d est tracée la même estimation mais moyennée 10 fois. Dans ce cas l'estimation est de bien meilleure qualité même si nous observons encore quelques fortes erreurs ponctuelles.

Ainsi, cette méthode qui semble bien s'adapter à de faibles niveaux de bruit semble très peu robuste à celui-ci. Cette particularité est problématique pour notre application dans laquelle la phase initiale n'est notamment pas contrôlée. C'est pour cela que nous préférons à cette méthode la précédente avec une modulation unique.

**Expérience** Comme nous l'avons dit, nous avons préféré à cette méthode la précédente à une modulation. La méthode à une modulation est moins instable vis-à-vis du bruit ce qui est préférable pour l'application aux tissus biologiques.

## 5) Méthode par modulation 4 phases de l'échantillon

**Simulation** Nous présentons figure 6.11 les résultats pour la méthode par modulation 4 phases de l'échantillon. La figure 6.11a est une simulation de l'estimation du déplacement en fonction du déplacement appliqué. Comme attendu, cette méthode n'est bijective que jusqu'à la première annulation de  $\sin(\phi)$  soit avec une longueur d'onde centrale d'illumination de  $530 \text{ nm}$  jusqu'à environ  $189 \text{ nm}$ . La figure 6.11b représente l'amplitude de déplacement estimé en fonction du déplacement appliqué en présence de bruit. A première vue, cette estimation semble très bruitée par rapport aux méthodes précédentes. Cependant, il faut prendre en compte que dans les méthodes précédentes l'estimation est réalisée sur des films de 400 images et que pour cette méthode, nous n'utilisons que 4 images. Par exemple, la figure 6.11c représente les résultats d'estimation que nous obtenons si nous moyennons 100 fois. Ainsi, pour un même nombre d'images pour des déplacements de  $60$  à  $160 \text{ nm}$  cette méthode est plus performante que les méthodes précédentes.

**Expérience** Afin de valider expérimentalement cette méthode, de la même manière que pour la méthode à une modulation harmonique, nous avons déplacé une interface silice/air dans le bras contenant l'échantillon.

La figure 6.12a est l'image d'OCT plein champ de l'interface silice/air. La figure 6.12b représente une image du déplacement estimé pour un déphasage correspondant à une amplitude de déplacement de  $200 \text{ nm}$  obtenue à partir de 4 interférogrammes déphasés de  $200 \text{ nm}$ . La figure 6.12c est un tracé de la moyenne sur  $100 \times 100$  pixels pour différentes amplitudes de modulations. Cette courbe correspond bien à ce que nous attendions. Cette méthode donne de bons résultats et est aussi un bon candidat pour l'application touchant à l'élastographie quasi-statique par OCT plein champ.

## Bilan

Ci-dessous nous présentons un tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de chacune des méthodes que nous avons étudiées.

Méthode	Avantages	Inconvénients	Commentaires
Mesure de la phase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite la mesure des 4 phases simultanément ou au moins à grande vitesse</li> <li>• Déroulement de phase nécessaire</li> </ul>	Méthode prometteuse avec une caméra rapide
Démodulation 4 phases	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicité</li> <li>• Pas de déroulement de phase nécessaire</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessite la mesure des 4 phases simultanément ou au moins à grande vitesse</li> </ul>	Méthode prometteuse avec une caméra rapide
Méthode harmonique à 1 modulation	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déplacement harmonique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Petits déplacements</li> <li>• Temps de calcul</li> </ul>	Meilleur candidat notamment pour l'élastographie quasi-statique utilisant des particules magnétiques (cf. ci-dessous)
Méthode harmonique à 2 modulations	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déplacement harmonique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Petits déplacements</li> <li>• Temps de calcul</li> <li>• Peu stable à faible rapport signal sur bruit</li> </ul>	Moins stable que la méthode à une modulation qu'on lui préférera
Méthode par modulation 4 phases de l'échantillon	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Simplicité</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Déplacement en créneaux 4</li> </ul>	Meilleur candidat notamment pour l'élastographie quasi-statique par compression globale de l'échantillon

### 6.3 Application à l'élastographie

Actuellement, la méthode d'élastographie par OCT classique la plus avancée est la méthode développée principalement par les groupes du Professeur Sampson (Université de Western Australia, Australie) [111] et du Professeur Boppart (Université de Champain, Illinois, US) [112]. Cette méthode est celle qui donne les résultats les plus prometteurs pour les applications d'aide au diagnostic. Il s'agit d'une méthode quasi-statique où les échantillons sont sollicités de manière harmonique et les déplacements locaux sont directement estimés par la mesure de phase. Ceci est possible car pour les méthodes à balayage utilisées en OCT classique les fréquences d'acquisition sont très hautes (photorécepteur unique ou bien linéaire). Malheureusement, dans le cas de l'OCT plein champ la fréquence d'acquisition des caméras 2D utilisées est trop lente pour utiliser cette méthode.

L'objectif de notre étude est de montrer que les méthodes que nous avons présentées dans la partie précédente nous permette de mesurer les déplacements à l'intérieur des tissus diffusants avec la haute résolution de l'OCT plein champ et ainsi de pouvoir accéder à une cartographie des déformations locales quasi-statique par OCT plein champ.

Pour cela nous avons étudié deux manières d'induire des déplacements :

- Déformation globale par compression de tout l'échantillon à l'aide d'une céramique piézoélectrique.

- Déformation locale à l'aide de nanoparticules magnétiques que l'on fait vibrer sous un champ magnétique oscillant.

### 6.3.1 Résultats sur échantillons fins : déformation globale

Afin de pouvoir comprimer de manière contrôlée nos échantillons, nous avons utilisé un porte-échantillon constitué d'une fenêtre de silice fixe sur laquelle nous venons plaquer l'échantillon via un piston. Lorsque l'échantillon est bien plaqué contre la fenêtre de silice on le sollicite mécaniquement à l'aide d'une céramique piézoélectrique se trouvant entre le piston et l'échantillon, comme on peut le voir sur le schéma figure 6.13.

A l'aide de ce porte-échantillon, nous avons dans un premier temps étudié des échantillons tests de polydiméthylsiloxane (PDMS Sylgard 184) et d'ecoflex™ dans lesquels nous avons dispersé des particules d'oxyde de zinc (ZnO - 205532 Sigma-Aldrich) de 1 à 5  $\mu m$ . Les particules d'oxyde de zinc nous permettent d'induire de la diffusion et nous contrôlons la rigidité mécanique des polymères de PDMS en faisant varier leur concentration en réticulant.

L'échantillon que nous présentons ici est un échantillon multicouche de polymères de rigidité différente. La concentration en particules d'oxyde de zinc est de 0,2  $mg/g$ . L'échantillon est constitué de 5 couches de polymères d'environ 30  $\mu m$  obtenues par centrifugation. La figure 6.14 est un schéma de cet échantillon. La première couche (en partant du bas) est un polymère de PDMS avec 10 % d'agents de réticulation correspondant à un module d'Young de l'ordre de 2,6  $MPa$  [97]. La deuxième couche est une couche d'ecoflex™ correspondant à un module d'Young de l'ordre de 70  $kPa$ . La troisième couche est un polymère de PDMS avec 5 % d'agents de réticulation correspondant à un module d'Young de l'ordre de 1,03  $MPa$  [97]. La quatrième couche est à nouveau une couche d'ecoflex™ et la dernière couche est une couche de PDMS avec 10 % d'agents de réticulation.

Afin de cartographier les déplacements dans l'échantillon nous avons utilisé la méthode de modulation 4 phases ainsi que la méthode à une modulation harmonique. Ces deux méthodes fournissent approximativement les mêmes résultats. Cependant, ici nous allons présenter uniquement les résultats obtenus par la méthode de modulation 4 phases. Cette méthode est facilement automatisable pour l'acquisition de piles d'images. Les résultats obtenus avec cette méthode sont présentés à la figure 6.15. Chaque image a été accumulée 100 fois et nous avons acquis une image tous les 10  $\mu m$  pour obtenir une image volumique des déplacements axiaux à la résolution de l'OCT plein champ. La figure 6.15a présente une coupe transversale de l'image volumique d'OCT plein champ. La figure 6.15b est le profil de la déformation en fonction de la profondeur obtenue pour une moyenne de 100 pixels. La pente de la courbe de déplacement en fonction de la profondeur permet d'estimer la déformation locale. Ainsi, sur ce profil nous observons bien que les couches d'ecoflex™ se déforment beaucoup plus que les couches de PDMS qui ne se déforment quasiment pas (ce qui n'est pas surprenant compte tenu des différences de rigidité entre les deux polymères).

### 6.3.2 Résultats avec une modulation magnétique *in situ* : déformation locale

Dans un deuxième temps, nous avons voulu montrer que la méthode harmonique avec une modulation nous permet d'utiliser la force magnétomotrice en OCT plein champ. L'objectif est de sonder localement des objets magnétiques déplacés (d'après la littérature, typiquement des nanoparticules ferromagnétiques). Cette méthode a été introduite en OCT classique en 2005 par l'équipe du professeur Boppart [113] (Université de Champaign, Illinois, US). La méthode consiste, non plus à venir solliciter la totalité de l'échantillon et mesurer les déplacements locaux induits par cette déformation globale mais, à venir, à l'aide d'un gradient de champ magnétique, appliquer localement sur les particules magnétiques une force magnétomotrice connue.

Bien que la force exercée sur les particules magnétiques soit facilement calculable, il faut garder à l'esprit que cette méthode est très dépendante de l'interaction entre la particule et le milieu qui l'entoure. Il est donc en pratique très difficile de quantifier la force locale appliquée au tissu. A l'heure actuelle, cette limitation freine l'application de cette méthode à la mesure de propriétés mécaniques. Cependant, l'utilisation de particules ou de nanoparticules magnétiques semble être très prometteuse, notamment comme nouvel agent de contraste exogène. En effet, en détectant les déplacements générés par la force magnétomotrice il est possible de détecter la présence ou l'absence de particules magnétiques. Le fait que l'usage de ces particules soit autorisé comme agent de contraste en IRM devrait faciliter son usage en OCT plein champ.

Nous présentons ici des résultats préliminaires encourageants. Nous les avons obtenus pour la mesure du déplacement d'une plaque de fer ( $5 \times 5 \times 1 \text{ mm}^3$ ) dans une matrice d'ecoflex (à environ  $200 \mu\text{m}$  de profondeur) sollicitée par un champ magnétique oscillant. La figure 6.16 est une représentation du porte échantillon qui a été utilisé.

L'échantillon est plaqué entre la fenêtre de silice et le solénoïde. Le solénoïde est alimenté par une tension sinusoïdale de fréquence  $4 \text{ Hz}$ . Ainsi, ce courant sinusoïdal permet de créer un gradient de champ magnétique d'amplitude sinusoïdale qui permet d'appliquer sur la plaque de fer une force harmonique. Nous avons tracé à la figure 6.17 l'amplitude de déplacement de la surface de la plaque de fer en fonction de la tension appliquée au solénoïde.

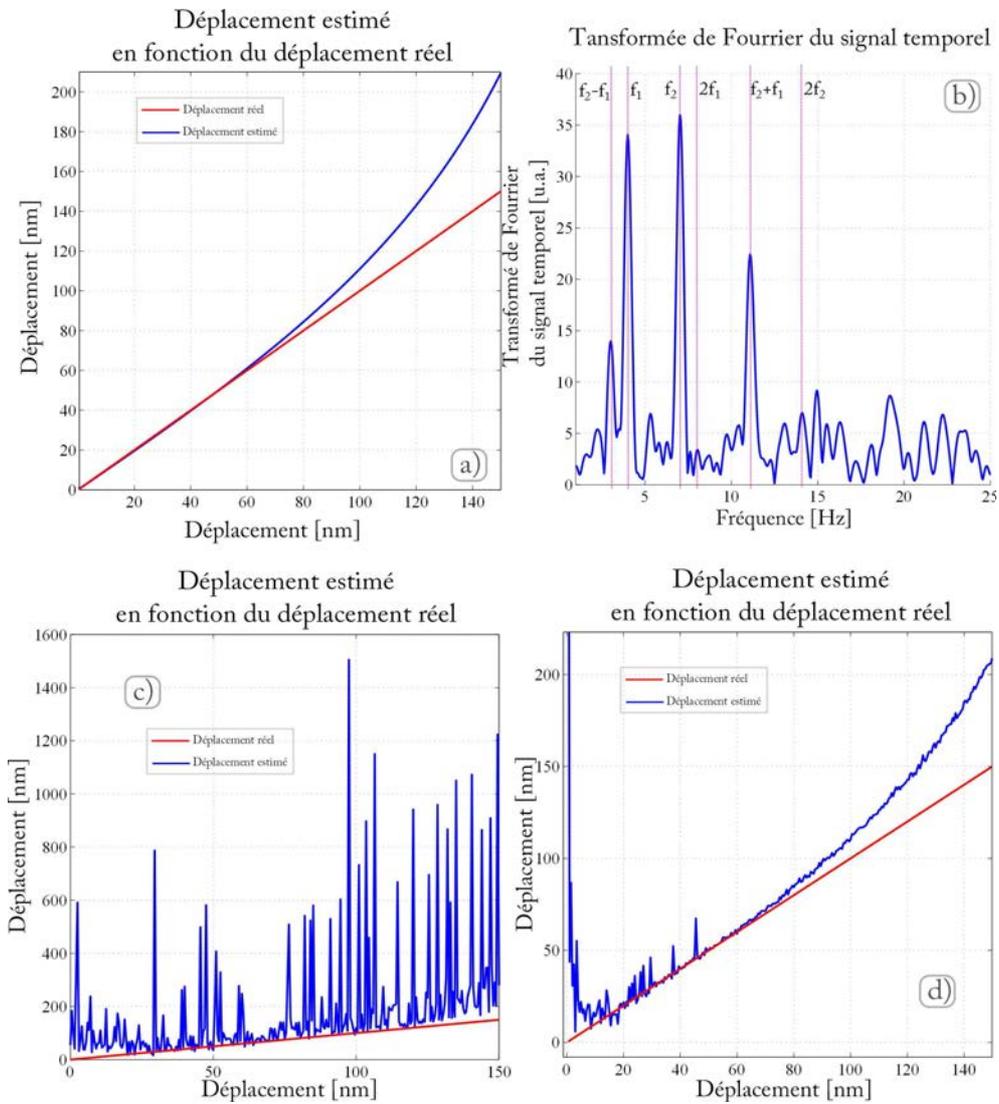
Nous avons présenté ici nos tous premiers résultats. La prochaine étape sera de vérifier si la méthode harmonique que nous avons présentée nous permet de détecter le déplacement de nanoparticules ferromagnétiques.

## Conclusion et discussions

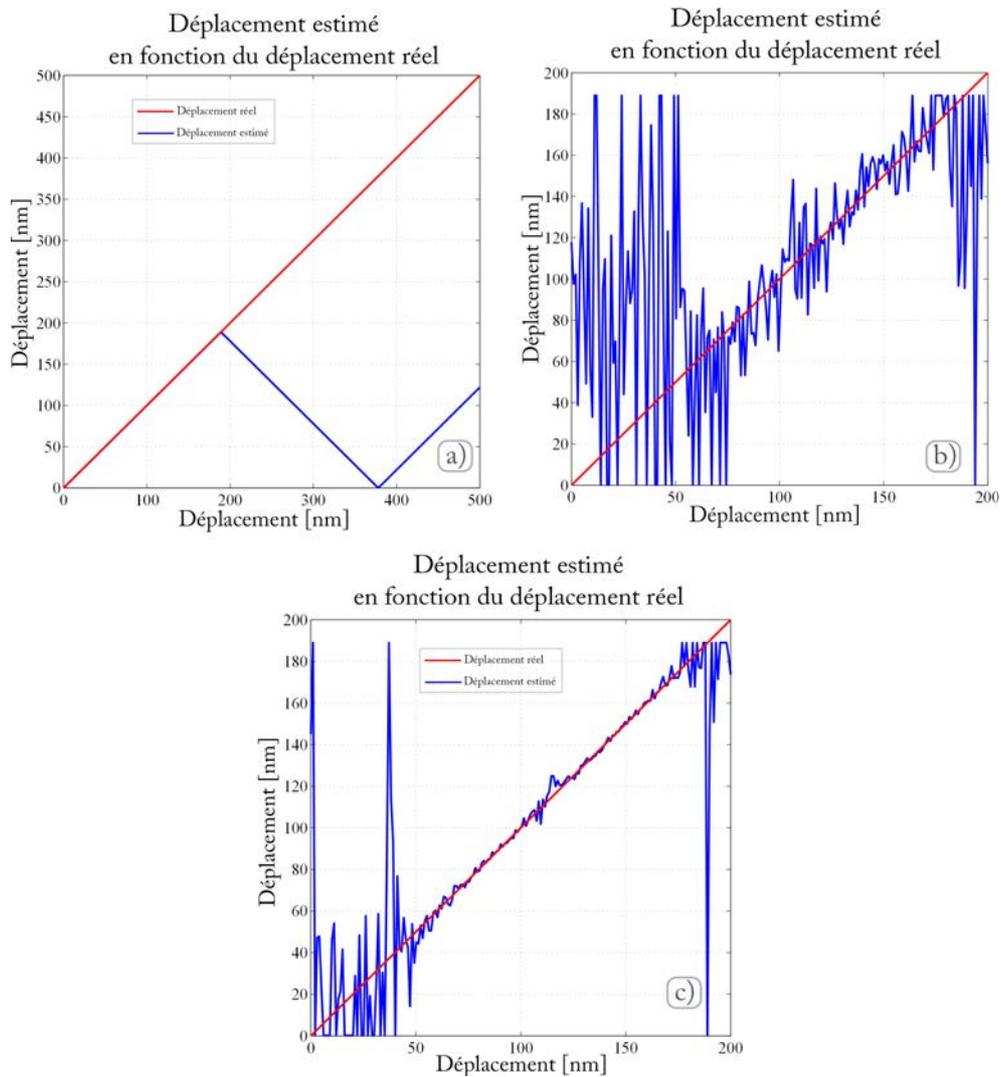
Dans ce chapitre, nous avons présenté différentes méthodes que nous avons testées afin de mesurer de manière plein champ les déplacements locaux dans les milieux biologiques. A l'issue de cette étude nous avons identifié deux méthodes permettant la mesure du déplacement et présenté des résultats préliminaires sur gels polymères. La première

méthode est basée sur le principe de l'imagerie 4 phases et la seconde une méthode où l'amplitude de déplacement est mesuré à partir d'une sollicitation mécanique harmonique de l'échantillon.

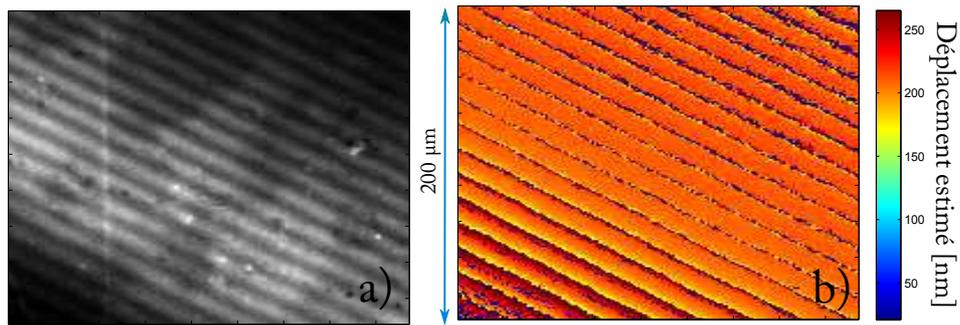
L'accès au déplacement local dans les échantillons par ces deux méthodes a deux objectifs : le premier est de développer une méthode d'élastographie statique et quasi-statique adapté à l'OCT plein champ qui ne nécessite pas dégrader la résolution de l'OCT plein champ et qui devrait permettre d'accéder à des paramètres viscoélastique. Le second objectif est de pouvoir utiliser les nanoparticules magnétiques comme sonde locale de rigidité [112]. Bien que les résultats présentés dans ce chapitre soient préliminaires, la comparaison entre nos simulations et les résultats obtenus en OCT classique nous donne confiance en cette approche, notamment, en ce qui concerne l'utilisation des nanoparticules magnétiques dont la validation expérimentale devrait être réalisée très bientôt.



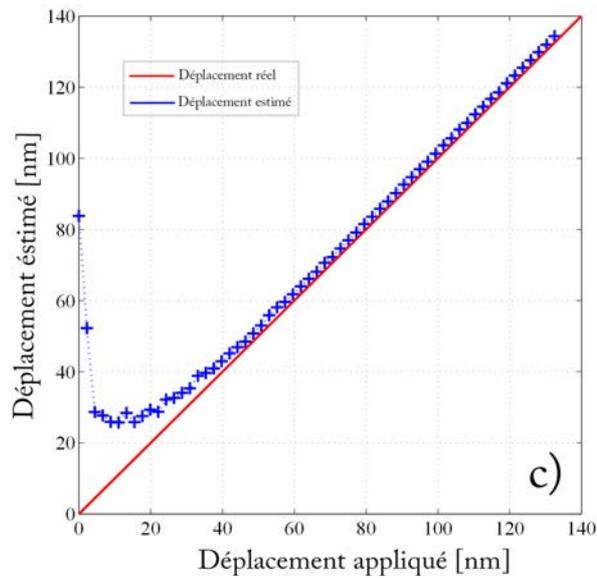
**Figure 6.10** – Résultats de simulations pour la méthode harmonique à deux modulations de fréquence  $f_1 = 4 \text{ Hz}$  et  $f_2 = 7 \text{ Hz}$  et une amplitude de déplacement dans le bras de référence de  $50 \text{ nm}$ . a) estimation des déplacements à partir de signaux non bruités, b) valeur absolue de la transformée de Fourier de la dérivée temporelle du signal OCT plein champ simulée sans bruit pour un déplacement de  $30 \text{ nm}$  et c-d) respectivement les estimations des déplacements à partir de signaux bruités pour 1 et 10 accumulations.



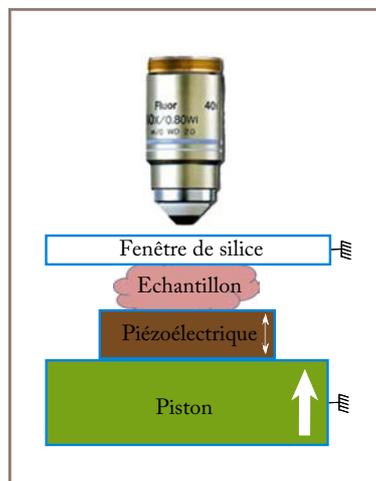
**Figure 6.11** – Résultats de simulations pour la méthode par modulation 4 phases de l'échantillon. a) estimation des déplacements à partir de signaux non bruités, b) même estimation qu'en b) mais à partir de signaux bruités et c) effets de 100 accumulations sur l'estimation des déplacements à l'aide de cette méthode.



Déplacement estimé en fonction du déplacement appliqué



**Figure 6.12** – Résultats expérimentaux pour la méthode par modulation 4 phases de l'échantillon. a) image OCT plein champ de la zone où nous effectuons l'estimation, b) image des déplacements estimés pour un déplacement appliqué à l'interface silice/air de 200 nm et c) image correspondant à la moyenne sur toute la zone de l'estimation du déplacement pour différents déplacements appliqués.



**Figure 6.13** – Schéma de principe du porte échantillon utilisé pour les méthodes d'élastographie quasi-statique.

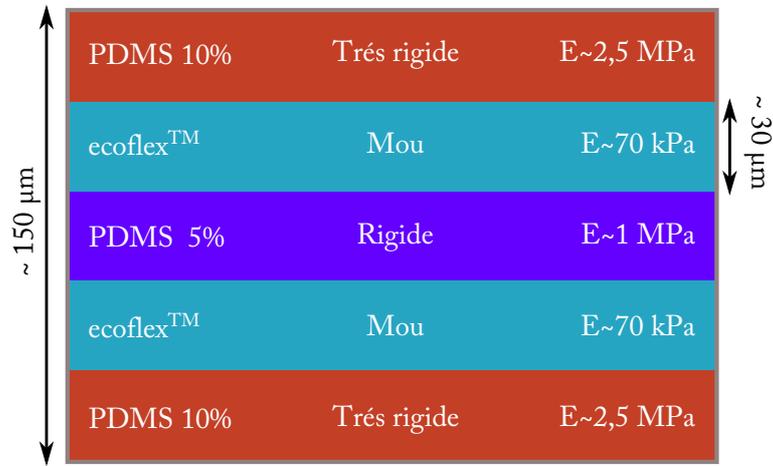


Figure 6.14 – Schéma de l'échantillon test de polymères.

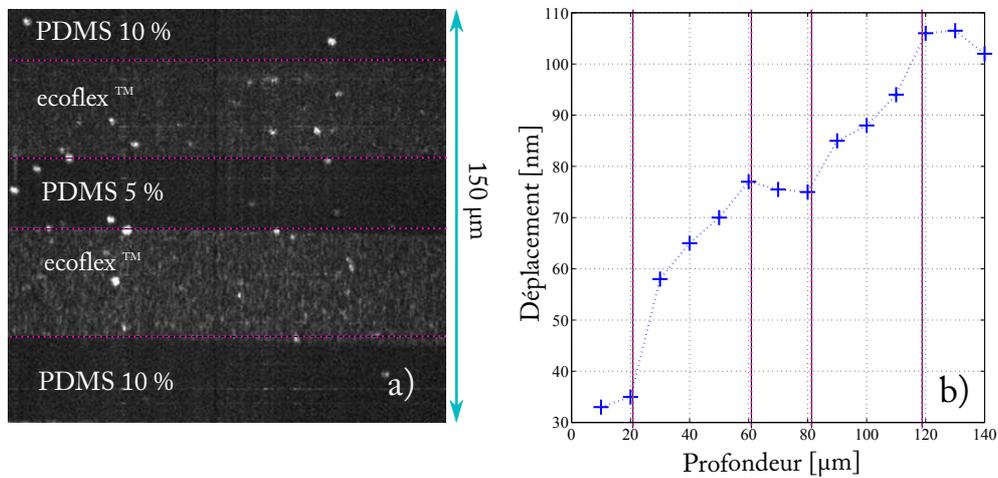
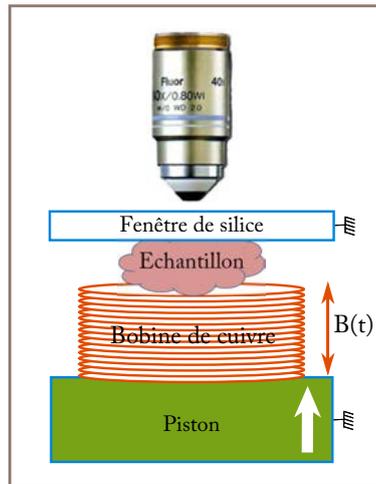
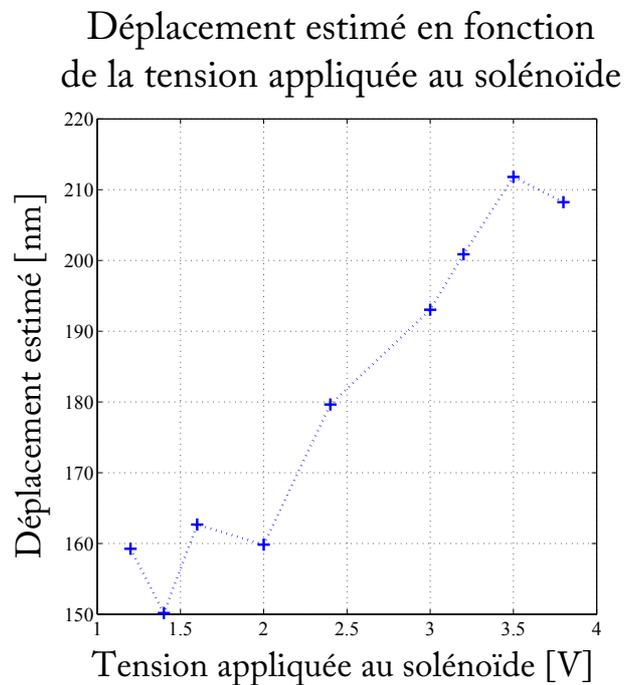


Figure 6.15 – Résultats expérimentaux sur un échantillon test de polydiméthylsiloxane (PDMS) et d'ecoflex™. L'image a) présente une coupe transversale de l'image volumique d'OCT plein champ où l'on distingue les 5 couches de polymères de rigidité différente. L'image b) est le profil de la déformation en fonction de la profondeur obtenue pour une moyenne de 100 pixels. Sur ce profil on distingue aussi les différentes couches, notamment les couches d'ecoflex™ qui se déforment beaucoup plus que les autres (cf. pente de la courbe).



**Figure 6.16** – Schéma de principe du porte échantillon utilisé pour les méthodes d'élastographie quasi-statique par sollicitation magnétique.



**Figure 6.17** – Amplitude de déplacement de la surface de la plaque de fer en fonction de la tension appliquée au solénoïde.

---

Elastographie par suivi de la propagation des ondes de cisaillement par OCT plein champ

---

**Table des matières**

---

7.1	Estimation du module de cisaillement à partir du film de la propagation de l'onde . . . . .	<b>114</b>
7.1.1	Etat de l'art . . . . .	115
7.1.2	Les ondes guidées . . . . .	117
7.1.3	Cas de l'OCT plein champ . . . . .	118
7.2	Montage expérimental et génération de l'onde de cisaillement . . . . .	<b>120</b>
7.2.1	Génération d'onde de cisaillement par pression de radiation . . . . .	120
7.2.2	Montage expérimental . . . . .	122
7.2.3	Performances . . . . .	123
7.2.4	Méthode . . . . .	124
7.3	Détection de l'onde de cisaillement par OCT plein champ et mesure de la vitesse locale . . . . .	<b>125</b>
7.3.1	Détection de l'onde de cisaillement par OCT plein champ . . . . .	125
7.3.2	Estimation de la vitesse locale . . . . .	126
7.3.3	Quelle résolution attendre? . . . . .	127
7.4	Résultats expérimentaux . . . . .	<b>127</b>
7.4.1	Résultats sur les échantillons tests . . . . .	127
7.4.2	Résultat sur des échantillons biologiques : échantillons de cerveau de rat <i>ex vivo</i> . . . . .	129

---

Dans ce chapitre, nous allons présenter la dernière méthode mise en place afin d'ajouter le contraste d'élastographie aux images d'OCT plein champ. Cette méthode, dynamique, est issue de l'adaptation à l'OCT plein champ de travaux effectués en acoustique à l'institut Langevin (Paris). L'originalité réside dans l'utilisation de l'élastographie par suivi de la propagation des ondes de cisaillement dans les milieux biologiques. Dans le chapitre 4, nous avons vu que pour un solide infini, homogène, isotrope et non visqueux, il existe une relation directe de proportionnalité entre la vitesse de propagation d'une onde de cisaillement et la racine du module de cisaillement. Dans ce chapitre, nous allons tirer parti de cette relation et nous proposons une méthode permettant d'estimer le module de cisaillement à partir d'une mesure locale de la vitesse de l'onde de cisaillement par OCT plein champ. Dans les tissus biologiques, nous nous plaçons à l'échelle micrométrique, accessible à l'OCT plein champ.

Nous présenterons tout d'abord comment de simples facteurs géométriques, comme la présence d'une surface, modifient fortement la relation entre la vitesse de l'onde de cisaillement et le module de cisaillement. Ensuite, nous décrirons le montage expérimental mis en place ainsi que la méthode utilisée afin de détecter la propagation de l'onde de cisaillement. Enfin, nous verrons les résultats obtenus sur des échantillons tests et sur des tissus biologiques.

*Publication associé au chapitre :*

- Amir Nahas, Mickaël Tanter, Thu-Mai Nguyen, Jean-Marie Chassot, Mathias Fink et A. Claude Boccara. "From supersonic shear wave imaging to full-field optical coherence shear wave elastography." *Journal of biomedical optics* 18.12 (2013) : 121514–121514.

## 7.1 Estimation du module de cisaillement à partir du film de la propagation de l'onde

Comme discuté au chapitre 4, la vitesse de propagation des ondes de cisaillement, dans les milieux infinis et homogènes, donne accès au module de cisaillement  $\mu$ . Cependant, les milieux biologiques ne sont ni homogènes, ni infinis. Dans cette partie, nous nous intéressons aux méthodes d'estimation du module de cisaillement mises en place en acoustique ainsi qu'en IRM au travers d'un bref état de l'art. Nous traiterons notamment des méthodes d'inversion et des difficultés de transposer ces méthodes aux images acquises par OCT plein champ. Ensuite, nous nous intéresserons aux ondes acoustiques guidées et à leur effet sur l'estimation du module de cisaillement. Nous étudierons enfin plus particulièrement le cas de l'OCT plein champ et de la sous-estimation systématique de la vitesse de l'onde, la mesure OCT plein champ étant faite en surface.

### 7.1.1 Etat de l'art

#### Inversion directe

La méthode d'inversion directe est une méthode d'estimation du module de cisaillement par inversion locale de l'équation de propagation de l'onde de cisaillement sous certaines hypothèses.

Dans le cas d'un milieu solide linéaire élastique, infini, isotrope, homogène par partie et non visqueux, comme nous l'avons vu au chapitre 4, l'équation de Lamé peut être écrite comme la propagation d'une onde de compression se propageant à une vitesse  $c_L = \sqrt{\frac{\lambda + 2\mu}{\rho}}$  et d'une onde de cisaillement se propageant à une vitesse  $c_T = \sqrt{\frac{\mu}{\rho}}$ . Comme les milieux biologiques sont quasi-incompressibles on a  $\lambda \gg \mu$  et ainsi, la propagation de ces deux ondes a lieu à des échelles temporelles différentes. La propagation de l'onde de cisaillement est donc solution de l'équation :

$$\mu \Delta \vec{u}_T = \rho \frac{\partial^2 \vec{u}}{\partial t^2} \quad (7.1)$$

Dans le cas qui nous intéresse où l'onde de cisaillement est polarisée rectilignement, le vecteur de déplacement  $\vec{u}$  peut être décrit par un scalaire  $s$  représentant le déplacement selon l'axe de polarisation. Ainsi l'équation 7.1 peut s'écrire comme :

$$\mu \Delta s = \rho \frac{\partial^2 s}{\partial t^2} \quad (7.2)$$

A partir de cette équation, en supposant que le module de cisaillement est localement constant, il est possible d'estimer le module de cisaillement local comme :

$$\forall t, \mu = \rho \frac{\frac{\partial^2 s}{\partial t^2}}{\Delta s} \quad (7.3)$$

Afin de limiter les cas où le Laplacien est nul, l'estimation est en pratique réalisée dans le domaine de Fourier sur la bande de fréquence du signal tel que :

$$\mu = \frac{\rho}{\delta\omega} \int \frac{\frac{\partial^2 s}{\partial t^2}}{\Delta s} d\omega \quad (7.4)$$

Ainsi, cette méthode permet à partir du film de la propagation de l'onde de cisaillement d'estimer localement le module de cisaillement. Cependant, cette méthode présente le grand désavantage d'être très sensible au bruit [114]. C'est pour cela que dans la majorité des cas l'algorithme d'inversion par temps de vol, qui est plus robuste vis-à-vis du bruit, est préféré à l'inversion directe.

#### Inversion par temps de vol

Une autre méthode d'inversion est possible. Cette méthode d'inversion est appelée en géophysique l'approximation Eikonal [115] et a de nombreuses applications en contrôle non destructif [116]. Cette approximation suppose que l'onde mécanique se propage dans

un milieu quasi-homogène ou peu contrasté. Ainsi, dans un tel milieu, le module de cisaillement peut s'écrire à partir de l'équation 4.12 comme :

$$\mu = \rho c_T^2 \quad (7.5)$$

avec  $c_T$  la vitesse de groupe de l'onde de cisaillement.

Pour des milieux quasi-homogènes, la mesure locale de la vitesse de groupe de l'onde de cisaillement permet une estimation directe du module de cisaillement. Cette méthode a été introduite en acoustique à l'institut Langevin (Paris) durant la thèse de T. Deffieux [117]. Elle a permis d'améliorer considérablement la robustesse de l'estimation du module de cisaillement vis-à-vis du bruit notamment en permettant les mesures *in vivo*.

### Limitation et problématique pour l'application à l'OCT plein champ

Afin d'estimer le module de cisaillement à partir du film de la propagation de l'onde, une limitation flagrante des méthodes utilisées dans la littérature est que pour chacune des deux méthodes précédentes (qui sont les plus couramment utilisées) la quasi-homogénéité est supposée. Comme nous l'avons vu au chapitre 4 cette approximation n'est pas justifiée pour les tissus biologiques qui possèdent de forts contrastes élastiques. Ainsi, un certain nombre d'artefacts se produisent, notamment des artefacts de diffraction : au niveau des hétérogénéités l'onde est diffractée et elle interfère avec l'onde initiale ce qui va perturber la vitesse de l'onde de cisaillement.

En échographie et en IRM, dans de nombreux cas cette approximation n'est pas problématique, bien qu'il y ait des artefacts, cette méthode permet de détecter avec une bonne sensibilité la présence d'une inclusion dans un milieu homogène et d'estimer assez bien le module de cisaillement de cette inclusion. Par exemple, c'est le cas des tumeurs mammaires : les tissus mammaires ont un module de cisaillement assez homogène (à l'échelle du millimètre sondé par l'échographie et l'IRM) alors que certain type de tumeur modifie fortement la rigidité du tissu. Cependant, contrairement à l'échographie et l'IRM qui possèdent des résolutions typiquement du millimètre, l'OCT plein champ possède une résolution de typiquement 1 à 2  $\mu m$ . Cette haute résolution nous donne accès à l'échelle cellulaire. A cette échelle, il n'est pas possible d'être dans des situations de type inclusion sur fond homogène comme en acoustique ou en IRM. En effet, les contrastes de cisaillement sont très grands par exemple entre les parois cellulaires, l'intérieur des cellules ou bien le collagène.

Ainsi, afin de pouvoir estimer de manière quantitative le module de cisaillement en OCT plein champ à partir du film de la propagation de l'onde de cisaillement une inversion plus complète doit être réalisée. Une bonne piste d'algorithme plus complet pourrait être la méthode d'inversion globale proposé par B. Arnal [114] durant sa thèse, cette méthode est très prometteuse.

C'est pour cela que dans la suite de ce chapitre nous n'estimerons le module de cisaillement (par inversion par temps de vol) uniquement dans le cas d'échantillons homogènes et non pour les milieux biologiques.

## 7.1.2 Les ondes guidées

Dans ce paragraphe nous étudierons un cas particulier d'hétérogénéités des échantillons qui sont les hétérogénéités semi-infinies. Ce type d'hétérogénéités se retrouve pour de nombreux cas dans les milieux biologiques. Les plus connues sont : la surface de l'échantillon, les différentes couches de la peau (épiderme, derme, etc.), les parois artérielles et les couches constituant la cornée.

L'étude de ce type d'hétérogénéités est essentielle. En effet, elles modifient fortement la vitesse de propagation des ondes mécaniques aux environs des interfaces sur des dimensions de l'ordre de la longueur d'onde de l'onde acoustique. En milieu biologique l'onde de cisaillement possède typiquement une longueur d'onde de 5 à 20 mm. Ainsi, comme en OCT plein champ les images sont prises en surface de l'échantillon jusqu'à des profondeurs d'environ 200  $\mu\text{m}$  : ce qui est mesuré n'est plus une onde de cisaillement pure mais une onde de surface qui, comme nous le verrons dans la suite, possède une vitesse de propagation qui ne s'exprime pas facilement en fonction des propriétés mécaniques.

### Origines d'ondes mécaniques guidées

Lorsqu'un solide est limité dans l'espace, par exemple par une surface plane solide / air, cette frontière impose des conditions sur les grandeurs mécaniques. Notamment, la continuité des paramètres physiques entre les différents milieux impose à l'interface que la propagation d'une onde satisfasse simultanément les équations de propagation de chaque milieu. Ainsi, la résolution de ce système d'équation nous permet de montrer qu'une simple surface plane solide / air agit comme un guide d'onde.

### Les principaux types d'ondes mécaniques guidées dans les solides

Comme nous l'avons vu dans le chapitre 4, dans les solides infinis il se propage deux types d'ondes : les ondes transversales de cisaillement de vitesse  $v_T$  polarisées perpendiculairement à la direction de propagation et les ondes longitudinales de compression de vitesse  $v_L$  polarisées selon la direction de propagation. A la surface d'un solide les conditions aux limites vont faire apparaître de nouveaux types d'ondes. Nous présentons ici brièvement les caractéristiques des ondes de surface de Rayleigh, de Love et de Stoneley puis le cas des ondes de plaques avec les ondes de Lamb. Il existe d'autres géométries de guidage comme le guidage cylindrique, plus d'informations sont disponibles à la référence [73].

**Ondes de Rayleigh** En 1885, Lord Rayleigh prédit mathématiquement l'existence d'une onde de surface à l'interface entre l'air et un solide de surface plane, de grande dimension devant les longueurs d'ondes acoustiques. Les ondes de Rayleigh font à l'heure actuelle l'objet de nombreuses applications, notamment en électronique, sismologie et prospection pétrolière. Ces ondes ont un mouvement complexe, elles sont la combinaison entre une onde transversale et une onde longitudinale déphasées de  $\pi$  et se propageant à une vitesse  $v_{\text{Rayleigh}}$  que l'on peut exprimer analytiquement en

fonction de la vitesse de propagation de l'onde transverse  $v_T$  [118] tel que :

$$v_{Rayleigh} = \frac{0.87 + 1.12\eta}{1 + \eta} v_T \quad (7.6)$$

avec  $\eta$  le coefficient de Poisson du milieu solide.

**Ondes de Scholte** Ces ondes sont l'équivalent des ondes de Rayleigh dans le cas d'une interface solide / liquide. De la même manière que les ondes de Rayleigh, les ondes de Scholte sont polarisées elliptiquement dans un plan perpendiculaire à la surface. L'une des principales applications de ce type d'onde est la détection d'objet dans les fonds marins [119]. Dans notre cas, comme nous utilisons des objectifs de microscope à immersion, nous sommes en présence de ce type d'onde qui malheureusement, à notre connaissance, ne possèdent pas d'expression analytique pour leur vitesse de propagation.

**Ondes de Stoneley** Ces ondes sont aussi l'équivalent des ondes Rayleigh mais dans le cas d'une interface solide / solide. Comme pour les ondes de Scholte ce sont des ondes polarisées elliptiquement dans un plan perpendiculaire à la surface dont la vitesse de propagation n'a pas d'expression analytique (à notre connaissance) et dont la vitesse dépend des différentes propriétés mécaniques des deux milieux en regard.

**Ondes de Love** En 1911, Augustus Edward Hough Love découvrit l'existence d'un nouveau type d'ondes, les ondes de Love. De la même manière que pour les types d'ondes précédents, les ondes de Love sont des ondes de surface se propageant à l'interface entre deux milieux aux propriétés mécaniques différentes. Contrairement aux autres ondes de surface, les ondes de Love sont polarisées dans un plan parallèle à l'interface. Dans notre cas, ce type d'onde ne nous a pas intéressés puisque notre système d'OCT plein champ n'est sensible qu'aux déplacements normaux à la surface.

**Ondes de plaques : ondes de Lamb** Lorsque deux surfaces sont suffisamment proches l'une de l'autre (de l'ordre de la longueur d'onde de l'onde de surface) les ondes de surface de chaque interface vont interférer et générer ainsi des ondes de plaques. Dans le cas d'interfaces solide / air, il existe une expression analytique de la vitesse de propagation des ondes de Lamb. A notre connaissance, il n'en existe pas pour les autres types d'interfaces (sauf cas de symétrie particulière). En élastographie par onde de cisaillement, l'étude de ce type d'onde est essentielle, notamment afin de pouvoir appliquer ces mesures d'élastographie à des tissus comme la cornée qui sont relativement homogènes mais avec une structure de plaques [120].

### 7.1.3 Cas de l'OCT plein champ

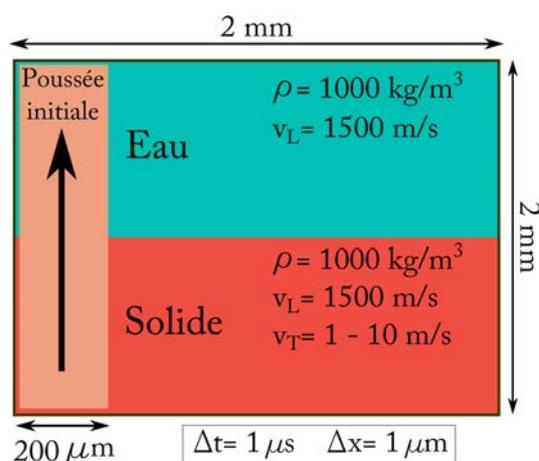
Comme nous l'avons dit précédemment, les mesures d'OCT plein champ sont des mesures faites à la surface des échantillons. Ainsi, nous n'avons pas accès aux ondes de volume mais uniquement aux ondes de surface. Dans le cas simple d'une interface *solide / air*, il est toujours possible d'exprimer analytiquement la vitesse de propagation de l'onde de

Rayleigh en fonction du module de cisaillement. Cependant, dans notre cas, l'échantillon est immergé dans un liquide de couplage (eau ou huile de silicone). Dans ce cas, à notre connaissance, il n'existe pas d'expression analytique pour la vitesse de l'onde de Scholte. Afin de pouvoir réaliser des mesures quantitatives de module de cisaillement pour des milieux semi-infinis homogènes, à l'aide de simulation numérique [121] nous avons déterminé une relation empirique entre la vitesse de propagation de l'onde de Scholte et la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement (volumique).

### Simulation *SimSonic*

Afin de simuler notre expérience, nous avons choisi d'utiliser le logiciel libre *SimSonic* développé par E. Bossy [121]. Ce logiciel permet de simuler par une méthode de différence fini la propagation d'onde acoustique dans les milieux élastiques non-visqueux avec une liberté totale de choix des propriétés élastiques ainsi que de la géométrie des sources et du milieu étudié.

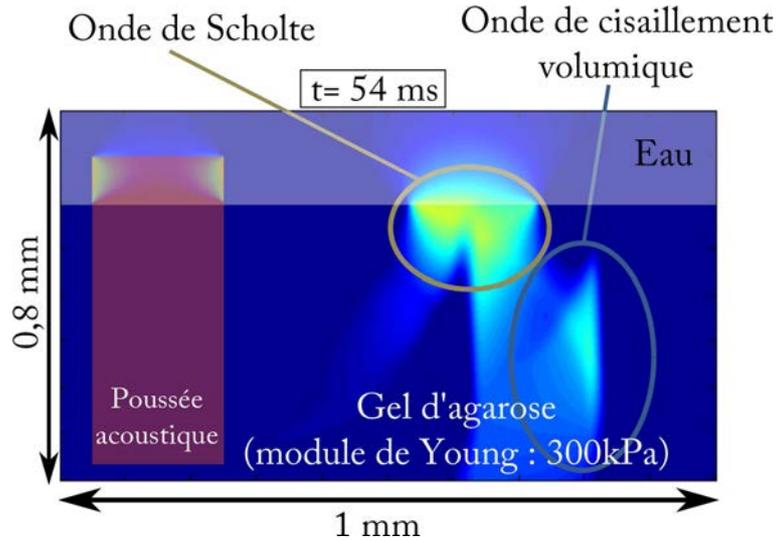
Dans notre cas, le système que nous étudions (figure 7.1) est un volume de  $2 \times 2 \text{ mm}^2$  avec un maillage spatial de  $1 \mu\text{m}$  et un pas temporel de  $1 \mu\text{s}$ . Les conditions à la frontière du domaine sont prises comme parfaitement absorbantes. La source acoustique que nous avons choisie est une poussée verticale de durée de  $10 \mu\text{s}$  (qui correspond à la tâche focale du transducteur acoustique que nous utilisons *cf.* paragraphe suivant).



**Figure 7.1** – Schéma du milieu utilisé pour les simulations *SimSonic*.

Ainsi, nous avons pu simuler sur le premier millimètre de l'échantillon la propagation des ondes générées par la poussée initiale. La figure 7.2 présente un résultat de simulation pour un solide homogène avec  $\{v_L = 1500 \text{ m/s}, v_T = 10 \text{ m/s}\}$ . Ce résultat illustre bien la différence de vitesse de propagation entre l'onde de surface (plus lente) et l'onde de volume.

L'objectif est de déduire une relation empirique entre la vitesse de propagation de l'onde de cisaillement volumique et l'onde de Scholte. Dans ce but nous avons simulé la propagation de l'onde de surface pour différents modules de cisaillement (de 1 à  $100 \text{ kPa}$ ) correspondant aux modules de cisaillement rencontrés dans les tissus biologiques. A partir



**Figure 7.2** – Résultat d’une simulation SimSonic d’un milieu semi-infini de module de Young de  $300 \text{ kPa}$ . Cette figure représente en niveau de couleur les déplacements induit dans le milieu selon l’axe verticale  $54 \text{ ms}$  après la poussée acoustique.

de ces simulations nous avons trouvé une relation assez directe entre la vitesse de propagation de l’onde de Scholte et la vitesse de propagation de l’onde de cisaillement dans le volume. Ainsi, de nos simulations nous avons établi la relation suivante entre la vitesse de l’onde de Scholte  $v_{Scholte}$  et l’onde de cisaillement  $v_T$  :

$$v_{Scholte} = 0.664 \times v_T + 0.01 \times v_T^2 \quad (7.7)$$

La figure 7.3 présente les résultats des simulations qui nous ont permis d’établir cette relation.

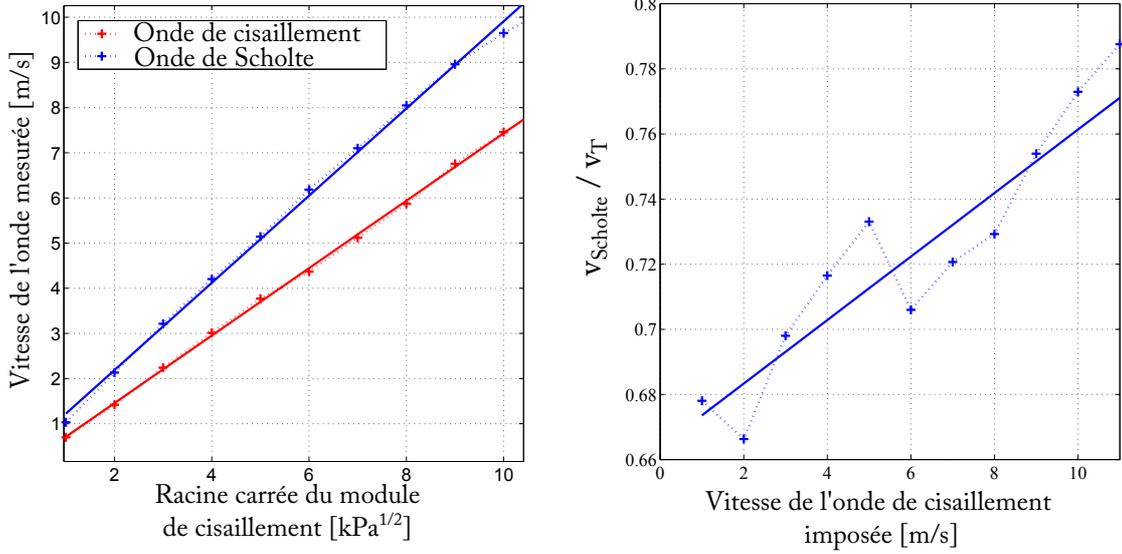
Ces simulations nous ont permis de mettre à jour une relation directe entre la vitesse de l’onde de Scholte et la vitesse de l’onde de cisaillement volumique dans le cas d’une interface entre de l’eau et un solide non-visqueux, semi-infini homogène aux propriétés mécaniques proches de celles des tissus biologiques. De plus, on notera le facteur de proportionnalité de 0.7 qui justifie l’importance de la prise en compte de cette correction lors de nos mesures. Plus d’informations sur le fonctionnement du logiciel SimSonic sont disponibles à la référence [122].

## 7.2 Montage expérimental et génération de l’onde de cisaillement

### 7.2.1 Génération d’onde de cisaillement par pression de radiation

Durant cette étude nous avons utilisé un échographe commercial programmable *Aixplorer*<sup>®</sup> de la société Supersonic Imaging (France). Il est muni d’une barrette ultrasonore conçue

Vitesse des ondes de cisaillement et de Scholte  
en fonction du module de cisaillement



**Figure 7.3** – Résultats de simulations pour des milieux isotropes, semi-infinis de rigidité différente. A gauche le graphique représente les vitesses de propagation des ondes de Scholte et des ondes volumiques de cisaillement en fonction de la racine carrée du module de cisaillement  $\sqrt{\mu}$ . A droite est représenté le quotient entre la vitesse de propagation des ondes de Scholte et des ondes volumiques de cisaillement en fonction de la racine carrée du module de cisaillement  $\sqrt{\mu}$ .

par la société Vermon (France) constituée de 128 éléments de 100  $\mu\text{m}$  fonctionnant à la fréquence de 15  $\text{MHz}$  avec une distance focale dans la direction normale au plan d'imagerie de 12  $\text{mm}$  (aussi appelée distance focale en élévation).

Afin de générer une onde acoustique dans notre échantillon, nous avons utilisé le déplacement engendré par la pression de radiation ultrasonore. En effet, la pression de radiation provient d'un transfert de quantité de mouvement entre l'onde et le milieu de propagation [123]. La variation de quantité de mouvement le long de l'axe de propagation induit une force  $f_{pr}$  proportionnelle à l'intensité acoustique et à l'atténuation de l'onde (typiquement 0,3  $\text{dB/cm/MHz}$ ), tel que :

$$\vec{f}_{pr} = 2\alpha \cdot \frac{P_0}{\rho \cdot c_L^2} \cdot \vec{u}_i \quad (7.8)$$

avec  $\alpha$  le coefficient d'atténuation de l'onde de compression,  $c_L$  la vitesse de groupe de l'onde de compression,  $\rho$  la densité du milieu et  $P_0$  l'amplitude de pression.

Ainsi, en focalisant une onde de compression à l'aide de la barrette échographique, il est possible de générer localement une force qui va localement déplacer le milieu. Lorsqu'on arrête d'appliquer cette force, le milieu déplacé va relaxer et dans le cas élastique revenir à sa position initiale. Cette relaxation va générer localement une onde de cisaillement se propageant perpendiculairement à la force appliquée et polarisée dans la direction de cette force. Pour la géométrie de barrette échographique que nous avons choisie et à une fréquence ultrasonore de 15  $\text{MHz}$  la tâche focale est un cylindre d'extension axiale de

1 mm et d'extension latérale de 200  $\mu\text{m}$ .

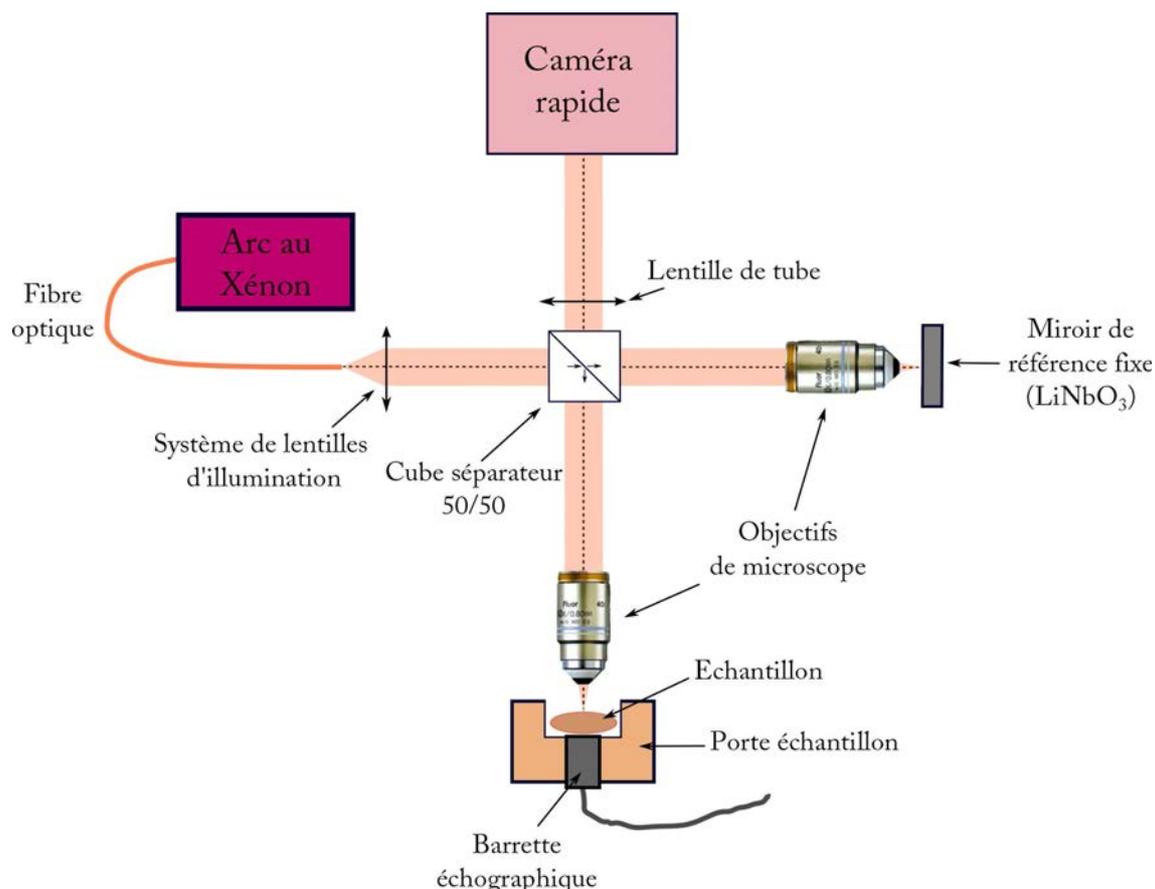
Ainsi, en émettant une onde acoustique durant une dizaine de microsecondes nous générons localement une poussée qui engendre une onde de cisaillement avec typiquement une amplitude de déplacement d'une centaine de nanomètres dans les tissus biologiques. En outre, l'utilisation d'une barrette linéaire permet une grande flexibilité quant à la position du point focal et nous permet de choisir facilement, sans déplacement mécanique, l'endroit où seront générées les ondes de cisaillement.

### 7.2.2 Montage expérimental

L'objectif de cette étude étant de filmer la propagation des ondes transversales dans les milieux biologiques, toute la gageure a été de développer un système d'OCT plein champ suffisamment rapide. En effet, les ondes de cisaillement se propagent dans les tissus humains à des vitesses allant de 1 à 10  $\text{m/s}$ . Ainsi, une cadence d'acquisition supérieure à 10  $\text{kHz}$  est nécessaire si l'on souhaite détecter la propagation de l'onde de cisaillement sur un champ de vue de 1  $\text{mm}^2$ . C'est pour cela que nous avons construit un montage d'OCT plein champ (figure 7.4) permettant d'atteindre des fréquences d'acquisition allant jusqu'à 30  $\text{kHz}$  sur un champ de vue de  $470 \times 235 \mu\text{m}^2$  et 10  $\text{kHz}$  pour un champ de vue de  $800 \times 800 \mu\text{m}^2$ .

Afin d'atteindre ces fréquences d'acquisition nous avons utilisé une caméra rapide (Vision Research Phantom V12,  $1024 \times 1024 \text{ pixels}$  à 10  $\text{kHz}$  ou  $512 \times 255 \text{ pixels}$  à 30  $\text{kHz}$ , 12  $\text{bits}$  et une profondeur de puits de 20000 électrons). Cette haute fréquence d'acquisition impose de très faible temps d'exposition, typiquement de 10  $\mu\text{s}$ , ce qui impose un éclairage suffisamment puissant pour remplir les puits de la caméra. La solution que nous avons choisi pour ces expériences de preuve de concept a été d'utiliser une source à arc au Xénon avec miroir ellipsoïdal (Spotlight 5310, Eurosep) couplé à une fibre optique (diamètre 0,9 mm ; NA 0,22) d'une puissance totale en sortie de fibre de 800  $\text{mW}$  dans la bande [200 – 2000]  $\text{nm}$ . De plus, afin de maximiser la puissance de l'illumination sur la zone imagée nous n'utilisons pas un montage d'illumination de type Köhler mais nous avons directement conjugué la sortie de la fibre d'illumination avec le plan d'imagerie. Cette configuration nous permet d'obtenir une illumination suffisante pour saturer la caméra mais pose certains problèmes de dose reçue par l'échantillon. Ce point sera essentiel pour le futur développement de la technique, notamment pour les approches *in vivo* où il faudra n'éclairer que pendant le temps de mesure.

Comme sur les montages présentés dans les précédents chapitres, dans chaque bras de l'interféromètre est placé un objectif de microscope 10 $\times$  de la société Olympus avec une ouverture numérique de 0,3. Le réflecteur dans le bras de référence et une interface huile de silicone d'indice d'environ 1,41 et un miroir de Niobate de lithium d'indice 2,27 à 700  $\text{nm}$  soit un coefficient de réflexion d'environ 5 %.



**Figure 7.4** – Schéma du montage OCT plein champ que nous avons mis en place afin de pouvoir filmer la propagation des ondes mécaniques de cisaillement dans les milieux biologiques.

## 7.2.3 Performances

### Résolution transversale

Comme dans les précédents chapitres, la résolution transversale de la détection est uniquement dépendante des objectifs de microscope. Pour les objectifs  $10\times$  d'ouverture 0,3 utilisés la résolution théorique est de  $1.5\ \mu\text{m}$ . Nous l'avons vérifié expérimentalement à l'aide de mires *USAF*.

### Résolution axiale

Pour cette expérience, nous avons utilisé une source à arc au Xénon qui, contrairement aux LED ou aux lampes halogènes qui ont un spectre très lisse, possède un spectre avec de nombreux pics (voir figure 7.5a). Ces pics sont assez dérangeants puisque, comme nous l'avons vu précédemment, la forme de la coupe optique est directement liée à la transformée de Fourier du spectre de l'illumination. La figure 7.5b représente le degré de cohérence en fonction de la différence de marche. On constate que la présence des pics fond apparaitre des rebonds dans la coupe OCT. Malgré cela, en ne prenant en compte que le pic central, la résolution axiale mesuré est de environ  $1,5\ \mu\text{m}$ .

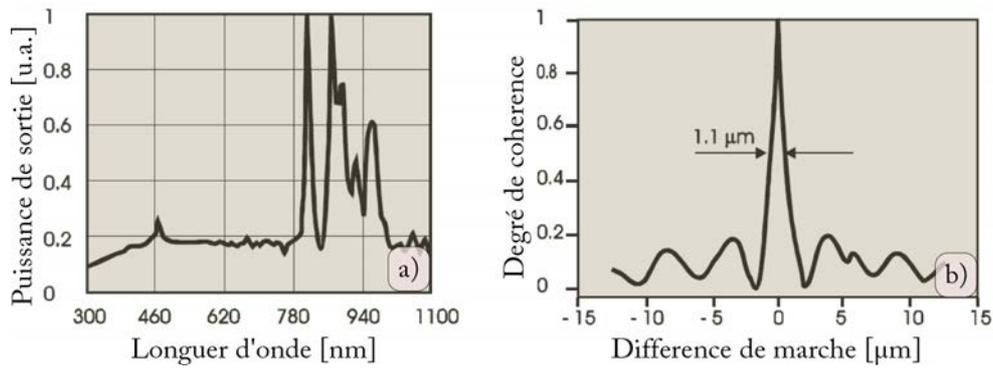


Figure 7.5 – Spectre et cohérence temporelle de la source à arc au Xénon d’après [22]

## Cadence d’acquisition et champ de vue

La cadence d’acquisition est donnée par la fréquence d’acquisition de la caméra. Le champ de vue dépend du couple : objectif de grossissement optique/taille du capteur. Ici la cadence d’acquisition est de 10 à 30  $kHz$  pour respectivement des champs de vue de  $950 \times 950 \mu m^2$  et  $471 \times 235 \mu m^2$ .

## Sensibilité

De la même manière que précédemment, nous définissons la sensibilité comme le plus petit coefficient de réflectivité détectable :  $R_{min}$ . La valeur de  $R_{min}$  est définie avec un rapport signal sur bruit de 1 en considérant uniquement le bruit de photons. En calculant de la même manière qu’au chapitre 2 nous obtenons avec ce montage expérimental :

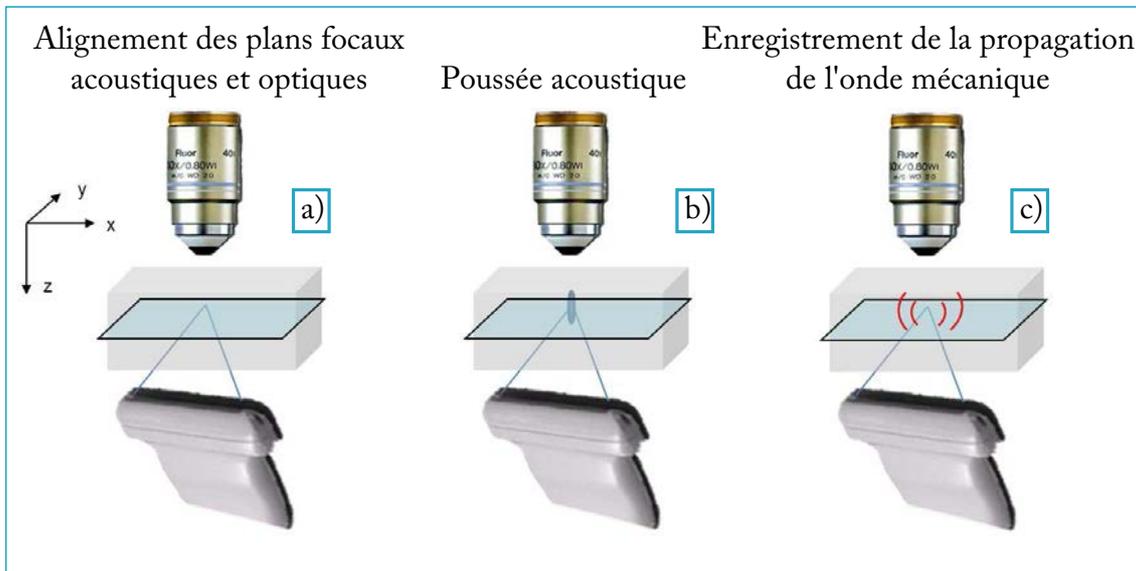
$$R_{min} = 5 \times 10^{-7} \quad (7.9)$$

pour une image sans accumulation.

### 7.2.4 Méthode

L’objectif est d’enregistrer la propagation des ondes transversales mécaniques. Nous procédons en 3 étapes (comme résumé sur le schéma de la figure 7.6). La première étape est l’alignement des plans focaux acoustiques et optiques. Cette étape nous assure une onde transversale générée dans le plan d’imagerie du système d’OCT plein champ et un contrôle de la position de la source mécanique par rapport au champ de vue optique. Cette étape n’est pas triviale et nécessite souvent beaucoup de temps. Un premier réglage grossier est réalisé en utilisant l’image échographique de l’objectif du microscope comme référence. Ensuite, en minimisant le temps entre l’arrivée de l’onde de cisaillement dans le champ de vue et le moment de la poussée acoustique, nous arrivons, après plusieurs itérations, à aligner le point focal acoustique dans le champ de vue du système d’OCT plein champ. A partir de là, à l’aide d’un vernier, nous pouvons placer où nous voulons

le point focal acoustique. Une fois la position du point focal choisie, la deuxième étape consiste à focaliser les ondes de compression émises par la barrette échographique et ainsi générer une poussée locale dans l'échantillon. La dernière étape concerne l'enregistrement du film de l'interférogramme de la propagation de l'onde transverse générée à l'aide du système d'OCT plein champ (dont le miroir de référence est fixe).



**Figure 7.6** – Schéma illustrant le principe combinant l'OCT plein champ et les ondes de cisaillement générées par pression de radiation acoustique. a) Première étape : les plans focaux acoustiques et optiques sont alignés. b) Deuxième étape : focalisation des ondes de compression émises par la barrette échographique pour générer des ondes de cisaillement polarisées selon l'axe  $z$ . c) Dernière étape : enregistrement de la propagation de l'onde mécanique générée avec notre système rapide d'OCT plein champ.

## 7.3 Détection de l'onde de cisaillement par OCT plein champ et mesure de la vitesse locale

### 7.3.1 Détection de l'onde de cisaillement par OCT plein champ

En se propageant l'onde de surface va générer localement un déplacement de typiquement une centaine de nanomètres. Ce déplacement étant très inférieur à la résolution latérale de notre système, le dispositif est uniquement sensible au déplacement selon l'axe optique  $u(t)$  (à l'ouverture numérique près). Ces déplacements selon l'axe optique vont moduler localement la figure d'interférence. Ainsi, l'intensité optique  $I$  reçue par chaque pixel de la caméra peut s'écrire comme :

$$I = I_0 + \alpha \cdot \cos(2k \cdot u(t) + \phi_i) \quad (7.10)$$

avec  $I_0$  l'intensité optique qui serait mesurée sans interférence,  $\alpha$  un facteur directement relié à l'amplitude rétrodiffusée par l'échantillon (à la profondeur observée) et la phase

initiale  $\phi_i$  différente pour chaque pixel.

Il est intéressant de noter que la modulation locale de la figure d'interférence va tout naturellement permettre de détecter la propagation de l'onde de surface. En effet, l'intensité reçue par un pixel de la caméra est constante (au bruit près) jusqu'au moment où l'onde passe par ce pixel et vient moduler le terme d'interférence. Ainsi, (pour des rapports signal sur bruit suffisants) il est assez facile de détecter le passage de l'onde mécanique.

Afin de visualiser directement le film de la propagation de l'onde, nous soustrayons au film de propagation une image de l'interférogramme avant la génération de l'onde mécanique. En pratique ceci est réalisé en commençant les acquisitions 50 *ms* avant la génération de l'onde mécanique. A partir du film de ces 50 *ms* nous définissons le signal initial  $I_{ini}$  comme la moyenne temporelle de ces premières images. Et pour finir nous soustrayons  $I_{ini}$  au film de propagation afin d'obtenir sur chaque pixel un signal  $I_{diff}$  proportionnel au cosinus de la phase et donc directement relié au déplacement local, tel que :

$$I_{diff} = \alpha \cdot (\cos(2k \cdot u(t) + \phi_i) - \cos(\phi_i)) \quad (7.11)$$

soit :

$$I_{diff} = -2\alpha \cdot \sin(k \cdot u(t)) \cdot \sin(k \cdot u(t) + \phi_i) \quad (7.12)$$

Ainsi, dans la suite de ce chapitre, quand nous présentons des images de la propagation de l'onde mécanique ces images représentent des images de ce film dont nous prenons la valeur absolue.

### 7.3.2 Estimation de la vitesse locale

Dans notre cas, l'estimation de la vitesse locale est moins évidente que pour les autres méthodes d'imagerie telles que l'échographie ou l'IRM. Par exemple, afin de pouvoir exploiter au maximum la fréquence d'acquisition de notre caméra, nous n'utilisons pas de méthodes 3 ou 4 phases. Utilisées en échographie et IRM ces méthodes donnent un accès direct à la mesure de la phase et ainsi à une estimation du déplacement.

Afin de mesurer la vitesse locale, la méthode la plus utilisée est le calcul de la corrélation temporelle de la phase du signal pixel par pixel (qui est directement reliée au déplacement local). Le décalage temporel est estimé à partir du maximum de corrélation et connaissant la distance entre les deux pixels il est possible d'en déduire la vitesse locale de l'onde.

Dans notre cas, nous n'avons pas accès à la phase mais à un signal dépendant de plusieurs paramètres (cf. équation 7.10). Ce signal varie en fonction du cosinus de la phase induite par le déplacement et il varie aussi en fonction de la phase initiale non contrôlée pouvant être différente pour chaque pixel. Ainsi, la phase initiale va fortement agir sur la forme du signal temporel que l'on va détecter ce qui va induire des erreurs sur l'estimation par corrélation. Cependant, nous avons tout de même utilisé cette méthode afin d'estimer la vitesse locale car, pour notre dispositif, comme nous le verrons au paragraphe suivant, la résolution spatiale et temporelle est très largement limitée par la fréquence de la caméra. Néanmoins, ce type d'erreur due à la phase initiale devra être pris en compte dans le cas de fréquence d'acquisition plus haute ou bien lors des approches stroboscopiques que nous sommes actuellement en train de mettre en place à l'institut Langevin (Paris). Une

manière simple de limiter ce type d'erreur serait par exemple d'utiliser une méthode 3 phases bien que cela réduise par 3 la fréquence d'acquisition.

### 7.3.3 Quelle résolution attendre ?

Bien que nous acquérions à la résolution de l'imagerie OCT plein champ, il faut garder à l'esprit la grande complexité de la détermination de la résolution spatiale des vitesses locales de déplacement. Nous travaillons par ailleurs à une meilleure compréhension de la résolution spatiale afin d'améliorer nos prochaines études.

Actuellement, notre mesure de vitesse se fait par corrélation temporelle des signaux entre pixels. La figure 7.7 présente le signal OCT plein champ d'un pixel pour une expérience faite sur un cerveau de rat *ex vivo*. Comme attendu, le temps de montée du signal mesuré est déterminé par 2 paramètres : la vitesse de l'onde de surface (ici  $0,43 \text{ m/s}$ ) et la dimension transversale de la tâche focale acoustique qui génère l'onde mécanique (ici environ  $200 \mu\text{m}$ ). L'estimation du temps de vol entre 2 pixels correspond à la différence de temps d'arrivée du front d'onde sur chaque pixel. Cette estimation va dépendre du temps de montée, du rapport signal sur bruit des pixels sur lesquels la corrélation est calculée, de la fréquence d'échantillonnage (la fréquence d'acquisition de la caméra) et de la phase initiale de chaque pixel.

Comme le rapport signal sur bruit dépend directement du signal OCT plein champ qui est différent pour chaque pixel, il est très difficile de calculer une sensibilité caractéristique pour l'image entière.

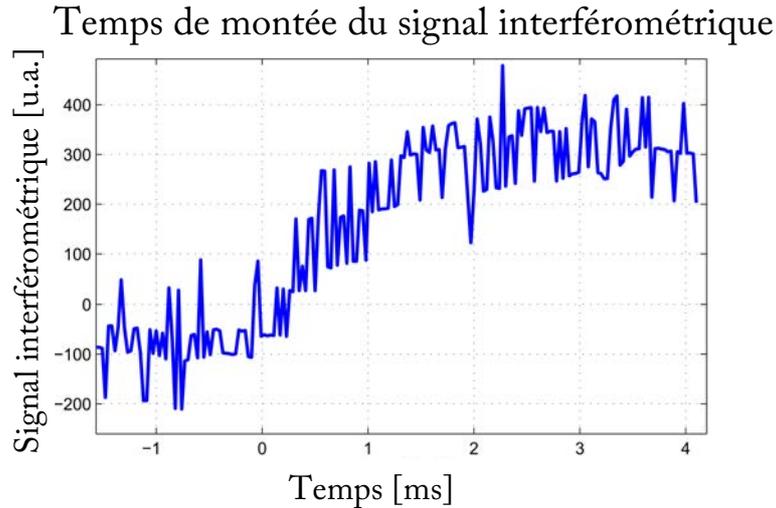
A titre d'exemple, pour un niveau de signal correspondant à la figure 7.7 (cerveau de rat *ex vivo*), nous sommes capables de déterminer expérimentalement une sensibilité spatiale. Pour une fréquence de caméra de  $30 \text{ kHz}$ , un temps de montée d'environ  $2 \text{ ms}$  et un niveau de signal correspondant à celui présenté figure 7.7, nous pouvons approximativement estimer que le plus petit décalage temporelle mesurable est de  $150 \text{ ms}$ . Ainsi, avec une vitesse de l'onde mécanique mesurée de  $0,43 \text{ m/s}$ , comme nous le verrons dans la partie résultats, ce plus petit décalage temporelle mesurable correspond à une précision dans le positionnement de l'onde de  $65 \mu\text{m}$ .

Jusqu'à présent, la principale limitation est la fréquence d'acquisition de la caméra. Cette fréquence limite fortement la résolution spatiale et la vitesse de l'onde de cisaillement mesurable. Pour surmonter cette limitation et améliorer le rapport signal sur bruit, nous travaillons actuellement sur la mise en œuvre d'une approche stroboscopique.

## 7.4 Résultats expérimentaux

### 7.4.1 Résultats sur les échantillons tests

La méthode que nous avons présentée ci-dessus a été testée sur des échantillons optiquement et mécaniquement homogènes. Les premiers échantillons testés ont été des gels de polyvinyle alcool (PVA-341584) de la société Sigma-Aldrich dans lesquels nous avons dispersé des particules d'argent issues d'une peinture argentée de la société PEBEO (PEBEO-Colorex : argent-342048). Les polymères de polyvinyle alcool ont la particularité

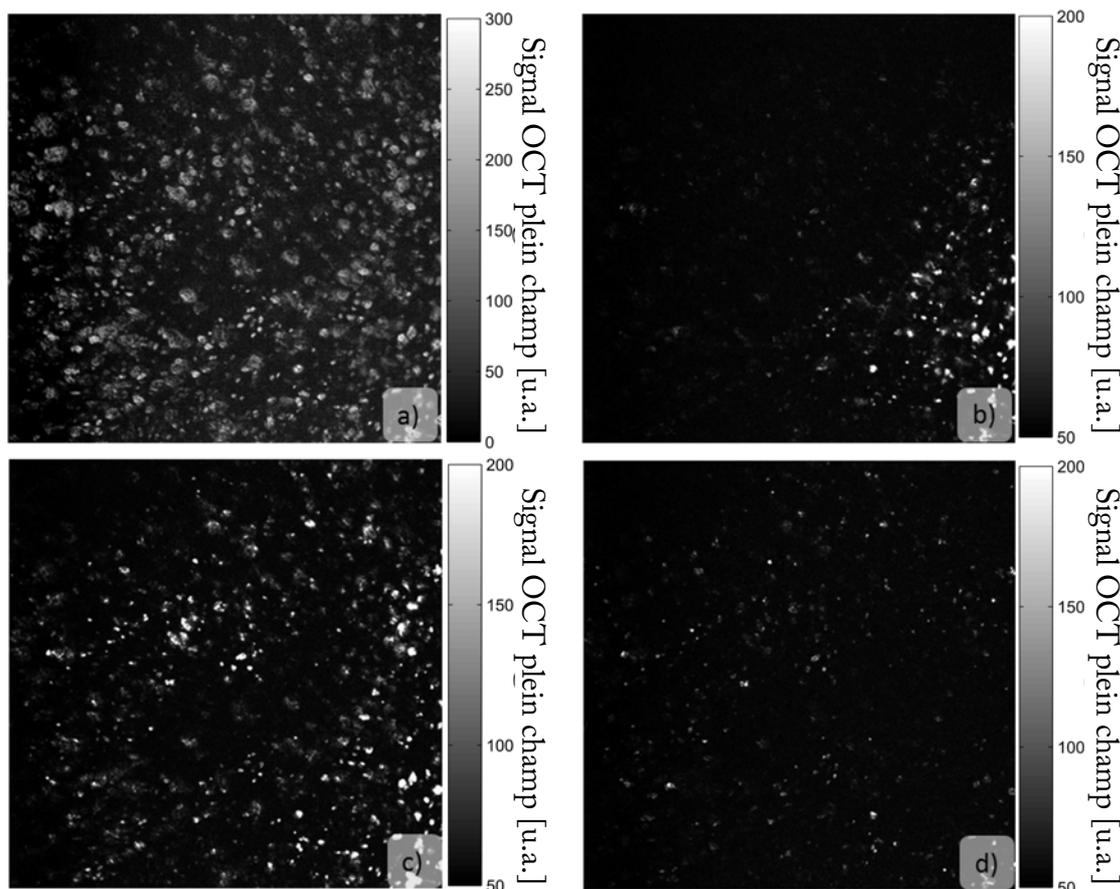


**Figure 7.7** – Variation temporelle du signal interférométrique pour un pixel de la caméra d'une mesure réalisé sur un cerveau de rat *ex vivo*.

de réticuler lors de cycles de congélation. Ainsi, il est possible de régler la raideur de nos échantillons par le nombre de cycle de congélation que l'on fait subir à l'échantillon. La figure 7.8 présente les résultats que nous avons obtenus pour un échantillon de polyvinyle alcool (avec une concentration en polyvinyle alcool de 5 % et deux cycles de congélation). La figure 7.8a présente une image standard d'OCT plein champ de l'échantillon en utilisant une modulation 4 phases classique. Les figures 7.8b-d représentent des images prises à différents moments de la propagation. Elles ont été extraites du film de la propagation auquel nous avons soustrait l'image initiale. Sur ces trois images nous observons le passage de l'onde qui se propage du coin en bas à droite de l'image vers le coin en haut à gauche. Cet enregistrement a été réalisé à 10  $kHz$  avec  $1024 \times 1024$  pixels et un temps d'exposition de 30  $\mu s$ .

Le deuxième type d'échantillons que nous avons testé sont des gels d'agarose (agarose-A9539) de la société Sigma-Aldrich dans lesquels nous avons dispersé des particules d'oxyde de zinc (ZnO-205532) de la même société. Les particules de zinc, comme les particules d'argent, nous permettent de rendre diffusants les polymères que nous étudions. Dans le cas des gels d'agarose, nous contrôlons la rigidité de l'échantillon en faisant varier la concentration en agarose de l'échantillon. Dans le tableau 7.1, nous présentons les résultats obtenus pour le gel de polyvinyle alcool que nous venons de présenter ainsi que pour un gel d'agarose possédant une concentration en particules d'oxyde de zinc de 0,2  $mg/g$  et une concentration en agarose de 1 %. Pour ce dernier échantillon nous avons acquis la propagation de l'onde mécanique à 30  $kHz$  sur  $512 \times 512$  pixels et un temps d'exposition de 30  $\mu s$ .

Pour ces deux échantillons, nous présentons tout d'abord la mesure de l'onde de cisaillement en volume faite à l'aide d'un échographe commercial. Nous présentons aussi les mesures de la vitesse de l'onde de Scholte réalisées par OCT plein champ à 10  $\mu m$  sous la surface ainsi que la vitesse de l'onde de cisaillement en volume déduite de la vitesse de propagation de l'onde de Scholte en utilisant la relation que nous avons établie par simu-



**Figure 7.8** – Images d'un échantillon de polyvinyle alcool dans lequel des particules d'argent sont dispersées. Ces images sont enregistrées à  $10000\text{ Hz}$  avec un champ de vue de  $950 \times 950\ \mu\text{m}^2$ . L'image a correspond à une image OCT plein champ classique utilisant la méthode 4 phases. On y observe une grande dispersion en taille des particules d'argent. Les images b-d représentent des images du film de la propagation de l'onde mécanique correspondant respectivement à  $t_b = 100\text{ ms}$ ,  $t_c = 300\text{ ms}$  et  $t_d = 800\text{ ms}$ .

lation (voir précédemment). Comme le tableau 7.1 le montre, nous observons une bonne corrélation entre la vitesse de l'onde de cisaillement en volume estimée par le système acoustique commercial et notre estimation par OCT plein champ.

#### 7.4.2 Résultat sur des échantillons biologiques : échantillons de cerveau de rat *ex vivo*

Comme l'objectif final de cette étude est d'aider le diagnostic médical en complétant les images d'OCT plein champ par des informations de rigidité « quantitative », nous avons testé notre méthode sur des échantillons biologiques. Nous présentons ici un résultat préliminaire que nous avons obtenu sur un cerveau de rat *ex vivo*. Nous avons sondé tout le cerveau mais la zone étudiée correspond à la surface du lobe frontal du cortex. La figure 7.9a présente une image standard d'OCT plein champ de l'échantillon en utilisant une modulation 4 phases classique. Les figures 7.9b-e représentent des images prises à différents moments à partir du film de la propagation auquel nous avons soustrait l'image

	Vitesse de l'onde de Scholte mesurée par OCT plein champ [ $m/s$ ]	Vitesse de l'onde de cisaillement mesurée avec le système acoustique commercial [ $m/s$ ]	Vitesse de l'onde de cisaillement correspondant à la vitesse de l'onde de Scholte mesurée par OCT plein champ [ $m/s$ ]
Polyvinyle alcool - Argent	1,2	$1,5 \pm 0,2$	1,77
Agarose – Oxyde de zinc	3,95	$5,0 \pm 0,2$	5,6

**Table 7.1** – Résultats des mesures de vitesse de propagation des ondes mécaniques pour un échantillon de polyvinyle alcool / particules d'argent et un échantillon d'agarose / particules d'oxyde de zinc.

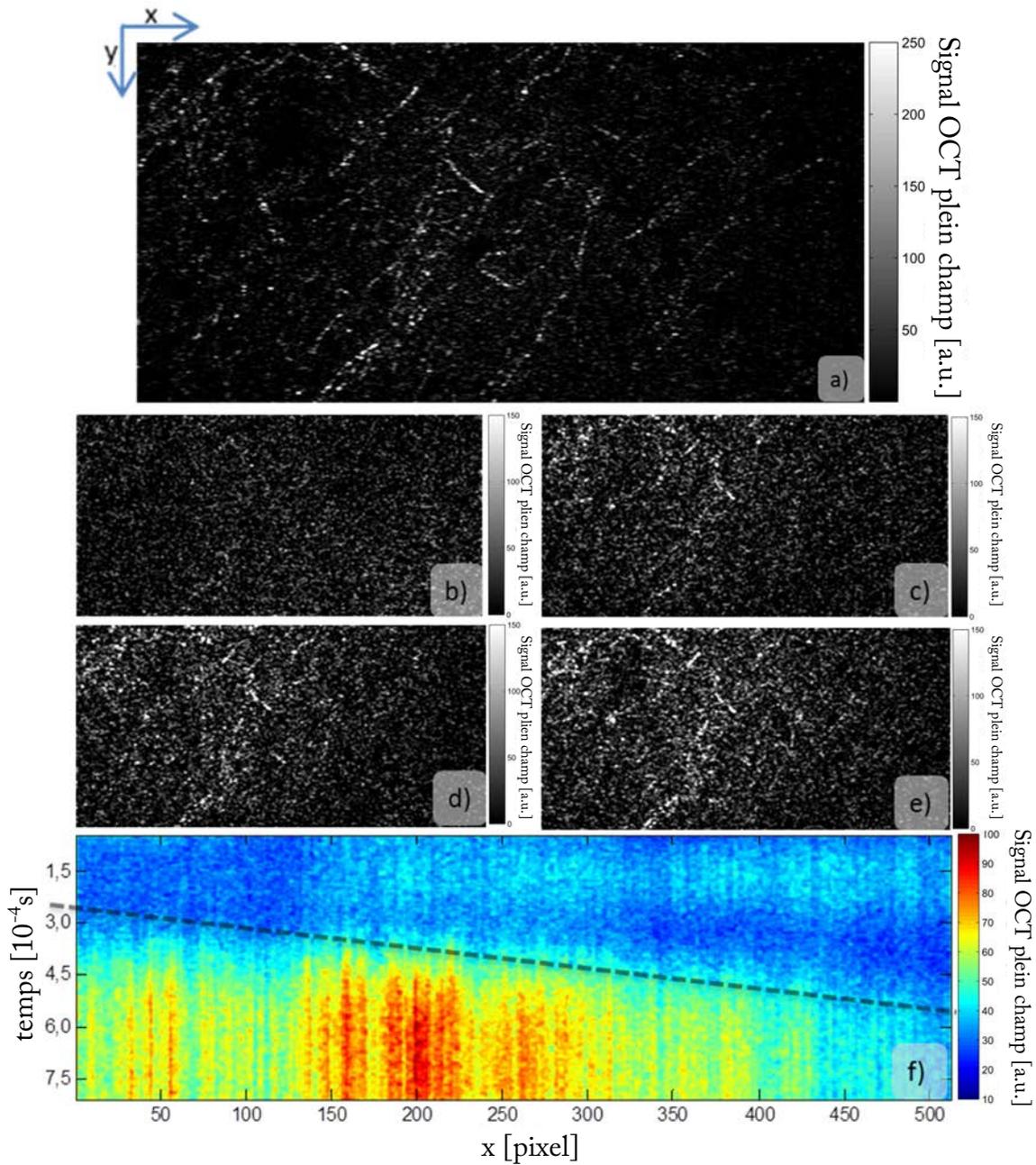
initiale. Sur ces quatre images nous observons le passage de l'onde qui se propage du coin en haut à gauche de l'image vers le coin en bas à droite. Cet enregistrement a été réalisé à  $30\text{ kHz}$  avec  $512 \times 255$  pixels et un temps d'exposition de  $30\ \mu s$ . La figure 7.9f représente l'évolution temporelle du signal OCT plein champ moyenné selon l'axe  $y$ . Ainsi, ce profil nous permet d'apprécier la propagation du front d'onde mécanique de la gauche vers la droite (schématisé par la ligne en pointillé). De plus, à partir du film de la propagation de l'onde mécanique nous pouvons estimer une valeur moyenne de la vitesse de propagation de l'onde (temps mis par l'onde pour traverser tout le champ) : nous estimons une vitesse de l'onde de Scholte de  $0,43\text{ m/s}$ . Cette vitesse correspond à une vitesse de l'onde de cisaillement volumique de  $0,64\text{ m/s}$  correspondant pour un solide infini homogène à un module de cisaillement de  $0,41\text{ kPa}$ . Cette dernière valeur est assez faible mais elle correspond assez bien aux valeurs trouvées dans la littérature en ultrasons [124] et en IRM [125].

## Conclusion et discussions

Dans ce chapitre nous avons présenté la troisième méthode que nous avons développée afin d'ajouter aux images d'OCT plein champ le contraste d'élastographie. Cette méthode est une méthode dynamique basée sur la capacité de l'OCT plein champ à filmer la propagation d'une onde de cisaillement dans un milieu diffusant et elle est basée sur le fait que la vitesse locale de propagation des ondes de cisaillement peut être reliée à la rigidité locale dans les solides. Cette relation entre la rigidité locale et la vitesse de propagation des ondes de cisaillement est complexe et fortement dépende de la géométrie, notamment dans les milieux hétérogènes que sont les milieux biologiques aux échelles accessibles à l'OCT plein champ. Malgré cela, comme c'est le cas pour l'échographie et l'IRM, nous espérons que ce contraste permette d'aider au diagnostic.

Lors de cette première étude nous avons utilisé une caméra rapide possédant des fréquences

d'acquisition de 10 à 30  $kHz$ . A notre connaissance, cette caméra nous a permis de réaliser les premiers films de propagation en temps réel d'onde de cisaillement dans des milieux biologiques comme le cerveau de rat *ex vivo* (aux échelles accessibles par l'OCT plein champ). Pour l'instant, la sensibilité et la résolution spatiale de la mesure du champ de vitesse sont limitées par la caméra. C'est pour cela qu'actuellement nous travaillons à un dispositif stroboscopique qui permettra de grandement améliorer les performances de nos mesures. De plus, notre objectif est d'aider au diagnostic. Nous avons l'intention de tester cette méthode sur des tissus pathologiques, comme les tissus tumoraux mammaires, afin de savoir si le contraste que nous apportons est comparable aux résultats d'histologie.



**Figure 7.9** – Images d'un lobe frontal du cortex de cerveau de rat *ex vivo* enregistrées à  $30\text{ kHz}$  avec un champ de vue de  $471 \times 235\ \mu\text{m}^2$ . L'image a correspond à une image OCT plein champ classique 4 phases. A ce niveau de signal sur bruit, on constate que la grande majorité du signal provient des fibres de myélines. Les images b-e représentent des images du film de la propagation de l'onde mécanique correspondant respectivement à  $t_b = 0\text{ ms}$ ,  $t_c = 0,6\text{ ms}$ ,  $t_d = 1,2\text{ ms}$  et  $t_e = 1,8\text{ ms}$ . L'image f correspond à l'évolution temporelle du signal OCT plein champ selon l'axe  $x$ , moyenné selon l'axe  $y$ . La ligne en pointillé schématise la propagation du front d'onde mécanique de la gauche vers la droite.

### Conclusion générale

L'OCT plein champ est une technique d'imagerie permettant de faire de la microscopie dans les milieux diffusants en sélectionnant la profondeur d'imagerie grâce à l'interférométrie. La haute résolution de l'OCT plein champ permet de fournir des images voisines des coupes histologiques en temps réel et sans préparation préalable des échantillons. Cependant, bien que les dernières études montrent une bonne corrélation entre les diagnostics faits à partir d'images OCT plein champ et ceux faits à partir d'images d'histologie (notamment dans le cas de pathologies modifiant fortement la morphologie), dans certain cas, le contraste uniquement morphologique n'est pas suffisant pour d'établir un diagnostic. C'est dans ce cadre que s'est inscrite cette thèse. Elle a eu pour objectif de développer de nouvelles modalités de contrastes pour l'imagerie OCT plein champ.

Dans cette optique, nous avons travaillé sur la détection optique et photo-thermique de nanoparticules d'or par OCT plein champ et la cartographie des propriétés mécaniques par trois méthodes. Le but était de développer de nouveaux types de contrastes qui pourront permettre d'améliorer le diagnostic.

### Nanoparticules d'or comme agent de contraste

Durant cette thèse, deux méthodes ont été développées afin de détecter la présence de nanoparticules d'or dans les tissus diffusants. Les deux méthodes que nous avons décrites tirent avantage de la résonance des propriétés optiques de diffusion et d'absorption des nanoparticules d'or à la résonance plasmon. La première méthode exploite la résonance des propriétés de rétrodiffusion. A partir d'une paire d'images prise avant et à la résonance de plasmon localisé de la nanoparticule, elle extrait le signal issu des nanoparticules du signal issu des autres diffuseurs. Nous avons appliqué avec succès cette méthode à des échantillons polymères. Cependant, elle est difficilement applicable aux milieux très diffusants. C'est pour cela que nous avons développé en parallèle une méthode basée sur l'effet photo-thermique et l'utilisation des nanoparticules d'or comme sources thermiques. Cette deuxième méthode mesure la variation transitoire du signal d'OCT plein champ

afin de détecter et de localiser les sources thermiques. Nos premiers résultats obtenus sur des échantillons biologiques sont très prometteurs. Contrairement à ce qui a été réalisé précédemment en OCT classique, à notre connaissance, cette méthode permet notamment la localisation des sources thermiques encore plus profondément que ce qui est accessible par l'imagerie OCT. Afin d'améliorer cette technique, nous travaillons actuellement à complexifier le modèle auquel les signaux expérimentaux sont comparés et nous étudions si cette méthode peut être adaptée à l'utilisation d'absorbeurs endogènes comme source thermique (comme c'est le cas en photo-acoustique).

Ainsi, les perspectives de ces travaux sont d'une part l'utilisation des nanoparticules d'or (ou d'autres particules possédant des résonances de plasmon localisé) comme nouvel agent de contraste exogène et à plus long terme à l'ajout d'un contraste d'absorption aux images d'OCT plein champ.

## Le contraste élastographique

Une grande partie de cette thèse a été dédiée à l'ajout du contraste d'élastographie à l'OCT plein champ. Cette étude a été fortement motivée par les bons résultats obtenus par l'ajout du contraste d'élastographie en ultrason et en IRM. Cette thèse a permis de développer trois approches afin d'ajouter cette nouvelle modalité à l'OCT plein champ.

### Approche statique basée sur la corrélation d'images

Utiliser la corrélation d'images digitales afin d'accéder aux propriétés mécaniques locales est une technique et une méthode bien connue. Au cours de notre étude nous l'avons appliquée avec succès à l'imagerie d'OCT plein champ. Elle nous a permis de cartographier localement les déplacements induits dans un milieu biologique sous contrainte et à partir de cette cartographie d'extraire des paramètres comme la déformation locale, l'anisotropie de déformation ou la compressibilité qui peuvent être reliées à des propriétés mécaniques de l'échantillon. Ce contraste de déformation donne notamment de très bons résultats dans le cas de tissus possédant une géométrie en couches successives comme la cornée et la peau. Mais, dans le cas de géométries plus complexes, le lien entre déformation et modules mécaniques est plus compliqué. Afin d'améliorer ce point, d'une part, nous avons développé un capteur de force locale adapté à l'OCT plein champ et d'autre part, au travers d'une collaboration avec l'équipe du professeur H. Ammari à l'ENS Ulm, nous travaillons sur une résolution du problème inverse afin d'accéder aux modules élastiques à partir de la cartographie des déplacements.

Ainsi, les perspectives pour cette méthode sont : une amélioration vers une mesure plus quantitative des propriétés mécaniques et l'étude d'échantillons pathologiques afin de déterminer si une mesure des propriétés mécaniques à cette échelle aide le diagnostic.

### **Approche quasi-statique basée sur la modulation locale du signal d'OCT plein champ**

Cette approche a permis de développer deux méthodes adaptées à l'OCT plein champ. Elles permettent d'accéder à une imagerie plein champ des déplacements locaux dans les échantillons diffusants. Les résultats préliminaires que nous avons présentés sur des gels polymères sont prometteurs. Notamment, l'une des perspectives de ces travaux est l'utilisation de nanoparticules magnétiques (déjà utilisées comme agent de contraste pour l'IRM) comme sonde locale de rigidité, simplement en mesurant le déplacement généré par l'application d'une force magnétique.

### **Approche dynamique basée sur la propagation des ondes de cisaillement**

Le développement de cette approche a été motivé par le lien direct entre la vitesse de propagation des ondes de cisaillement et une valeur quantitative du module de cisaillement dans un milieu homogène. Afin de filmer la propagation des ondes de cisaillement à l'échelle du micromètre, nous avons construit un montage d'OCT plein champ très rapide avec des fréquences d'acquisition allant jusqu'à 30 *kHz*. A l'aide de ce montage nous avons montré la faisabilité d'une détection par OCT plein champ des ondes de cisaillement dans des milieux biologiques comme le cerveau de rat *ex vivo*.

Aux échelles accessibles par l'OCT plein champ, il n'est pas possible d'approximer les milieux biologiques à des milieux homogènes. Ainsi, dans la très grande majorité des cas, les vitesses des ondes de cisaillement ne permettent pas un accès facile à une valeur quantitative de rigidité. Cependant, pour l'application à l'aide au diagnostic, une valeur quantitative exacte n'est pas absolument nécessaire : pouvoir simplement observer une modification des propriétés mécaniques pour un même tissu peut suffire.

La continuité de ces travaux sera de tester cette méthode sur des tissus pathologiques et d'utiliser une approche stroboscopique afin d'améliorer la résolution et la sensibilité de cette technique.



---

## Références

---

- [1] Tuan Vo-Dinh. *Biomedical photonics handbook*. CRC press, 2010.
- [2] Tadeusz Sarna and Harold A Swartz. The physical properties of melanins. *The Pigmentary System : Physiology and Pathophysiology, Second Edition*, pages 311–341, 1998.
- [3] Steven L Jacques. Skin optics. *Oregon Medical Laser Center News*, 1998(1) :1–9, 1998.
- [4] Canada Natural Phenomena Simulation Group, University of Waterloo. Human skin : <http://www.npsg.uwaterloo.ca/data/skin.php>.
- [5] Akira Ishimaru. *Wave propagation and scattering in random media*, volume 2. Academic press New York, 1978.
- [6] AP Gibson, JC Hebden, and Simon R Arridge. Recent advances in diffuse optical imaging. *Physics in medicine and biology*, 50(4) :R1, 2005.
- [7] A Villringer, J Planck, C Hock, L Schleinkofer, and U Dirnagl. Near infrared spectroscopy (nirs) : a new tool to study hemodynamic changes during activation of brain function in human adults. *Neuroscience letters*, 154(1) :101–104, 1993.
- [8] Daniel Dolfi and Francois Micheron. Imaging process and system for transillumination with photon frequency marking, December 29 1992. US Patent 5,174,298.
- [9] Salma Farahi. *Méthodes holographiques et spectroscopiques appliquées à l'imagerie acousto-optique de milieux diffusants épais*. PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI, 2011.
- [10] Emilie Benoit à la Guillaume. *Imagerie acousto-optique dans les milieux diffusants épais : de l'amélioration technique à l'application pré-clinique ex vivo*. PhD thesis, Paris 6, 2013.
- [11] Alaxander Graham Bell. Production of sound by radiant energy. *J. Franklin Inst*, 111(6) :401–428, 1881.
- [12] Lihong V Wang and Song Hu. Photoacoustic tomography : in vivo imaging from organelles to organs. *Science*, 335(6075) :1458–1462, 2012.
- [13] M Minsky. Microscopy apparatus : Us 3,013,467.
- [14] Jerome Mertz. *Introduction to optical microscopy*. Roberts, 2010.

- [15] Jerome Mertz. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nature methods*, 8(10) :811–819, 2011.
- [16] Peter Kner, Bryant B Chhun, Eric R Griffis, Lukman Winoto, and Mats GL Gustafsson. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nature methods*, 6(5) :339–342, 2009.
- [17] Emeric Mudry, Kamal Belkebir, J Girard, Julien Savatier, E Le Moal, C Nicoletti, Marc Allain, and Anne Sentenac. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns. *Nature Photonics*, 6(5) :312–315, 2012.
- [18] Elvire Guiot. *Microscopie de fluorescence sous excitation à deux photons : application à des études de corrélations et de déclins de fluorescence en milieu biologique*. PhD thesis, 2001.
- [19] L Wang, Ping Pei Ho, X Liang, H Dai, and RR Alfano. Kerr-fourier imaging of hidden objects in thick turbid media. *Optics letters*, 18(3) :241–243, 1993.
- [20] Michael D Duncan, Rita Mahon, Lawrence L Tankersley, and J Reintjes. Time-gated imaging through scattering media using stimulated raman amplification. *Optics letters*, 16(23) :1868–1870, 1991.
- [21] David Huang, Eric A Swanson, Charles P Lin, Joel S Schuman, William G Stinson, Warren Chang, Michael R Hee, Thomas Flotte, Kenton Gregory, Carmen A Puliafito, et al. Optical coherence tomography. *Science*, 254(5035) :1178–1181, 1991.
- [22] Adolf F Fercher, Wolfgang Drexler, Christoph K Hitzenberger, and Theo Lasser. Optical coherence tomography-principles and applications. *Reports on progress in physics*, 66(2) :239, 2003.
- [23] Arnaud Dubois, Kate Grieve, Gael Moneron, Romain Lecaque, Laurent Vabre, and Claude Boccara. Ultrahigh-resolution full-field optical coherence tomography. *Applied Optics*, 43(14) :2874–2883, 2004.
- [24] AF Fercher, K Mengedoht, and W Werner. Eye-length measurement by interferometry with partially coherent light. *Optics letters*, 13(3) :186–188, 1988.
- [25] José-Philippe Pérez and Eric Anterrieu. *Optique : fondements et applications : avec 250 exercices et problèmes résolus*. Dunod, 2004.
- [26] RA Leitgeb, Martin Villiger, AH Bachmann, Lukas Steinmann, and Theo Lasser. Extended focus depth for fourier domain optical coherence microscopy. *Optics letters*, 31(16) :2450–2452, 2006.
- [27] Wolfgang Drexler and James G Fujimoto. *Optical coherence tomography : technology and applications*. Springer, 2008.
- [28] J Schwider and Liang Zhou. Dispersive interferometric profilometer. *Optics letters*, 19(13) :995–997, 1994.
- [29] Adolph F Fercher, Ch K Hitzenberger, G Kamp, and Sy Y El-Zaiat. Measurement of intraocular distances by backscattering spectral interferometry. *Optics Communications*, 117(1) :43–48, 1995.
- [30] R Leitgeb, C Hitzenberger, and Adolf Fercher. Performance of fourier domain vs. time domain optical coherence tomography. *Optics Express*, 11(8) :889–894, 2003.

- [31] Michael Choma, Marinko Sarunic, Changhuei Yang, and Joseph Izatt. Sensitivity advantage of swept source and fourier domain optical coherence tomography. *Optics Express*, 11(18) :2183–2189, 2003.
- [32] Joseph A Izatt, Eric A Swanson, James G Fujimoto, Michael R Hee, and Gabrielle M Owen. Optical coherence microscopy in scattering media. *Optics letters*, 19(8) :590–592, 1994.
- [33] Arnaud Dubois, Laurent Vabre, Albert-Claude Boccara, and Emmanuel Beaufrepaire. High-resolution full-field optical coherence tomography with a linnik microscope. *Applied optics*, 41(4) :805–812, 2002.
- [34] Arnaud Dubois, Juliette Selb, Laurent Vabre, and Albert-Claude Boccara. Phase measurements with wide-aperture interferometers. *Applied optics*, 39(14) :2326–2331, 2000.
- [35] DM Gale, MI Pether, and JC Dainty. Linnik microscope imaging of integrated circuit structures. *Applied optics*, 35(1) :131–148, 1996.
- [36] Arnaud Dubois. Phase-map measurements by interferometry with sinusoidal phase modulation and four integrating buckets. *JOSA A*, 18(8) :1972–1979, 2001.
- [37] Jihoon Na, Woo June Choi, Eun Seo Choi, Seon Young Ryu, and Byeong Ha Lee. Image restoration method based on hilbert transform for full-field optical coherence tomography. *Applied optics*, 47(3) :459–466, 2008.
- [38] Blandine Laude, Antonello De Martino, Bernard Drevillon, Laurence Benattar, and Laurent Schwartz. Full-field optical coherence tomography with thermal light. *Applied optics*, 41(31) :6637–6645, 2002.
- [39] S Labiau, G David, S Gigan, and AC Boccara. Defocus test and defocus correction in full-field optical coherence tomography. *Optics letters*, 34(10) :1576–1578, 2009.
- [40] Jonas Binding, Juliette Ben Arous, Jean-François Léger, Sylvain Gigan, Claude Boccara, and Laurent Bourdieu. Brain refractive index measured in vivo with high-na defocus-corrected full-field oct and consequences for two-photon microscopy. *Optics express*, 19(6) :4833–4847, 2011.
- [41] JM Lamarre. Photon noise in photometric instruments at far-infrared and submillimeter wavelengths. *Applied optics*, 25(6) :870–876, 1986.
- [42] Manu Jain, Nidhi Shukla, Maryem Manzoor, Sylvie Nadolny, Sushmita Mukherjee, et al. Modified full-field optical coherence tomography : A novel tool for rapid histology of tissues. *Journal of pathology informatics*, 2(1) :28, 2011.
- [43] Osnath Assayag, Martine Antoine, Brigitte Sigal-Zafrani, Michael Riben, Fabrice Harms, Adriano Burcheri, Bertrand Le Conte de Poly, and Claude Boccara. Large field, high resolution full field optical coherence tomography : a pre-clinical study of human breast tissue and cancer assessment. *arXiv preprint arXiv :1202.6281*, 2012.
- [44] Eugénie Dalimier and Denis Salomon. Full-field optical coherence tomography : a new technology for 3d high-resolution skin imaging. *Dermatology*, 224(1) :84–92, 2012.
- [45] Adriano Burcheri-Curatolo. *Avancées en tomographie optique plein champ pour applications cliniques et biologie du développement*. PhD thesis, Université Pierre

- et Marie Curie-Paris VI, 2012.
- [46] Moshe Wolman. Polarized light microscopy as a tool of diagnostic pathology. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 23(1) :21–50, 1975.
- [47] Gael Moneron, Albert-Claude Boccara, and Arnaud Dubois. Polarization-sensitive full-field optical coherence tomography. *Optics letters*, 32(14) :2058–2060, 2007.
- [48] GJ Tearney, ME Brezinski, BE Bouma, MR Hee, JF Southern, and JG Fujimoto. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography. *Optics Letters*, 20(21) :2258–2260, 1995.
- [49] Sohail Akhter, Mohammad Zaki Ahmad, Farhan Jalees Ahmad, Gert Storm, and Robbert J Kok. Gold nanoparticles in theranostic oncology : current state-of-the-art. *Expert opinion on drug delivery*, 9(10) :1225–1243, 2012.
- [50] Craig F Bohren and Donald R Huffman. *Absorption and scattering of light by small particles*. John Wiley & Sons, 2008.
- [51] Hendrik Christoffel Hulst and HC Van De Hulst. *Light scattering by small particles*. Courier Dover Publications, 1957.
- [52] Emmanuel Bossy. *Quelques solutions de l'équation de la chaleur*. 2014.
- [53] Joseph M Schmitt and Gitesh Kumar. Optical scattering properties of soft tissue : a discrete particle model. *Applied Optics*, 37(13) :2788–2797, 1998.
- [54] Amy L Oldenburg, Matthew N Hansen, Daniel A Zweifel, Alexander Wei, and Stephen A Boppart. Plasmon-resonant gold nanorods as low backscattering albedo contrast agents for optical coherence tomography. *Optics Express*, 14(15) :6724–6738, 2006.
- [55] Timothy S Troutman, Jennifer K Barton, and Marek Romanowski. Optical coherence tomography with plasmon resonant nanorods of gold. *Optics letters*, 32(11) :1438–1440, 2007.
- [56] André M Gobin, Min Ho Lee, Naomi J Halas, William D James, Rebekah A Drezek, and Jennifer L West. Near-infrared resonant nanoshells for combined optical imaging and photothermal cancer therapy. *Nano Letters*, 7(7) :1929–1934, 2007.
- [57] EV Zagaynova, MV Shirmanova, M Yu Kirillin, BN Khlebtsov, AG Orlova, IV Balalaeva, MA Sirotkina, ML Bugrova, PD Agrba, and VA Kamensky. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography : phantom, in vivo studies and monte carlo simulation. *Physics in Medicine and Biology*, 53(18) :4995, 2008.
- [58] Yeongri Jung, Guangying Guan, Chen-wei Wei, Roberto Reif, Xiaohu Gao, Matthew O'Donnell, and Ruikang K Wang. Multifunctional nanoprobe to enhance the utility of optical based imaging techniques. *Journal of biomedical optics*, 17(1) :0160151–0160156, 2012.
- [59] Prashant K Jain, Kyeong Seok Lee, Ivan H El-Sayed, and Mostafa A El-Sayed. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition : applications in biological imaging and biomedicine. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(14) :7238–7248, 2006.
- [60] SJ Oldenburg, RD Averitt, SL Westcott, and NJ Halas. Nanoengineering of optical resonances. *Chemical Physics Letters*, 288(2) :243–247, 1998.

- [61] Chao Zhou, Tsung-Han Tsai, Desmond C Adler, Hsiang-Chieh Lee, David W Cohen, Amy Mondelblatt, Yihong Wang, James L Connolly, and James G Fujimoto. Photothermal optical coherence tomography in *ex vivo* human breast tissues using gold nanoshells. *Optics letters*, 35(5) :700–702, 2010.
- [62] Desmond C Adler, Shu-Wei Huang, Robert Huber, and James G Fujimoto. Photothermal detection of gold nanoparticles using phase-sensitive optical coherence tomography. *Optics Express*, 16(7) :4376–4393, 2008.
- [63] Christophe Pache, Noelia L Bocchio, Arno Bouwens, Martin Villiger, Corinne Berclaz, Joan Goulley, Matthew I Gibson, Christian Santschi, and Theo Lasser. Fast three-dimensional imaging of gold nanoparticles in living cells with photothermal optical lock-in optical coherence microscopy. *Optics express*, 20(19) :21385–21399, 2012.
- [64] Ting-Ta Chi, Yi-Chou Tu, Ming-Jyun Li, Che-Kuan Chu, Yu-Wei Chang, Chih-Kang Yu, Yean-Woei Kiang, and CC Yang. Photothermal optical coherence tomography based on the localized surface plasmon resonance of au nanoring. *Optics Express*, 22(10) :11754–11769, 2014.
- [65] Yeongri Jung, Roberto Reif, Yaguang Zeng, and Ruikang K Wang. Three-dimensional high-resolution imaging of gold nanorods uptake in sentinel lymph nodes. *Nano letters*, 11(7) :2938–2943, 2011.
- [66] JM Tucker-Schwartz, TA Meyer, CA Patil, CL Duvall, and MC Skala. In vivo photothermal optical coherence tomography of gold nanorod contrast agents. *Biomedical optics express*, 3(11) :2881–2895, 2012.
- [67] AP Sarvazyan, AR Skovoroda, SY Emelianov, JB Fowlkes, JG Pipe, RS Adler, RB Buxton, and PL Carson. Biophysical bases of elasticity imaging. In *Acoustical imaging*, pages 223–240. Springer, 1995.
- [68] J Ophir, I Cespedes, Hm Ponnekanti, Y Yazdi, and X Li. Elastography : a quantitative method for imaging the elasticity of biological tissues. *Ultrasonic imaging*, 13(2) :111–134, 1991.
- [69] Mickael Tanter, Jeremy Bercoff, Alexandra Athanasiou, Thomas Deffieux, Jean-Luc Gennisson, Gabriel Montaldo, Marie Muller, Anne Tardivon, and Mathias Fink. Quantitative assessment of breast lesion viscoelasticity : initial clinical results using supersonic shear imaging. *Ultrasound in medicine & biology*, 34(9) :1373–1386, 2008.
- [70] R Sinkus, J Lorenzen, D Schrader, M Lorenzen, M Dargatz, and D Holz. High-resolution tensor mr elastography for breast tumour detection. *Physics in medicine and biology*, 45(6) :1649, 2000.
- [71] Jean-Claude Charmet. Mécanique du solide et des matériaux—élasticité—plasticité—rupture, 2000.
- [72] Armen P Sarvazyan, Oleg V Rudenko, Scott D Swanson, J Brian Fowlkes, and Stanislav Y Emelianov. Shear wave elasticity imaging : a new ultrasonic technology of medical diagnostics. *Ultrasound in medicine & biology*, 24(9) :1419–1435, 1998.

- [73] Daniel Royer and Eugene Dieulesaint. *Ondes élastiques dans les solides. Tome 1*, volume 1. Masson, 1996.
- [74] I Cespedes, J Ophir, H Ponnekanti, and N Maklad. Elastography : Elasticity imaging using ultrasound with application to muscle and breast< i> in vivo</i>. *Ultrasonic imaging*, 15(2) :73–88, 1993.
- [75] Joseph Schmitt. Oct elastography : imaging microscopic deformation and strain of tissue. *Optics express*, 3(6) :199–211, 1998.
- [76] AR Skovoroda, SY Emelianov, and M o’Donnell. Tissue elasticity reconstruction based on ultrasonic displacement and strain images. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 42(4) :747–765, 1995.
- [77] F Kallel and M Bertrand. Tissue elasticity reconstruction using linear perturbation method. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 15(3) :299–313, 1996.
- [78] Habib Ammari, Elie Bretin, Pierre Millien, Laurent Seppecher, and Jin-Keun Seo. Mathematical modeling in full-field optical coherence elastography. *arXiv pre-print arXiv :1405.4987*, 2014.
- [79] Vasilica Crecea, Amy L Oldenburg, Xing Liang, Tyler S Ralston, and Stephen A Boppart. Magnetomotive nanoparticle transducers for optical rheology of viscoelastic materials. *Optics express*, 17(25) :23114–23122, 2009.
- [80] Vasilica Crecea, Adeel Ahmad, and Stephen A Boppart. Magnetomotive optical coherence elastography for microrheology of biological tissues. *Journal of biomedical optics*, 18(12) :121504–121504, 2013.
- [81] RM Lerner and KJ Parker. Sono-elasticity images for cancer-detection. In *Ultrasonic Imaging*, volume 9, pages 63–63. ACADEMIC PRESS INC JNL-COMP SUBSCRIPTIONS 525 B ST, STE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495, 1987.
- [82] R Muthupillai, DJ Lomas, PJ Rossman, JF Greenleaf, A Manduca, and RL Ehman. Magnetic resonance elastography by direct visualization of propagating acoustic strain waves. *Science*, 269(5232) :1854–1857, 1995.
- [83] Travis Elgin Oliphant. *Direct methods for dynamic elastography reconstruction : optimal inversion of the interior Helmholtz problem*. PhD thesis, Biomedical Sciences–Biomedical Imaging–Mayo Graduate School, 2001.
- [84] Jeremy Bercoff, Mickael Tanter, and Mathias Fink. Supersonic shear imaging : a new technique for soft tissue elasticity mapping. *Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control, IEEE Transactions on*, 51(4) :396–409, 2004.
- [85] Jeremy Bercoff. *L’imagerie échographique ultrarapide et son application à l’étude de la viscoélasticité du corps humain*. PhD thesis, ESPCI ParisTECH, 2004.
- [86] Chunhui Li, Guangying Guan, Xi Cheng, Zhihong Huang, and Ruikang K Wang. Quantitative elastography provided by surface acoustic waves measured by phase-sensitive optical coherence tomography. *Optics letters*, 37(4) :722–724, 2012.
- [87] Karan D Mohan and Amy L Oldenburg. Elastography of soft materials and tissues by holographic imaging of surface acoustic waves. *Optics express*, 20(17) :18887–18897, 2012.

- [88] Shang Wang, Jiasong Li, Ravi Kiran Manapuram, Floredes M Menodiado, Davis R Ingram, Michael D Twa, Alexander J Lazar, Dina C Lev, Raphael E Pollock, and Kirill V Larin. Noncontact measurement of elasticity for the detection of soft-tissue tumors using phase-sensitive optical coherence tomography combined with a focused air-puff system. *Optics letters*, 37(24) :5184–5186, 2012.
- [89] Shang Wang, KV Larin, Jiasong Li, S Vantipalli, RK Manapuram, S Aglyamov, S Emelianov, and MD Twa. A focused air-pulse system for optical-coherence-tomography-based measurements of tissue elasticity. *Laser Physics Letters*, 10(7) :075605, 2013.
- [90] Wenjuan Qi, Ruimin Chen, Lidek Chou, Gangjun Liu, Jun Zhang, Qifa Zhou, and Zhongping Chen. Phase-resolved acoustic radiation force optical coherence elastography. *Journal of biomedical optics*, 17(11) :110505–110505, 2012.
- [91] Marjan Razani, Adrian Mariampillai, Cuiru Sun, Timothy WH Luk, Victor XD Yang, and Michael C Kolios. Feasibility of optical coherence elastography measurements of shear wave propagation in homogeneous tissue equivalent phantoms. *Biomedical optics express*, 3(5) :972–980, 2012.
- [92] Michael A Sutton, Stephen R McNeill, Jeffrey D Helm, and Yuh J Chao. Advances in two-dimensional and three-dimensional computer vision. In *Photomechanics*, pages 323–372. Springer, 2000.
- [93] Francois Hild and Stéphane Roux. *Digital image correlation*. Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
- [94] Hugo Leclerc, Jean-Noël Périé, François Hild, and Stéphane Roux. Digital volume correlation : what are the limits to the spatial resolution ? *Mechanics & Industry*, 13(06) :361–371, 2012.
- [95] Gilles Besnard, François Hild, and Stéphane Roux. “finite-element” displacement fields analysis from digital images : application to portevin–le châtelier bands. *Experimental Mechanics*, 46(6) :789–803, 2006.
- [96] Pathbase European mutant mouse pathology database. Mouse skin and hair database : <http://eulep.pdn.cam.ac.uk/skinbase/>.
- [97] Zhixin Wang. *Polydimethylsiloxane mechanical properties measured by macroscopic compression and nanoindentation techniques*. PhD thesis, University of South Florida, 2011.
- [98] LE Millon, H Mohammadi, and WK Wan. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel for cardiovascular applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part B : Applied Biomaterials*, 79(2) :305–311, 2006.
- [99] Simon Chatelin, Miguel Bernal, Thomas Deffieux, Clément Papadacci, Patrice Flaud, Amir Nahas, Claude Boccara, Jean-Luc Gennisson, Mickael Tanter, and Mathieu Pernot. Anisotropic polyvinyl alcohol hydrogel phantom for shear wave elastography in fibrous biological soft tissue : a multimodality characterization. *Phys. Med. Biol.* *accepted*.
- [100] Kate Grieve, Gael Moneron, Arnaud Dubois, Jean-François Le Gargasson, and Claude Boccara. Ultrahigh resolution ex vivo ocular imaging using ultrashort

- acquisition time en face optical coherence tomography. *Journal of Optics A : Pure and Applied Optics*, 7(8) :368, 2005.
- [101] Jean-Luc Gennisson, Stefan Catheline, Sana Chaffai, and Mathias Fink. Transient elastography in anisotropic medium : application to the measurement of slow and fast shear wave speeds in muscles. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 114(1) :536–541, 2003.
- [102] Wei-Ning Lee, Mathieu Pernot, Mathieu Couade, Emmanuel Messas, Patrick Bru-neval, Alain Bel, Albert A Hagege, Mathias Fink, and Mickaël Tanter. Mapping myocardial fiber orientation using echocardiography-based shear wave imaging. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 31(3) :554–562, 2012.
- [103] Habib Ammari, Elie Bretin, Pierre Millien, Laurent Seppecher, and Jin-Keun Seo. Mathematical modeling in full-field optical coherence elastography. *arXiv pre-print arXiv :1405.4987*, 2014.
- [104] Anne Latrive and A Claude Boccara. In vivo and in situ cellular imaging full-field optical coherence tomography with a rigid endoscopic probe. *Biomedical optics express*, 2(10) :2897–2904, 2011.
- [105] Nahas-Amir Latrive, Anne and A Claude Boccara. Multimodal endoscopic full-field oct imaging and elasticity mapping with a needle-like probe. SPIE photonics WEST BIOS conference, paper 8571-25 of conference 8571, 2013.
- [106] Christopher B Scruby and Leslie E Drain. *Laser ultrasonics techniques and appli-cations*. CRC Press, 1990.
- [107] Richard J Dewhurst and Qing Shan. Optical remote measurement of ultrasound. *Measurement Science and Technology*, 10(11) :R139, 1999.
- [108] Adrian Bachmann, Rainer Leitgeb, and Theo Lasser. Heterodyne fourier domain optical coherence tomography for full range probing with high axial resolution. *Opt. Express*, 14(4) :1487–1496, Feb 2006.
- [109] Julien Moreau, Vincent Loriette, and Albert-Claude Boccara. Full-field birefringence imaging by thermal-light polarization-sensitive optical coherence tomography. ii. instrument and results. *Appl. Opt.*, 42(19) :3811–3818, Jul 2003.
- [110] JM Lamarre. Photon noise in photometric instruments at far-infrared and submil-limeter wavelengths. *Applied optics*, 25(6) :870–876, 1986.
- [111] Brendan F Kennedy, Timothy R Hillman, Robert a McLaughlin, Bryden C Quirk, and David D Sampson. In vivo dynamic optical coherence elastography using a ring actuator. *Optics express*, 17(24) :21762–72, November 2009.
- [112] Vasilica Crecea, Amy L Oldenburg, Xing Liang, Tyler S Ralston, and Stephen a Boppart. Magnetomotive nanoparticle transducers for optical rheology of vis-coelastic materials. *Optics express*, 17(25) :23114–22, December 2009.
- [113] Amy Oldenburg, Farah Toublan, Kenneth Suslick, Alexander Wei, and Stephen Bop-part. Magnetomotive contrast for in vivo optical coherence tomography. *Optics Express*, 13(17) :6597–6614, 2005.
- [114] Bastien Arnal. *Elastographie pour le suivi des thérapies par ultrasons focalisés et nouveau concept de cavité à retournement temporel pour l’histotripsy*. PhD the-sis, Université Paris-Diderot-Paris VII, 2013.

- 
- [115] James H Rose and B DeFacio. Eikonal approximation in elastic-wave-scattering theory. *Presented at the AF/DARPA Rev. of Progress in Quantitative NDE, Boulder, Colo., 2-7 Aug. 1981*, 1 :2–7, 1981.
- [116] L Capineri, HG Tattersall, MG Silk, and JAG Temple. Time-of-flight diffraction tomography for ndt applications. *Ultrasonics*, 30(5) :275–288, 1992.
- [117] Thomas Deffieux. *Palpation par force de radiation ultrasonore et échographie ultrarapide : Applications à la caractérisation tissulaire in vivo*. PhD thesis, Université Paris-Diderot-Paris VII, 2008.
- [118] Igor Aleksandrovich Viktorov. *Rayleigh and Lamb waves : physical theory and applications*, volume 147. Plenum press New York, 1967.
- [119] Cyril Kotenkoff. *Détection d'objets enfouis sur le fond marin par ondes sismo-acoustiques de Scholte*. PhD thesis, Institut National Polytechnique de Grenoble-INPG, 2006.
- [120] Thu-Mai Nguyen. *Elastographie haute-résolution pour l'évaluation des propriétés élastiques de la cornée et de la peau*. PhD thesis, Université Paris-Diderot-Paris VII, 2012.
- [121] Emmanuel Bossy, Maryline Talmant, and Pascal Laugier. Three-dimensional simulations of ultrasonic axial transmission velocity measurement on cortical bone models. *The Journal of the Acoustical Society of America*, 115(5) :2314–2324, 2004.
- [122] Emmanuel Bossy. Simsonic suite user's guide for simsonic2d, 2012.
- [123] Robert T Beyer. Radiation pressure in a sound wave. *American Journal of Physics*, 18(1) :25–29, 1950.
- [124] Emilie Macé, Ivan Cohen, Gabriel Montaldo, Richard Miles, Mathias Fink, and Mickael Tanter. In vivo mapping of brain elasticity in small animals using shear wave imaging. *Medical Imaging, IEEE Transactions on*, 30(3) :550–558, 2011.
- [125] Simon Chatelin, André Constantinesco, and Rémy Willinger. Fifty years of brain tissue mechanical testing : from in vitro to in vivo investigations. *Biorheology*, 47(5) :255–276, 2010.