



Caractérisation objective et quantitative de la transparence cornéenne par OCT plein champ et microscopie holographique

Romain Bocheux

► To cite this version:

Romain Bocheux. Caractérisation objective et quantitative de la transparence cornéenne par OCT plein champ et microscopie holographique. Optique [physics.optics]. Université Paris Saclay (COMUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLY009 . tel-02928883

HAL Id: tel-02928883

<https://pastel.hal.science/tel-02928883>

Submitted on 3 Sep 2020

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.

Caractérisation objective et quantitative de la transparence cornéenne par OCT plein champ et microscopie holographique

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
préparée à l'ENSTA

École doctorale n°573 Interfaces : approches interdisciplinaires,
fondements, applications et innovation
Spécialité de doctorat : Physique

Thèse présentée et soutenue à Palaiseau, le 30 septembre 2019, par

Romain Bocheux

Composition du Jury :

Gilles Tessier Pr, Institut de la Vision, Sorbonne Université	Rapporteur
Gilles Thuret Pr, CHU de Saint-Étienne	Rapporteur
Gaëlle Georges MC, DIMABIO, Institut Fresnel	Examinatrice
Sandrine Lévêque-Fort DR, ISMO, Université Paris Sud	Présidente du Jury
Karsten Plamann Pr, LOA, LOB, École polytechnique, ENSTA Paris	Directeur de thèse
Kristina Irsch CR, Institut de la Vision, Sorbonne Université	Codirectrice de thèse

Remerciements

Tout d’abord, je remercie la Fondation de l’avenir pour la recherche médicale d’avoir financé ma thèse.

Ce travail de thèse n’aurait évidemment pas été possible sans mes directeurs de thèse, Karsten Plamann et Kristina Irsch, avec qui ça a été un plaisir de travailler. Merci à tous les deux pour votre soutien et l’ambiance de travail agréable que vous avez instaurée. Je suis content de la façon dont on a travaillé, dans une bonne ambiance et sans compromis sur la qualité ou l’investissement dans le projet (ce qui allait de soi dans l’équipe, mais ce n’est pas le cas partout). Je garderai le souvenir de ces repas de midi au restaurant autour d’un verre de vin, ou encore de toutes les discussions musicales que l’on a eues. Trois années dont le bilan est plus que positif pour moi !

Je tiens ensuite à remercier toutes les personnes qui m’ont aidé scientifiquement sur ce travail. Je pense en particulier aux trois collaborations importantes que j’ai eues au cours de ma thèse.

Je remercie donc Rémi Carminati de l’institut Langevin (ESPCI) et Ugo Tricoli qui était alors en post-doc, avec lesquels nous avons souvent discuté de toute la théorie de l’OCT et de la propagation de la lumière dans la cornée. Cette collaboration a été très fructueuse et source d’une grande satisfaction.

Je remercie également Pascal Pernot, du laboratoire de Chimie Physique (Université Paris Sud), dont la rencontre a été fortuite (au cours d’une excellente formation sur le calcul des incertitudes de mesure), mais qui nous a permis de raffiner notre analyse de données et d’obtenir une estimation de la précision de nos mesures, ce qui est indispensable quand on veut être quantitatif.

Enfin je remercie le professeur Vincent Borderie de l’hôpital des 15-20 et Cristina Georgeon (orthoptiste), qui nous ont donné un retour de la part d’une équipe médicale, nous permettant d’évaluer la pertinence de nos travaux, et nous ont aussi proposé des études cliniques à réaliser. Grâce à cette collaboration nous avons pu être au cœur de l’hôpital des 15-20 pour faire des analyses sur des cornées pathologiques et avoir accès aux images cliniques de l’hôpital.

Passons maintenant aux remerciements plus personnels. Pour tenir trois ans malgré les tribulations de la thèse, il faut être bien entouré. Il est bon de pouvoir discuter des aléas de la thèse avec des amis dans la même situation. Dans mon cas, j’ai pu compter sur mes amis et camarades de l’ESPCI : Minh, Nico et Kévin. Merci à vous les gars, ces parties de *Magic* (et

autres jeux) et ces restos japonais ont été indispensables pour se changer les idées.

J'ai aussi eu la chance de partager la vie de labo avec des doctorants super sympas et dont certains se sont investis pour mettre en place des activités au sein du labo. Je pense notamment à Margaux et Júlia qui ont apporté beaucoup de musique au labo (et aussi de la bonne humeur), et aussi à Arthur et ses soirées jeux. De très bonnes initiatives qui ont rendu cette période de thèse très agréable. Il y avait aussi Yoann et son humour qui mettait un peu de piquant dans ce labo ; et Guillaume, pratiquement devenu un permanent du LOB depuis la fondation de sa start-up projet celcius. Bonne chance pour ton projet.

Je pense aussi à ces soirées de labo où l'on a passé de bons moments notamment avec Clothilde, Hugo et Anastasia (merci pour les gâteaux).

Je dois remercier spécialement Joséphine pour son soutien moral pendant la phase intense de ma rédaction. J'espère t'avoir rendu la pareille pendant ta longuuuuue période de rédaction. Je n'oublie pas non plus les discussions en salle café, avec tous les membres du labo, qui participent à ce côté détendu que l'on retrouve au LOB.

Enfin, je terminerai par le classique mais indispensable remerciement à ma famille, qui a été mon référentiel, me permettant de ne pas me perdre en chemin.

Table des matières

Introduction	1
I Transparence de la cornée	3
I.1 Anatomie de l'œil	3
I.2 Histologie de la cornée	5
I.3 Origine de la transparence cornéenne	6
I.4 Effet de la diffusion sur la vision	10
I.5 Méthodes de mesure de transparence	12
II Modèle de diffusion de la lumière dans la cornée	15
II.1 Histologie et hypothèses du modèle	16
II.2 Équation de transfert radiatif (ETR)	17
II.2.1 Équation de transfert radiatif et solution	17
II.3 Modèle des kératocytes & lacs	20
II.3.1 Libre parcours moyen de diffusion	20
II.3.2 Fonction de répartition	22
II.4 Modélisation des domaines 2D de fibrilles de collagène	23
II.4.1 Section efficace de diffusion	23
II.4.2 Fonction de corrélation de paires	24
II.4.3 Fonction de répartition des fibrilles de collagène	27
II.4.4 Fonction de répartition et libre parcours moyen total	27
II.5 Modélisation de la nanostructure du stroma et transparence	27
II.5.1 Méthode d'analyse des images de microscopie électronique	28
II.5.2 Modèle de disques durs	30

II.5.3	Thermodynamique de la cornée	37
III	Analyse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> des mesures en rétrodiffusion	41
III.1	Principe de l'OCT	42
III.1.1	OCT temporelle	42
III.1.2	OCT spectrale	43
III.1.3	OCT plein champ	45
III.2	Évaluation de la transparence <i>in vitro</i> par OCT plein champ	46
III.2.1	Principe général de l'analyse	46
III.2.2	Acquisition des données	49
III.2.3	Méthode d'analyse des données	50
III.2.4	Mesure de transparence de cornées par OCT plein champ	60
III.2.5	Précision de la mesure	67
III.3	Analyse à plusieurs longueurs d'onde	71
III.3.1	Propriétés spectrales des cornées	71
III.3.2	Solutions de billes de polystyrène	73
III.4	Évaluation de la transparence <i>in vivo</i> par SD-OCT et lampe à fente	73
III.4.1	Analyse des images cliniques d'OCT	76
III.4.2	Analyse de précision et répétabilité	78
III.4.3	Cas cliniques typiques	80
III.4.4	Étude comparative avec la méthode de référence	81
III.4.5	Analyse des images de lampe à fente	84
IV	Évaluation de la transparence par holographie numérique en transmission	87
IV.1	Principe de l'holographie	88
IV.1.1	Holographie hors axe	89
IV.1.2	Holographie numérique	89
IV.1.3	Démodulation	91
IV.2	Dispositif de microscopie holographique numérique	93
IV.2.1	Sources laser	93
IV.2.2	Microscope	94
IV.2.3	Porte échantillon et platines de translation	94

IV.2.4	Caméra	94
IV.2.5	Interface graphique	95
IV.3	Caractérisation du système	96
IV.3.1	Grandissement	96
IV.3.2	Reconstruction d'un hologramme d'une mire de résolution	97
IV.3.3	Démodulation par déplacement de l'échantillon	97
IV.4	Mesure de sensibilité du système	100
Conclusions et perspectives		105
A Fonction de corrélation de paires et fonction d'autocorrélation		109
B Complément sur la précision de la mesure du libre parcours moyen par OCT plein champ		111
C Fonction de transfert en éclairage cohérent et incohérent		115
C.1	Éclairage cohérent	115
C.1.1	PSF	115
C.1.2	Fonction de transfert	115
C.2	Éclairage incohérent	115
C.2.1	Fonction de transfert	116
Bibliographie		117

Introduction

Si vous beurrez une tartine et qu'elle tombe du côté non beurré, c'est que vous aviez beurré le mauvais côté.

Corollaire de Blumenfeld

La perte de transparence cornéenne est une cause majeure de cécité au plan mondial. À elle seule, la cécité cornéenne affecte plus de 10 millions de personnes. De nombreuses pathologies peuvent causer cette perte de transparence, certaines allant jusqu'à nécessiter une greffe complète de la cornée. La majorité de ces greffes pourraient être évitées si les pathologies étaient détectées suffisamment tôt. De plus il y a un manque de greffons dans de nombreux pays, il est donc important d'améliorer le diagnostic et ainsi les traitements, pour réduire le nombre de greffes. Un diagnostic précoce et un suivi quantitatif pourrait améliorer le rendement clinique et ainsi combattre la cécité. Par ailleurs, une mesure quantitative de la transparence cornéenne pourrait améliorer la sélection des greffons et permettre un meilleur pronostic après transplantation. Il y a donc un besoin critique pour des outils cliniques fiables et faciles à utiliser pour la caractérisation objective et quantitative de la transparence cornéenne.

L'objectif de cette thèse est de mettre au point une méthode répondant à ces besoins de mesure objective et quantitative de la transparence cornéenne. Dans le premier chapitre nous présentons brièvement l'anatomie de l'œil et nous décrivons les structures présentes dans la cornée. Nous rappelons les modèles physiques d'explication de la transparence de la cornée, puis nous présentons les méthodes actuelles d'évaluation de la transparence cornéenne.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons un modèle d'interaction de la lumière avec le tissu cornéen, que nous avons développé en collaboration avec Rémi Carminati (Institut Langevin, ESPCI, CNRS) un expert de l'optique des milieux complexes. Ce modèle simple contient peu de paramètres et permet, dans l'approximation de faible diffusion, d'obtenir des paramètres quantitatifs pour les différents types de diffuseurs présents dans la cornée. Nous avons également analysé la nanostructuration des fibrilles de collagène (principaux constituants du stroma cornéen, dont l'organisation est nécessaire à la transparence) à partir d'images de microscopie électronique en transmission, en modélisant le potentiel d'interaction entre les fibrilles avec un modèle simple à un seul paramètre.

En complément de cette analyse théorique nous nous avons étudié expérimentalement la lumière diffusée en transmission par un système de microscopie holographique numérique (DHM) et en réflexion à l'aide d'un système de tomographie en cohérence optique plein champ (FF-OCT) ainsi qu'avec les méthodes d'imagerie disponibles en clinique ayant une résolution en

profondeur. La géométrie en transmission nous permet d'observer directement les effets de la diffusion sur la rétine et donc sur l'acuité visuelle des patients. La géométrie en réflexion est celle utilisée en clinique et donc celle à partir de laquelle on doit déterminer les propriétés de diffusion de la cornée.

Dans le chapitre trois nous décrivons la méthode d'analyse que nous avons mise au point, en collaboration avec Pascal Pernot (Université Paris Sud, CNRS), fondée sur une analyse bayésienne qui permet d'extraire le libre parcours moyen de diffusion et ses éventuelles fluctuations en profondeur ainsi qu'un intervalle de confiance sur cette mesure. Nous avons d'abord utilisé cette analyse sur des images d'OCT plein champ obtenues *ex vivo* à partir de cornées saines provenant de la banque des tissus, et des cornées pathologiques prélevées après une opération de greffe de cornée. Nous avons ainsi montré que cette analyse permet de mesurer le libre parcours moyen de diffusion avec une grande précision et également de déterminer si une cornée présente des hétérogénéités. Enfin nous avons montré la faisabilité de cette analyse *in vivo* en l'appliquant à des images d'OCT clinique et de lampe à fente, et nous avons obtenu une très bonne reproductibilité de nos mesures ainsi qu'une corrélation entre les mesures effectuées par les deux méthodes d'imagerie.

Enfin le quatrième chapitre est consacré à l'analyse de la diffusion en transmission par microscopie holographique numérique. Comme l'holographie permet de reconstruire des fronts d'onde, nous avons choisi cette technique pour observer l'effet de la diffusion sur la lumière arrivant sur la rétine. Nous décrivons le système expérimental et ses caractéristiques puis déterminons si le rapport signal sur bruit du montage est suffisant pour observer les effets de la diffusion.

Nous terminons par une conclusion résumant et discutant les résultats de ce travail, en précisant les expériences qu'il convient de réaliser pour répondre aux questions soulevées pendant cette thèse.

Chapitre I

Transparence de la cornée

Dans une hiérarchie, tout employé a tendance à s'élever à son niveau d'incompétence.

Laurence J. Peter, *Le principe de Peter*

Sommaire

I.1	Anatomie de l'œil	3
I.2	Histologie de la cornée	5
I.3	Origine de la transparence cornéenne	6
I.4	Effet de la diffusion sur la vision	10
I.5	Méthodes de mesure de transparence	12

I.1 Anatomie de l'œil

L'œil humain est formé de plusieurs éléments optique. La cornée est la première lentille de l'œil, responsable de près des deux tiers de son pouvoir optique et assure également une protection contre l'environnement extérieur. Le tiers restant est assuré par le cristallin, qui est une lentille déformable permettant l'accommodation. Ces deux lentilles ont pour fonction optique de focaliser la lumière sur la rétine, qui possède des photorécepteurs sensibles à la lumière visible. L'anatomie de l'œil est montré sur la figure I.1.

Le système optique de l'œil, bien que particulier, est très performant. Pour un œil emmétrope, c'est-à-dire ne présentant pas de trouble de la réfraction, le pouvoir de résolution de l'œil est d'environ une minute d'arc.

Comme dans les système optiques classique, la résolution est affectée par la taille de la pupille. Pour une pupille de faible dimension (1 à 2 mm) la résolution est limitée par la diffraction alors que pour des larges pupilles les aberrations vont limiter la résolution (maximum à 8 mm). Le maximum de résolution est généralement observé pour une pupille de taille intermédiaire (3 à 4 mm)¹.

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Visual_acuity

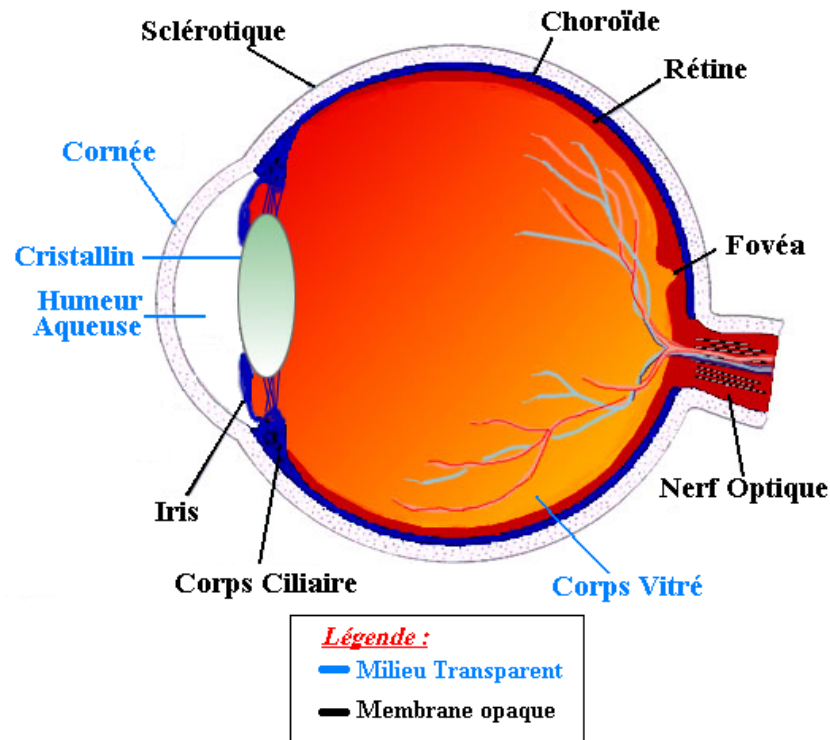


Figure I.1 – Anatomie de l'œil faisant apparaître l'axe optique et l'axe visuel.

L'œil est également sensible à la lumière sur une grande plage d'intensité lumineuse. La dynamique de l'œil varie sur une échelle logarithmique, couvrant environ 15 ordres de grandeurs (de la limite de sensibilité des bâtonnets, photorécepteurs les plus sensibles, jusqu'à l'observation directe du soleil [1]).

Du point de vue conception optique, l'œil est très différent des systèmes d'imagerie conçus en ingénierie optique. Cela rend difficile l'optimisation des chirurgies de corrections de la réfraction [2]. La figure I.2 trace les différents axes des éléments optiques de l'œil.

L'axe optique est la ligne reliant les centres de courbure des éléments réfractifs d'un système optique centré. L'œil n'étant pas centré il ne possède pas réellement d'axe optique, mais on peut définir un axe correspondant à l'ajustement linéaire des centres de courbure des sphères ajustées aux surfaces de la cornée et du cristallin (Cline, Hofstetter et Griffin, 1989)- (Millodot, 1993).

L'axe visuel est l'axe reliant le point de fixation, les points nodaux et la fovéa (zone de vision précise). Les points nodaux sont deux points de l'axe optique, conjugués, pour lesquels un rayon entrant par le premier point sort par le deuxième avec un angle égal à l'angle d'incidence par rapport à l'axe optique.

La ligne de vision relie le point de fixation et le centre de la pupille d'entrée. Cette ligne n'est pas fixe car le centre de la pupille se déplace en fonction de l'ouverture de la pupille.

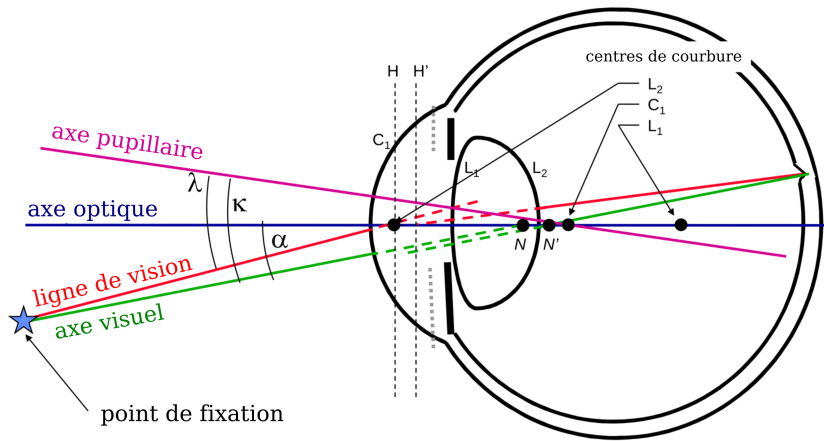


Figure I.2 – Différents axes du système optique de l'œil. source – vision.berkeley.edu/roordalab/

L'axe pupillaire est la droite passant par le centre de la pupille et perpendiculaire à la surface de la cornée. La pupille étant souvent décentrée par rapport à la cornée, l'axe pupillaire et l'axe optique ne sont pas confondus.

I.2 Histologie de la cornée

La cornée est un tissu qui doit assurer des fonctions de transparence et de résistance aux contraintes mécaniques pour maintenir sa forme convexe nécessaire à la réfraction. La cornée d'un adulte mesure 11 à 12 mm horizontalement et 9 à 11 mm verticalement (Atchinson & Smith, Optics of the Human Eye, 2002). L'épaisseur de la cornée varie entre 500 μm au centre et jusqu'à 700 μm à la périphérie. La figure I.3 montre un schéma histologique de la cornée, présentant ses différentes couches cellulaires et tissulaires.

La couche la plus superficielle est l'épithélium, constituée de plusieurs couches de cellules jointives qui forment une barrière avec le milieu extérieur. Il mesure environ 50 μm d'épaisseur.

Sous l'épithélium se trouve la membrane de Bowman, de 7 à 14 μm d'épaisseur, constituée de fibrilles de collagène désorganisées.

Le stroma cornéen est un tissu conjonctif dense, non vascularisé, mesurant environ 400 μm . Il est constitué principalement de fibrilles de collagène de 60 nm de diamètre environ, organisées en lamelles parallèles à la surface de la cornée. Chaque lamelle contient des fibrilles orientées principalement dans une même direction. L'alternance de l'orientation des fibrilles d'une lamelle à une autre forme une structure en contreplaqué qui donne ses propriétés de résistance à la cornée. Entre les lamelles de collagène, se trouvent des cellules appelées kératocytes, capables de synthétiser des fibrilles de collagène, par exemple en cas de blessure. Le stroma comprend également des nerfs, mais ses principaux constituants, en proportion, sont les fibrilles de collagènes.

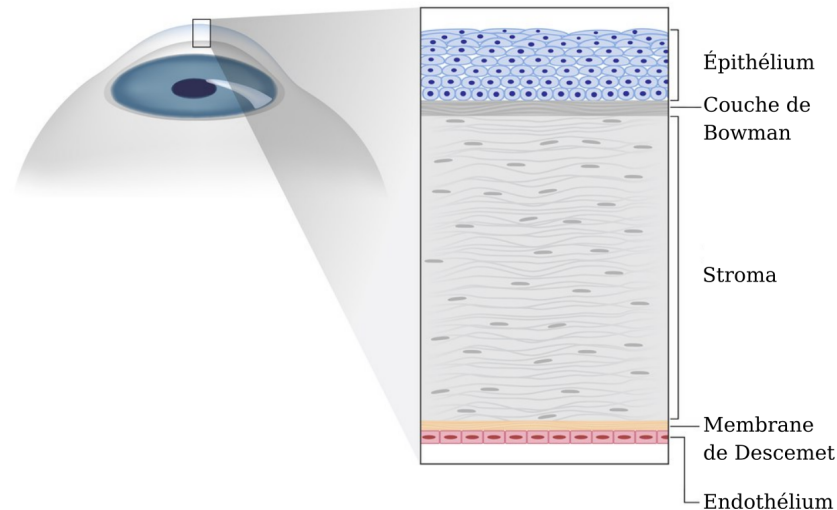


Figure I.3 — Histologie de la cornée. source — <https://discoveryeye.org/cataract-surgery-keratoconus/>

La membrane de Descemet est la lame basale de l'endothélium, constituée de fibrilles de collagène et de fibronectine permettant l'adhésion au stroma. Elle est synthétisée par l'endothélium, mesure environ 10 μm et s'épaissit avec l'âge.

Enfin l'endothélium est la couche plus interne de la cornée. C'est une couche monocellulaire de cellules jointives dont le rôle est de contrôler les échanges d'eau et de nutriments entre le stroma et l'humeur aqueuse. Elle forme une barrière semi-perméable et régule l'hydratation du stroma par l'action de pompes ioniques maintenant une pression osmotique négative sur le stroma, ce qui le maintient dans un état d'hydratation plus faible. Cette fonction permet de maintenir une organisation des fibrilles de collagène dans le stroma. Les cellules endothéliales ont de très faibles capacité de régénération, c'est pourquoi lorsqu'il est endommagé il peut être nécessaire de procéder à une greffe d'un endothélium sain, pour restaurer la fonction de régulation d'hydratation du stroma [3]. La densité de cellules endothéliales est à l'heure actuelle le principal paramètre utilisé dans les banques de tissu pour décider de la viabilité d'une cornée pour une greffe. Cette densité peut être mesurée manuellement, mais plusieurs études ont été faites pour améliorer la fiabilité de l'estimation de la densité endothéliale [4, 5].

I.3 Origine de la transparence cornéenne

L'origine de la transparence de la cornée est longtemps restée inexpliquée. C'est en effet une propriété peu commune pour un tissu, dont les différents composants ont des indices de réfraction différents et diffusent donc fortement la lumière.

La première explication convaincante de l'origine de la transparence de la cornée a été proposée par David Maurice en 1957 [6]. Pour comprendre la transparence de la cornée, il faut s'intéresser à la microstructure du stroma. En effet le stroma représente près de 90 % de l'épaisseur de la cornée, c'est donc principalement le stroma qui doit assurer les propriétés mécaniques tout en conservant une bonne transparence. Les principaux constituants du stroma sont les fi-

brilles de collagène, dont la structure en lamelle est illustrée sur la figure I.4. En considérant les

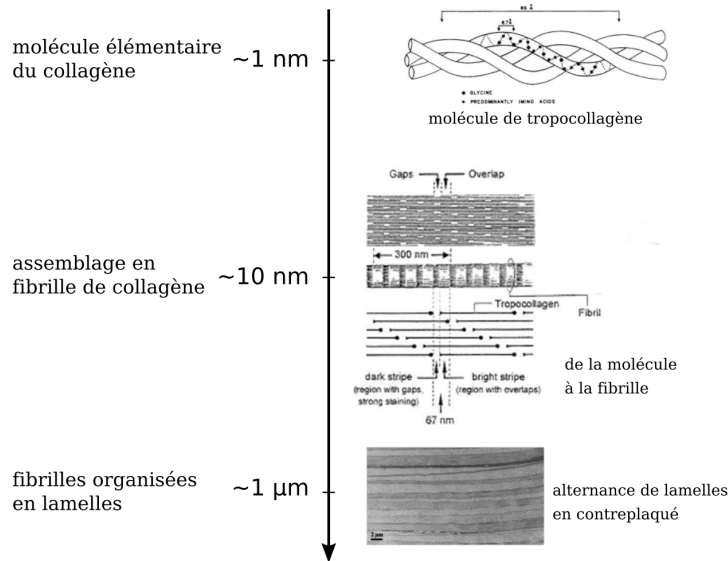


Figure I.4 – Organisation des fibrilles de collagène en lamelles. Modifié à partir de [7].

fibrilles de collagène comme des aiguilles diélectrique de longueur infinie, D. Maurice a montré que si l'on considère que les fibrilles de collagène sont distribuées aléatoirement dans le stroma, la cornée serait presque totalement opaque. Il a utilisé la théorie de la diffusion de Rayleigh pour calculer la puissance diffusée par une aiguille diélectrique ayant les mêmes propriétés optique que celles mesurées pour les fibrilles de collagène, et a sommé les puissances diffusées par toutes les fibrilles. Sa conclusion a été que les fibrilles sont nécessairement organisées de manière régulière, de façon à ce que la lumière interfère constructivement dans la direction de propagation (il a fait l'hypothèse d'un réseau hexagonal parfait). Cette théorie a été modifiée par Feuk [8] qui propose une théorie d'un réseau déformé, suscité par l'évolution des techniques de microscopie électronique et les observations des fibrilles de collagène contredisant une structure cristalline.

À la même période, Hart et Farrel [9] ont montré qu'une structure cristalline n'était pas nécessaire pour expliquer la transparence de la cornée, mais qu'un ordre à courte distance était suffisant. Ces considérations ont été précisées par Benedek [10] qui a également considéré une perte de corrélation dans l'organisation des fibrilles en cas d'œdème ainsi que l'apparition de lacs (zone sans fibrilles de collagène). Cela a suscité un intérêt dans la compréhension de l'interaction entre les fibrilles. Twersky [11] a alors utilisé un modèle dans lequel chaque fibrille est entourée de protéoglycanes responsables d'une interaction répulsive entre les fibrilles à cause de leurs charges électriques. Meek *et al* [12] ont également étudié les effets des œdèmes sur la distribution des fibrilles de collagène et ont contribué à une meilleure compréhension de ces effets.

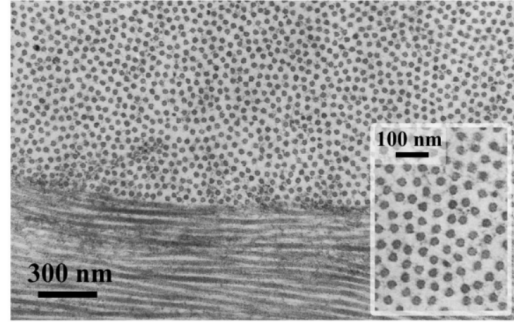
Plus récemment encore, Cheng *et al* ont modélisé le potentiel d'interaction entre les fibrilles [13–15]. Ils ont considéré les interactions électrostatiques entre les protéoglycanes chargés négativement entourant les fibrilles, et les interactions osmotiques générées par le déplacement d'une fibrille.

L'importance de l'organisation des fibrilles de collagène est illustrée dans la figure I.5 où l'on

voit qu'une désorganisation des fibrilles de collagène est associée à une perte de transparence.

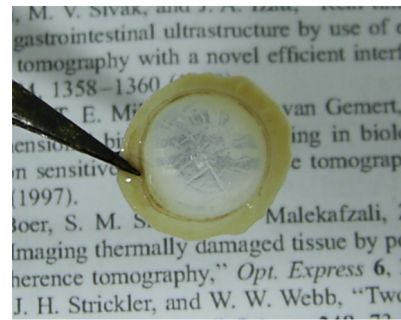


Florent Aptel, LOA ENSTA

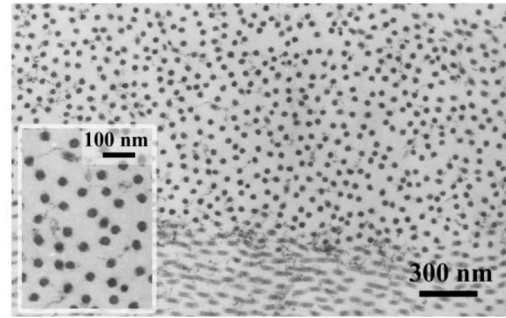


Michèle Savoldelli, Hôtel-Dieu, Paris

(a) Transparence et image de microscopie électronique des fibrilles de collagène pour une cornée saine.



Florent Aptel, LOA ENSTA



Michèle Savoldelli, Hôtel-Dieu, Paris

(b) Transparence et image de microscopie électronique des fibrilles de collagène pour une cornée œdémateuse.

Figure I.5 – Perte de transparence associée à une désorganisation des fibrilles de collagène causée par un œdème du stroma.

Plamann *et al* ont expliqué la transparence de la cornée par l'optique de Fourier [16]. D'après l'optique de Fourier, la distribution d'intensité sur la rétine est le module carré de la transformée de Fourier des éléments sur le passage de la lumière. En ne considérant que les fibrilles de collagènes, la figure de diffraction sera donc le module carré de la transformée de Fourier de la distribution des fibrilles de collagène. Le théorème de Wiener-Khintchine nous dit que le module carré de la transformée de Fourier d'une fonction est égale à la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de cette fonction. Cela nous donne le lien mathématique entre l'organisation des fibrilles, à travers la fonction d'autocorrélation $C(\vec{r})$, et la puissance diffusée par les fibrilles P :

$$\begin{aligned} P(\vec{K}) &\propto |\mathcal{F}\{\text{distribution des fibrilles}\}|^2 \\ &\propto \mathcal{F}\{C(\vec{r})\} \end{aligned}$$

La figure I.6 montre les distributions des fibrilles de collagène d'une cornée saine, d'une cornée œdémateuse et de la sclère, ainsi que leurs transformées de Fourier. Pour la cornée saine, on

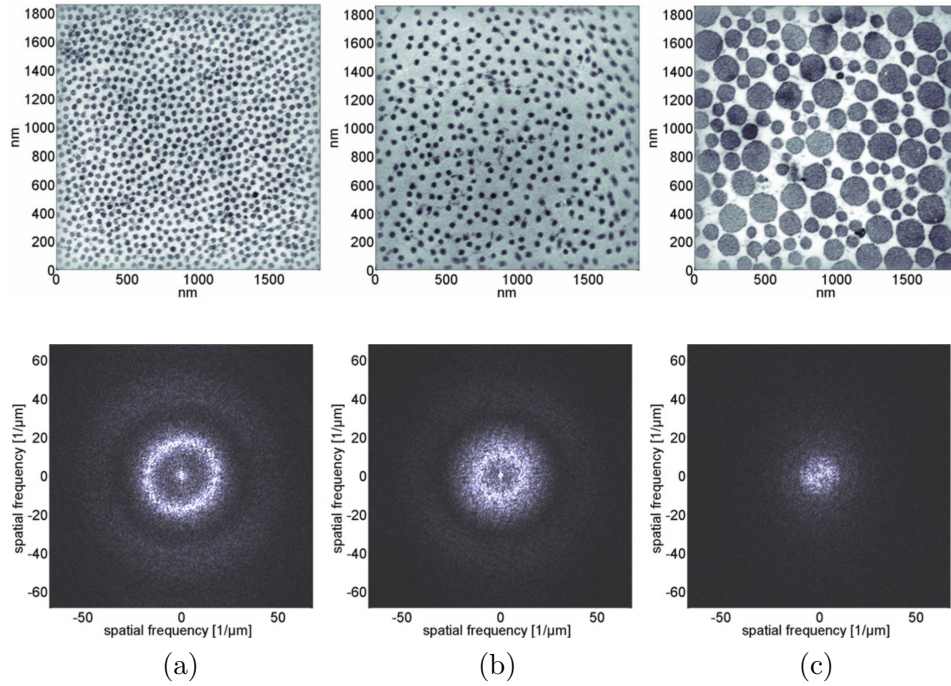


Figure I.6 – En haut : images de microscopie électronique en transmission d’une cornée saine (a), d’une cornée œdémateuse (b) et de la sclère (c). En bas : transformées de Fourier à deux dimensions des images de microscopie correspondantes. Images issues de [16].

voit sur la transformée de Fourier un cercle intense dont le rayon est la fréquence spatiale qui correspond à la distance interfibrillaire (ou distance moyenne entre les fibrilles adjacentes). Comme cette distance est très bien définie avec peu de variations pour une cornée saine, le cercle a une faible épaisseur. Pour la cornée œdémateuse le cercle a un rayon plus faible qui correspond à une distance interfibrillaire plus grande. De plus l’épaisseur du cercle est plus grande car la distribution des distances entre fibrilles adjacentes est plus large.

Enfin la sclère est constituée de fibrilles de collagène de diamètres différents et donc la distance interfibrillaire n’est pas bien définie.

La distribution angulaire de la puissance diffusée est donc en regardant directement les transformées de Fourier de la distribution des fibrilles. Comme illustré sur le schéma de la figure I.7, le vecteur de diffusion \vec{K} décrit un cercle dans l’espace de Fourier. Pour des longueurs d’onde dans le visible, ce cercle se trouve à l’intérieur du cercle correspondant à la distance interfibrillaire moyenne d’une cornée saine. Dans ce cas, le vecteur de diffusion n’interagit qu’avec la partie centrale, c’est-à-dire les basses fréquences, ce qui correspond à une diffusion vers l’avant. Pour une cornée œdémateuse le vecteur de diffusion peut interagir avec une partie du cercle de la distance interfibrillaire moyenne, conduisant à une diffusion vers l’arrière importante.

Ce raisonnement à partir de la transformée de Fourier de la distribution des fibrilles permet également de comprendre des phénomènes comme la coloration de la peau de certains animaux [17, 18]. Certains oiseaux et certains mammifères comme le mandrill présentent une coloration bleue sur certaines parties de leur corps, due à l’organisation des fibres de collagène de la peau dont la transformée de Fourier présente aussi un cercle dont le diamètre correspond à une longueur d’onde dans le bleu.

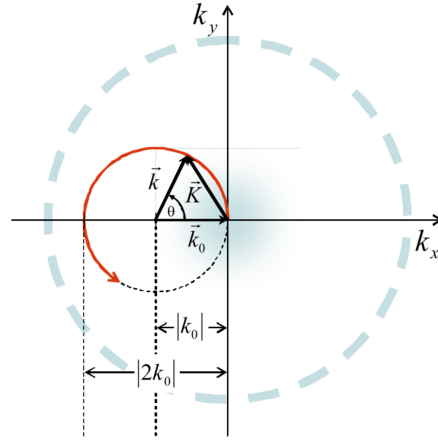


Figure I.7 – Schéma de la distribution d'intensité diffusée par rapport au module carré de la transformée de Fourier de la distribution des fibrilles. Le cercle rouge est le cercle décrit par le vecteur de diffusion. Issu de [16].

I.4 Effet de la diffusion sur la vision

La transparence cornéenne est essentielle pour la vision. En tant que première lentille de l'œil, la cornée doit assurer la focalisation de la lumière sur la rétine. La régularité et la forme de la surface de la cornée vont déterminer l'absence ou la présence d'aberrations optiques (que l'on décrit habituellement par les polynômes de Zernike) alors que l'arrangement du volume de la cornée (principalement le stroma) vont en déterminer la transparence. Les aberrations comme la diffusion vont affecter la qualité de l'image formée sur la rétine.

En particulier, la diffusion de la lumière n'est pas isotrope et donne lieu à une émission sous un angle solide qui dépend de la taille de la structure diffusante et de la longueur d'onde. En optique on définit deux régimes de diffusion selon le rapport entre la taille du diffuseur et la longueur d'onde. Le régime de diffusion Rayleigh est valable pour des diffuseurs petits devant la longueur d'onde. La théorie de Mie est valable pour toutes les dimensions de diffuseur et tend vers le régime de diffusion Rayleigh pour des diffuseurs petits devant la longueur d'onde. Par abus de langage on considère qu'un diffuseur petit devant la longueur d'onde est un diffuseur Rayleigh, et qu'un diffuseur de taille comparable ou supérieure à la longueur d'onde est un diffuseur Mie. De même la théorie de Mie a été originalement calculée pour des diffuseurs sphériques, mais par abus de langage également on appellera tout diffuseur de taille comparable ou supérieure à la longueur d'onde, diffuseur Mie.

Les distributions angulaires associées à ces deux régimes de diffusion sont différentes. En particulier la diffusion de Mie a une distribution angulaire anisotrope et diffuse principalement vers l'avant sur des angles larges. Pour la cornée, les diffuseurs Rayleigh (les fibrilles de collagène) diffusent principalement vers l'avant (comme montré dans l'espace de Fourier avec le vecteur de diffusion, cf figure I.7), mais une structure de fibrilles désorganisée diffusera sur des angles beaucoup plus larges.

L'effet de la diffusion sur la formation de l'image dépendra donc de la nature des processus de diffusion au sein de la cornée.

Fonction d'étalement du point

La qualité de la vision peut être décrite en observant la fonction d'étalement du point [19] (ou *PSF* en anglais) sur la rétine. Elle représente l'image d'une source ponctuelle sur la rétine. La PSF est le produit de tous les phénomènes qui ont eu lieu sur le parcours de la lumière, c'est-à-dire les aberrations et la diffusion. La figure I.8 montre une représentation angulaire de la fonction d'étalement du point en termes cliniques. La partie centrale de la PSF définit l'acuité

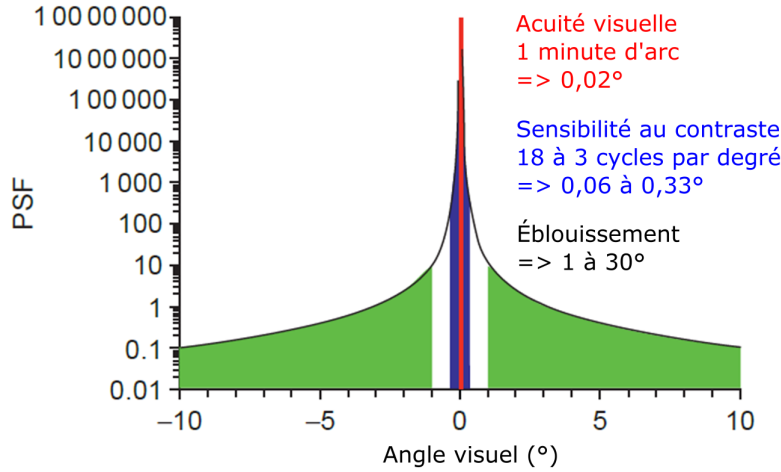


Figure I.8 – Fonction angulaire d'étalement du point sur la rétine. La partie rouge définit l'acuité visuelle, la partie bleue la sensibilité au contraste et la partie verte l'éblouissement. La PSF a pour unité stéradian^{-1} et l'intégrale sur l'angle solide est normalisée.

visuelle, puis, pour des angles légèrement plus grands, elle définit la sensibilité au contraste et pour les angles larges cela correspond au phénomène d'éblouissement.

Une augmentation de la diffusion va provoquer un élargissement de la PSF et donc une baisse de l'acuité visuelle et une augmentation de l'éblouissement.

Rapport de Strehl

Pour quantifier la qualité d'un instrument optique, on définit en optique de Fourier le rapport de Strehl. Il est défini comme le rapport du maximum d'intensité de la PSF réelle sur celui de la PSF uniquement limitée par la diffraction (donc le maximum théorique). Ce rapport a été introduit en astronomie pour quantifier la qualité d'un instrument. Plus il y a d'aberration ou de diffusion plus le rapport de Strehl diminue, car ces phénomènes élargissent la PSF, donc diminue son maximum.

Le rapport de Strehl peut être calculé de façon équivalente [20], en partant du décalage du front d'onde par rapport au front d'onde d'un système focalisant parfaitement. Comme l'intensité de l'onde focalisée est le module carré de la transformée de Fourier du champ au niveau de la pupille, on a :

$$S = \left| \langle e^{i\phi} \rangle \right|^2 = \left| \langle e^{i2\pi \frac{\delta}{\lambda}} \rangle \right|^2$$

où $\phi = 2\pi \frac{\delta}{\lambda}$ est le décalage en phase du front d'onde sur l'ouverture, à la longueur d'onde λ . La formule de Ruze (de la théorie des antennes) donne l'approximation suivante :

$$S \approx e^{-\sigma^2}$$

où σ est l'écart-type de la phase du front d'onde sur l'ouverture.

Le rapport de Strehl d'un œil humain va dépendre de la taille de la pupille. Pour une pupille de 5 mm après correction de l'aberration sphérique et de l'astigmatisme, le rapport de Strehl est d'environ 0,05 (vision.berkeley.edu/roordalab). Pour une pupille d'1 mm le rapport de Strehl est proche de 1 mais la résolution est mauvaise car la diffraction est très importante.

I.5 Méthodes de mesure de transparence

Plusieurs pathologies peuvent être responsable de la perte de transparence cornéenne par l'augmentation de la diffusion, comme des infections, des réactions immunitaires, des traumatismes, l'âge ou la chirurgie de la cornée. Dans certains cas la greffe chirurgicale de cornée, à partir d'un donneur décédé, est le seul traitement possible. Plus de 10 millions de personnes sont affectées par un trouble de la transparence cornéenne, donnant lieu à un grave handicap visuel. Parmi eux, plus d'1,5 million deviennent aveugles, souvent à cause de mauvaises conditions pour la greffe ou d'absence de greffon [21, 22]. Le taux de réussite d'une transplantation varie entre 60 % et 90 % [23]. En considérant que la majorité des cas (près de 80 % [24]) de cécité causée par perte de transparence cornéenne sont évitables, une prévention ou un traitement thérapeutique par un diagnostic précoce sont préférables à une transplantation cornéenne dont le taux de réussite lorsque la cécité est atteinte est très faible [23].

Dans la pratique, que ce soit en clinique ou dans les laboratoires des banques des yeux, l'évaluation de la transparence de la cornée est limitée à une simple observation des opacités par un biomicroscope à lampe à fente. L'appareil de lampe à fente est un dispositif qui envoie une fente de lumière (d'une source halogène) sur la cornée avec un angle d'incidence réglable, puis un objectif de microscope permet d'observer la fente de lumière diffusée par la cornée à différents grossissements. Cette observation s'accompagne parfois d'une comparaison avec une échelle de notation arbitraire et subjective (de 0 à 4 ou 5, 0 indiquant une cornée claire et 4 ou 5 une cornée opaque) [25, 26]. Un exemple de telles images est montré sur la figure I.9.

Les images choisies sur cette figure sont les images des cas le plus extrêmes, où la différence est flagrante. En revanche il est beaucoup plus difficile de détecter une cornée faiblement diffusante, par exemple peu après l'apparition d'une pathologie, ou bien de comparer des images d'une même cornée à des moments différents pour réaliser le suivi de l'évolution d'une pathologie.

Par la nature subjective et qualitative de cette méthode, les résultats sont observateur-dépendants, difficiles à standardiser et manquent de reproductibilité. Plusieurs équipes ont proposé d'autres méthodes pour quantifier et/ou évaluer objectivement la transparence cornéenne [27].

Des auteurs ont proposé une amélioration du biomicroscope à lampe à fente [27, 28] en ajoutant des polariseurs pour séparer la réflexion spéculaire de la lumière diffusée. Cette méthode est basée sur l'analyse des niveaux de gris du signal de la cornée. La résolution axiale reste cependant limitée et l'analyse n'est pas très précise.

D'autres auteurs ont proposé une méthode utilisant des images de photographie Scheimpflug [29]. Cette méthode permet, par l'inclinaison du capteur par rapport à l'objectif, d'obtenir des images en coupe de la cornée où toute la cornée est mise au point. À partir d'images de photo-



Figure I.9 – En haut : image d'un biomicroscope à lampe à fente. En bas : images par lampe à fente d'une cornée saine peu diffusante (à gauche) et d'une cornée pathologique fortement diffusante (à droite).

graphie Scheimpflug les auteurs calculent des moyennes d'intensité de la zone hyperréfléctive observée sur ces images. La répétabilité de cette méthode n'a été validée que sur des mesures en laboratoire.

Une autre méthode utilise la microscopie confocale [30] pour évaluer la diffusion après une opération de chirurgie réfractive. L'inconvénient de la microscopie confocale est la nécessité d'un contact physique entre l'objectif du microscope et la cornée, ce qui est désagréable pour le patient et n'est donc pas utilisé comme examen de routine.

Il existe également des méthodes d'évaluation de la transparence cornéenne basées sur la tomographie optique cohérente (OCT) très répandue en clinique [31].

Chacune de ces techniques présente ses propres avantages et inconvénients. Cependant aucune de ces approches n'a gagné un usage à large échelle. Récemment, des auteurs [32] ont développé une technique de mesure très sensible aux variations angulaires de la lumière rétro-diffusée. Ils ont ainsi mesuré une augmentation de la lumière rétrodiffusée sur des cornées *ex vivo* avant même l'apparition d'œdème. Cette méthode nécessite l'utilisation d'un appareil de mesure très sensible, et un balayage angulaire. Elle n'a pour l'instant pas été appliquée *in vivo* mais pourrait permettre une estimation objective et très sensible de la diffusion dans la cornée.

Cela confirme qu'il existe un besoin d'un outil simple d'utilisation et une procédure de diagnostic permettant la caractérisation objective et quantitative de la transparence cornéenne. En clinique, un tel outil permettra un meilleur suivi des patients, améliorant ainsi la prévention, le diagnostic et le traitement de pathologies affectant la transparence cornéenne.

Chapitre II

Modèle de diffusion de la lumière dans la cornée

Douter de tout ou tout croire, ce sont deux solutions également commodes qui l'une et l'autre nous dispensent de réfléchir.

Henri Poincaré, *La Science et l'hypothèse* (1908)

Sommaire

II.1	Histologie et hypothèses du modèle	16
II.2	Équation de transfert radiatif (ETR)	17
II.2.1	Équation de transfert radiatif et solution	17
II.3	Modèle des kératocytes & lacs	20
II.3.1	Libre parcours moyen de diffusion	20
II.3.2	Fonction de répartition	22
II.4	Modélisation des domaines 2D de fibrilles de collagène	23
II.4.1	Section efficace de diffusion	23
II.4.2	Fonction de corrélation de paires	24
II.4.3	Fonction de répartition des fibrilles de collagène	27
II.4.4	Fonction de répartition et libre parcours moyen total	27
II.5	Modélisation de la nanostructure du stroma et transparence	27
II.5.1	Méthode d'analyse des images de microscopie électronique	28
II.5.2	Modèle de disques durs	30
II.5.3	Thermodynamique de la cornée	37

Dans ce chapitre nous allons développer notre approche physique de la diffusion de la lumière dans la cornée. Il s'agit d'une approche globale, qui essaie de garder aussi peu de paramètres que nécessaire, ne prenant pas en compte les détails anatomique précis de la structure de la cornée mais cherchant plutôt à en tirer des lois générales. Nous allons dans un premier temps établir un modèle de diffusion simple, puis détailler pour chaque structure leur effet sur la

transparence. Nous nous intéresserons ensuite à la nanostructure du stroma cornéen, que nous essayerons de modéliser avec un modèle simple à un seul paramètre. Enfin nous établirons les liens entre la nanostructure et les propriétés thermodynamiques de la cornée, que l'on peut mesurer à l'échelle macroscopique.

II.1 Histologie et hypothèses du modèle

Pour modéliser la diffusion de la lumière dans la cornée, il faut considérer les différents éléments qui la composent. Le stroma constituant 90% de la cornée est la structure principale responsable de la transparence de celle-ci. Nous ne modéliserons donc que l'interaction de la lumière avec le stroma. La figure II.1 montre une image de coupe histologique (II.1a) ainsi que le schéma représentant les éléments inclus dans le modèle (II.1b). Le stroma est constitué de lamelles contenant des fibrilles de collagène orientées dans une direction principale. Cette direction principale varie d'une lamelle à une autre. Nous ne considérerons aucune direction privilégiée pour l'orientation des lamelles. Les autres composants que nous considérerons sont les kératocytes et les lacs. Les kératocytes sont les cellules qui synthétisent le collagène, et les lacs sont les structures formées par deux lamelles disjointes en cas d'œdème, formant une zone allongée sans fibrille de collagène.

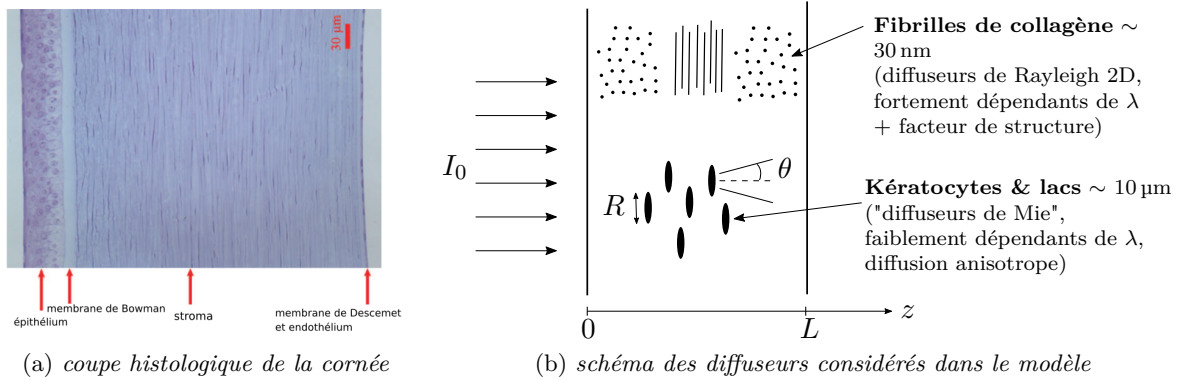


Figure II.1 – Histologie de la cornée (a) et schéma du modèle présentant les différents diffuseurs présents dans le stroma (b).

Comme la cornée est transparente dans son état physiologique, on se limite au régime de faible diffusion. On exclut donc les cornées fortement diffusantes de notre modèle, mais celles-ci peuvent être diagnostiquées à l'aide d'un biomicroscope ou par simple contrôle visuel, et ne nécessitent donc pas une analyse précise de leurs propriétés de diffusion. En revanche les cornées pathologiques faiblement diffusantes nécessitent le développement d'un outil de diagnostic permettant de détecter de faibles évolutions de la diffusion. En terme physique, on s'intéresse donc aux cornées dont le libre parcours moyen de diffusion est de l'ordre de l'épaisseur de la cornée : $L \lesssim \ell_s$.

On cherche à développer le modèle le plus simple, contenant le moins de paramètres possible, permettant de décrire l'intensité diffusée, et notamment la distribution angulaire et le spectre transmis et réfléchi par la cornée.

II.2 Équation de transfert radiatif (ETR)

Pour développer un modèle de diffusion de la lumière dans la cornée, nous avons travaillé en collaboration avec Rémi Carminati (Institut Langevin, ESPCI, Paris), spécialiste de l'optique des milieux complexes. Il a notamment résolu l'équation de transfert radiatif dans le régime de diffusion simple ce qui a défini le cadre théorique de notre modèle.

L'équation de transfert radiatif décrit l'évolution de la luminance énergétique au cours de la propagation. En radiométrie on définit la luminance énergétique L_e comme étant la puissance par unité de surface du rayonnement passant ou étant émis en un point d'une surface, et dans une direction donnée par unité d'angle solide^{1, 2}. Il ne faut pas la confondre avec la luminance définie en photométrie (c'est-à-dire prenant en compte la réponse de la rétine en fonction de la longueur d'onde). Comme nous ne nous intéressons pas ici à la réponse de la rétine, nous utiliserons le terme luminance pour désigner la luminance énergétique, que nous noterons L .

II.2.1 Équation de transfert radiatif et solution

L'équation de transfert radiatif est une équation aux dérivées partielles faisant intervenir des termes de perte par diffusion ou absorption, et des termes de gain par diffusion dans la direction considérée ou par une source. Dans notre cas, nous ne considérons que les pertes par diffusion (puisque la cornée est un tissu très peu absorbant dans le visible [16, 33, 34]) et nous ne considérons qu'un terme de gain, correspondant à la luminance diffusée dans la direction considérée. L'équation de transfert radiatif peut alors s'écrire :

$$\vec{u} \cdot \vec{\nabla} L(\vec{r}, \vec{u}) = \underbrace{-\frac{1}{\ell_s} L(\vec{r}, \vec{u})}_{\text{perte}} + \underbrace{\frac{1}{4\pi\ell_s} \int_{4\pi} p(\vec{u}, \vec{u}') L(\vec{r}, \vec{u}') d\Omega'}_{\text{gain}} \quad (\text{II.1})$$

où $p(\vec{u}, \vec{u}')$ est la fonction de répartition (en anglais « phase function ») et $L(\vec{r}, \vec{u})$ est la luminance.

La fonction de répartition $p(\vec{u}, \vec{u}')$ représente la probabilité de changement de direction de propagation de l'onde d'une direction \vec{u}' vers une direction \vec{u} . Cette fonction traduit le processus de diffusion par les différentes familles de diffuseurs. La luminance $L(\vec{r}, \vec{u})$ [$\text{W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$] représente le flux d'énergie en un point \vec{r} dans la direction \vec{u} .

Le membre de gauche de l'équation de transfert radiatif décrit l'évolution spatiale de la luminance (projection du gradient de la luminance dans la direction \vec{u}). Le membre de droite est composé d'un premier terme négatif qui représente la perte de luminance dans la direction \vec{u} au cours de la propagation dans le milieu (ce terme donnera une exponentielle décroissante avec une atténuation décrite par le libre parcours moyen de diffusion). Le second terme est une intégrale sur l'angle solide qui représente les événements de diffusion qui vont augmenter la luminance dans la direction \vec{u} .

1. BIPM, Le Système international d'unités, Sèvres, France, BIPM, 2006, 8e éd., 92 p. (ISBN 92-822-2213-6), p.29

2. Commission électrotechnique internationale, « Luminance énergétique », dans CIE 60050 Vocabulaire électrotechnique international, 2015 (1re éd. 1987)

Changement de coordonnées et symétrie

$$\text{On définit } \mu = \cos(\theta) \Rightarrow \begin{cases} L(z, \theta, \phi) &= L(z, \mu, \phi) \\ p(\vec{u}, \vec{u}') &= p(\mu, \mu', \phi - \phi') \end{cases} \quad (\text{isotrope selon l'angle } \phi)$$

La projection sur l'axe z de l'équation de transfert radiatif donne :

$$\mu \frac{\partial L}{\partial z}(z, \mu) = -\frac{1}{\ell_s} L(z, \mu) + \frac{1}{2\ell_s} \int_{-1}^{+1} p^0(\mu, \mu') L(z, \mu') d\mu' \quad (\text{II.2})$$

$$\text{avec } p^0(\mu, \mu') = \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} p(\mu, \mu', \phi - \phi') d\phi'$$

Intensité balistique et luminance diffusée

La notion d'intensité balistique est une notion statistique (un photon n'ayant pas de trajectoire définie) qui correspond à la moyenne cohérente de l'intensité. Plus formellement, on peut écrire le champ transmis de la façon suivante :

$$E = \langle E \rangle + \delta E \quad \text{avec } \langle \delta E \rangle = 0$$

L'intensité moyenne transmise s'écrit alors :

$$\langle I \rangle = \langle EE^* \rangle = \langle |\langle E \rangle|^2 + |\delta E|^2 + 2\Re[\langle E \rangle^* \delta E] + 2\Re[\langle E \rangle \delta E^*] \rangle$$

et comme $\langle E \rangle$ et δE sont des variables indépendantes, on a :

$$\begin{aligned} \langle I \rangle &= |\langle E \rangle|^2 + \langle |\delta E|^2 \rangle + 2\langle E \rangle^* \Re[\delta E] + 2\langle E \rangle \Re[\delta E^*] \\ &= |\langle E \rangle|^2 + \langle |\delta E|^2 \rangle. \end{aligned}$$

Le premier terme est l'intensité balistique et le second est l'intensité diffusée. L'intensité balistique doit vérifier l'équation de Helmholtz (propagation en espace libre) :

$$\Delta \langle E \rangle + \frac{\omega^2}{c^2} n_{\text{eff}}^2 \langle E \rangle = 0 \quad \text{avec } n_{\text{eff}} = n'_{\text{eff}} + i n''_{\text{eff}}. \quad (\text{II.3})$$

On retrouve alors l'équation de Bouguer-Beer-Lambert pour l'intensité balistique :

$$I_{\text{bal}}(z) = I_0 e^{-\frac{z}{\ell_s}} \quad (\text{II.4})$$

On peut également retrouver cette expression à partir de l'équation de transfert radiatif en écrivant la luminance en deux termes, l'un correspondant à l'intensité balistique et l'autre contenant toute partie qui ne diffuse pas vers l'avant ($\mu = 1$) qu'on appelle luminance diffusée :

$$L(z, \mu) = I_{\text{bal}}(z) \delta(\mu - 1) + L_{\text{diff}}(z, \mu) \quad (\text{II.5})$$

En injectant l'expression de la luminance balistique $L_{\text{bal}} = I_{\text{bal}} \delta(\mu - 1)$ dans l'équation de transfert radiatif et en intégrant sur μ on a :

$$\int_{-1}^{+1} \mu \frac{\partial I_{\text{bal}}}{\partial z}(z) \delta(\mu - 1) d\mu = -\frac{1}{\ell_s} I_{\text{bal}}(z) \int_{-1}^{+1} d\mu + \frac{I_{\text{bal}}(z)}{2\ell_s} \int_{-1}^{+1} p^0(\mu, 1) d\mu$$

$$\frac{\partial I_{\text{bal}}}{\partial z}(z) = -\frac{2I_{\text{bal}}(z)}{\ell_s} + \frac{I_{\text{bal}}(z)}{\ell_s}$$

On retrouve alors l'équation de Bouguer-Beer-Lambert :

$$\frac{\partial I_{\text{bal}}}{\partial z}(z) = -\frac{1}{\ell_s} I_{\text{bal}}(z)$$

Pour la luminance diffusée on obtient :

$$\mu \frac{\partial L_{\text{diff}}}{\partial z}(z, \mu) = -\frac{1}{\ell_s} L_{\text{diff}}(z, \mu) + \frac{1}{2\ell_s} \int_{-1}^{+1} p^0(\mu, \mu') L_{\text{diff}}(z, \mu') d\mu' + \frac{1}{2\ell_s} p^0(\mu, 1) I_0 e^{-\frac{z}{\ell_s}}$$

où l'on a négligé la diffusion multiple (approximation de faible diffusion), ce qui donne finalement :

$$\mu \frac{\partial L_{\text{diff}}}{\partial z}(z, \mu) = -\frac{1}{\ell_s} L_{\text{diff}}(z, \mu) + \frac{1}{2\ell_s} p^0(\mu, 1) I_0 e^{-\frac{z}{\ell_s}} \quad (\text{II.6})$$

Solution pour la luminance diffusée

On résout cette équation différentielle en cherchant une solution générale à l'équation linéaire homogène associée et une solution particulière.

La solution générale est : $L_{\text{gen}} = A \exp\left(-\frac{z}{\mu \ell_s}\right)$

et la solution particulière : $L_{\text{par}} = B \exp\left(-\frac{z}{\ell_s}\right)$

En injectant la solution particulière dans l'équation différentielle on obtient :

$$\mu B \left(-\frac{1}{\ell_s}\right) = -\frac{1}{\ell_s} B + \frac{1}{2\ell_s} p^0(\mu, 1) I_0$$

$$B = \frac{1}{2(1-\mu)} p^0(\mu, 1) I_0$$

La solution complète est donc :

$$L_{\text{diff}}(z, \mu) = A \exp\left(-\frac{z}{\mu \ell_s}\right) + \frac{p^0(\mu, 1)}{2(1-\mu)} I_0 \exp\left(-\frac{z}{\ell_s}\right) \quad (\text{II.7})$$

Pour trouver l'expression de la constante A , on impose une condition limite. On suppose qu'il n'y a pas de lumière diffuse provenant de l'endothélium ($z = L$) :

$$L_{\text{diff}}(z = L, \mu < 0) = 0 \quad \Rightarrow \quad A = -\frac{p^0(\mu, 1)}{2(1-\mu)} I_0 \exp\left(-\frac{(\mu-1)L}{\mu \ell_s}\right),$$

la solution avec cette condition limite est alors :

$$L_{\text{diff}}(z, \mu) = \frac{p^0(\mu, 1)}{2(1-\mu)} I_0 \left[e^{-\frac{z}{\ell_s}} - e^{-\frac{(\mu-1)L+z}{\mu \ell_s}} \right] \quad (\text{II.8})$$

ℓ_s et $p^0(\mu, 1)$ sont des paramètres **effectifs**, considérant 2 familles de diffuseurs (domaines de fibrilles de collagène et kératocytes).

II.3 Modèle des kératocytes & lacs

Les kératocytes et les lacs sont des structures larges de plusieurs microns latéralement et peuvent donc être considérés comme des diffuseurs de type Mie pour les longueurs d'onde du spectre visible. Ainsi leur section efficace de diffusion est faiblement dépendante de la longueur d'onde et leur taille influence la distribution angulaire de l'intensité diffusée.

On représente ces diffuseurs comme illustré sur la figure II.2.

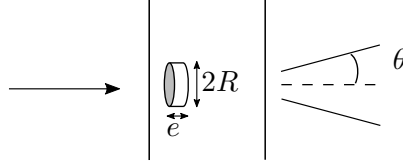


Figure II.2 – Schéma du modèle des diffuseurs de Mie dans la cornée.

II.3.1 Libre parcours moyen de diffusion

a) Les kératocytes

On trouve dans la littérature [35, 36] la dimension caractéristique et la densité des kératocytes dans le stroma d'une cornée saine :

$$R \approx 15 \mu\text{m} \quad \text{et} \quad \rho_K \approx 20\,500 \text{ cellules}/\text{mm}^3$$

La section efficace de diffusion des kératocytes σ_K va dépendre de leur section géométrique, de leur différence d'indice optique avec le milieu extra-cellulaire, et de leur épaisseur. On trouve dans la littérature [37, 38] l'expression suivante :

$$\begin{aligned} \sigma_K &= 2\pi R^2 \left(1 - \cos \left(\frac{4\pi e(m-1)}{\lambda} \right) \right) \\ &= 2\pi R^2 (1 - \cos \delta) \end{aligned} \quad (\text{II.9})$$

où $\delta = 4\pi e(m-1)/\lambda$ est la différence de phase de la lumière à la longueur d'onde λ après la traversée d'un kératocyte d'épaisseur e et d'un rapport d'indice optique m avec le milieu extra-cellulaire.

Les kératocytes ont un rapport d'indice optique : $m = n_K/n_e$, avec $n_K = 1,381$ $n_e = 1,375$, les indices optiques des kératocytes et du milieu extra-cellulaire respectivement [37]. L'indice optique des kératocytes au repos est très proche de celui du milieu extra-cellulaire. En effet il est suggéré que les kératocytes synthétisent des protéines appelées cristallines pour réduire l'indice optique de leur cytoplasme et ainsi la quantité de lumière qu'ils diffusent.

Le libre parcours moyen de diffusion est relié à la section efficace de diffusion et la densité de diffuseurs. La figure II.3 illustre cette relation. Pour une longueur d'onde $\lambda = 550 \text{ nm}$, en considérant une épaisseur des kératocytes $e \simeq 1 \mu\text{m}$, on trouve un déphasage $\delta \simeq 0,0997$. Ce qui donne pour le libre parcours moyen de diffusion associé aux kératocytes :

$$\ell_K = \frac{1}{\rho_K \sigma_K} = \frac{1}{2\pi \rho_K R^2 (1 - \cos \delta)} \approx 6948 \mu\text{m} \quad (\text{II.10})$$

Pour $\lambda = 840 \text{ nm}$ (longueur d'onde centrale de l'OCT clinique de l'hôpital des Quinze Vingts), $\delta \simeq 0,0653$ et $\ell_K \approx 16\,200 \mu\text{m}$.

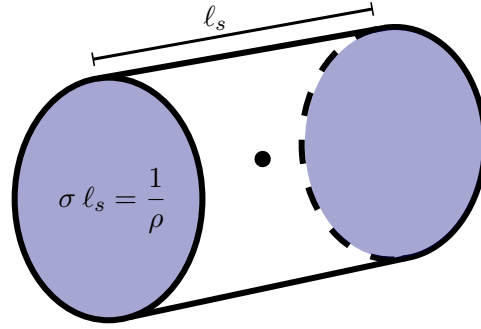


Figure II.3 – Représentation de la section efficace de diffusion, du libre parcours moyen de diffusion et de la densité de diffuseurs. Le cylindre a une section égale à σ et le libre parcours moyen est tel que $V = 1/\rho$.

b) Les lacs

Les lacs sont des zones contenant du milieu extra-cellulaire qui apparaissent en cas d'œdème et se développent autour des kératocytes. Ce sont donc des structures de faible épaisseur et étendues latéralement, que l'on modélise de la même manière que les kératocytes. Cependant leur indice optique est différent puisqu'ils sont remplis de milieu extra-cellulaire, ils ont donc l'indice de la solution saline qui les compose. Leur épaisseur est variable puisque les lacs se développent avec le degré d'œdème, ils peuvent donc atteindre plusieurs microns d'épaisseur. On va considérer en première approximation que les lacs se développent autour de chaque kératocyte, et qu'ils sont donc présents en même densité que ces derniers dans le stroma. Si l'on considère leur indice $n_1 = 1,335$ (valeur de l'indice optique de la solution saline du milieu extra-cellulaire [39]) pour une épaisseur de 1 micron, on obtient :

$$\delta \simeq -0,6647 \quad \text{et} \quad \ell_1 \simeq 162 \mu\text{m}.$$

On a considéré ici des lacs avec la même surface que les kératocytes, ce qui n'est généralement pas le cas, les lacs étant plus larges. On observe déjà dans ces conditions que l'apparition de lacs se traduit par une baisse importante du libre parcours moyen de diffusion associé à ces structures micrométriques.

Le même calcul pour la longueur d'onde $\lambda = 840 \text{ nm}$ donne $\delta \simeq -0,4352$ et $\ell_1 \simeq 370 \mu\text{m}$.

c) Synthèse des résultats

On observe que les libres parcours moyens de diffusion de ces diffuseurs de type Mie ont malgré tout une dépendance en longueur d'onde non négligeable. Il y a un peu plus d'un facteur 2 entre les libres parcours moyens de diffusion calculés à 550 et 840 nm.

Le tableau II.1 rassemble les valeurs des paramètres de la littérature et celles calculées dans cette section pour les kératocytes et les lacs. On a supposé dans cette section que la dispersion était faible et nous avons utilisé les mêmes valeurs des indices de réfraction à 550 nm et à 840 nm pour les kératocytes et les lacs. Ces valeurs sont celles de la référence [37], les indices optiques ont été mesurés à 589 nm et comme le mentionnent les auteurs, les variations d'indice avec la longueur d'onde devraient être faibles dans la plage du spectre visible.

	kératocytes	lacs
taille typique R	15 μm	15 μm
épaisseur e	1 μm	1 μm
densité ρ	20 500 mm^{-3}	20 500 mm^{-3}
indice optique n	1,381	1,335
ℓ_s à 550 nm	6948 μm	162 μm
ℓ_s à 840 nm	16 200 μm	370 μm

Tableau II.1 – Résumé des valeurs considérées des paramètres modélisant les kératocytes et les lacs, ainsi que les valeurs calculées du libre parcours moyen de diffusion à deux longueurs d'onde. Les tailles typiques et la densité des kératocytes proviennent de [35, 36], les indices optiques proviennent de [37, 39].

II.3.2 Fonction de répartition

Fonction de répartition d'Henye-Greenstein

La fonction d'Henye-Greenstein est la fonction de répartition la plus simple dépendant d'un seul paramètre, le facteur d'anisotropie g . Elle est normalisée et s'écrit :

$$p_K(\mu, 1) = \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2\mu g]^{\frac{3}{2}}} \quad \text{avec } -1 < g < 1 \quad (\text{II.11})$$

La figure II.4 représente la fonction de répartition d'Henye-Greenstein pour différentes valeurs du facteur d'anisotropie.

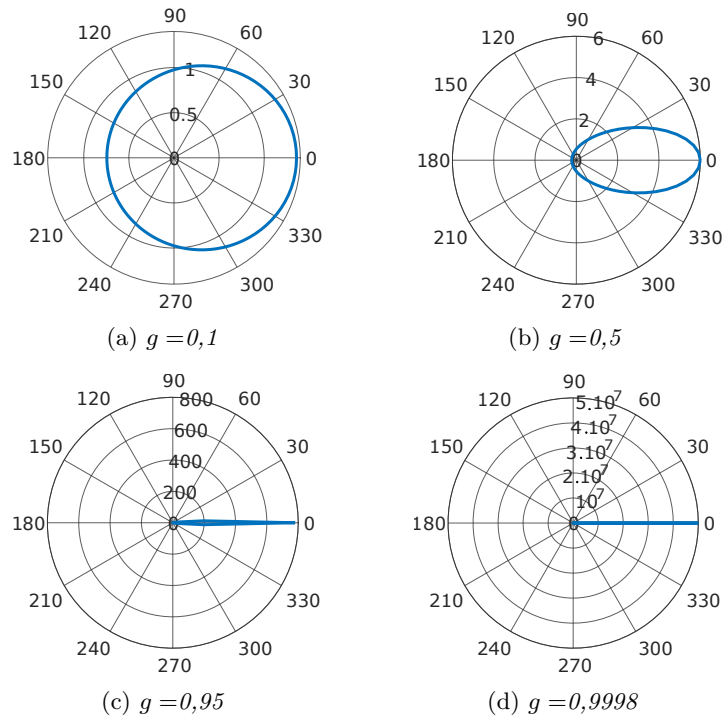


Figure II.4 – Diagramme polaire de la fonction de répartition d'Henye-Greenstein pour différentes valeurs du facteur d'anisotropie g .

On peut estimer le facteur d'anisotropie g à partir de la taille du lobe de diffraction. En effet la taille angulaire du lobe de diffraction d'un objet de taille caractéristique R est :

$$\sin(\theta_{\max}) \approx \frac{\lambda}{2R}$$

Le facteur d'anisotropie s'écrit alors :

$$g \approx \cos(\theta_{\max}) = \sqrt{1 - \sin^2(\theta_{\max})} \approx \sqrt{1 - \frac{\lambda^2}{4R^2}} \approx 1 - \frac{\lambda^2}{8R^2}$$

Pour $\lambda = 550 \text{ nm}$ et $R = 15 \text{ }\mu\text{m}$ on trouve $g = 0,9998$. On voit que ce paramètre varie peu avec la longueur d'onde car $\lambda \ll R$ pour les longueurs d'onde dans le visible.

II.4 Modélisation des domaines 2D de fibrilles de collagène

On suppose qu'il n'y a qu'un seul domaine par lamelle et qu'il n'y a pas de dépendance en ϕ (isotropie de l'orientation des domaines suivant ϕ). On considère une lumière incidente de vecteur d'onde \vec{k}_{inc} de norme $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$.

On définit le vecteur de diffusion comme étant la différence entre le vecteur d'onde diffusé et le vecteur d'onde incident : $\vec{q} = k_0 \vec{u} - \vec{k}_{\text{inc}}$.

La norme du vecteur de diffusion peut se calculer géométriquement, à partir de la figure II.5 :

$$\begin{aligned} q^2 &= (k_0 \sin \theta)^2 + (k_0 (1 - \cos \theta))^2 = 2k_0^2 (1 - \cos \theta) \\ &= 2k_0^2 \left(-2 \sin \frac{\theta}{2} \sin \frac{-\theta}{2} \right) \\ &= 4k_0^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \end{aligned}$$

Ce qui donne finalement $q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2}$.

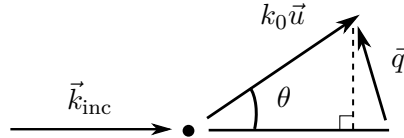


Figure II.5 – Représentation du vecteur de diffusion.

II.4.1 Section efficace de diffusion

Comme dans la littérature, on considère les fibrilles de collagène de longueur infinie, et nous nous plaçons donc dans une géométrie à 2 dimensions. Dans cette configuration, la section efficace de diffusion σ_c a la dimension d'une longueur. Le libre parcours moyen de diffusion correspondant est donc lié à cette section efficace de diffusion par unité de longueur σ_c [m] et à la densité surfacique de fibrilles de collagène ρ_c [m⁻²].

On trouve dans la littérature la formule de diffusion par des aiguilles diélectriques [40–42] :

Encart II.1 - Diffusion par des aiguilles diélectriques

On considère un champ incident E_0 à la longueur d'onde λ dans un milieu d'impédance caractéristique η interagissant avec une fibrille de collagène considérée comme une aiguille diélectrique de longueur infinie et de rayon a .

- $m = n_f / n_e$ est le rapport des indices optique du collagène fibrillaire sur celui du milieu extra-cellulaire. On trouve ces valeurs dans la littérature [39]. À 589 nm, $n_f = 1,413$ et $n_e = 1,359$.
- $P = \frac{E_0^2}{\eta} \frac{\pi^2 a^4}{16} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^3 (m^2 - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2 + 1)^2} \right)$ est la puissance diffusée par unité de longueur $[\text{W} \cdot \text{m}^{-1}]$ par une fibrille de collagène.
- $\sigma_f = \frac{P \eta}{E_0^2} = \frac{\pi^2 a^4}{16} \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^3 (m^2 - 1)^2 \left(1 + \frac{2}{(m^2 + 1)^2} \right)$ est la section efficace de diffusion par unité de longueur $[\text{m}]$ associée à une fibrille de collagène.

La section efficace de diffusion d'une lamelle de collagène dépend de la section efficace de diffusion d'une fibrille isolée et de l'organisation des fibrilles dans la lamelle, que l'on peut prendre en compte par l'intermédiaire du facteur de structure $S(\vec{q})$. Pour un milieu présentant un ordre à courte distance le facteur de structure est défini par :

$$S(\vec{q}) = 1 + \frac{1}{N} \sum_{j \neq k} e^{-i\vec{q} \cdot (\vec{r}_j - \vec{r}_k)} \quad (\text{II.12})$$

où N est le nombre de particules dans le milieu et \vec{r} leurs positions. Le facteur de structure permet de prendre en compte les interférences constructives ou destructives entre les différentes ondes émises par les diffuseurs.

La section efficace de diffusion d'une lamelle de collagène peut alors se calculer à partir de la section efficace de diffusion d'une fibrille de collagène σ_f (dont l'expression est indiquée dans l'encart II.1) et du facteur de structure :

$$\sigma_c = \sigma_f \frac{1}{2\pi} \int_0^{2\pi} S(q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2}) d\theta \quad (\text{II.13})$$

II.4.2 Fonction de corrélation de paires

Lien avec le facteur de structure

La figure de diffraction de l'ensemble des fibrilles de collagène dépend donc de leur organisation à travers le facteur de structure. Le facteur de structure est une grandeur qui décrit le milieu dans l'espace de Fourier et peut donc s'avérer très pratique en cristallographie lorsqu'on observe une figure de diffraction par rayons X, car dans ce cas on observe directement la

Encart II.2 - Transformation de Fourier

Pour les transformations de Fourier à n dimensions, nous utilisons les conventions suivantes :

$$\begin{aligned} - \mathcal{F}\{f(\vec{x})\} &= \int f(\vec{x}) e^{-i\vec{k}\cdot\vec{x}} d\vec{x} \\ - \mathcal{F}^{-1}\{\hat{f}(\vec{k})\} &= \frac{1}{(2\pi)^n} \int \hat{f}(\vec{k}) e^{i\vec{k}\cdot\vec{x}} d\vec{k} \end{aligned}$$

En particulier, on a :

$$\begin{aligned} - \mathcal{F}\{\delta(\vec{x})\} &= \mathcal{F}^{-1}\{\delta(\vec{x})\} = 1 \\ - \mathcal{F}\{1\} &= (2\pi)^n \delta(\vec{k}) \end{aligned}$$

transformée de Fourier du réseau cristallin, donc ce qu'on observe est le facteur de structure. En revanche, dans notre cas on veut décrire l'organisation des fibrilles dans l'espace réel, notamment car on peut les observer directement par microscopie électronique en transmission. L'équivalent du facteur de structure dans l'espace réel est la fonction de corrélation de paires $g(\vec{r})$ (cf figure II.6) qui décrit la variation de densité de particules (ici des fibrilles de collagène) en fonction de la distance à une particule de référence. Sa définition formelle est la suivante [43] :

$$g(\vec{r}) = \frac{1}{\rho} \left\langle \sum_{i \neq 0} \delta(\vec{r} - \vec{r}_i) \right\rangle \quad (\text{II.14})$$

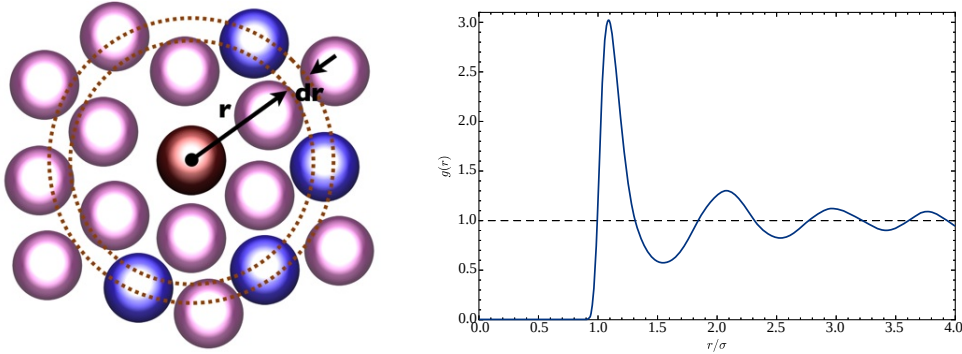


Figure II.6 — Fonction de corrélation de paires ou fonction de distribution radiale. L'axe des abscisses est normalisé par la distance moyenne entre particules, et la fonction de corrélation de paires est normalisée par la densité du milieu. source : Wikipédia – radial distribution function

Dans le cas d'un réseau cristallin parfait, la fonction de corrélation de paires est une somme de pics de Dirac espacés de la distance inter-atomique du cristal, car les atomes sont parfaitement positionnés, il n'y a donc pas de fluctuations sur leurs positions. On peut imaginer partir d'un tel milieu parfaitement ordonné, puis par la pensée augmenter le désordre pro-

gressivement. On verrait alors les pics s'élargir progressivement puis la fonction de corrélation de paires présentera des oscillations autour de la densité moyenne du milieu (comme dans la figure II.6 qui représente la fonction de corrélation de paires d'un milieu présentant un ordre à courte distance) pour finir par être constante pour un milieu parfaitement désorganisé.

La fonction de corrélation de paires permet donc une appréciation visuelle rapide du degré de corrélation dans le milieu. Plus les oscillations s'atténuent rapidement, moins le milieu est ordonné.

À partir des équations II.12 et II.14 on peut trouver le lien entre le facteur de structure et la fonction de corrélation de paires, qui est le suivant :

$$\begin{aligned} S(\vec{q}) &= 1 + \langle \rho \rangle \iint g(\vec{r}) e^{-i\vec{q} \cdot \vec{r}} d^2\vec{r} \\ &= 1 + \langle \rho \rangle \mathcal{F} \{g(\vec{r})\}. \end{aligned} \quad (\text{II.15})$$

Si le milieu est isotrope, alors $g(\vec{r}) = g(|\vec{r}|)$ et est appelée fonction de distribution radiale. La fonction de corrélation de paires est assez proche de la fonction d'autocorrélation, qui mesure aussi l'ordre du milieu considéré. Le lien entre ces fonctions et le facteur de structure est précisé dans l'annexe A.

L'équation II.13 relie la section efficace de diffusion des fibrilles de collagène au sein d'une lamelle à leur facteur de structure. Cette section efficace de diffusion peut aussi s'exprimer en fonction de la fonction de corrélation de paires [9]. Si on appelle ρ_c la densité surfacique de fibrilles de collagène, la section efficace de diffusion s'écrit :

$$\sigma_c = \sigma_f \left[1 + 2\pi\rho_c \int_0^\infty r [g(r) - 1] J_0^2(k_0 r) dr \right]. \quad (\text{II.16})$$

Cette équation traduit bien le fait que la section efficace de diffusion des fibrilles de collagène est directement dépendante de leur organisation, à travers la fonction de corrélation de paires. En effet pour un milieu désordonné, la fonction de corrélation de paires tend vers 1 et la section efficace des fibrilles vaut alors σ_f , alors que pour un milieu parfaitement ordonné (un cristal parfait), $g(\vec{r})$ est une somme de pics de Dirac, donc vaut zéro partout sauf aux positions du réseau, l'intégrale est alors négative et la section efficace σ_c est donc strictement inférieure à σ_f .

On peut ainsi calculer le libre parcours moyen de diffusion à partir de la section efficace de diffusion et la densité des fibrilles de collagène, par la relation suivante :

$$\ell_c = \frac{1}{\rho_c \sigma_c} \quad (\text{II.17})$$

La densité surfacique des fibrilles de collagène doit être inférieure à la densité d'un réseau hexagonal. En effet les fibrilles de collagène ne sont organisées en réseau que localement, et l'arrangement en réseau hexagonal est celui qui présente la plus grande densité³. La densité réelle sera donc toujours plus faible.

3. Laszlo Fejes Toth, "Über die dichteste Kugellagerung". Math. Z. 48 : 676–684. 1940

La densité d'un réseau hexagonal se calcule comme l'inverse de la surface du triangle formé par 3 centres de fibrilles (le motif du réseau hexagonal est un triangle équilatéral). En considérant un réseau hexagonal avec une distance moyenne entre premiers voisins de 60 nm on obtient une densité surfacique de fibrilles $\rho_c \approx 641,5 \mu\text{m}^{-2}$. Cette valeur est à comparer à celles obtenues à partir des images de microscopie électronique dans la section suivante, rassemblées dans le tableau II.2.

II.4.3 Fonction de répartition des fibrilles de collagène

La contribution des domaines de fibrilles de collagène à la fonction de répartition est :

$$p_c(\theta) = 2\pi \frac{S(q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2})}{\int_0^{2\pi} S(q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2}) d\theta} = \frac{\sigma_f}{\sigma_c} S(q = 2k_0 \sin \frac{\theta}{2})$$

II.4.4 Fonction de répartition et libre parcours moyen total

La fonction de répartition totale, incluant les contributions des kératocytes et des lacs ainsi que des lamelles de collagène est la combinaison des fonctions de répartition de chaque famille de diffuseur, pondérées par leur fraction volumique.

Nous n'avons considéré les fibrilles de collagène qu'à deux dimensions. Pour recombinaison l'ensemble des fonctions de répartitions, il faut alors considérer que les lamelles de collagènes sont disposées de façon isotrope selon l'angle ϕ , ce qui revient à considérer que la moitié des lamelles est orientée dans une direction et l'autre moitié dans la direction orthogonale. On peut alors écrire :

$$p^0(\mu, 1) = \frac{f_K}{f_K + f_c/2} p_K(\mu, 1) + \frac{f_c/2}{f_K + f_c/2} p_c(\mu, 1) \quad (\text{II.18})$$

avec f_K et f_c les fractions volumiques des kératocytes et des fibrilles de collagène respectivement. On trouve dans la littérature [37, 44, 45] que les kératocytes représentent 10 à 15 % du volume total du stroma, et les fibrilles de collagène de l'ordre de 25 % [13]. On a donc $f_K \approx 15\%$ et $f_c \approx 25\%$.

Concernant le libre parcours moyen de diffusion total, la combinaison est plus simple. En effet, il suffit d'ajouter les sections efficaces de diffusion de chaque famille de diffuseurs. Finalement ce sont les inverses des libres parcours moyens qui s'ajoutent. On a donc :

$$\frac{1}{\ell_s} = \frac{1}{\ell_K} + \frac{1}{\ell_c} \quad (\text{II.19})$$

II.5 Modélisation de la nanostructure du stroma et transparence

Pour étudier la nanostructure du stroma, nous avons analysé des images de microscopie électronique à transmission (MET) de cornées humaines. Ces images ont été obtenues par Michèle Savoldelli (hôpital Hôtel-Dieu, Paris) et sont issues d'un microscope électronique argentique dont nous avons récupéré soit des négatifs que nous avons numérisés puis dont nous avons inversé le contraste pour obtenir un fond clair, soit des photographies déjà développées que nous

avons directement numérisées. Pour les négatifs le grandissement est celui du microscope alors que pour les photographies développées il faut multiplier le grandissement du microscope avec celui utilisé lors du développement (le grandissement total est inscrit sur les photographies). Nous avons constaté un biais systématique dans les valeurs de grandissement du microscope électronique, d'un facteur 1,5, en comparant les valeurs des diamètres des fibrilles de collagène avec ceux mesurés dans la littérature. Comme les fibrilles de collagène ont une distribution de diamètres très fine (donc avec peu de variabilité d'une fibrille à l'autre), nous considérons que nous pouvons nous baser sur leur diamètre pour corriger notre grandissement. Nous avons donc appliqué ce facteur à toutes les images que nous avons numérisées, de façon à obtenir un diamètre de fibrille de collagène proche de 30 nm.

Nous avons sélectionné plusieurs images montrant les fibrilles de collagène en coupe orthogonale, dont nous avons analysé l'organisation. Comme ces images ont une très bonne résolution (selon les images le grandissement du microscope électronique varie entre 20 520, 39 900 et 52 300), on peut directement calculer la fonction de corrélation de paires des fibrilles de collagène dans une cornée humaine. Pour cela nous avons utilisé le programme d'analyse d'image *Fiji* avec un *plugin* permettant de calculer la fonction de corrélation de paires⁴.

II.5.1 Méthode d'analyse des images de microscopie électronique

La méthode est illustrée en prenant un exemple d'une image de microscopie électronique en transmission et en montrant les résultats des différentes étapes de l'analyse. L'image choisie est une image de cornée humaine saine, vue sous un grandissement de 52 300. La figure II.7a montre l'image originale numérisée des fibrilles de collagène et la figure II.7b montre cette même image après application d'un filtre gaussien permettant de supprimer les défauts de développement ou d'impression de la diapositive. Pour calculer la fonction de corrélation de paires, il

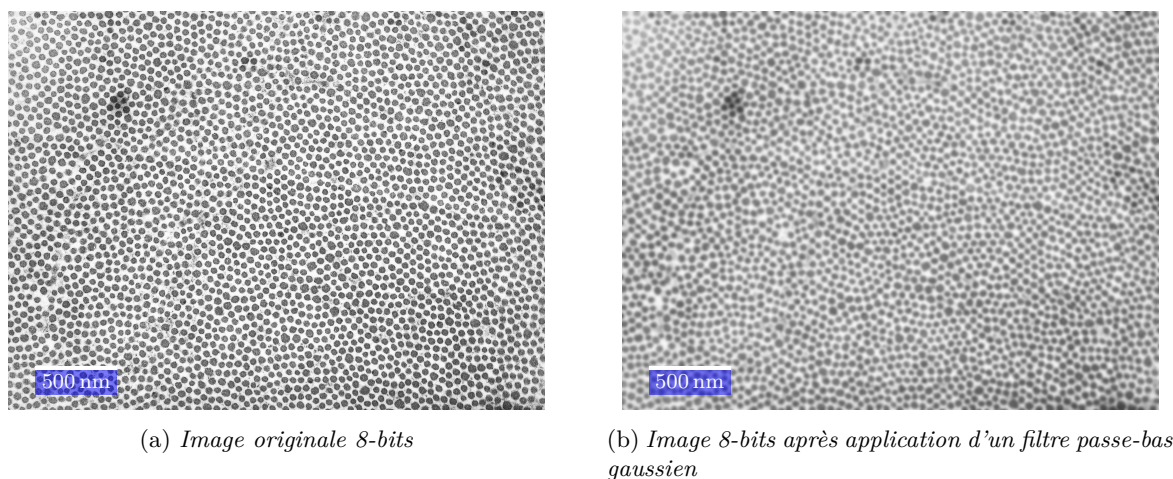
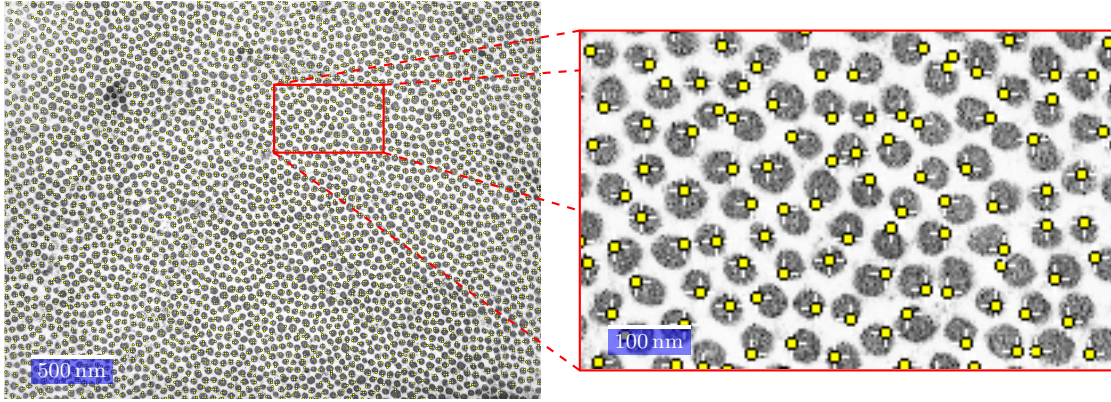


Figure II.7 – Exemple d'image des fibrilles de collagène en coupe orthogonale par microscopie électronique à transmission.

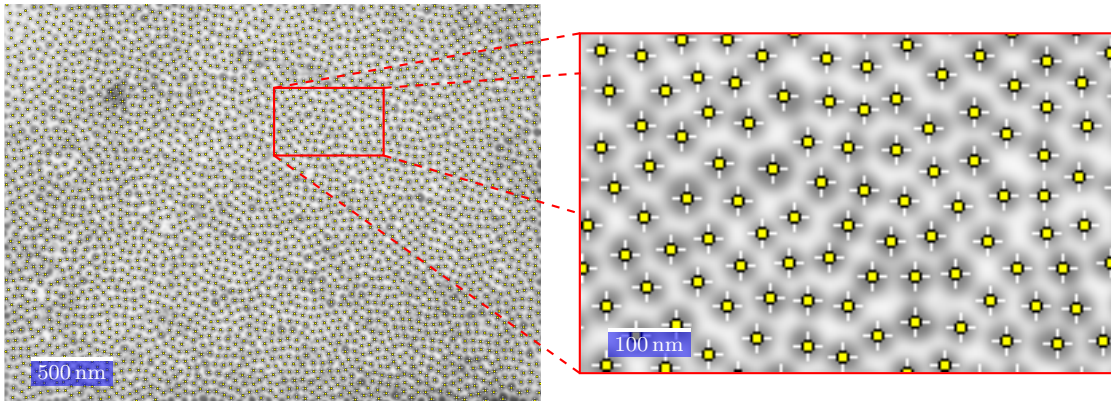
faut d'abord repérer les centres des fibrilles. Pour cela on doit définir un seuil, dont la valeur dépend de l'image, et il faut s'assurer que chaque fibrille est identifiée une et une seule fois et

4. https://imagejdocu.tudor.lu/macro/radial_distribution_function

que son centre est bien repéré. Pour déterminer ce seuil on utilise la fonction *Find Maxima* de *Fiji* qui a une option de pré-visualisation. La figure II.8 montre cette pré-visualisation pour l'image d'origine (II.8a) et l'image filtrée (II.8b). Dans les deux cas le seuil de détection a été optimisé manuellement.



(a) Détection des centres des fibrilles à partir de l'image d'origine



(b) Détection des centres des fibrilles après application d'un filtre passe-bas gaussien

Figure II.8 – Effet du filtrage passe-bas sur la détection des centres des fibrilles (en jaune) par la fonction *Find Maxima* de *Fiji*.

On observe ici l'importance d'appliquer filtrage passe-bas pour localiser précisément les centres des fibrilles. Sur l'image d'origine, la netteté apporte également les défauts d'impression, de développement ou de numérisation, ce qui rend les fibrilles non homogènes et la localisation du centre d'une fibrille se fait de façon aléatoire sur toute sa surface. De plus, certains défauts peuvent être considérés comme des fibrilles. Cela s'atténue avec le filtrage passe-bas.

Finalement, la figure II.9 représente les fonctions de corrélation de paires calculées à partir de l'image d'origine et de l'image filtrée. L'effet du filtrage passe-bas a permis de mieux localiser les fibrilles en conservant l'ordre dans leur organisation. Ainsi la fonction de corrélation de paires de l'image filtrée possède des pics mieux définis, plus fins et d'une plus grande amplitude. La différence entre ces deux résultats est très importante, à tel point que sans application du filtrage gaussien on a l'impression d'observer la fonction de corrélation de paires d'un milieu aléatoire. Il est donc nécessaire d'appliquer un filtre passe-bas sur les images pour s'assurer

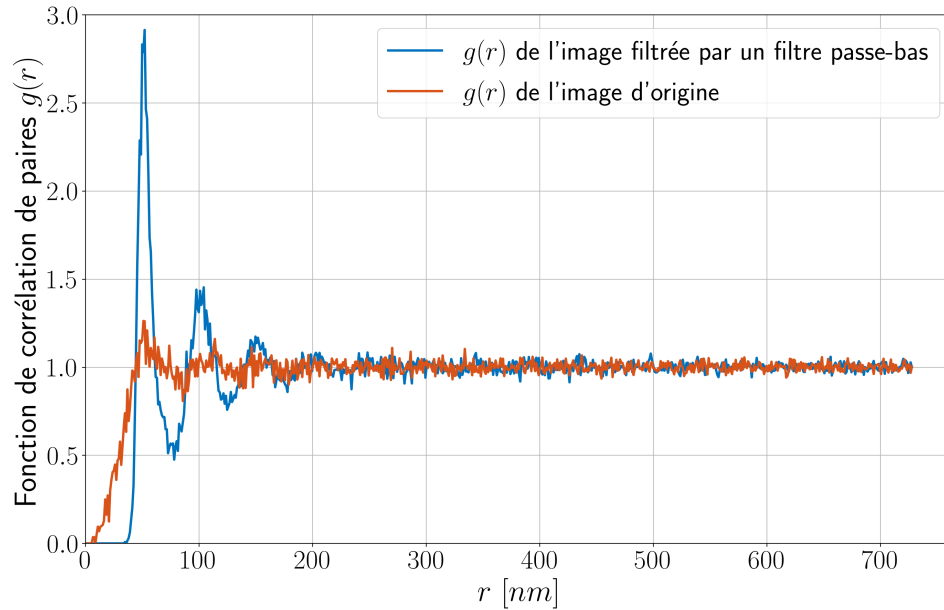


Figure II.9 – Fonctions de corrélation de paires de la même image avec ou sans filtrage passe-bas.

d'une bonne détection des positions des fibrilles.

II.5.2 Modèle de disques durs

Dans le stroma cornéen, les fibrilles de collagène sont entourées de protéoglycanes possédant des chaînes latérales linéaires de glycosaminoglycanes chargées négativement. Ces éléments créent à la fois un potentiel d'interaction électrostatique répulsif entre les fibrilles de collagène, et augmentent la pression osmotique au sein du stroma. Il existe des modélisations du potentiel d'interaction entre les fibrilles et des équilibres thermodynamiques au sein du stroma [13]. Cependant, du fait des différentes interactions possibles entre glycosaminoglycanes (électrostatique, osmotique, ou encore entropique), ces modèles sont complexes. Nous nous proposons ici d'analyser l'interaction entre les fibrilles à l'aide d'un modèle simple à un seul paramètre. L'objectif n'est pas de représenter précisément l'interaction complexe entre les fibrilles mais d'avoir un modèle simple, permettant d'expliquer l'organisation bidimensionnelle des fibrilles.

Description du modèle

On utilise un modèle de disques durs [46], analogue à 2 dimensions du modèle tridimensionnel des sphères dures. Il s'agit d'un modèle de mécanique statistique dans lequel on représente des particules (ici les fibrilles de collagène) comme des disques impénétrables, possédant tous le même diamètre et qui n'ont aucune interaction entre eux sauf lorsqu'ils sont en contact, auquel cas le potentiel d'interaction est infini.

Le diamètre des disques dans ce modèle, noté σ , ne correspond pas au diamètre des fibrilles mais à la distance typique d'interaction entre les fibrilles. En effet les disques n'interagissent que lorsqu'ils sont en contact, or les fibrilles de collagène dans le stroma cornéen ne sont pas en contact, c'est donc bien leur zone d'interaction qu'on modélise par un disque centré sur la

fibrille.

Ce type de modèle ne possède qu'un seul paramètre, la densité de remplissage :

$$\eta = \frac{\rho\pi\sigma^2}{4} \quad (\text{II.20})$$

où ρ est la concentration de particules et σ est leur diamètre. À partir de ce modèle, en utilisant l'équation de Percus-Yevick [47], on peut calculer la fonction de corrélation de paires d'un milieu rempli de tels disques avec une densité η . L'équation de Percus-Yevick à 2 dimensions peut être résolue numériquement ou approximée analytiquement. Ugo Tricoli, de l'équipe de Rémi Carminati, a implémenté les équations décrites dans l'article de Guo [46] qui sont des solutions numériques faciles à manipuler de l'équation de Percus-Yevick à 2 dimensions (donc pour le modèle des disques durs). Nous avons utilisé ce code écrit en *Matlab* pour ajuster la fonction de corrélation de paires décrite par ce modèle de disques durs avec les fonctions de corrélation de paires calculées depuis les images de microscopie électronique. L'objectif est d'abord de vérifier que l'on peut modéliser l'organisation des fibrilles de collagène dans la cornée par un modèle de disques durs à un seul paramètre, puis de déterminer si la distance d'interaction entre les fibrilles reste constante pour des cornées saines. Pour cela, on calcule le diamètre des disques à partir de la formule II.20, connaissant la densité de remplissage des disques et la concentration des fibrilles. La concentration des fibrilles est mesurée au moment de la détection des centres des fibrilles par *Fiji*, qui compte les fibrilles dans l'image. On divise ce nombre par la surface de l'image.

Modélisation de l'organisation des fibrilles de collagène

Nous avons analysé 16 images de microscopie électronique. Onze sont des images du stroma de cornées saines, quatre sont des images de cornées œdémateuses, et la dernière est située dans la zone de transition entre la cornée et la sclère ce qui se traduit par des fibrilles de tailles différentes et une distance inter-fibrillaire plus grande. La figure II.10 montre les cas typiques observés pour des images du stroma de cornées saines.

La figure II.11 montre les mêmes résultats pour une cornée œdémateuse, pour laquelle la distance inter-fibrillaire devient plus grande et les fibrilles de collagènes sont moins ordonnées.

Enfin la figure II.12 montre l'analyse de l'organisation des fibrilles de collagène dans la zone entre la cornée et la sclère, où la distribution de taille des fibrilles est plus large que dans le stroma, mais l'organisation est encore ordonnée (contrairement au reste de la sclère qui est un tissu très diffusant).

On remarque que le modèle des disques durs reproduit bien les oscillations observées dans les fonctions de corrélations de paires des différents échantillons. Seul le premier pic apparaît trop important dans le modèle. On peut expliquer ce résultat par l'échantillonnage de nos images qui n'est pas suffisant pour reproduire un pic très fin, comme dans la figure II.12 où l'on a que 5 ou 6 points pour décrire le pic.

Une autre part de l'explication vient de la précision avec laquelle on détecte le centre des fibrilles. Comme on l'a vu dans la section précédente, l'application d'un filtre passe-bas augmente grandement cette précision, mais il est possible que certains défauts persistent, ce qui peut limiter la précision de détection du centre des fibrilles.

Enfin, dans le modèle des disques durs, les disques sont impénétrables ; il n'y a donc aucun disque avant la distance σ (où l'interaction devient infinie), ce qui n'est pas le cas dans la réalité

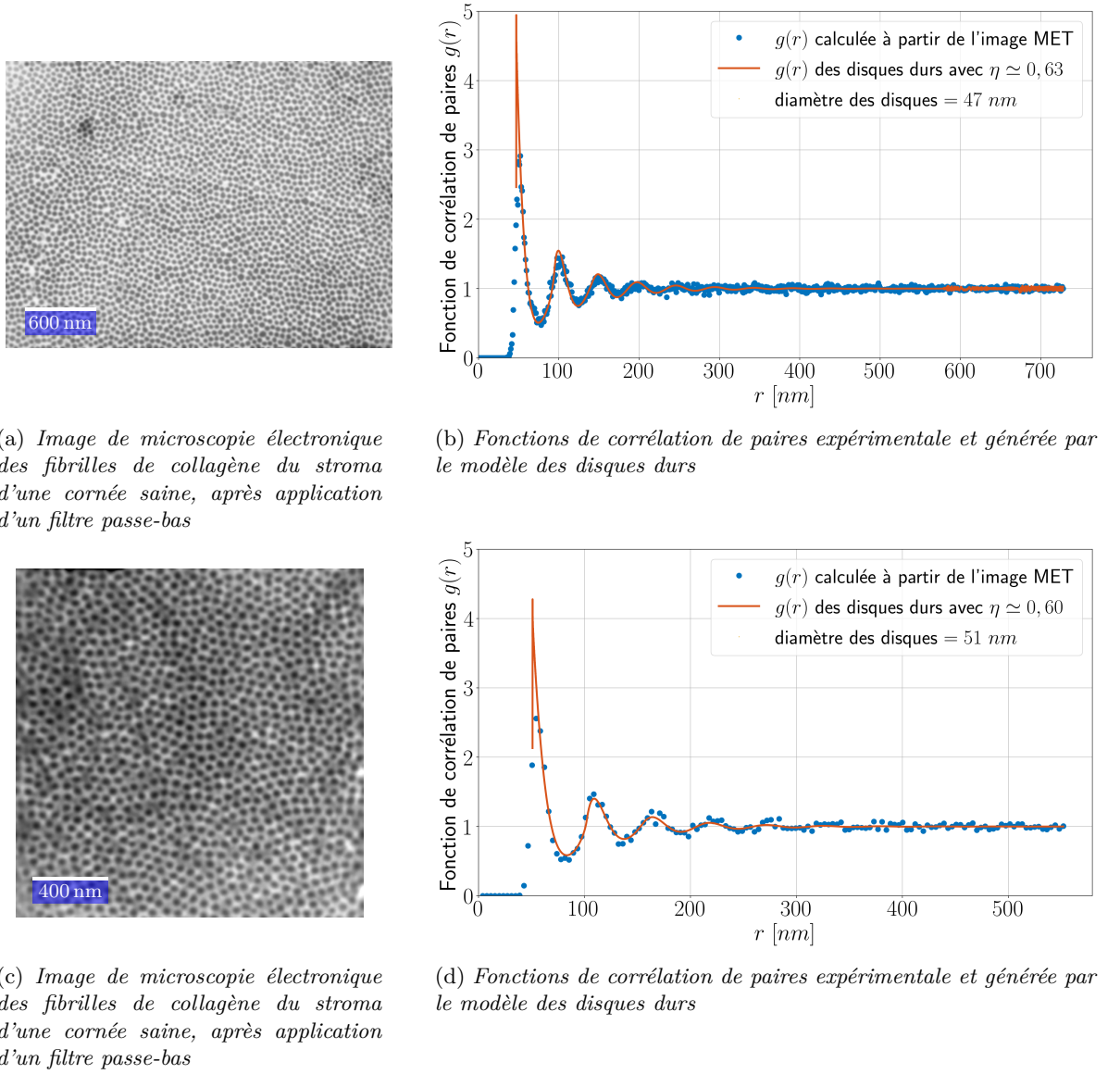
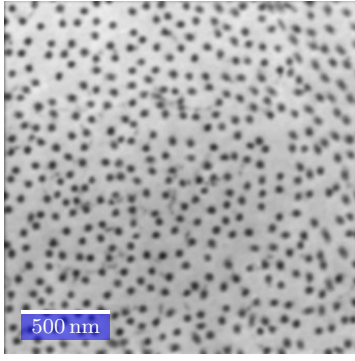


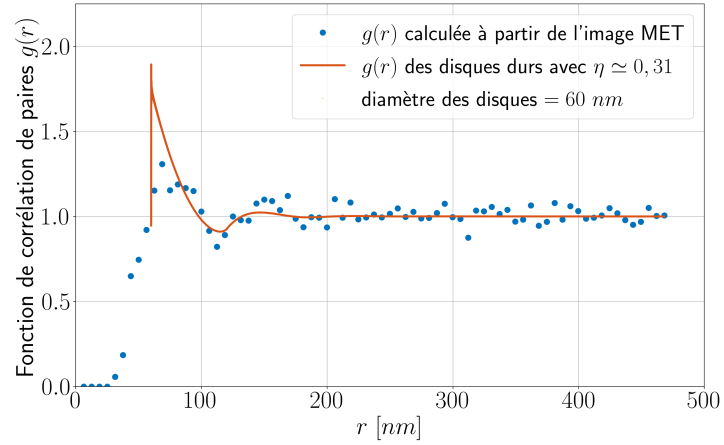
Figure II.10 – Modèle des disques durs ajusté pour correspondre aux fonctions de corrélation de paires (b et d) calculées à partir des images de microscopie électronique de fibrilles de collagène du stroma de cornées saines (a et c).

où le potentiel d'interaction est majoritairement de type électrostatique (cf figure II.13). Ce potentiel électrostatique permet un écart (positif ou négatif) dans la position des fibrilles par rapport à leur distance moyenne. Il est donc normal d'observer un premier pic plus large et d'amplitude plus faible. Les pics suivants sont moins affectés par cette contrainte du modèle car même si les disques sont impénétrables, une légère désorganisation permet de positionner les disques à des distances légèrement plus faibles que 2σ ou 3σ ...

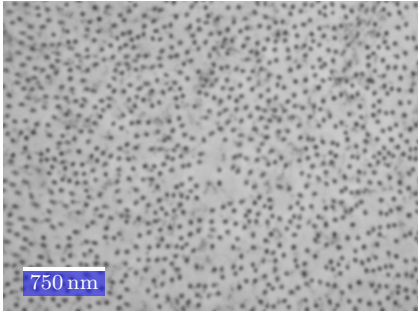
Les résultats de l'analyse par le modèle de disques durs sont résumés dans le tableau II.2. Les libres parcours moyens de diffusion ont été calculés à partir des équations II.16 (reliant



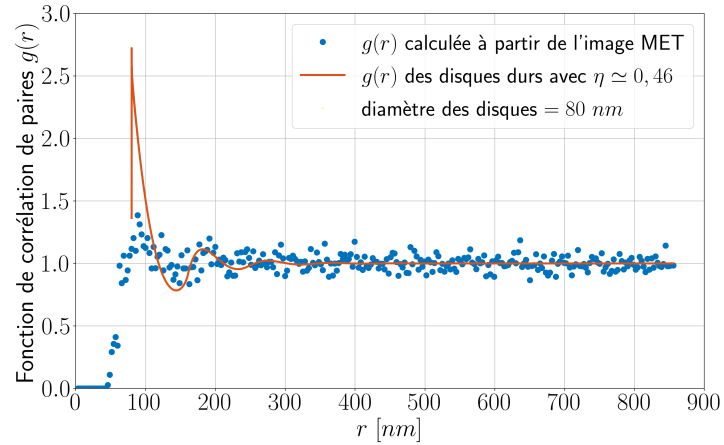
(a) Image de microscopie électronique des fibrilles de collagène du stroma d'une cornée œdémateuse, après application d'un filtre passe-bas



(b) Fonctions de corrélation de paires expérimentale et générée par le modèle des disques durs



(c) Image de microscopie électronique des fibrilles de collagène du stroma d'une cornée œdémateuse, après application d'un filtre passe-bas



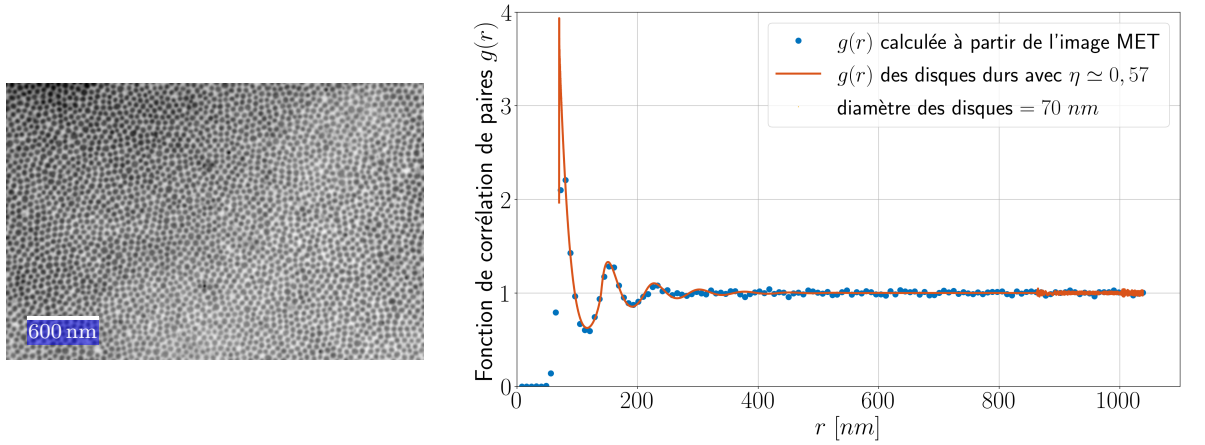
(d) Fonctions de corrélation de paires expérimentale et générée par le modèle des disques durs

Figure II.11 – Modèle des disques durs ajusté pour correspondre aux fonctions de corrélation de paires (b et d) calculées à partir des images de microscopie électronique (a et c) de cornées œdémateuses.

la section efficace de diffusion à la fonction de corrélation de paires) et II.17 (reliant le libre parcours moyen à la section efficace).

Analyse des résultats

Le modèle à un seul paramètre est suffisant pour décrire la plupart des cornées saines. En revanche dans certains cas, notamment les œdèmes importants, il faut rajouter un deuxième paramètre en plus de la taille des disques, la position du premier pic. Ce deuxième paramètre permet de découpler la taille des disques et la distance d'interaction. En cas d'œdème la distance inter-fibrillaire est plus grande, et le modèle à un seul paramètre n'est plus suffisant. Cela signifie que l'interaction entre les fibrilles est modifiée, ce qui peut se comprendre comme



(a) Image de microscopie électronique des fibrilles de collagène de la sclère, dans la zone proche du stroma, après application d'un filtre passe-bas

(b) Fonctions de corrélation de paires expérimentale et générée par le modèle des disques durs

Figure II.12 – Modèle des disques durs ajusté pour correspondre à la fonction de corrélation de paires (b) calculée à partir de l'image de microscopie électronique (a) d'une cornée saine au niveau de la transition entre le stroma et la sclère.

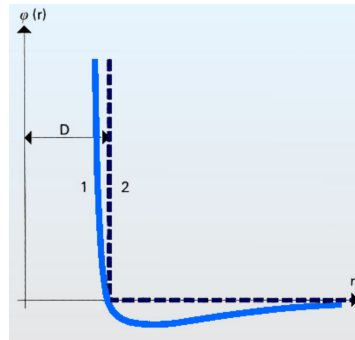


Figure II.13 – Potentiel d'interaction d'un modèle de disques durs (2) et potentiel d'interaction réel (1). source : <https://www.universalis.fr/encyclopedie/theorie-cinetique-des-fluides>

un changement de charges électriques au niveau des fibrilles ou des électrolytes présents en solution.

Avec ce modèle à deux paramètres on peut modéliser correctement les cornées en italique dans le tableau II.2. La figure II.14 représente les fonctions de corrélation de paires pour la cornée œdémateuse appelée œdème-3 dans le tableau II.2, calculées avec les modèles à un et deux paramètres. Le modèle à deux paramètres permet de conserver une fonction de corrélation de paires avec peu d'oscillations, donc représentant un ordre local faible, tout en ayant une interaction entre fibrilles à plus longue distance.

Les libres parcours moyens calculés pour les cornées saines sont de l'ordre de 7 mm dans le visible. Si l'on considère les valeurs de libre parcours moyen calculée pour les kératocytes, et que l'on calcule le libre parcours moyen effectif de la cornée à l'aide de l'équation II.19, on obtient un libre parcours moyen de diffusion pour la cornée de l'ordre de 3600 μm (pour

	densité surfacique de fibrilles ρ [μm^{-2}]	diamètre des disques σ [nm] (distance d'interaction)	libre parcours moyen de diffusion ℓ_c [μm] à 550 nm
sain-27046	233	57	8300
sain-27048	292	51	6700
sain-27240	352	47	7600
sain-28345	330	49	6400
sain-28346	364	47	5700
sain-36316	278	54	7400
sain-36322	276	54	7400
sain-1	245	55	8000
sain-2	258	55	8400
<i>sain-27095</i>	<i>276</i>	<i>47 - 52</i>	<i>7100</i>
<i>sain-27119</i>	<i>277</i>	<i>47 - 55</i>	<i>7900</i>
cornée saine moyenne	289 ± 42	$51,7 \pm 3,4$	7300 ± 800
œdème-1	108	60	18 500
œdème-2	111	72	19 300
œdème-3	145	72	14 500
œdème-4	91	80	21 800
sclère	149	70	14 500

Tableau II.2 – Synthèse de l'analyse des images de microscopie électronique par le modèle des disques durs. Les lignes en italiques sont les cornées pour lesquelles le modèle de disques durs à un paramètre n'est pas suffisant pour décrire la fonction de corrélation de paires mesurée. Les libre parcours moyens ont été calculés à partir des fonctions de corrélation de paires des images de microscopie électronique.

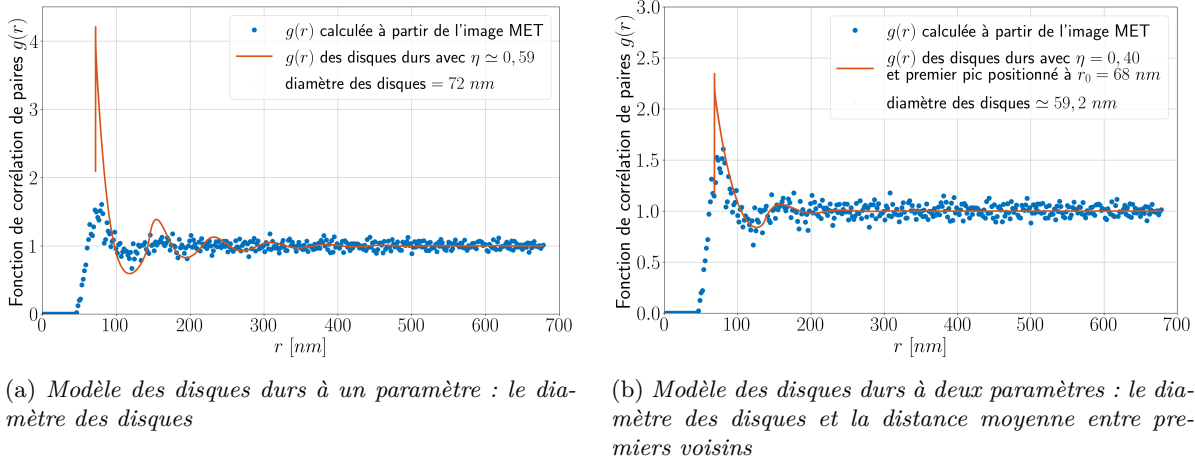


Figure II.14 – Comparaison des fonctions de corrélation de paires modélisées par le modèle de disques durs à un paramètre (a) et le modèle à deux paramètres (b) pour la cornée œdème-3.

une longueur d'onde de 550 nm). Cette valeur est cohérente avec les valeurs de transmission mesurées dans la littérature (80 à 90 % dans le visible). En effet pour une épaisseur de 500 μm ,

le pourcentage de lumière transmise à travers la cornée sera :

$$T = \exp\left(-\frac{\text{épaisseur}}{\ell_s}\right) = \exp\left(-\frac{500 \mu\text{m}}{3600 \mu\text{m}}\right) \approx 87 \%$$

On observe que les libres parcours moyens de diffusion des cornées œdémateuses sont supérieurs à ceux des cornées saines. Ce résultat, bien que surprenant, n'est pas absurde car lors de la formation d'œdème il se produit deux phénomènes ayant des effets opposés. En effet, la désorganisation des fibrilles augmente leur section efficace de diffusion, mais elle dilue également les diffuseurs (σ_c augmente mais ρ diminue). Ce qu'on observe dans les résultats de ces calculs est qu'en cas d'œdème la dilution compense (et dépasse même légèrement) l'augmentation de la section efficace de diffusion des fibrilles. Cela signifierait donc que les œdèmes diminuent la transparence de la cornée par l'apparition de lacs, qui possèdent un libre parcours moyen de diffusion beaucoup plus faible (*cf* tableau II.1).

	libre parcours moyen de diffusion ℓ_c [mm]			
	à 550 nm	à 725 nm	à 840 nm	à 1300 nm
sain-27046	8,25	18,75	28,12	85,63
sain-27048	6,71	14,54	22,37	74,56
sain-27240	7,58	18,64	28,84	129,06
sain-28345	6,37	14,56	22,30	79,98
sain-28346	5,66	12,84	19,57	69,05
sain-36316	7,40	16,62	25,32	88,91
sain-36322	7,43	16,71	25,26	91,98
sain-1	7,96	17,52	26,67	92,46
sain-2	8,36	18,95	29,61	105,54
sain-27095	7,12	15,61	23,64	80,31
sain-27119	7,85	18,25	27,72	104,64
cornée saine moyenne	$7,33 \pm 0,79$	$16,64 \pm 1,94$	$25,40 \pm 3,01$	$91,10 \pm 16,15$
œdème-1	18,47	40,31	61,79	206,46
œdème-2	19,28	42,58	64,42	230,26
œdème-3	14,54	32,78	49,44	187,77
œdème-4	21,84	49,39	75,14	250,35
sclère	14,47	32,70	50,11	179,11

Tableau II.3 – Valeurs du libre parcours moyen de diffusion calculées à partir des images de microscopie électronique à différentes longueurs d'ondes.

Enfin le tableau II.3 rassemble les valeurs du libre parcours moyen de diffusion à différentes longueurs d'onde. Les longueurs d'ondes choisies sont la longueur d'onde typique dans le visible (550 nm), la longueur d'onde centrale de l'OCT plein champ que l'on utilise (725 nm), la longueur d'onde centrale de l'OCT clinique disponible à l'hôpital des Quinze-Vingts (840 nm) et une longueur d'onde typique utilisée pour l'imagerie de tissus diffusants dans l'infra rouge (1300 nm).

II.5.3 Thermodynamique de la cornée

Équation de compressibilité

La fonction de corrélation de paires contient beaucoup d'informations sur le milieu étudié ; elle est notamment reliée à ses propriétés thermodynamiques. En effet on peut écrire une équation de compressibilité, qui relie la compressibilité isotherme $\chi_T = \frac{1}{\rho} \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_T$ à la fonction de corrélation de paires [43] :

$$\frac{\rho \chi_T}{\beta} = \frac{1}{\beta} \left(\frac{\partial \rho}{\partial P} \right)_T = 1 + \rho \int_V [g(r) - 1] d\vec{r}. \quad (\text{II.21})$$

où l'on a posé $\beta = \frac{1}{k_B T}$. Dans cette équation T n'est pas la température de la cornée. En effet ces équations proviennent de la thermodynamique où les molécules sont agitées par la température et interagissent par collisions. Ainsi plus l'agitation thermique est importante plus il y a d'interactions entre les molécules. Dans notre cas, les fibrilles de collagène ne sont pas agitées par la température. Pour nous, $k_B T$ représente une unité de mesure de l'interaction entre les fibrilles. On peut donc utiliser l'équation II.21 en considérant que la compressibilité sera dans des unités normalisées par l'énergie d'interaction des fibrilles.

Facteur de compressibilité

Le modèle des disques durs nous permet également de calculer des grandeurs thermodynamiques, notamment le facteur de compressibilité $Z(\eta)$, où l'on rappelle que η est la densité de remplissage. La définition du facteur de compressibilité est :

$$Z(\eta) = \frac{\beta P}{\rho(\eta)} \quad (\text{II.22})$$

où P est la pression. Le facteur de compressibilité représente la déviation de l'équation d'état par rapport à celle des gaz parfaits ($Z = 1$ correspond à l'équation d'état d'un gaz parfait). Ce facteur de compressibilité peut être calculé de plusieurs façons. Premièrement, à partir de la valeur de la fonction de corrélation de paires au premier pic, appelé aussi valeur au point de contact [48, 49], soit :

$$g(r = \sigma, \eta) = \frac{Z(\eta) - 1}{2\eta}. \quad (\text{II.23})$$

Deuxièmement, à faible densité, on peut effectuer un développement du viriel du facteur de compressibilité, c'est-à-dire l'écrire de la façon suivante [46, 50] :

$$Z(\eta) = 1 + \sum_{n=1}^{\infty} b_n \eta^n \quad (\text{II.24})$$

où les b_n sont les coefficients du viriel. Les trois premiers coefficients ont été calculés analytiquement et les autres numériquement jusqu'à l'ordre 6 [50, 51]. Pour les densités plus élevées, Baus et Colot [50] ont modifié l'équation II.24 pour proposer l'équation suivante :

$$Z(\eta) = \frac{1 + \sum_{n=1}^{\infty} c_n \eta^n}{(1 - \eta)^2}, \quad (\text{II.25})$$

où ils ont introduit une singularité à $\eta = 1$, cette valeur de la densité de remplissage étant impossible à atteindre pour un système physique (il est impossible de recouvrir complètement une surface avec des disques, il reste toujours des interstices). Les auteurs ont calculé les coefficients c_n à partir des coefficients b_n de l'équation II.24, jusqu'à l'ordre 6. On peut alors calculer la pression dans le stroma (qui s'exerce sur les fibrilles) en fonction du volume de la cornée, ou de façon équivalente, de son épaisseur. En effet on peut considérer qu'un changement de volume de la cornée correspond uniquement à un changement de son épaisseur, la cornée étant contrainte latéralement par la sclère.

Courbe pression-volume

Nous allons utiliser l'équation II.25 développée à l'ordre 6 par Baus et Colot pour obtenir une courbe de la pression en fonction de l'épaisseur de la cornée à partir du modèle des disques durs à un seul paramètre. Il faut d'abord connaître la densité de remplissage η en fonction de l'épaisseur. Elle se calcule à partir de la densité des disques ρ et de leur diamètre σ (cf équation II.20). En cas d'œdème, l'épaisseur de la cornée (appelée aussi pachymétrie) augmente, ce qui dilue d'autant la densité des fibrilles et donc des disques dans notre modèle. La densité des disques évolue donc de façon inversement proportionnelle à l'épaisseur de la cornée.

Posons alors ρ_{sain} la densité moyenne des fibrilles pour une cornée saine. D'après nos analyses d'images de microscopie électronique, la densité moyenne est $\rho_{\text{sain}} \approx 289 \mu\text{m}^{-2}$ (cf tableau II.2). Connaissant également le diamètre moyen des disques pour une cornée saine ($\sigma_{\text{sain}} \approx 51,7 \text{ nm}$), on peut calculer une densité de remplissage moyenne pour une cornée saine $\eta_{\text{sain}} \approx 0,61$. Comme nous utilisons le modèle des disques durs à un seul paramètre, on considère que le diamètre des disques ne varie pas en cas d'œdème, ce qui n'est pas tout à fait le cas comme nous l'avons vu à la section précédente. C'est une approximation qui devrait tout de même permettre une assez bonne représentation de l'évolution de la pression autour de l'épaisseur physiologique et pour des œdèmes relativement peu importants.

Dans cette approximation, c'est la densité ρ qui varie avec le degré d'œdème (que l'on note t), ce qui implique :

$$\rho = \frac{\rho_{\text{sain}}}{t} \quad (\text{II.26})$$

$$\eta = \frac{\rho \pi \sigma^2}{4} = \frac{\rho_{\text{sain}} \pi \sigma^2}{4t} = \frac{\eta_{\text{sain}}}{t}. \quad (\text{II.27})$$

Pour $t = 1$ la cornée est à l'épaisseur physiologique (on prend comme valeur $500 \mu\text{m}$), et pour $t > 1$ la cornée est œdémateuse. On calcule ensuite le facteur de compressibilité à partir du développement à l'ordre 6 de Baus et Colot :

$$Z(\eta) = \frac{1 + 0,1280\eta^2 + 0,0018\eta^3 - 0,0507\eta^4 - 0,0533\eta^5 - 0,0410\eta^6}{(1 - \eta^2)}. \quad (\text{II.28})$$

Enfin, on calcule la pression $P = Z(\eta)\rho$, que l'on normalise par la valeur de la pression pour une cornée à l'épaisseur physiologique ($500 \mu\text{m}$).

Cette pression normalisée est tracée sur la figure II.15. On a également tracé les données expérimentales obtenues précédemment par Donald A. Peyrot *et al* (points oranges) et celles obtenues par Olsen en 1987 (courbe verte). Les données de notre équipe proviennent d'une expérience de mise en déturgescence de la cornée. Plusieurs cornées ont été mises dans des

solutions à différentes concentrations de Dextran (solution commerciale à base de polymère de sucre et dont le rôle ici est d'appliquer une pression osmotique) et leurs pachymétries ont été mesurées. On obtient alors une courbe de la pachymétrie en fonction de la concentration de Dextran (c'est-à-dire de la pression osmotique). Pour comparer ces valeurs de pression osmotique à celles calculées dans notre modèle de disques durs, on normalise les concentrations de Dextran par la concentration qui correspond à une pachymétrie de 500 μm . Les points expérimentaux ont été ajustés par la courbe :

$$P = \frac{A}{x - B}$$

où $A = 1579 \pm 148$, $B = 282 \pm 14$ et x est la pachymétrie en micron. L'incertitude a été calculée à partir des incertitudes sur les paramètres de la courbe et est indiquée par un intervalle à plus ou moins un écart-type.

Dans l'article de 1987, Olsen et Sperling [52] ont mesuré la pression de gonflement de plusieurs cornées et leurs épaisseurs. La courbe tracée est la fonction ajustée par les auteurs :

$$P = 7,56x^{-3,48},$$

avec la pachymétrie x en millimètre. Les valeurs de pression ont aussi été normalisées par la valeur obtenue pour une pachymétrie de 500 μm .

Le modèle des disques durs est en accord avec les courbes expérimentales de l'évolution de la pression avec la pachymétrie, y compris pour des degrés d'œdème relativement important (pachymétrie de 900 μm).

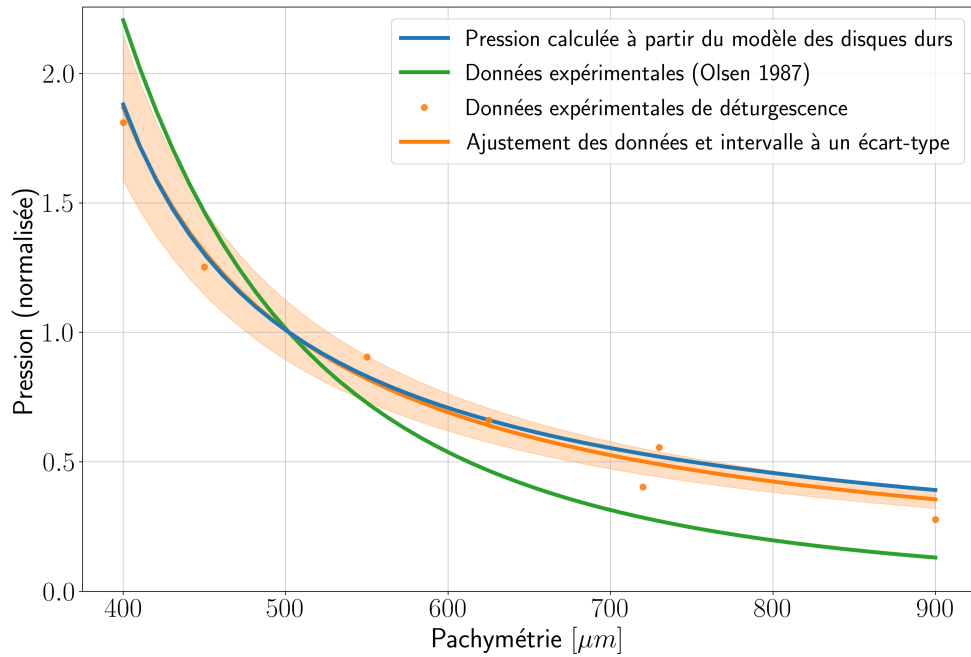


Figure II.15 – Pression du stroma en fonction de l'épaisseur de la cornée (pachymétrie). Les pressions sont normalisées par rapport à la pression d'une cornée saine, c'est-à-dire dont la pachymétrie est de 500 μm .

Encart II.3 - **Résumé des principaux résultats**

- ✓ Nous avons établi un modèle de diffusion dans le stroma à partir de l'équation de transfert radiatif, prenant en compte les diffuseurs micrométriques (kératocytes et lacs) et les diffuseurs nanométriques (fibrilles de collagène) organisés en lamelle avec un ordre à courte distance.
- ✓ Un modèle de disques durs à un seul paramètre est suffisant pour décrire l'organisation des fibrilles de collagène de cornées saines, en revanche il en faut un deuxième pour les cornées œdémateuses pour lesquelles le potentiel d'interaction entre les fibrilles est modifiée.
- ✓ Le modèle de diffusion nous a permis de calculer un ordre de grandeur pour les libres parcours moyens de diffusion des différents diffuseurs, à partir des paramètres décrits dans la littérature et à partir des images de microscopie électronique en transmission. À 550 nm, on a trouvé typiquement $\ell_K \simeq 7000 \mu\text{m}$ et $\ell_c \simeq 7300 \mu\text{m}$.
- ✓ Le libre parcours moyen de diffusion effectif du stroma d'une cornée saine a également été calculé : $\ell_s \simeq 3600 \mu\text{m}$, et est en accord avec les mesures de transmission décrites dans la littérature (80 à 90 % dans le visible).
- ✓ Le modèle des disques durs à un seul paramètre a été utilisé pour calculer l'évolution de la pression du stroma en fonction de la pachymétrie de la cornée. La courbe obtenue est en accord avec les données expérimentales de mise en déturgescence.

Chapitre III

Analyse *in vitro* et *in vivo* des mesures en rétrodiffusion

*Tout le monde se plaint de sa mémoire, et
personne ne se plaint de son jugement.*

François de La Rochefoucauld, *Maximes*, LXXXIX

Sommaire

III.1 Principe de l'OCT	42
III.1.1 OCT temporelle	42
III.1.2 OCT spectrale	43
III.1.3 OCT plein champ	45
III.2 Évaluation de la transparence <i>in vitro</i> par OCT plein champ	46
III.2.1 Principe général de l'analyse	46
III.2.2 Acquisition des données	49
III.2.3 Méthode d'analyse des données	50
III.2.4 Mesure de transparence de cornées par OCT plein champ	60
III.2.5 Précision de la mesure	67
III.3 Analyse à plusieurs longueurs d'onde	71
III.3.1 Propriétés spectrales des cornées	71
III.3.2 Solutions de billes de polystyrène	73
III.4 Évaluation de la transparence <i>in vivo</i> par SD-OCT et lampe à fente	73
III.4.1 Analyse des images cliniques d'OCT	76
III.4.2 Analyse de précision et répétabilité	78
III.4.3 Cas cliniques typiques	80
III.4.4 Étude comparative avec la méthode de référence	81
III.4.5 Analyse des images de lampe à fente	84

Après avoir établi notre modèle de diffusion dans la cornée, nous souhaitons en mesurer les paramètres de façon quantitative, notamment le libre parcours moyen de diffusion dont la

valeur quantifie la transparence du milieu.

Comme la mesure clinique ne peut se faire qu'en rétro-diffusion, les techniques d'imagerie qui vont nous intéresser sont celles en rétro-diffusion, présentant une résolution axiale permettant de voir l'évolution du signal au cours de sa propagation en profondeur dans la cornée. Plusieurs méthodes d'imagerie optique ont ces propriétés, certaines sont uniquement utilisables en laboratoire, d'autres sont disponibles en clinique.

Nous allons dans un premier temps présenter une des méthodes d'imagerie résolues en profondeur les plus couramment utilisées en ophtalmologie, l'OCT, dont nous détaillerons les différentes approches. Ensuite nous présenterons notre méthode d'analyse de données par inférence bayésienne, développée en collaboration avec Pascal Pernot (Laboratoire de Chimie Physique, Université Paris-Sud, CNRS), permettant d'extraire le libre parcours moyen de diffusion à partir de la courbe d'atténuation de la moyenne cohérente du signal en profondeur. Cette méthode sera d'abord validée par des mesures en laboratoire par OCT plein champ sur des cornées saines de la banque des yeux et des cornées pathologiques du bloc opératoire de l'hôpital des Quinze-Vingts. Puis nous évaluerons la précision de cette méthode ainsi que les propriétés spectrales de diffusion à l'aide d'une solution monodisperse de billes de polystyrènes. Enfin la méthode sera appliquée aux données cliniques d'OCT spectrale et de lampe à fente.

III.1 Principe de l'OCT

La tomographie en cohérence optique, aussi appelée OCT en anglais pour *Optical Coherence Tomography*, est une technique d'imagerie optique des tissus, développée en 1991 [53]. L'OCT est l'analogue optique de l'échographie, basée sur des mesures de temps de vol des ondes réfléchies sur un tissu diffusant. Cependant il n'existe pas de moyen de mesurer directement le temps de vol des photons, il faut alors utiliser un interféromètre pour mesurer la différence de marche entre un faisceau de référence et un faisceau échantillon. Le montage habituel repose sur un interféromètre de Michelson dans lequel on place un miroir dans l'un des bras (que l'on définit comme le bras de référence) et l'échantillon est placé dans l'autre bras. La lumière réfléchie par l'échantillon interfère avec la lumière réfléchie par le miroir dans le bras de référence. Pour pouvoir déterminer de quelle profondeur provient la lumière qui a interféré, il faut utiliser une source de lumière faiblement cohérente. En effet pour une source à faible longueur de cohérence temporelle, il n'y aura interférence qu'avec la lumière réfléchie par le plan de l'échantillon correspondant à la longueur du chemin optique du bras de référence (plus ou moins la demie longueur de cohérence).

III.1.1 OCT temporelle

Dans le cas de l'OCT *temporelle*, on réalise une image en balayant la longueur du bras de référence, ce qui permet de sélectionner différents plans de coupe (balayage suivant z), puis à l'aide de miroirs oscillants on balaye suivant x ou y . Le schéma du montage est représenté sur la figure III.1. Un des intérêts de l'OCT est que ses résolutions axiale et latérale sont indépendantes, contrairement aux systèmes de microscopie classiques où ces résolutions dépendent du système optique. Avec l'OCT, la résolution latérale dépend de la focalisation du faisceau (c'est-à-dire de l'ouverture numérique ON), donc est limitée par la diffraction. Si l'on considère

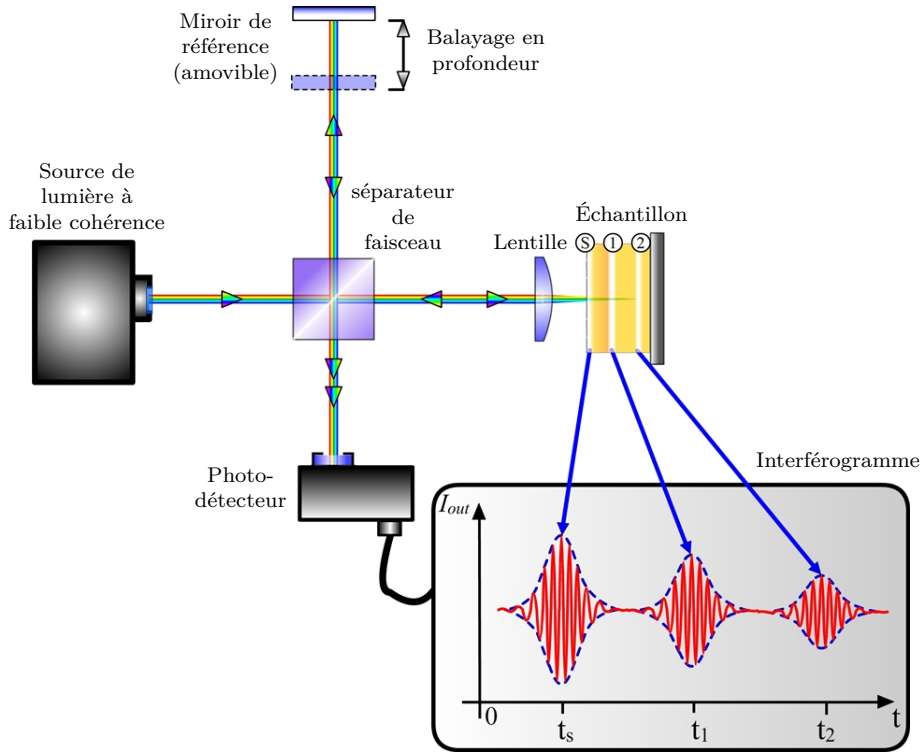


Figure III.1 – Schéma de principe de l'OCT temporelle - <https://www.recendt.at/en/OCT.html>.

un faisceau gaussien de longueur d'onde centrale $\bar{\lambda}$, la résolution latérale (définie par la largeur à mi-hauteur du faisceau) s'écrit [54] :

$$\Delta x = 0,37 \frac{\bar{\lambda}}{ON}. \quad (\text{III.1})$$

En revanche la résolution axiale ne dépend pas du système optique, mais uniquement des propriétés spectrales de la source. Ainsi la résolution axiale est égale à la longueur de cohérence de la source, ce qui s'écrit :

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{n\pi} \left(\frac{\bar{\lambda}^2}{\Delta \lambda} \right), \quad (\text{III.2})$$

avec n l'indice optique du milieu et $\Delta \lambda$ la largeur spectrale de la source définie par sa largeur à mi-hauteur.

III.1.2 OCT spectrale

Dans le cas de l'OCT *spectrale*, dont le schéma de principe est représenté sur la figure III.2, le miroir de référence est fixe et on se sert de l'analyse spectrale du signal pour obtenir une image en profondeur.

D'après le théorème de Wiener Khintchine qui relie l'autocorrélation de la source à la densité spectrale de puissance par une relation de transformée de Fourier, on peut obtenir le profil en profondeur de l'échantillon à partir du spectre des interférences. En effet le spectre $I(\lambda)$ peut

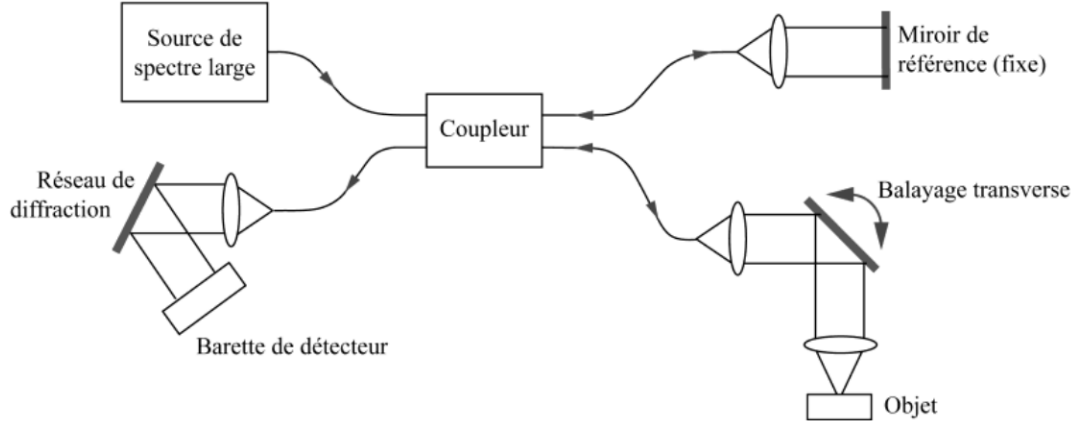


Figure III.2 – Schéma de principe de l'OCT spectrale, issu du cours de biophotonique d'Arnaud Dubois.

s'écrire :

$$I(\lambda) = S(\lambda)R_{\text{ref}} + \sum_n S(\lambda)R_n + \sum_n S(\lambda)\sqrt{R_{\text{ref}}R_n} \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} \cdot 2(z_{\text{ref}} - z_n)\right) + \sum_{n \neq m} S(\lambda)\sqrt{R_n R_m} \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda} \cdot 2(z_n - z_m)\right)$$

où $S(\lambda)$ est le spectre de la source, R_{ref} est le coefficient de réflexion du miroir de référence et R_n est le coefficient de réflexion de l'échantillon au niveau du diffuseur numéro n . Les deux premiers termes représentent respectivement le signal provenant du bras de référence et du bras échantillon, le troisième terme représente le signal d'interférence entre la lumière réfléchie par l'échantillon et la lumière réfléchie par le miroir de référence, et le quatrième terme représente les interférences entre la lumière réfléchie par les différents plans de l'échantillon.

Le signal qui contient les informations sur la position des structures réfléchissantes est donc le troisième terme. On remarque dans ce terme que la longueur d'onde λ et la profondeur $z_{\text{ref}} - z$ sont des variables conjuguées, donc reliées par transformée de Fourier. La profondeur est donc donnée par la fréquence de modulation de ce signal. Il suffit alors de normaliser par $S(\lambda)$ et d'en prendre la transformée de Fourier pour obtenir le profil en profondeur de l'échantillon.

Il existe deux façons de réaliser un dispositif d'OCT spectral. On peut encoder le signal tomographique du tissu soit spatialement soit temporellement. Pour encoder le signal spatialement on peut par exemple utiliser un prisme qui va séparer les longueurs d'onde du signal que l'on va collecter avec une caméra en ligne. L'information spectrale est ainsi décomposée spatialement.

Pour encoder le signal tomographique temporellement, on utilise une source de lumière à balayage (*swept source* en anglais) qui va donc balayer une plage de longueur d'onde.

L'intérêt de l'OCT spectral par rapport à sa version temporelle est le gain en rapport signal sur bruit d'environ deux ordres de grandeur [55] et sa vitesse d'acquisition plus élevée. En effet il n'y a plus de balayage du bras de référence, un profil en profondeur (A-scan) est acquis en une fois dans le cas d'un encodage spatial, où en balayant les longueurs d'ondes de la source dans le cas de l'encodage temporel. Avec les sources à balayages actuelles, la vitesse de balayage

permet des vitesses d'acquisition très élevées (jusqu'à 200 kHz).

III.1.3 OCT plein champ

Une autre approche de l'OCT a été développée à l'institut Langevin par l'équipe de Claude Boccara [56, 57] pour permettre la microscopie *ex vivo* de tissus fixes. Cette approche ne nécessite pas de balayage latéral, c'est pourquoi elle est appelée OCT « plein champ » (ou *Full Field OCT* en anglais). Elle repose sur un interféromètre de Linnik, c'est-à-dire un interféromètre de Michelson dans lequel on a placé un objectif de microscope dans chacun des bras. Ces objectifs de grande ouverture numérique permettent une meilleure résolution latérale. La figure III.3 montre le schéma du montage d'un OCT plein champ. Grâce aux objectifs de microscopes et

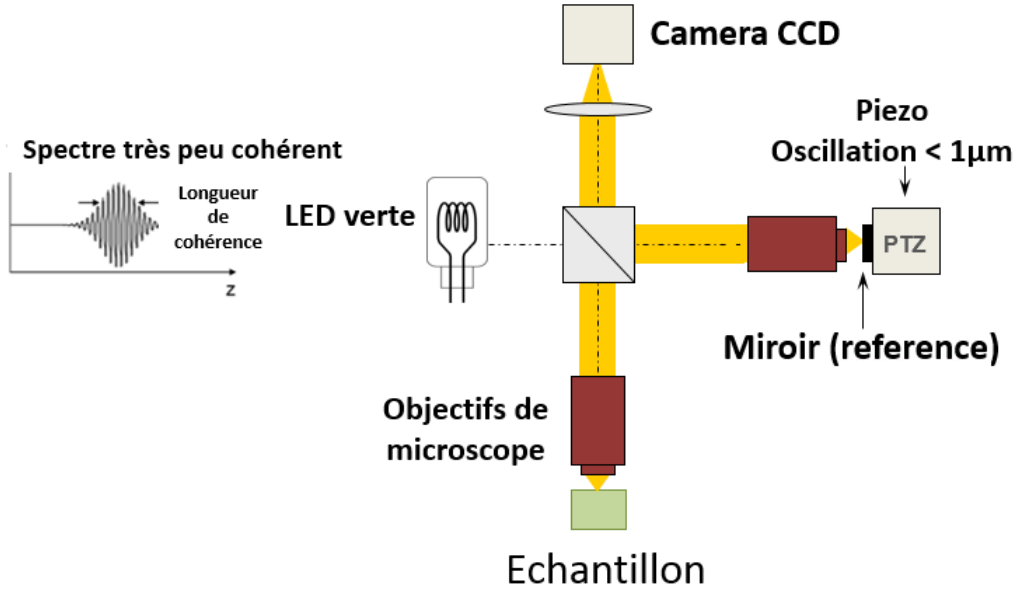


Figure III.3 – Schéma d'un montage d'OCT plein champ - https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/9b/Oct_FF.png

à la caméra, on récupère une image « en face » à haute résolution (de l'ordre du micron), et le balayage en profondeur se fait en déplaçant l'échantillon ou le miroir de référence. Le principe est d'utiliser une source de lumière de très faible cohérence temporelle et spatiale afin d'avoir un sectionnement optique très fin et peu de diaphonie ou *cross-talk* (interférences entre des points adjacents qui rajoutent du bruit de speckle).

L'intensité d'une image captée par la caméra peut s'écrire :

$$I_{\text{caméra}}(x, y) = I_{\text{incoh}}(x, y) + 2\sqrt{R_{\text{éch}}(x, y)R_{\text{ref}}}\cos(\Delta\phi(x, y)) \quad (\text{III.3})$$

où I_{incoh} est la partie incohérente de la lumière qui ne peut pas interférer car la différence de chemin optique est plus grande que la longueur de cohérence de la source, $R_{\text{éch}}$ est la réflectivité de l'échantillon, R_{ref} la réflectivité du miroir de référence (idéalement constante dans tout le plan d'imagerie), et $\Delta\phi$ la différence de phase entre la lumière cohérente du bras échantillon et celle du bras de référence.

Pour obtenir l'image de la structure de l'échantillon ($R_{\text{éch}}$) et supprimer les autres termes qui n'apportent pas d'information sur l'échantillon, il faut acquérir plusieurs images en changeant la différence de phase entre les deux bras ($\Delta\phi$). Il s'agit d'une démodulation de signal, comme elle est utilisée couramment en holographie. En pratique cette différence de phase est obtenue par l'utilisation d'un transducteur piézoélectrique positionné derrière le miroir de référence, permettant un déplacement précis du miroir (par exemple de $\bar{\lambda}/4$, ce qui correspond à un déplacement de l'ordre de 100 nm pour une source de lumière dans le visible) et ce à une vitesse importante. Les différentes techniques de démodulation sont présentées dans le chapitre IV.

En plus de sa meilleure résolution latérale, l'OCT plein champ possède comme avantages la simplicité de son montage (ne nécessitant pas de balayage latéral et utilisant comme source une lampe halogène ou une diode électroluminescente) et le fait d'acquérir toute une image 2D en simultané, ce qui permet de réduire les artéfacts liés aux mouvements des tissus biologiques. Cette dernière propriété est notamment cruciale en ophtalmologie, où les mouvements de l'œil ajoutent une contrainte aux systèmes à balayage, obligeant un compromis entre échantillonnage latéral et champ de vue pour une vitesse de balayage donnée.

L'OCT plein champ n'est pour l'instant disponible commercialement qu'en tant que microscope *ex vivo* pour des tissus immobiles (LLTech, SAS, France), mais des développements sont en cours pour permettre son application *in vivo* sur des yeux vivants [58].

III.2 Évaluation de la transparence *in vitro* par OCT plein champ

III.2.1 Principe général de l'analyse

Pour mesurer les paramètres de diffusion présentés dans notre modèle, notre approche est de mesurer expérimentalement l'atténuation exponentielle de la moyenne du signal OCT en profondeur. Nous avons choisi l'OCT plein champ pour sa résolution latérale élevée et sa bonne résolution axiale. L'OCT étant une technique d'imagerie cohérente, si l'on fait la moyenne de chaque image en face on obtient le profil d'atténuation de la moyenne cohérente, aussi appelé signal balistique.

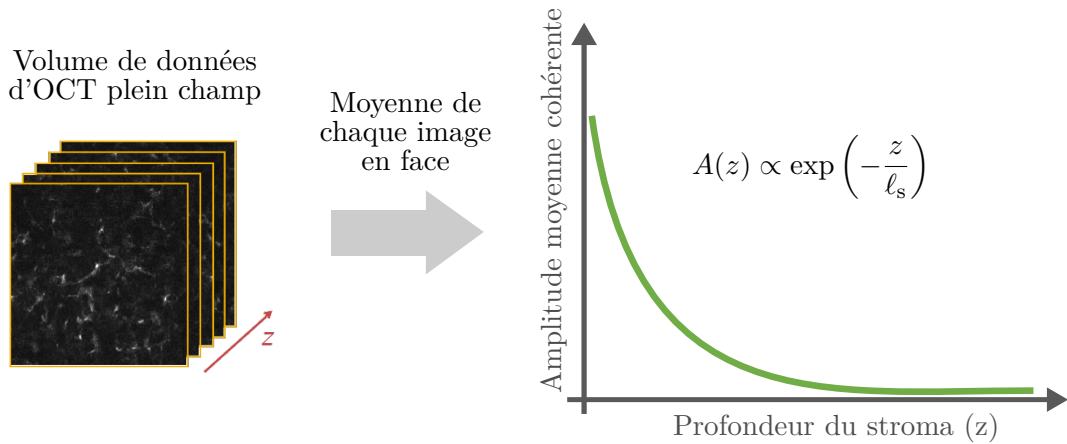


Figure III.4 – Évolution de l'amplitude moyenne du signal d'OCT plein champ avec la profondeur pour un milieu homogène.

Ugo Tricoli et Rémi Carminati ont développé un modèle du signal d'OCT plein champ dans un milieu diffusant [59]. Ils ont notamment établi que pour un milieu homogène, la valeur moyenne de l'amplitude du signal OCT décroît exponentiellement avec comme longueur caractéristique d'atténuation le libre parcours moyen de diffusion ℓ_s . On peut alors écrire le signal de la façon suivante :

$$A(z) = A_0 \exp\left(-\frac{z}{\ell_s}\right) + C, \quad (\text{III.4})$$

où A_0 est un paramètre qui reflète la directionalité des processus de diffusion (et donc est lié à la fonction de répartition décrite dans l'équation de transfert radiatif) et C est une constante reliée à la diffusion multiple.

On remarque que le terme d'atténuation par diffusion fait intervenir la profondeur du plan d'imagerie z et non deux fois cette distance, comme on pourrait s'y attendre pour un système en réflexion dont la lumière fait donc un aller-retour jusqu'au plan d'imagerie z . Cela provient du fait que notre système d'OCT plein champ mesure l'amplitude du signal et non son intensité.

Dispositif expérimental

Nous disposons d'un système d'OCT plein champ de la société LLTech, dont le schéma de montage est représenté sur la figure III.5. Les échantillons sont placés sur un porte échantillon par dessus lequel est fixée une lame de verre. Le balayage en profondeur est effectué par déplacement de l'échantillon par des moteurs. La source de lumière de l'appareil commercial est une lampe halogène dont les basses longueurs d'ondes sont filtrées à partir de 650 nm. Nous avons modifié l'appareil commercial afin de pouvoir changer la source et utiliser des diodes centrées à différentes longueurs d'ondes. En utilisant des diodes de largeur spectrale plus fine (voir tableau III.1), on perd en sectionnement optique de l'OCT. Dans l'application qui nous intéresse pour ces travaux, la résolution axiale n'est pas le paramètre le plus important, en revanche utiliser différentes longueurs d'ondes est important pour connaître le régime de diffusion observé (Rayleigh ou Mie).

La caméra utilisée est une caméra CMOS, de 1024×1024 pixels. L'objectif est un objectif Olympus à immersion d'ouverture numérique 0,3. Le champ de vue est de $780 \mu\text{m}$ par $780 \mu\text{m}$ et les résolutions latérale et axiale sont respectivement $\Delta x = 1,6 \mu\text{m}$ et $\Delta z = 1 \mu\text{m}$. Les mesures du spectre de la source, de la réponse de la caméra et donc la réponse effective du système dans sa configuration commerciale est montrée sur la figure III.6.

Influence de la cohérence de la source en OCT

En OCT, on peut distinguer l'OCT plein champ de l'OCT à champ large (ou *wide field*). L'OCT plein champ utilise une source temporellement et spatialement incohérente, alors que l'OCT à champ large utilise une source spatialement cohérente (et temporellement incohérente). La cohérence spatiale joue un rôle important en OCT et il a été montré qu'une source spatialement cohérente génère plus de diaphonie [60]. Des auteurs ont également montré que l'OCT plein champ était insensible aux aberrations [61], c'est-à-dire que les aberrations ne provoquent pas une perte de résolution mais seulement une perte de rapport signal sur bruit.

Enfin, dans leur modèle du signal d'OCT plein champ [59], Ugo Tricoli et Rémi Carminati ont montré l'importance de la cohérence spatiale de la source de lumière dans l'évolution du signal OCT en profondeur. Ainsi pour que l'amplitude moyenne du signal OCT suive une loi de

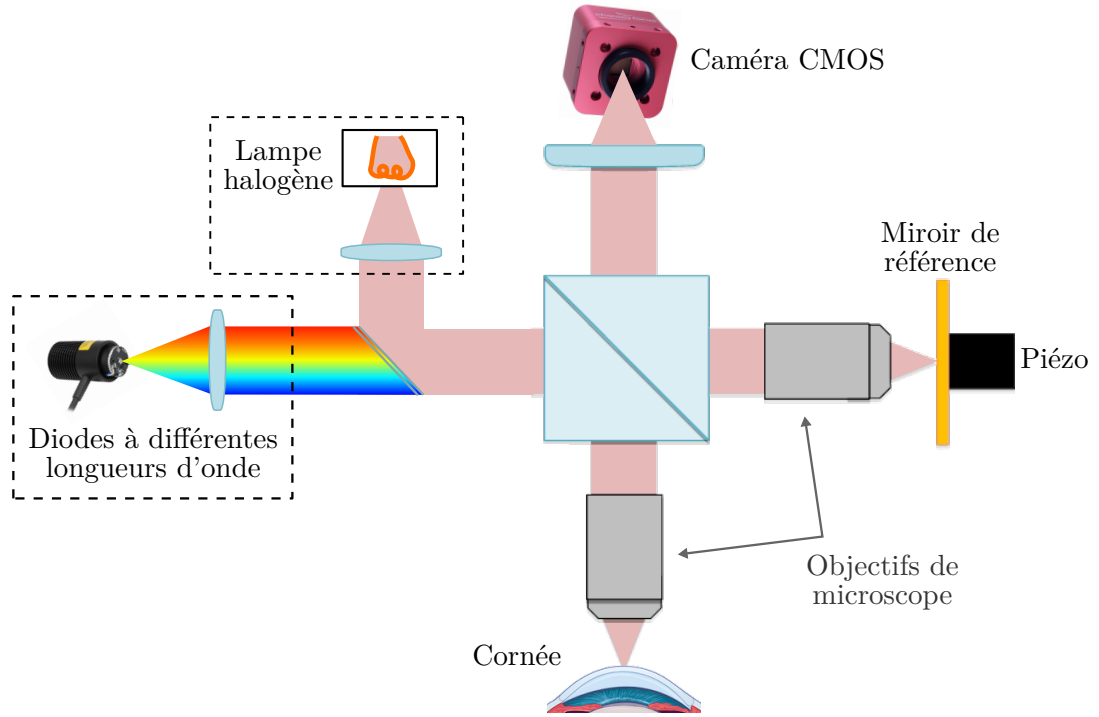


Figure III.5 – Schéma du montage d'OCT plein champ de LLTech modifié pour pouvoir utiliser des sources à différentes longueurs d'ondes.

décroissance exponentielle, la cohérence spatiale de la source doit être supérieure à la longueur de corrélation du milieu et l'ouverture numérique doit être suffisamment faible [59]. La source de lumière de notre OCT plein champ est une lampe halogène fournissant une lumière blanche avec une faible longueur de cohérence temporelle, et une faible cohérence spatiale. Cette lumière est envoyée dans l'interféromètre de Michelson à l'aide d'un paquet de fibres optiques. Dans ces conditions il peut alors apparaître une déviation à l'atténuation mono-exponentielle près de l'interface avec le milieu. Les auteurs ont montré que la déviation devient négligeable avec la profondeur et on peut donc considérer que le signal d'OCT plein champ, utilisant une source faiblement cohérente spatialement et avec une ouverture numérique relativement importante, suit une loi d'atténuation exponentielle (en considérant qu'une légère déviation est possible sur les premiers microns de l'atténuation).

Propriétés des diodes électroluminescentes

Les autres sources de lumière dont nous disposons sont des diodes électroluminescentes. Comme nous l'avons vu, la cohérence spatiale de la source est un paramètre important pour l'évolution du signal OCT. Il faut vérifier que les diodes ont les mêmes propriétés de cohérence spatiale si l'on veut pouvoir comparer les mesures. La propriété qui nous intéresse pour mesurer la cohérence spatiale est la surface de cohérence A_c . C'est la cohérence mesurée dans les expériences des fentes d'Young. Elle dépend de la longueur d'onde centrale émise ($\bar{\lambda}$), la distance d'observation (z) et la surface d'émission de la source (A_s).

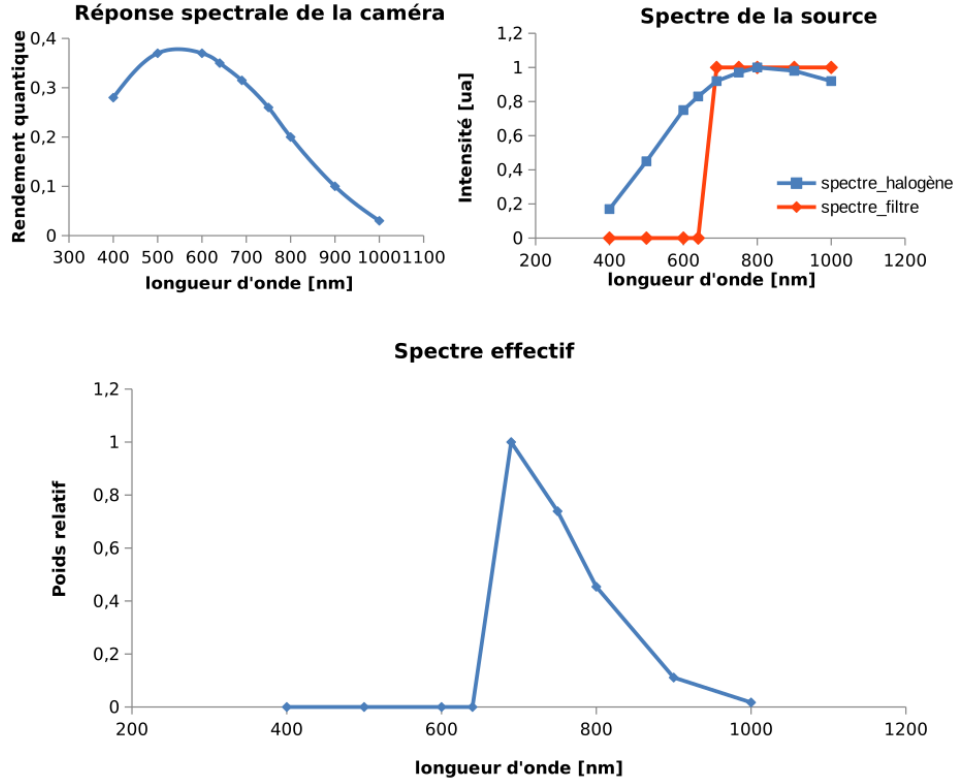


Figure III.6 – Mesures de la réponse de la caméra, du spectre d'émission de la lampe halogène et du filtre passe-haut. Le spectre effectif est le produit des trois spectres (spectre de la source \times filtre \times réponse de la caméra).

Elle se calcule comme suit [62] :

$$A_c = \frac{(\bar{\lambda}z)^2}{A_s} \approx \frac{\bar{\lambda}^2}{\Omega_s} \quad (\text{III.5})$$

où Ω_s est l'angle solide d'émission. Si l'on considère une émission conique, l'angle solide d'un cône de révolution (de demi-angle au sommet α) vaut :

$$\Omega_s = \iint d^2\Omega = \int_0^{2\pi} d\phi \int_0^\alpha \sin(\theta) d\theta = 2\pi(1 - \cos(\alpha))$$

Le tableau III.1 indique les propriétés des différentes diodes utilisées, calculées à partir des données du constructeur (Thorlabs).

L'angle d'émission correspond à l'angle au sommet du cône d'émission de la diode. Dans notre notation il vaut donc 2α . On remarque que les diodes ont des surfaces de cohérence spatiale assez proches, exceptée la diode centrée à 780 nm. Il faudra en tenir compte pour comparer les mesures à différentes longueurs d'onde.

III.2.2 Acquisition des données

Pour maintenir la cornée dans des conditions proches des conditions physiologiques, nous la plaçons quelques microns sous la lame de verre de façon à ce que la cornée ne soit pas en contact physique avec la lame et qu'elle ne subisse donc pas de contrainte de celle-ci et sa

Longueur d'onde centrale $\bar{\lambda}$ [nm]	490	590	625	780	850
Largeur spectrale $\Delta\lambda$ [nm]	23	18	18	28	30
Angle d'émission θ [°]	36	80	80	20	90
Surface de cohérence A_c [μm^2]	0,78	0,24	0,27	6,4	0,39
Résolution axiale mesurée [μm]	3,0	7,5	7,5	8,0	9,0

Tableau III.1 – Propriétés des diodes Thorlabs. Les données du constructeur sont les longueurs d'onde centrales et les angles d'émission.

courbure est alors maintenue par les propriétés mécaniques de la cornée. Le contact optique est accompli par l'utilisation d'un gel ophtalmique (ou par le gel optique prévu pour l'utilisation de l'OCT). Le fait de démarrer l'acquisition quelques microns avant l'épithélium permet de ne pas superposer les franges de la lame de verre avec les images du tissu. En pratique, la cornée ne doit pas être trop loin de la lame de verre non plus, sinon le rapport signal sur bruit diminue, probablement à cause de la dispersion.

Notre analyse se faisant en profondeur, nous compensons numériquement la courbure de la cornée de façon à ce que les pixels d'une image en face soient bien à la même profondeur dans la cornée. Pour réaliser cet aplatissement, nous procédons en deux étapes. Pour chaque ligne de la pile d'images on extrait la coupe orthogonale (équivalent d'un B-scan), on recherche alors la position de l'épithélium en détectant les maxima de chaque colonne de l'image 2D. La courbe des maxima est alors filtrée par un filtre médian qui permet d'enlever les pics, puis un filtre de Savitzky-Golay (qui est une moyenne glissante pondérée par un polynôme) pour mieux ajuster les valeurs aux bords de l'image 2D.

III.2.3 Méthode d'analyse des données

Encart III.1 - Inférence bayésienne

Le principe de l'analyse par inférence bayésienne est de modéliser les données par une fonction de plusieurs paramètres et d'estimer au départ les distributions de probabilité de ces paramètres. Généralement on choisit les distributions les plus générales, sauf si certaines contraintes peuvent être imposées, par exemple une impossibilité physique pour un paramètre d'être négatif. Ces distributions sont les distributions *a priori* et on choisit donc les distributions qui maximisent l'entropie (autrement dit on ajoute le moins d'information possible pour ne pas biaiser l'analyse).

Dans notre cas, on utilise la méthode de Monte-Carlo par chaînes de Markov pour affiner les distributions des paramètres jusqu'à converger vers les valeurs les plus probables. La méthode de Monte-Carlo génère des valeurs pour les paramètres suivant leurs lois de probabilité définies au départ, puis les chaînes de Markov servent à explorer l'espace des paramètres. Après un nombre d'itérations suffisant, les paramètres convergent vers leur distribution d'équilibre ; ce sont les distributions *a posteriori*.

On cherche à ajuster la moyenne cohérente par une courbe exponentielle décrite par l'équation III.4. Nous avons alors trois paramètres à ajuster : A_0 , ℓ_s et C . Comme nous voulons obtenir une mesure quantitative de la transparence cornéenne, il nous faut connaître l'incertitude des paramètres que l'on ajuste.

Une façon simple d'estimer la qualité d'un ajustement est d'utiliser le coefficient de détermination, R^2 . Ce coefficient compare la variance des résidus de l'ajustement à la variance des données. Si la courbe modélisée passe par tous les points expérimentaux, la variance des résidus est nulle et $R^2 = 1$. En revanche si la variance des résidus est égale à la variance des données $R^2 = 0$. Cependant il est difficile d'évaluer précisément la qualité d'un ajustement à partir du coefficient R^2 . Selon la nature des données que l'on veut ajuster, on va souvent déterminer un seuil pour la valeur du R^2 qui nous paraît acceptable. Ce seuil sera arbitraire et c'est pourquoi il est difficile d'utiliser ce paramètre. Dans notre cas, il serait par exemple impossible de distinguer le signal d'une cornée hétérogène de celui d'une cornée saine mais présentant beaucoup de bruit. Ces deux signaux auraient un coefficient R^2 faible.

Nous avons alors travaillé en collaboration avec Pascal Pernot de l'Université Paris Sud, expert en analyse de données par inférence bayésienne, pour mettre au point une méthode d'analyse qui nous permette de distinguer un signal présentant beaucoup de bruit d'un signal intrinsèquement non exponentiel, signe de la présence d'une pathologie.

L'algorithme repose sur l'analyse du bruit du signal et sur la possible présence d'hétérogénéité, c'est-à-dire d'un écart à une atténuation mono-exponentielle. Le principe de l'algorithme est représenté dans le diagramme de flux de la figure III.7 et peut se décomposer en deux parties :

1. modélisation du bruit (en bleu), dont les fluctuations servent d'estimation de l'incertitude sur les données ;
2. ajustement des données par un modèle d'atténuation ;
 - a) modèle simple d'une atténuation mono-exponentielle (en vert) ;
 - b) si insuffisant, ajustement par une fonction exponentielle dans laquelle on permet au libre parcours moyen d'évoluer avec la profondeur (en orange).

Chaque ajustement est réalisé par inférence bayésienne et a été conçu et implémenté par Pascal Pernot en `stan` [63], utilisant l'interface `rstan` [64] pour `R` [65]. Nous allons détailler le principe de l'algorithme (à partir de la description fournie par Pascal Pernot) en l'illustrant par un exemple d'une cornée pathologique dont le profil de la moyenne cohérente ne suit pas une atténuation exponentielle.

Modélisation du bruit

On considère un ensemble de N points de mesure $D = \{z_i, A_i\}_{i=1}^N$ que l'on modélise sous la forme

$$A_i = f(z_i) + \epsilon_i \quad (\text{III.6})$$

où f est une fonction modèle et ϵ_i est le bruit de mesure suivant une loi normale centrée

$$\epsilon_i \sim \mathcal{N}(0, \sigma_i). \quad (\text{III.7})$$

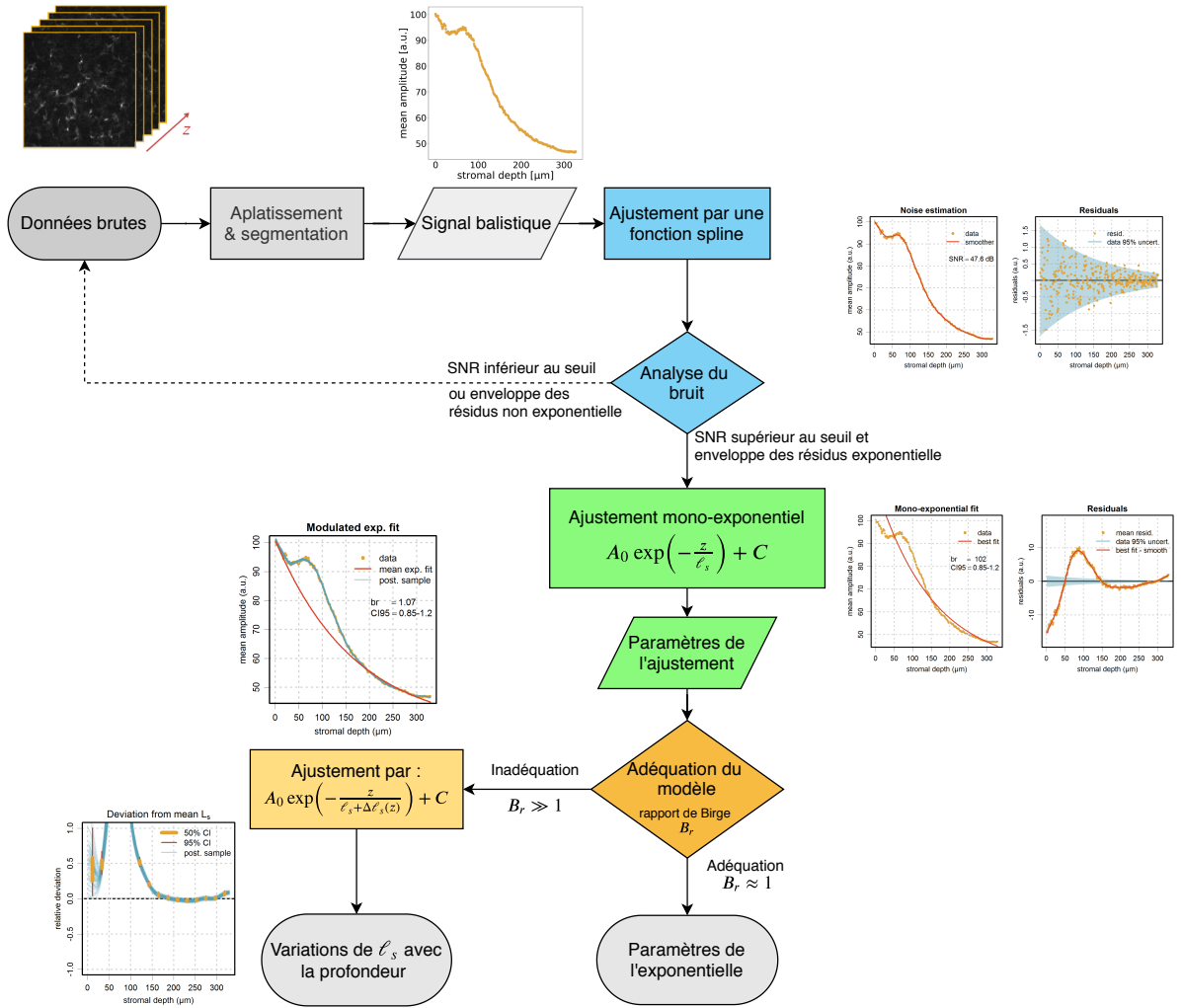


Figure III.7 – Diagramme de flux de l’algorithme d’ajustement par inférence bayésienne, décomposé en trois parties : analyse du bruit (en bleu), ajustement mono-exponentiel (en vert), ajustement par une exponentielle avec variation en profondeur du libre parcours moyen de diffusion (en orange).

Les données sont d’abord ajustées par une fonction spline cubique¹, dont le degré de lissage est réglable de façon à pouvoir inclure les fluctuations du signal, mais en évitant d’ajuster les fluctuations liées au bruit. Si l’on soustrait cette courbe ajustée de notre profil d’amplitude on devrait observer un bruit aléatoire. Comme nos données proviennent d’un comptage de photon, l’amplitude du bruit doit décroître typiquement avec l’amplitude du signal suivant une loi de Poisson. L’écart-type du bruit devrait donc présenter une décroissance exponentielle :

$$\sigma_i = a_1 \exp\left(-\frac{z_i}{a_2}\right). \quad (\text{III.8})$$

1. https://en.wikipedia.org/wiki/Smoothing_spline

Cette forme permet également de modéliser un bruit quasi uniforme pour $a_2 \gg \max(z_i)$. Les paramètres sont obtenus par inférence bayésienne en utilisant la vraisemblance :

$$R|a_1, a_2 \sim \prod_{i=1}^N \mathcal{N}(0, \sigma_i) \quad (\text{III.9})$$

et les probabilités *a priori* des paramètres a_1 et a_2 sont uniformes dans l'intervalle $]0, a_{\max}]$, a_{\max} étant choisi suffisamment grand pour pouvoir modéliser une distribution de bruit quasi-uniforme. Ensuite on détermine l'incertitude des points de mesure u_{Ai} à partir des paramètres :

$$u_{Ai} = \hat{a}_1 \exp\left(-\frac{z_i}{\hat{a}_2}\right) \quad (\text{III.10})$$

Si la forme des résidus ne suit pas une loi exponentielle, l'algorithme peut se poursuivre mais l'incertitude sur les paramètres ne pourra pas être estimée correctement.

Enfin le rapport signal sur bruit (ou *SNR* en anglais) est calculé en prenant le rapport de l'amplitude moyenne du signal sur l'amplitude moyenne des résidus du bruit. Si le rapport signal sur bruit est trop bas, il est nécessaire de refaire une acquisition en changeant les paramètres pour obtenir un meilleur rapport signal sur bruit. La figure III.8 montre l'analyse du bruit du signal d'une cornée pathologique. La fonction spline cubique reproduit bien le signal balistique et les résidus ont bien une distribution aléatoire dont l'écart-type s'atténue exponentiellement.

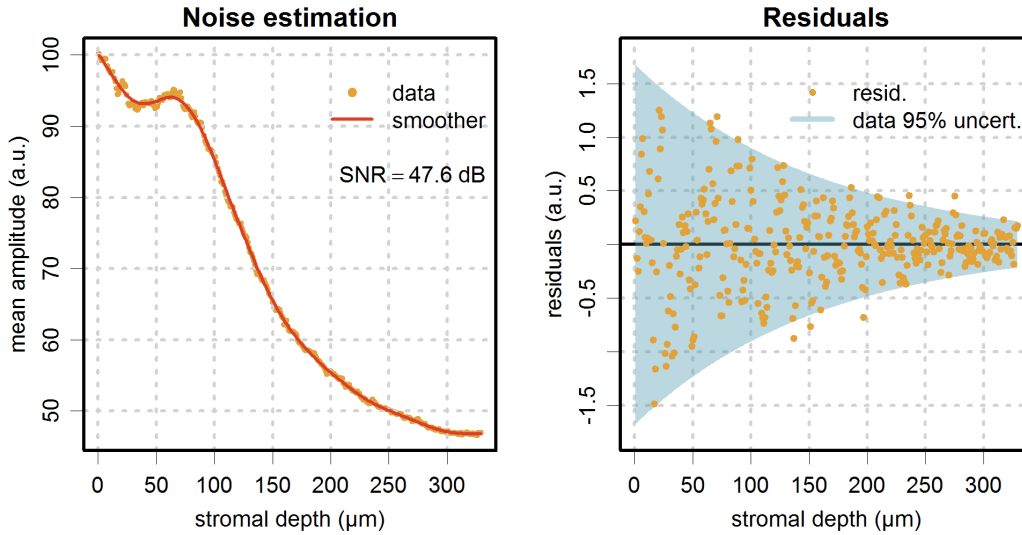


Figure III.8 – Ajustement des données par une fonction spline cubique (à gauche). Analyse de la distribution du bruit (à droite).

Ajustement exponentiel

La courbe de la moyenne cohérente est ajustée par une fonction exponentielle à trois paramètres

$$\begin{aligned}\vartheta &= \{A_0, \ell_s, C\} \\ f(z; \vartheta) &= A_0 \exp\left(-\frac{z}{\ell_s}\right) + C.\end{aligned}\tag{III.11}$$

Les paramètres sont obtenus par maximisation de la fonction de densité de probabilité *a posteriori* (MAP). En absence de corrélations, la vraisemblance est un produit de distributions normales univariées :

$$A|\vartheta \sim \prod_{i=1}^N \mathcal{N}(f(z_i; \vartheta), u_{Ai})\tag{III.12}$$

où les probabilités *a priori* des paramètres sont uniformes sur $[0, \infty[$.

Pour considérer le modèle comme valide, les résidus ne doivent pas présenter de corrélation de série et doivent être conformes au bruit aléatoire. La méthode bayésienne nous permet d'obtenir un paramètre statistique traduisant l'adéquation entre le modèle mono-exponentiel et les données. En effet on peut définir une fonction chi-carré pondérée

$$\chi^2(A; z, u_A, \vartheta) = \sum_{i=1}^N \frac{[A_i - f(z_i; \vartheta)]^2}{u_{Ai}^2}.\tag{III.13}$$

Pour plus de facilité d'analyse on définit le rapport de Birge B_r , qui correspond au χ^2 réduit (c'est-à-dire divisé par le nombre de degrés de liberté)

$$B_r = \chi_r^2 = \frac{\chi^2}{(N-3)}.\tag{III.14}$$

De cette façon, les valeurs de ce paramètre sont normalisées et B_r doit rester proche de 1 pour que l'on considère que l'ajustement est statistiquement valide. Plus précisément, on considère l'ajustement valide si B_r appartient à l'intervalle de confiance à 95 % (IC₉₅) défini par les quantiles de la distribution du χ^2 à $N-3$ degrés de liberté.

- Si $B_r \in \text{IC}_{95}$ alors on peut considérer que le modèle mono-exponentiel est valide et l'on a alors les paramètres de l'exponentiel ainsi que leurs incertitudes.
- En revanche si $B_r \notin \text{IC}_{95}$, on doit alors modifier notre modèle car on ne peut plus connaître l'incertitude sur nos paramètres si le modèle n'est pas statistiquement adéquat.

La figure III.9 montre l'exemple d'une cornée pour laquelle le modèle mono-exponentiel n'est pas valide. Le paramètre statistique indique l'inadéquation du modèle : $B_r = 102 \gg 1$.

On modifie alors l'exponentielle en permettant au libre parcours moyen ℓ_s de varier avec la profondeur autour de sa valeur moyenne :

$$f(z; \vartheta, \kappa) = A_0 \exp\left(-\frac{z}{\ell_s(1 + \Delta\ell_s(z; \kappa))}\right) + C.\tag{III.15}$$

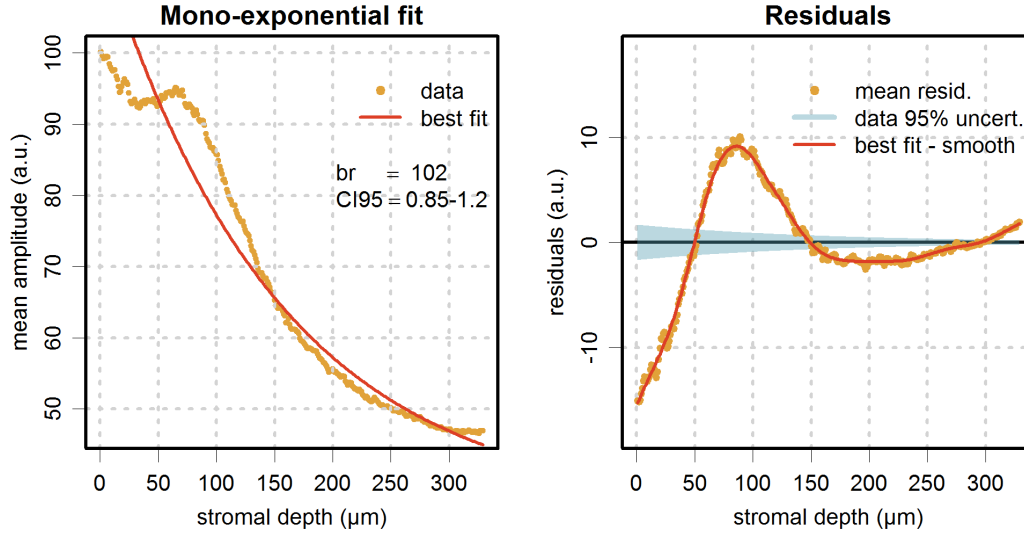


Figure III.9 – Ajustement des données par une fonction exponentielle (à gauche) et résidus (à droite).

La fonction de modulation $\Delta\ell_s(z; \kappa)$ est un processus gaussien de moyenne nulle, conditionné par M points de contrôle $\kappa = \{\kappa_i\}_{i=1}^M$ à des positions prédéfinies $\hat{z} = \{\hat{z}_i\}_{i=1}^M$. La valeur moyenne du processus gaussien sert comme fonction d'interpolation entre ces points et on utilise un noyau gaussien pour ses propriétés de régularité :

$$C(z, z') = \alpha^2 \exp\left(-\frac{(z - z')^2}{\rho^2}\right). \quad (\text{III.16})$$

$\Delta\ell_s(z; \kappa)$ peut être calculé à n'importe quel profondeur à partir de la valeur moyenne du processus gaussien :

$$\Delta\ell_s(z; \kappa) = \Omega^T K^{-1} \kappa \quad (\text{III.17})$$

où K est une matrice de covariance $M \times M$ dont les éléments sont $K_{ij} = C(\hat{z}_i, \hat{z}_j)$ et Ω est un vecteur de dimension M avec les éléments $\Omega_i = C(\hat{z}_i, z)$.

Les points de contrôle sont choisis *a priori* sur une grille régulière dans l'intervalle des profondeurs de mesure. Le nombre de points de contrôle peut-être réglé en fonction des fluctuations que l'on observe sur le signal. En pratique, pour les données d'OCT plein champ on choisit $M = 15$. De la même façon on peut régler la régularité de l'interpolation à partir de la longueur de corrélation du noyau (ρ) ; en pratique on utilise $\rho = \text{profondeur totale}/M$. La variance du processus gaussien (α) est choisie comme une fraction de la variance des points de contrôle $\alpha = 0,1 \times \sigma(\kappa)$.

Distributions *a priori*

κ . Ce modèle étendu introduit une indétermination entre ℓ_s et $\Delta\ell_s$. Par exemple, fixer toutes les valeurs des points de contrôle κ à 1 peut être entièrement compensé en divisant ℓ_s par 2. Pour éviter cette indétermination on contraint alors les points de contrôle κ à être proches de 0 en utilisant un lasso (*Least Absolute Shrinkage and Selection Operator*) [66] dans une version

adaptée de [67] ; c'est-à-dire en contraignant les densités de probabilité *a priori* des écart-types des points de contrôle de la façon suivante :

$$\begin{aligned}\kappa_i|u_i &\sim \text{Normal}(0, s_i); i = 1, M \\ s_i|\lambda &\sim \text{Gamma}(2, \lambda); i = 1, M \\ \lambda &\sim \text{Gamma}(2, \lambda_r)\end{aligned}\tag{III.18}$$

où λ_r est choisi *a priori* et définit l'amplitude de déviation des points de contrôle κ (ou la largeur du lasso) ; typiquement on choisit $\lambda_r = 0,1$.

Ces corrections servent à assurer que les fluctuations $\Delta\ell_s$ ne soient que des corrections par rapport à l'exponentielle moyenne. Elles permettent également d'assurer que les valeurs des points de contrôle ne sont modifiées que si nécessaire.

ϑ . La distribution *a priori* de ϑ est une distribution normale multivariée $\pi(\vartheta) = \text{N}(\hat{\vartheta}_1, \Sigma_\vartheta)$ centrée sur la meilleure estimation de l'ajustement mono-exponentielle, $\hat{\vartheta}_1$ avec une matrice de covariance Σ_ϑ . On ne peut pas directement utiliser la matrice de covariance de l'ajustement mono-exponentiel Σ_{ϑ_1} puisque celui-ci est considéré comme inadéquat dans le cas présent. On construit alors une matrice de covariance qui permet les atténuations couvrant l'amplitude des variations des résidus de l'ajustement mono-exponentiel [68]. Deux méthodes ont été implémentées :

1. la matrice de covariance est construite à partir de la matrice de corrélation C_{ϑ_1} issue de l'ajustement mono-exponentiel et un vecteur d'écart-types spécifié par une incertitude relative sur les paramètres :

$$\Sigma_\vartheta = I(u_\vartheta)C_{\vartheta_1}I(u_\vartheta)\tag{III.19}$$

où $I(u_\vartheta)$ est une matrice diagonale avec pour éléments $u_\vartheta = r \times \hat{\vartheta}_1$. Le facteur d'incertitude est typiquement un pourcentage faible, par exemple $r = 0,05$.

2. une matrice de covariance diagonale $\Sigma_\vartheta = I(u_\vartheta^2)$ est construite par une procédure de correspondance des moments. Les écart-types u_ϑ sont optimisés pour satisfaire deux critères :
 - a) S_1 , l'incertitude de prédiction à 2-sigma du modèle mono-exponentiel doit correspondre au 95^e quantile des erreurs absolues du modèle mono-exponentiel (toutes statistiques étant pondérées par u_A) [69] ;
 - b) l'écart-type de l'incertitude de prédiction doit être aussi petit que possible.

Le premier critère assure que la moyenne de prédiction d'incertitude du modèle mono-exponentiel est en accord avec l'amplitude des résidus du modèle [68]. Ce critère peut être satisfait par une infinité de solutions, et le second critère sélectionne les paramètres qui donnent l'intervalle de prédiction le plus plat. L'optimisation est faite en échantillonnant les distributions *a posteriori* des paramètres u_ϑ à partir des distributions *a priori* uniformes sur $[0, \infty[$ et une fonction de vraisemblance normale bivariée

$$\{Q_{95}, 0\}|u_\vartheta \sim \text{N}_2(\{S_1(u_\vartheta), S_2(u_\vartheta)\}, \varepsilon)\tag{III.20}$$

où $S_1 = 1,96 \times \sqrt{\langle u_p^2 / u_A^2 \rangle}$, u_p est la prédiction d'incertitude du modèle mono-exponentiel estimée par propagation linéaire d'incertitude [70], Q_{95} est le 95^e quantile des résidus

pondérés absolus $|\{A - f(z; \vartheta)\}/u_A|$, $S_2 = \text{std}(u_p/u_A)$ et ε est un facteur de précision prédéfini ($\varepsilon = 0,001$).

La figure III.10 illustre l'utilisation de la méthode de correspondance des moments.

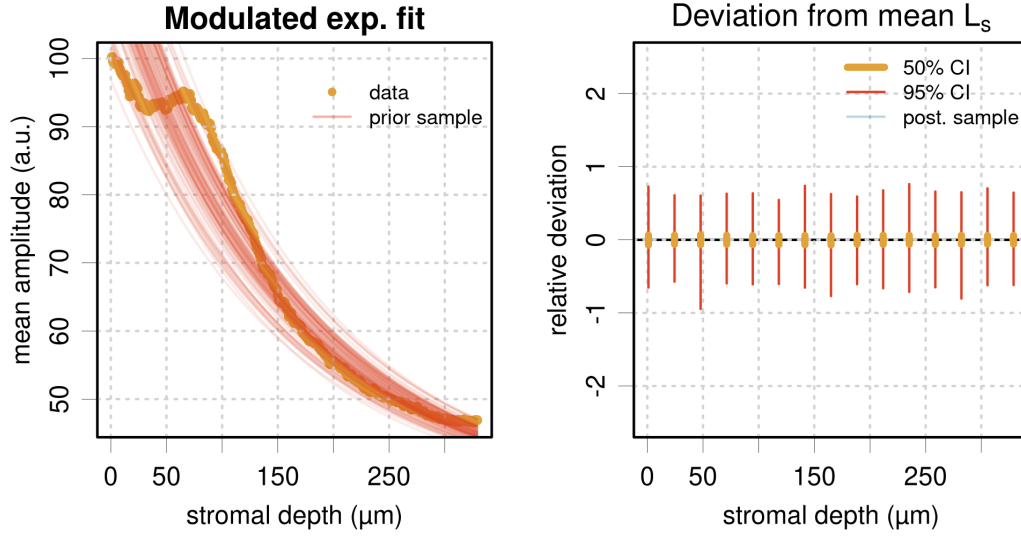


Figure III.10 – Échantillonnage des distributions *a priori*. Tous les points de contrôle sont bien à 0.

σ . Pour compenser d'éventuelles erreurs dans l'estimation du bruit, un paramètre σ est introduit comme facteur multiplicatif de u_A . La distribution *a priori* de σ est normale, centrée en 1 avec un écart-type de 0,1.

Les paramètres à ajuster sont alors $\vartheta, \kappa, \lambda_r$ et σ . Comme pour l'ajustement mono-exponentiel, la fonction de vraisemblance est un produit de distributions normales univariées

$$A|\vartheta, \kappa, \sigma \sim \prod_{i=1}^N N(f(z_i; \vartheta, \kappa), \sigma \times u_{Ai}) \quad (\text{III.21})$$

Enfin, la qualité de l'ajustement est aussi indiquée par l'analyse des résidus et par le rapport de Birge B_r . Dans le cas présent $B_r = \chi^2/(N - \nu)$ avec $\nu = 5 + \hat{M}$ le nombre de degrés de liberté; \hat{M} étant le nombre de points de contrôle significativement différent de 0, c'est-à-dire ceux pour lesquels $0 \notin IQ_{90}(\kappa_i)$.

On obtient alors les paramètres de l'ajustement, y compris la valeur moyenne du libre parcours moyen de diffusion et ses fluctuations en profondeur. Si les fluctuations sont de faibles amplitude, on considère que le stroma est homogène, malgré le fait que le modèle mono-exponentiel ne soit pas valide. En effet on sait que le stroma n'est pas rigoureusement un milieu homogène (par exemple à cause du gradient dans l'organisation des lamelles de collagène), on peut alors s'attendre à une légère déviation par rapport au modèle mono-exponentiel. Mais en cas de fortes fluctuations nous considérons qu'elles indiquent la présence d'une hétérogénéité. Ces informations sont importantes car on peut déterminer la position d'une telle

hétérogénéité au sein du stroma. Un exemple est montré en figure III.11 où l'on observe une forte hétérogénéité.

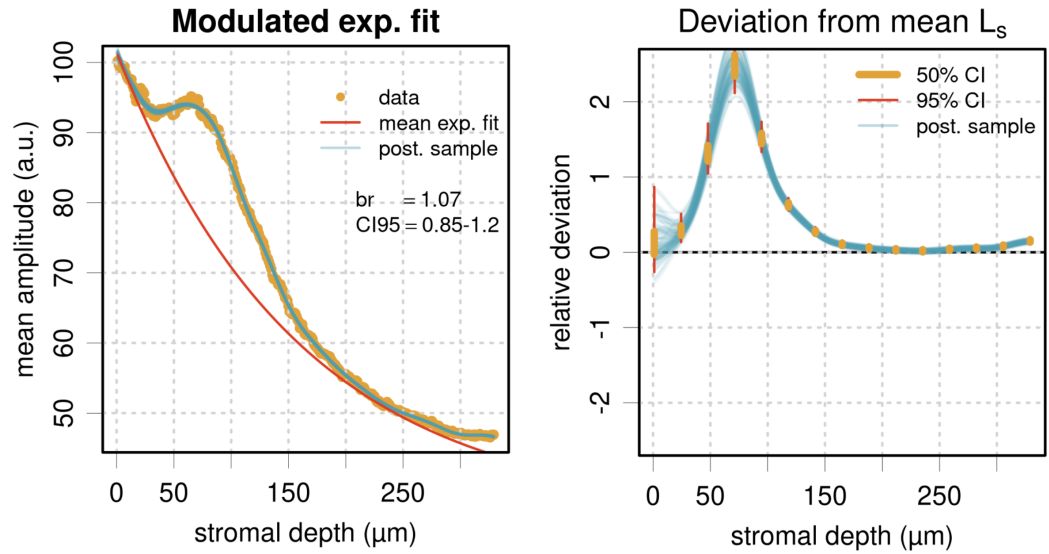


Figure III.11 – À gauche : ajustement par le modèle étendu (en bleu) et exponentielle moyenne sans variation du libre parcours moyen (en rouge). À droite : valeurs des variations Δl_s avec la profondeur. Les points de contrôle sont représentés avec des intervalles de confiance sur leur valeur à 50 % (en jaune) et 95 % (en rouge).

Encart III.2 - Résumé de l'algorithme d'ajustement

- Ajustement du signal balistique par une spline cubique dont les résidus sont supposés être un bruit aléatoire suivant une statistique de Poisson et donc l'écart-type des résidus doit s'atténuer exponentiellement avec le signal. On calcule également un rapport signal sur bruit.
- Ajustement des données par une fonction mono-exponentielle. La qualité de l'ajustement est déterminée en comparant les résidus de l'ajustement avec le bruit calculé précédemment, ce qui se traduit dans un paramètre statistique : le rapport de Birge B_r .
- Si $B_r \approx 1$ le modèle est adéquat et l'algorithme s'arrête en donnant les paramètres de l'exponentielle A_0, ℓ_s, C et leurs incertitudes.
- Si $B_r \gg 1$ le modèle est inadéquat et on fait un ajustement avec un modèle étendu permettant la variation en profondeur du libre parcours moyen autour de sa valeur moyenne :

$$A(z) = A_0 \exp\left(-\frac{z}{\ell_s(1 + \Delta\ell_s)}\right) + C$$

Pour permettre un ajustement correct, on impose des contraintes entre les paramètres ℓ_s et $\Delta\ell_s$.

III.2.4 Mesure de transparence de cornées par OCT plein champ

Nous avons acquis les images de plusieurs cornées saines et pathologiques par OCT plein champ. Les cornées saines proviennent de la banque des yeux de l'Établissement Français du Sang (EFS) ; ce sont des cornées de donneurs dont les densités de cellules endothéliales sont jugées insuffisantes pour une greffe et sont donc utilisées pour la recherche si le donneur en a donné l'autorisation. Les cornées pathologiques sont des cornées provenant du bloc opératoire du centre hospitalier national d'ophtalmologie des Quinze-Vingts. Nous récupérons la cornée pathologique après une opération de greffe, ou kératoplastie, d'une cornée de donneur. Comme nous nous intéressons au stroma nous sélectionnons les patients qui ont eu une greffe de cornée totale, appelée kératoplastie transfixiante (KT) ou ceux qui ont eu une kératoplastie lamellaire antérieure profonde (KLAP). Les différents types de greffes possibles sont indiqués dans la figure III.12.

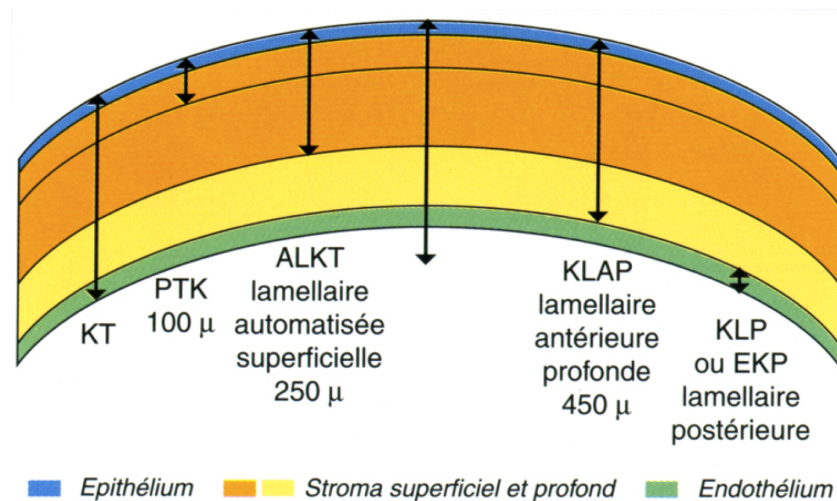


Figure III.12 – Les différentes kératoplasties : épithélium, stroma superficiel et profond, endothélium.
source – <https://www.ophtalmologie-besancon.fr/greffe-de-cornee/>

Les cornées ont été placées dans une solution de Dextran (CorneaJet, Eurobio, France) avant d'être analysées à l'OCT plein champ [71]. Le Dextran est un milieu à base de polymère de glucose, qui sert ici à diminuer la pression osmotique que subit la cornée. En effet comme la cornée est déshydratée dans son état physiologique, il faut la placer dans une solution fortement concentrée pour éviter un œdème cornéen. Ce phénomène s'appelle la mise en déturgescence.

Nous allons présenter les résultats d'analyse de quelques exemples typiques de cornées saines et pathologiques.

Cornées saines

La figure III.13 est une image en coupe orthogonale du volume d'une cornée saine transparente ainsi que le profil de la moyenne cohérente du stroma. La segmentation du stroma se fait manuellement en regardant les images en faces. La première image que l'on retient doit être intégralement dans le stroma. S'il reste une courbure résiduelle après l'aplatissement numérique on ne sélectionne pas les images qui contiennent une partie de l'épithélium ou de la membrane

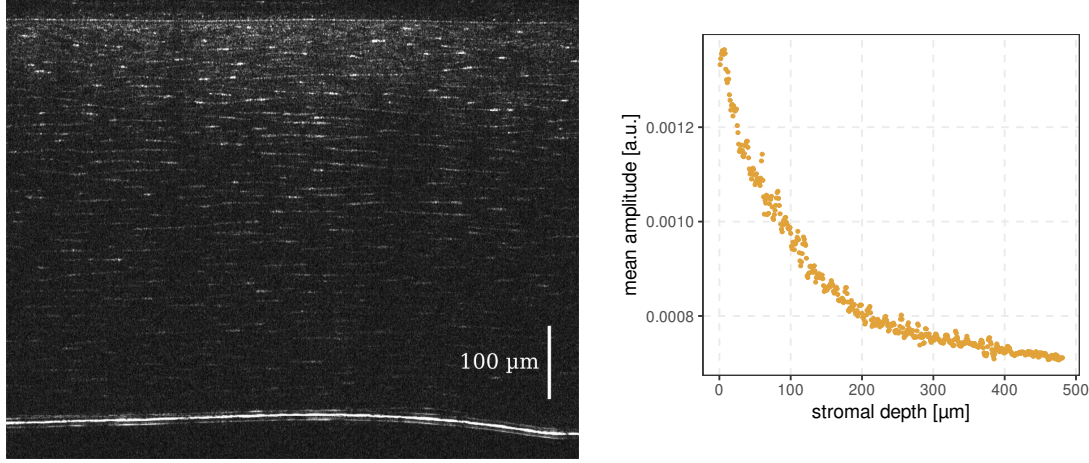


Figure III.13 – À gauche : image en coupe d’une cornée saine, l’épithélium est vers le haut. À droite : profil de la moyenne cohérente de cette cornée après segmentation du stroma.

de Bowman. Le stroma de cette cornée a été ainsi mesuré à 480 μm

À partir du profil en profondeur de la moyenne cohérente, on applique l’analyse bayésienne présentée précédemment. La première étape est montrée sur la figure III.14, il s’agit de l’analyse du bruit dont on extrait notamment le rapport signal sur bruit $\text{SNR} = 39,1 \text{ dB}$, puis d’un ajustement mono-exponentiel, dont le rapport de Birge nous indique si le modèle mono-exponentiel est statistiquement valide ou non ; ici $B_r = 1,29 \notin \text{CI95}$. Le rapport de Birge indique ici que le modèle mono-exponentiel n’est pas statistiquement valide.

La figure III.15 montre les résultats de l’ajustement par le modèle étendu. Les variations du libre parcours moyen en profondeur sont proches de zéro ce qui nous permet de conclure qu’il n’y a pas d’hétérogénéité. Le libre parcours moyen de diffusion est de $\ell_s = 108 \pm 2,3 \mu\text{m}$, ce qui donne un rapport avec l’épaisseur du stroma :

$$\frac{\text{épaisseur}}{\ell_s} = 4,44. \quad (\text{III.22})$$

Cornées homogènes pathologiques

On choisit ici une cornée dont la transparence est compromise mais dont la moyenne cohérente présente un profil d’atténuation exponentiel. Il s’agit d’une dystrophie de Schnyder qui se caractérise par la présence d’opacités en forme d’anneau autour du centre de la cornée. Dans notre cas le champ de vue de l’OCT plein champ est suffisamment petit pour ne pas observer ces opacités.

En revanche le stroma de cette cornée a une épaisseur supérieure à la normale et présente un œdème. On mesure l’épaisseur du stroma à 564 μm . Sur la figure III.16 on remarque sur l’image en coupe orthogonale que l’on ne distingue pas facilement l’endothélium ni même les kératocytes dans le stroma postérieur. L’aspect visuel de cette section orthogonale indique une cornée peu transparente. La figure III.17 présente l’analyse de bruit et l’ajustement mono-exponentiel.

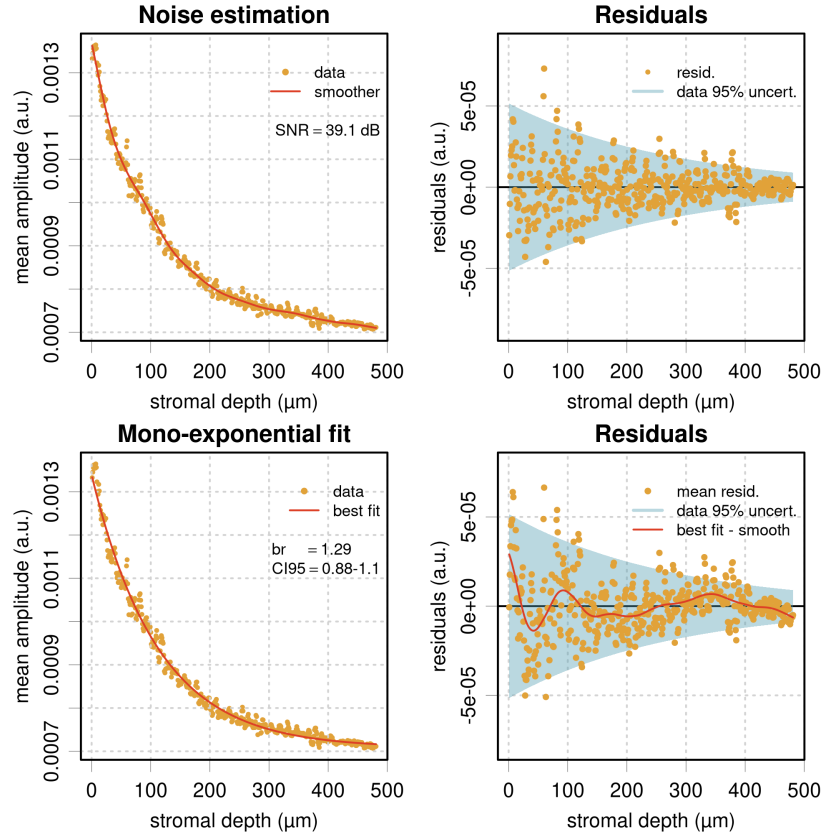


Figure III.14 – *Haut* : ajustement des données d’une cornée saine par une fonction spline et résidus. Les résidus servent à estimer l’incertitude des paramètres d’ajustement exponentiel. Le rapport signal sur bruit est également calculé (SNR). *Bas* : ajustement mono-exponentiel et résidus. Le rapport de Birge (br) est calculé ainsi que son intervalle de confiance à 95 %.

Le rapport signal sur bruit est de 48,3dB et le rapport de Birge de l’ajustement mono-exponentiel est $B_r = 7,68$. On peut donc conclure que l’ajustement mono-exponentiel n’est pas statistiquement valide, ce qui est visible également sur les résidus qui ne sont pas aléatoires et présentent des corrélations de série. Il est donc nécessaire de procéder à l’ajustement avec le modèle étendu dont les résultats sont résumés sur la figure III.18.

L’ajustement du modèle étendu révèle que les fluctuations du libre parcours moyen de diffusion avec la profondeur sont faibles : $|\Delta\ell_s| < 0,1$. On considère donc que cette cornée est homogène (sur le champ de vue que l’on considère) mais son libre parcours moyen de diffusion est nettement plus faible que pour la cornée saine : $\ell_s = 68,8 \pm 1,4\mu\text{m}$. Ce qui donne un rapport avec l’épaisseur du stroma :

$$\frac{\text{épaisseur}}{\ell_s} = 8,17. \quad (\text{III.23})$$

Cornées hétérogènes

On analyse ici une cornée présentant une dégénérescence nodulaire de Salzmann, caractérisée par l’apparition de nodules diffusants à la surface de la cornée. La figure III.19 montre l’image

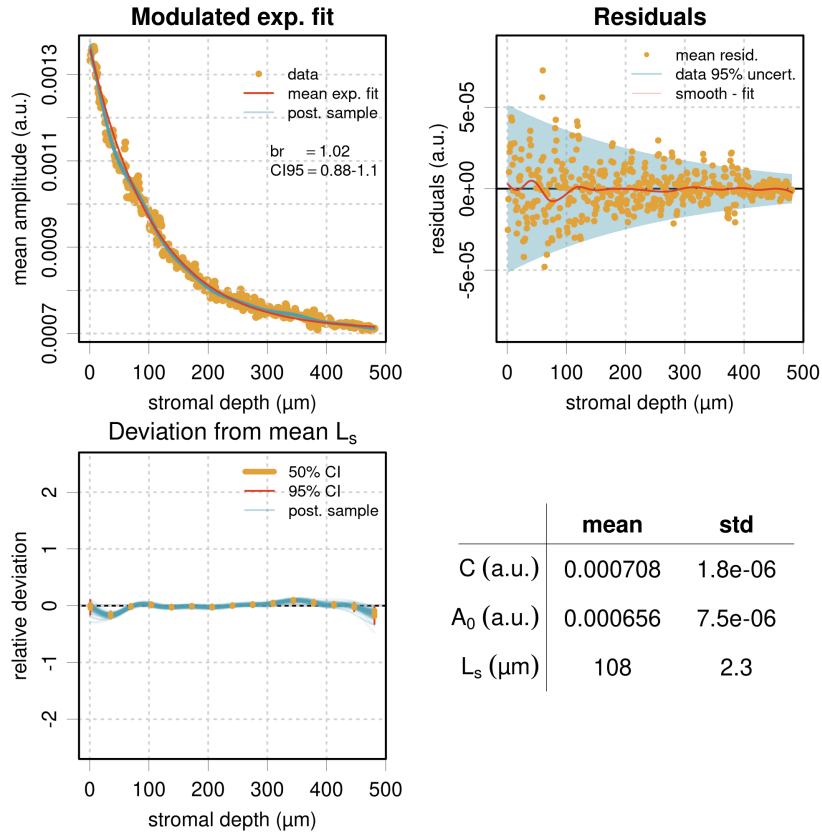


Figure III.15 – En haut à gauche : ajustement par le modèle étendu. En haut à droite : résidus de l'ajustement. En bas à gauche : déviation du libre parcours moyen en profondeur. En bas à droite : tableau des paramètres de l'ajustement.

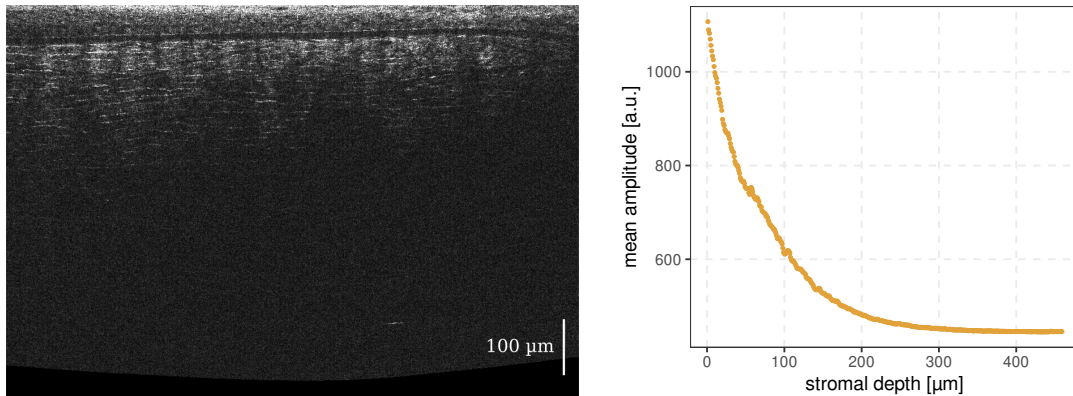


Figure III.16 – À gauche : image en coupe d'une cornée pathologique ayant une dystrophie de Schnyder, l'épithélium est vers le haut. À droite : profil de la moyenne cohérente de cette cornée après segmentation du stroma.

en coupe de cette cornée ainsi que le profil de la moyenne cohérente dans le stroma.

Le profil de la moyenne cohérente dévie très nettement d'une exponentielle. L'image en

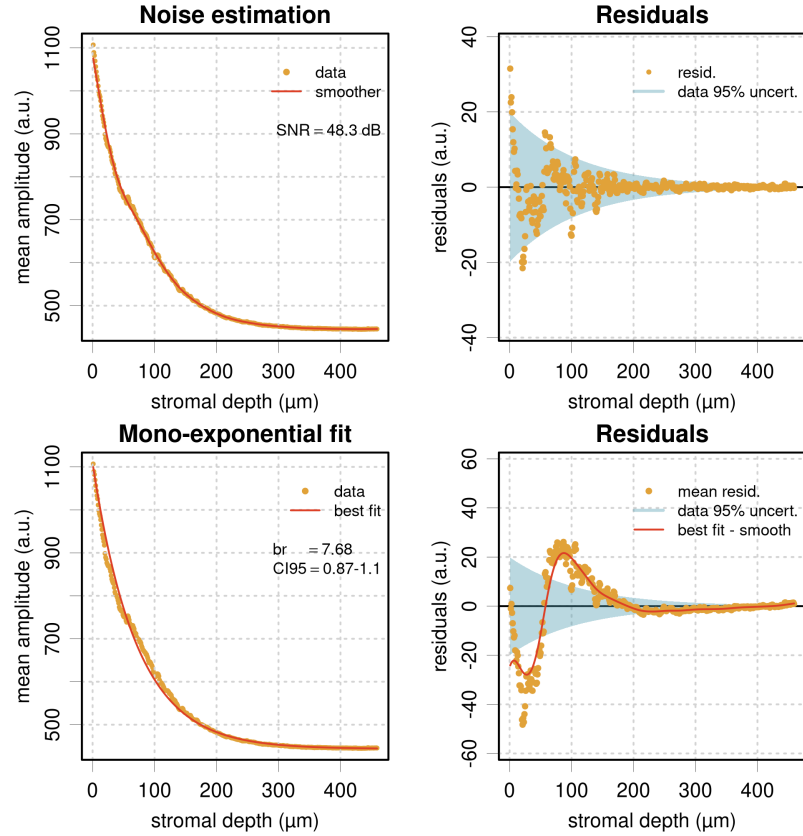


Figure III.17 – *Haut : analyse du bruit d’une cornée pathologique œdémateuse par une fonction spline et résidus. Le rapport signal sur bruit est également calculé (SNR). Bas : ajustement mono-exponentiel et résidus. Le rapport de Birge (br) est calculé ainsi que son intervalle de confiance à 95 %.*

coupe montre également une zone hyperréfléctive dans le stroma antérieur. L’analyse du bruit et l’ajustement exponentiel sont représentés sur la figure III.20.

Le rapport signal sur bruit est de $SNR = 47,6$ dB et le rapport de Birge de l’ajustement mono-exponentiel est $B_r = 102$. La cornée est fortement hétérogène et on voit alors que le rapport de Birge peut prendre des valeurs très différentes selon les cas.

Le modèle étendu est alors ajusté et les résultats sont affichés dans la figure III.21. Les variations du libre parcours moyen de diffusion sont très fortes : $|\Delta\ell_s| \approx 2,5$. Les valeurs des paramètres de l’ajustement ne sont pas pertinentes ici car la cornée est fortement hétérogène donc sa transparence est compromise.

Notre algorithme est donc capable de distinguer les cornées homogènes des cornées hétérogènes par l’intermédiaire du rapport de Birge de l’ajustement mono-exponentiel (B_r), dont la valeur indique le degré d’hétérogénéité, et les variations du libre parcours moyen $|\Delta\ell_s|$. Il faudra définir un seuil précis pour la valeur du rapport de Birge ou des fluctuations du libre parcours moyen permettant de définir une cornée comme hétérogène. En effet comme on le voit avec les cornées saines ou homogène le rapport de Birge de l’ajustement mono-exponentiel n’est pas dans l’intervalle de confiance car le modèle mono-exponentiel suppose un milieu homogène.

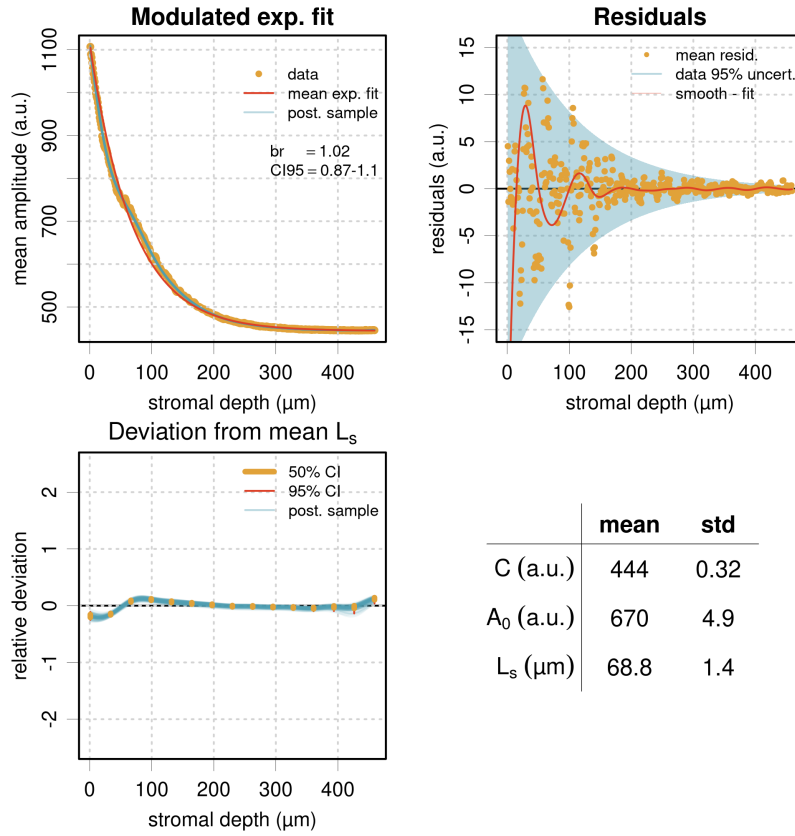


Figure III.18 – En haut à gauche : ajustement par le modèle étendu. En haut à droite : résidus de l'ajustement. En bas à gauche : déviation du libre parcours moyen en profondeur. En bas à droite : tableau des paramètres de l'ajustement.

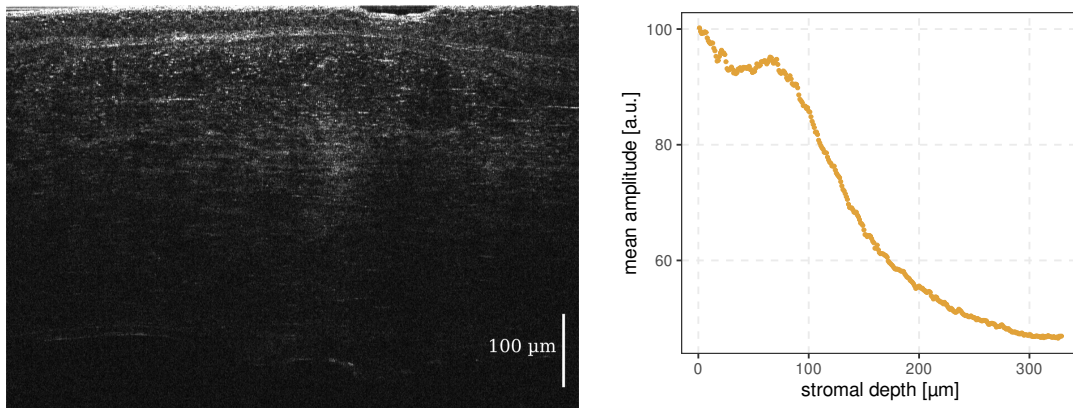


Figure III.19 – À gauche : image en coupe d'une cornée pathologique ayant une dégénérescence nodulaire de Salzmann, l'épithélium est vers le haut. À droite : profil de la moyenne cohérente de cette cornée après segmentation du stroma.

Nous avons défini un seuil pour l'homogénéité : $B_r < 10$. Pour les cornées que nous avons analysées cette valeur correspond à des fluctuations du libre parcours moyen assez faibles.

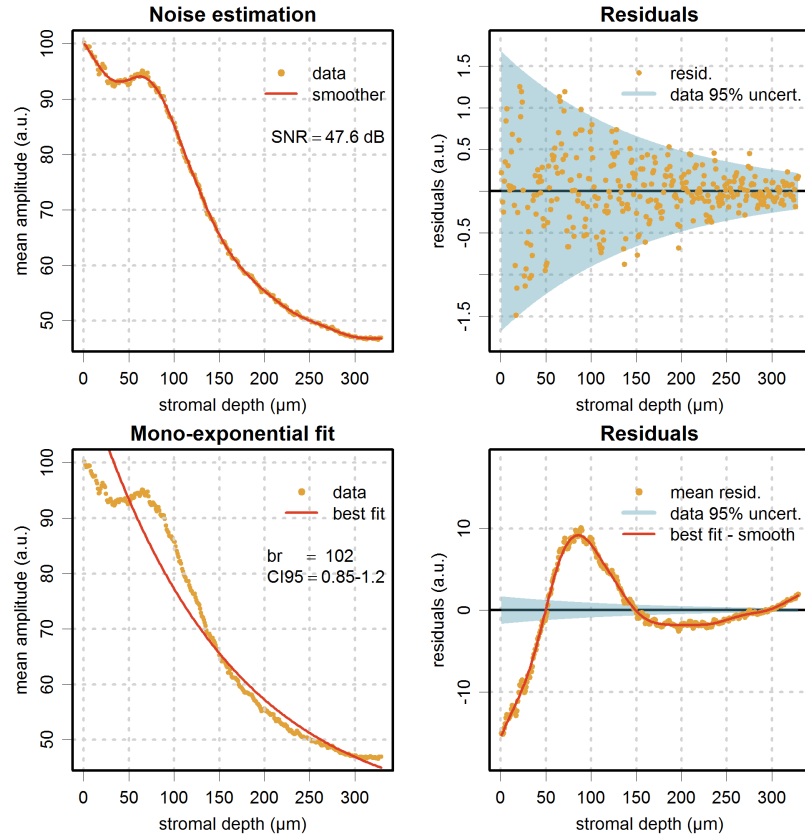


Figure III.20 – *Haut* : analyse du bruit d'une cornée pathologique hétérogène par une fonction spline et résidus. Le rapport signal sur bruit est également calculé (SNR). *Bas* : ajustement mono-exponentiel et résidus. Le rapport de Birge (br) est calculé ainsi que son intervalle de confiance à 95 %.

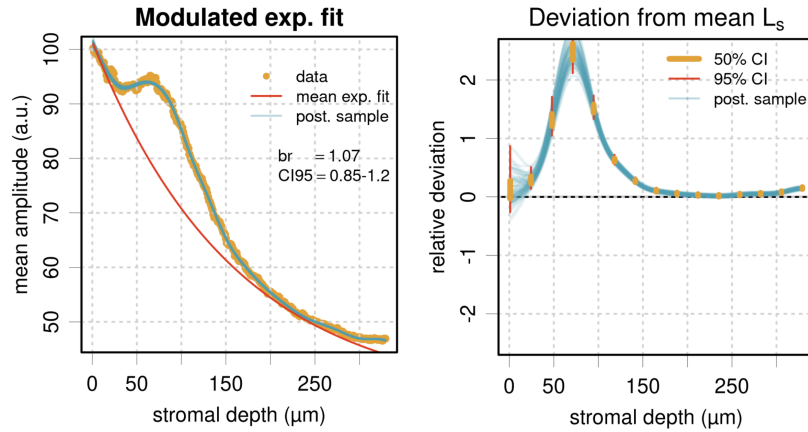


Figure III.21 – *En haut à gauche* : ajustement par le modèle étendu. *En haut à droite* : résidus de l'ajustement. *En bas à gauche* : déviation du libre parcours moyen en profondeur. *En bas à droite* : tableau des paramètres de l'ajustement.

III.2.5 Précision de la mesure

Cette partie concernant la précision de la mesure par OCT plein champ a été complétée dans l'annexe [B](#)

Solution monodisperse de polystyrène

On souhaite préparer un milieu dont on peut contrôler la valeur du libre parcours moyen de diffusion, pour valider notre mesure quantitative du libre parcours moyen de diffusion. Pour cela on utilise une solution aqueuse de billes de polystyrène comme milieu modèle. Ces solutions sont monodisperses, on peut donc calculer le libre parcours moyen de diffusion d'une telle solution à l'aide de la théorie de Mie. En fonction de quelques paramètres des particules (leur diamètre, leur concentration et leur indice optique), et de la longueur d'onde de la lumière utilisée, le programme Matlab « *Maetzler's MATLAB Mie calculation* » calcule le libre parcours moyen de diffusion selon la théorie de Mie.

On utilisera une solution de billes de polystyrène de diamètre 0,51 μm et on utilisera la source de lumière halogène centrée à 725 nm. Il nous faut calculer la concentration nécessaire pour obtenir une valeur du libre parcours moyen de diffusion du même ordre de grandeur que celui obtenu en général pour les cornées *ex vivo* ($\approx 100 \mu\text{m}$).

Les paramètres de la solution de billes de polystyrène de *Polysciences, Inc.* sont les suivants² :

- La teneur de la solution de base C_0 est de 2,6 % en $\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ soit $26 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
- La masse volumique du polystyrène est : $\rho_{\text{PS}} = 1050 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
- La concentration en nombre de particules par unité de volume est donc :

$$C = \frac{26 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}}{\rho_{\text{PS}} \frac{4}{3} \pi r^3} \approx 3,57 \times 10^{11} \text{ molécules/ml}$$
avec $r = 0,255 \mu\text{m}$, ce qui équivaut à une fraction volumique de $V_f = C \times V_{\text{sphère}} \approx 0,025$
- Les indices optique du milieu et des sphères à la longueur d'onde de 589 nm sont respectivement : $n_{\text{eau}} = 1,33$ et $n_{\text{polystyrène}} = 1,59$

On prépare 4 solutions à des concentrations différentes que l'on place dans des cuves pour spectroscopie d'absorption Hellma. Ces cuves possèdent un bouchon qui permet de maintenir la concentration constante en évitant l'évaporation de l'eau. Les quatre cuves sont identiques et ont un volume de 1,75 ml pour un trajet optique de 5 mm. Le verre de la cuve est un verre optique spécial transparent dans la plage de longueurs d'onde 320 à 2500 nm ($> 80\%$ de transmission).

On choisit comme concentrations : $C_0/7$, $C_0/27$, $C_0/47$ et $C_0/67$. Ces concentrations donnent d'après le calcul de la théorie de Mie des libres parcours moyens de diffusion compris entre 150 μm et 1500 μm . Les cuves sont placées directement sous le microscope sans lame de verre, les cuves étant elles-mêmes en verre. Cependant cela peut diminuer le signal car on ne compense plus exactement la dispersion (on ne peut pas enlever la lame de verre placée dans le bras

2. <http://www.polysciences.com/skin/frontend/default/polysciences/pdf/TDS%20238.pdf>

de référence, prévue pour compenser la dispersion de la lame devant l'échantillon). Comme le système n'est pas utilisé dans sa configuration initiale, une calibration du bras de référence est effectuée avant de démarrer les acquisitions. Pour chaque cuve on enregistre 75 images avec un pas de $10\ \mu\text{m}$, ce qui permet de diminuer le temps total d'acquisition (pour éviter une éventuelle sédimentation des billes dans la cuve). Comme pour les images de cornées, chaque image d'OCT plein champ est le résultat d'une accumulation de 40 images.

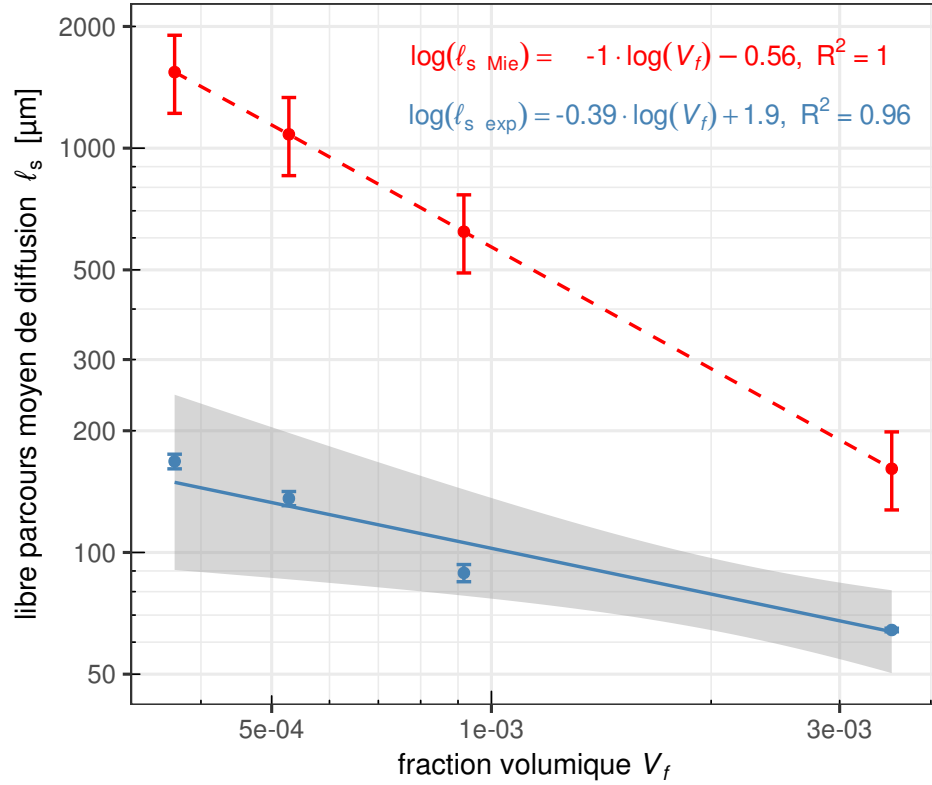


Figure III.22 – Libres parcours moyens de diffusion d'une solution monodisperse de billes de polystyrène de diamètre $0,51\ \mu\text{m}$ à différentes fractions volumiques. La courbe rouge représente les valeurs calculées par la théorie de Mie (avec en barre d'erreur les valeurs à $650\ \text{nm}$ et $800\ \text{nm}$) et la courbe bleue celles mesurées par analyse du signal de l'OCT plein champ (l'intervalle de confiance à 95 % de l'ajustement linéaire est indiqué par la zone grise). Les deux axes sont en échelle logarithmique pour comparer les deux courbes à des droites.

Sur la figure III.22 on observe les libres parcours moyens de diffusion mesurés par OCT plein champ, et ceux calculés par la théorie de Mie pour une solution monodisperse de billes de polystyrène de diamètre $0,51\ \mu\text{m}$ à la longueur d'onde centrale de la source halogène filtrée $725\ \text{nm}$. Les barres d'erreur représentent les valeurs du libre parcours moyen de diffusion calculées pour les longueurs d'onde correspondant à la mi-hauteur du spectre de la source ($650\ \text{nm}$ et $800\ \text{nm}$). La courbe est affichée dans repère log-log pour faciliter la comparaison entre les deux courbes. On s'attend en effet à ce que le libre parcours moyen de diffusion soit inversement proportionnelle à la concentration en diffuseurs ; en choisissant une échelle logarithmique pour

les libres parcours moyens et les concentrations on doit retrouver une droite :

$$\ell_s = \frac{1}{\sigma C}$$

$$\log(\ell_s) = -\log(C) - \log(\sigma)$$

Sur la figure on a tracé en abscisse la fraction volumique, au lieu de la concentration, ce qui est pareil à un facteur près (le volume d'une particule) et améliore la lisibilité de l'axe. On remarque que les libres parcours moyens de diffusion mesurés sont plus faibles que ceux calculés. Cependant on observe quand même une relation linéaire avec le logarithme de la concentration, comme pour les valeurs théoriques. Mais les coefficients ne sont pas les mêmes : $-0,39$ pour les données mesurées alors que théoriquement le coefficient linéaire vaut -1 .

Le fait qu'on observe bien une relation linéaire avec le facteur de dilution dans nos mesures, mais avec un facteur différent de celui prédit par la théorie suggère que l'on mesure un autre phénomène qui se superpose à la seule diffusion des billes de polystyrène. Une des explications possible de cette différence observée est que la solution est un échantillon dynamique où les diffuseurs sont en mouvement permanent. Avec l'OCT plein champ, pour chaque profondeur on moyenne 40 images, et chacune de ces images a un temps d'acquisition d'environ 6 ms lorsqu'on utilise comme source la lampe halogène. Un rapide calcul d'ordre de grandeur nous permet d'estimer la vitesse des billes dans l'eau :

- on considère une température $T = 293 \text{ K}$;
- la masse d'une bille est de $m = \rho_{\text{PS}} \times V_{\text{sphère}} \approx 7 \times 10^{-17} \text{ kg}$;
- on néglige la gravité et on considère un équilibre thermodynamique entre les particules et l'eau. On peut donc appliquer le théorème de l'équipartition de l'énergie, qui nous dit que l'énergie du système (ici uniquement cinétique) vaut $\frac{1}{2}k_B T$ par degré de liberté. À 3 dimensions, on a donc :

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = \frac{3}{2}k_B T$$

$$v = \sqrt{\frac{3k_B T}{m}} \approx 12,9 \mu\text{m} \cdot \text{ms}^{-1} \quad (\text{III.24})$$

À la température ambiante, les billes de polystyrène se déplacent donc de façon non négligeable pendant le temps d'exposition nécessaire à l'acquisition d'une image. Un tel mouvement des diffuseurs conduit à une perte de cohérence de la lumière provenant de l'échantillon.

De plus, ici on ne fait pas l'image des billes puisqu'elles sont de taille inférieure à notre résolution. C'est une situation différente de celle rencontrée avec les cornées. En effet pour les cornées les structures diffusantes renvoient aussi un signal spéculaire, par exemple à l'interface de chaque lamelle et de chaque kératocyte.

Gel d'agarose contenant les billes de polystyrène

Pour supprimer l'effet de perte de cohérence dû au mouvement des billes, une possibilité est de piéger les billes dans un gel solide. L'objectif est de vérifier si l'on mesure alors le libre parcours moyen de façon quantitative ou en tout cas si l'on observe une augmentation du libre parcours moyen d'un facteur 2 lorsque l'on double la concentration de diffuseurs.

Un échantillon couramment utilisé comme modèle de diffusion est le gel d'agarose contenant des billes de polystyrène [72]. Le gel d'agarose est un gel aqueux ce qui permet de facilement y incorporer les billes de polystyrène qui sont également en solution aqueuse. Pour obtenir un échantillon suffisamment solide on prépare des gels d'agarose à 1 % de concentration.

On prépare alors trois gels de 15 ml à 1 % d'agarose aux concentrations de billes de polystyrène $C_0/10$, $C_0/20$ et $C_0/40$.

Pour obtenir des gels de 15 ml on pèse 0,15 g d'agarose que l'on mélange dans 15 ml de solution de billes de polystyrène à la concentration voulue, puis on chauffe la solution pour dissoudre l'agarose à l'aide d'un four à micro-ondes et on laisse refroidir pour que la solution se gélifie.

Les valeurs mesurées sont présentées dans le tableau III.2.

	dilué 10×	dilué 20×	dilué 40×	gel d'agarose seul
libre parcours moyen mesuré [μm]	$38,1 \pm 2,4$	$90,9 \pm 0,79$	$94,8 \pm 0,91$	$110 \pm 4,5$

Tableau III.2 – Mesures des libres parcours moyens de diffusion de gels d'agarose concentré à 1 % avec des billes de polystyrène à différentes concentrations et un témoin : un gel d'agarose sans billes de polystyrène.

On observe une augmentation proche d'un facteur 2 dans le libre parcours moyen des gels avec les solutions de billes diluées 10 et 20 fois, cependant les valeurs ne correspondent pas avec les valeurs théoriques. De plus ce facteur 2 n'est pas observé entre le gel avec la solution diluée 20 fois et celui avec la solution diluée 40 fois. Pour interpréter correctement cette expérience il faut regarder le résultat de l'expérience contrôle faite avec le gel d'agarose à 1 %, sans billes de polystyrène. Le gel d'agarose est en fait lui-même assez fortement diffusant puisque son libre parcours moyen de diffusion est de 110 μm , ce qui est du même ordre de grandeur que ceux des solutions que l'on regarde. Il faut donc corriger les valeurs qu'on observe en considérant la somme de deux types de diffuseurs. On note ℓ_s^* le libre parcours moyen associé uniquement aux billes de polystyrène, ℓ_s^{agar} celui associé au gel d'agarose à 1 % et ℓ_s^{tot} le libre parcours moyen total mesuré :

$$\frac{1}{\ell_s^{\text{tot}}} = \frac{1}{\ell_s^*} + \frac{1}{\ell_s^{\text{agar}}}$$

$$\ell_s^* = \frac{1}{\frac{1}{\ell_s^{\text{tot}}} - \frac{1}{\ell_s^{\text{agar}}}}$$

Les résultats sont tracés sur la figure III.23 où l'on représente la courbe théorique, les données mesurées et les valeurs après correction en prenant en compte la diffusion par le gel d'agarose lui-même. La prise en compte de la diffusion du gel d'agarose rapproche les valeurs mesurées de celles théoriques, en revanche la mesure du gel avec la plus grande concentration de billes présente un écart important dont l'origine n'a pas encore été clairement établie.

Une des sources d'incertitudes dans cette expérience se trouve dans l'étape de dissolution de l'agarose dans la solution. On chauffe alors la solution à une température proche de la température d'ébullition, ce qui peut entraîner une perte de volume et donc un changement dans les concentrations à la fois du gel d'agarose et de la solution de billes de polystyrène. De

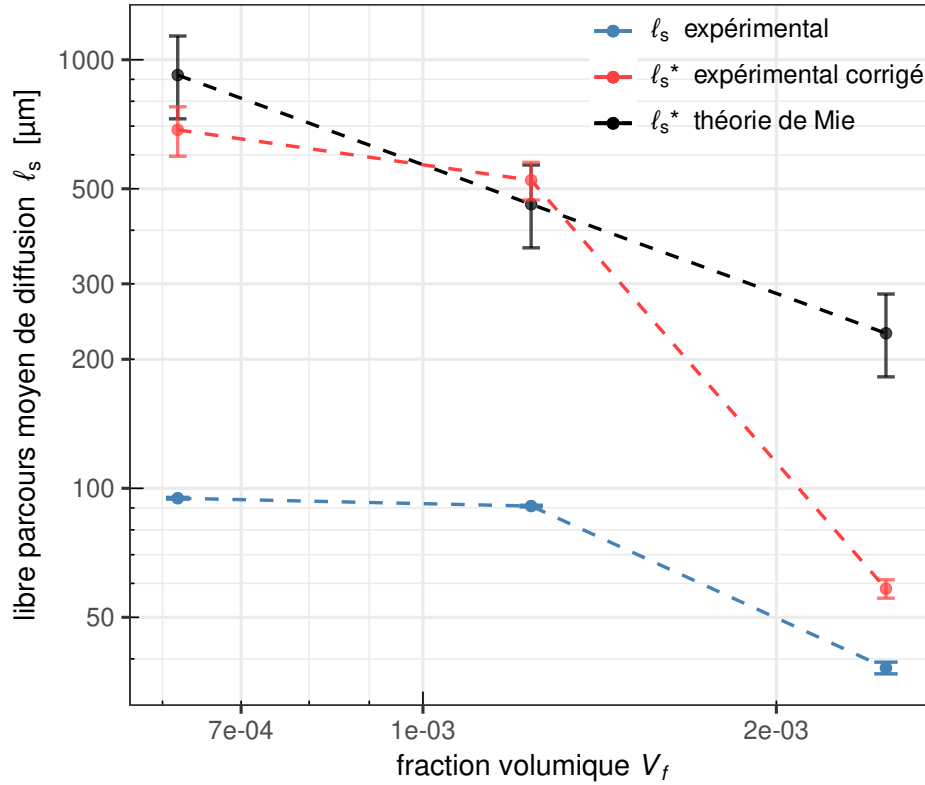


Figure III.23 – Libres parcours moyens de diffusion de gels d'agarose contenant une solution monodisperse de billes de polystyrène de diamètre $0,51 \mu\text{m}$ à différentes concentrations. La courbe noire représente les valeurs calculées par la théorie de Mie (avec en barre d'erreur les valeurs à 650 nm et 800 nm), la courbe bleue celles mesurées par analyse du signal de l'OCT plein champ et la courbe rouge les valeurs mesurées corrigées en tenant compte de la diffusion du gel d'agarose à 1% . Les deux axes sont en échelle logarithmique pour comparer les deux courbes à des droites.

plus si l'agarose n'est pas complètement dissout il reste des agrégats que l'on peut observer à l'OCT plein champ. Tous nos gels présentaient ces agrégats observables, donc de l'ordre du micron. Une possibilité d'amélioration serait de modifier le protocole expérimental pour mieux dissoudre l'agarose, par exemple en laissant l'agarose dans l'eau à température élevée plus longtemps, tout en vérifiant qu'il n'y a pas trop d'évaporation. Cela pourrait permettre de diminuer la contribution à la diffusion du gel d'agarose et donc permettre des mesures plus reproductibles.

III.3 Analyse à plusieurs longueurs d'onde

III.3.1 Propriétés spectrales des cornées

Notre OCT plein champ nous permet de modifier la source de lumière que l'on utilise. Cette modification a été prévue pour pouvoir analyser les propriétés de diffusion, et par exemple distinguer les cornées pour lesquelles les fibrilles de collagène sont les principaux diffuseurs et donc la diffusion Rayleigh domine, et celles dont la diffusion est principalement liée à la présence de

lacs. Nous avons donc analysé plusieurs cornées en changeant à chaque fois la source de lumière.

Sur la figure III.24 on montre la courbe du libre parcours moyen de diffusion en fonction de la longueur d'onde pour une cornée saine. Nous avons observé le même profil sur toutes les cornées saines que nous avons analysées par OCT plein champ.

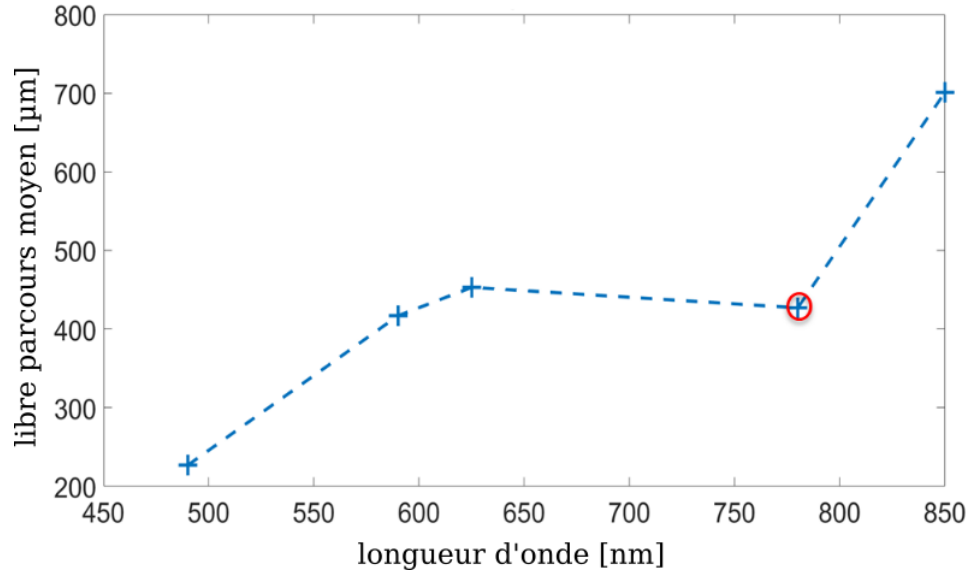


Figure III.24 – Libre parcours moyen de diffusion en fonction de la longueur d'onde pour une cornée saine typique. La valeur entourée en rouge correspond au libre parcours moyen mesuré pour la diode à 780 nm dont la cohérence spatiale est plus grande que les autres diodes.

Pour les longueurs d'onde les plus basses on observe un comportement qui correspond à la diffusion Rayleigh. En effet entre les longueurs d'ondes 490 nm et 590 nm, le libre parcours moyen de diffusion varie d'environ 225 μm à 400 μm. Cela correspond à un rapport de $400/225 \approx 1,78$ qui est proche du cube du rapport des longueurs d'ondes $(590/490)^3 \approx 1,75$.

Pour les longueurs d'onde plus élevées on observe une baisse du libre parcours moyen de diffusion à 780 nm. Il n'y a dans la littérature aucune mesure faisant apparaître un tel comportement dans les longueurs d'onde proches de 780 nm. Ce n'est donc pas une propriété du tissu mais en lien avec notre dispositif expérimental. Comme notre mesure est une mesure d'atténuation en profondeur, une telle baisse du libre parcours moyen ne peut s'expliquer par la présence d'un élément absorbant à cette longueur d'onde car cela ne ferait que diminuer l'amplitude du signal mais ne changerait pas son atténuation. Nous avons vérifié les propriétés d'émission des diodes qui sont conformes à celles annoncées par le constructeur et leur émission est stable dans le temps.

On ne peut expliquer ce phénomène que par le changement de cohérence spatiale pour cette diode particulière qui est le seul point présentant une anomalie (cf tableau III.1 pour les propriétés de cohérence des diodes).

Si l'on omet cette valeur en considérant qu'il faut appliquer une correction au libre parcours moyen mesuré, on constate que dans cette partie du spectre la courbe évolue moins rapidement avec la longueur d'onde. On peut s'attendre à ce changement de comportement qui correspond à une prédominance de la diffusion par les diffuseurs de type Mie : kératocytes ou lacs. On

a vu dans le chapitre II que l'évolution du libre parcours moyen de diffusion des kératocytes avec la longueur d'onde était plus faible que pour les fibrilles de collagène. On observe donc une transition entre le régime de la diffusion Rayleigh et celui de la diffusion de Mie.

III.3.2 Solutions de billes de polystyrène

Pour confirmer que la valeur aberrante mesurée à 780 nm n'est pas une propriété du tissu, nous reprenons comme solution test les solutions de billes de polystyrène de 0,51 μm de diamètre. Nous préparons une solution dont le libre parcours moyen de diffusion sera proche de ceux mesurés pour les cornées sur la plage de longueur d'onde de nos diodes.

Après une dilution par 5 de la solution de billes de 0,51 μm de diamètre, on obtient une fraction volumique $V_f \approx 5 \times 10^{-3}$. Cette concentration correspond à une plage de valeur du libre parcours moyen dans l'intervalle de longueur d'onde de 490 à 850 nm : $\ell_s \approx 50 - 170 \mu\text{m}$. Pour ces mesures nous n'avons pas réalisé de gel d'agarose, les billes sont donc seulement en solution dans une cuve. Les valeurs des libres parcours moyens de diffusion ne sont donc pas absolus à cause de la perte de cohérence par le mouvement brownien, mais on peut analyser l'évolution de la courbe, puisque la solution est toujours la même, seule la source de lumière change.

Les mesures sont présentées sur la figure III.25.

Cette série de mesures montre une évolution qui est semblable à celle observée pour les cornées. En comparant ces mesures avec le tableau III.1 des propriétés de cohérence spatiale des diodes, le point le plus éloigné de la forme théorique est celui mesuré avec la diode à 780 nm.

Pour pouvoir conclure sur l'effet de la cohérence spatiale de la source il faudra réaliser des mesures en changeant la cohérence de la source, par exemple en utilisant un montage comme celui schématisé sur la figure III.26 dans lequel on conjugue la diode avec un diaphragme dont on peut contrôler l'ouverture. Ce diaphragme servira alors à régler la cohérence spatiale de la source ; plus il sera fermé plus l'onde sera cohérente.

De cette façon, si l'on observe un changement dans la valeur du libre parcours moyen mesuré avec une diode faiblement cohérente spatialement, on pourra connaître l'effet précis de la cohérence et même le quantifier pour des valeurs d'ouverture différentes.

III.4 Évaluation de la transparence *in vivo* par SD-OCT et lampe à fente

Bathilde Rivière a beaucoup contribué à l'analyse des données cliniques dont les résultats sont résumés dans cette partie.

Après avoir démontré la faisabilité de la technique en l'appliquant aux données *ex vivo* nous voulons essayer de l'appliquer aux données cliniques. Il existe plusieurs techniques d'imagerie de la cornée utilisées régulièrement en clinique et présentant une résolution en profondeur. On peut citer notamment l'OCT dans le domaine spectral, le biomicroscope à lampe à fente, et le microscope confocal. Ces techniques présentent des caractéristiques différentes, résumées dans la figure III.27.

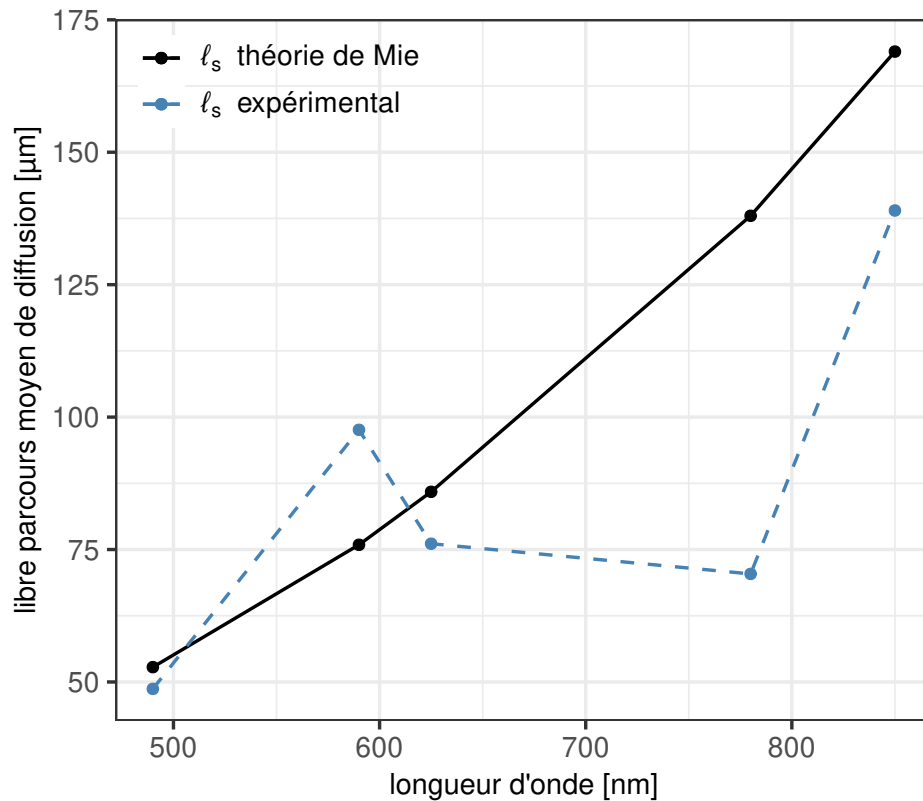


Figure III.25 – Libre parcours moyen de diffusion en fonction de la longueur d'onde pour une solution de billes de polystyrène de $0,51\ \mu\text{m}$ de diamètre concentrée à 0,5 %. La courbe noire représente les valeurs calculées par la théorie de Mie et la courbe bleue représente les valeurs extraites des données d'OCT plein champ.

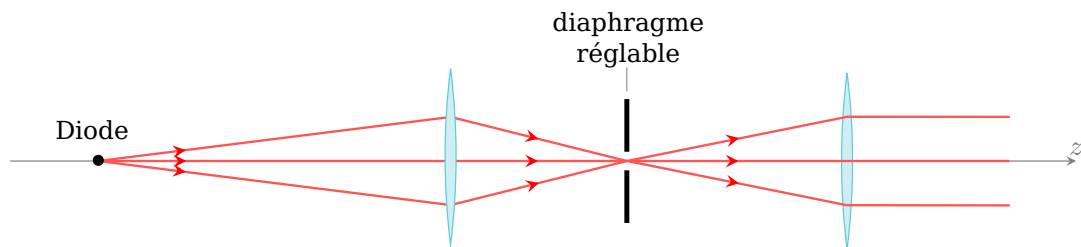
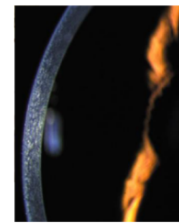
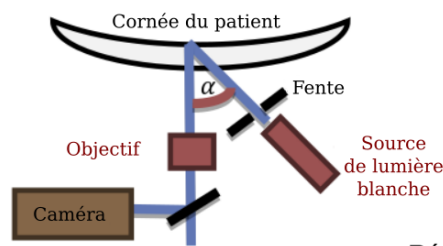


Figure III.26 – Schéma d'un montage permettant de régler la cohérence spatiale de la source en changeant l'ouverture du diaphragme.

Le biomicroscope à lampe à fente est un appareil assez simple. Il consiste à envoyer une fente de lumière blanche sur la cornée et de regarder la lumière rétro-diffusée avec un objectif de microscope et une caméra couleur. On peut changer le grossissement en changeant d'objectif, les grossissements allant de $10\times$ à $40\times$ sur le modèle que nous utilisons à l'hôpital des Quinze-Vingts. On peut régler à la fois l'angle sous lequel la fente de lumière arrive sur la cornée, et l'angle sous lequel on regarde la cornée avec l'objectif.

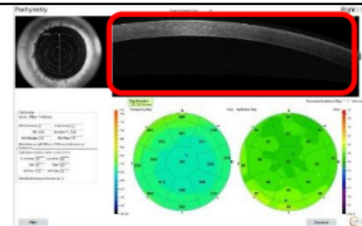
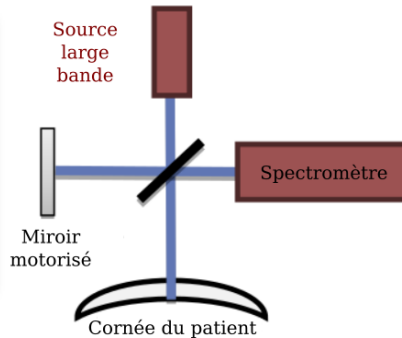
De ces trois techniques, l'OCT et la lampe à fente sont les plus couramment utilisées, car la

Biomicroscope à lampe à fente



Résolution axiale ~ 30µm

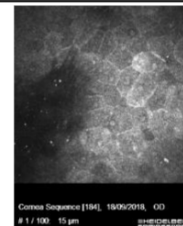
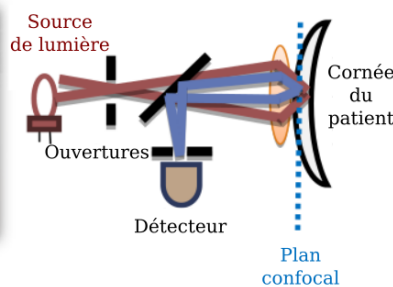
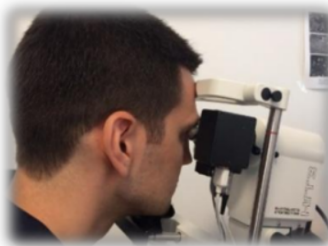
OCT dans le domaine spectral (SD-OCT)



Moyenne de plusieurs B-scans
(images transverses)

Résolution axiale ~ 10µm

Microscope confocal (HRT3)



images en face

Résolution axiale ~ 7,6 µm

Figure III.27 – Principales méthodes d'imagerie clinique de la cornée résolues en profondeur.

microscopie confocale nécessite un contact entre l'objectif et la cornée par l'application d'un gel ophtalmique ce qui est désagréable et n'en fait donc pas une méthode de routine. C'est une méthode d'imagerie réservées à des cas nécessitant des images à haute résolution. De plus le microscope confocal commercial HRT3 compense automatiquement la perte d'intensité moyenne des images en profondeur pour augmenter la visibilité des structures. Nous n'avons pas eu la possibilité d'extraire les données brutes ; il nous faudra contacter le fabricant pour pouvoir extraire le profil de la moyenne cohérente à partir des données brutes.

Nous nous concentrerons ici sur les méthodes d'OCT clinique et de lampe à fente. Ces deux méthodes présentent des différences importantes : l'OCT a une meilleure résolution axiale et latérale, et utilise une source laser, donc cohérente spatialement et temporellement. À l'inverse la lampe à fente est moins bien résolue axialement, mais présente l'avantage d'utiliser une source de lumière blanche et une caméra couleur. En séparant l'information des trois canaux

de la caméra, il sera possible de faire une analyse spectrale et potentiellement d'en tirer des informations sur la nature des diffuseurs.

III.4.1 Analyse des images cliniques d'OCT

Pour l'OCT clinique nous utilisons des images 2D, moyennes de plusieurs B-scan, car elles présentent une meilleure résolution que les autres modalités d'acquisition comme la pachymétrie, qui n'est en fait qu'un seul B-scan, ou des acquisitions de volume (C-scan) qui nécessitent d'acquérir plusieurs B-scans rapidement à cause des mouvements de l'œil et donc chaque B-scan est de moins bonne qualité.

À partir d'une image 2D nous voulons calculer la moyenne cohérente de l'intensité à chaque profondeur. Le champ de vue des images de l'OCT clinique est de 6 ou 8 mm (selon le modèle d'OCT), ce qui implique que la courbure de la cornée est fortement visible sur ces images. De plus l'OCT clinique est sans contact, il y a donc une forte réflexion spéculaire, créée par la différence d'indice entre l'air et la cornée, que l'on ne reçoit qu'au niveau de l'apex, où la surface de la cornée est perpendiculaire au faisceau. Ces réflexions peuvent être évitées en se décalant légèrement avant l'acquisition de façon à ne pas imager l'apex de la cornée, ainsi les réflexions ne sont pas captées par l'OCT.

La première étape de préparation des données est donc d'enlever les éventuelles réflexions spéculaires, en les sélectionnant manuellement sur la figure. Puis nous aplatissons numériquement la cornée suivant la ligne de l'épithélium. Pour cela nous utilisons une version légèrement modifiée de l'algorithme utilisé pour les images d'OCT plein champ. Cette étape est illustrée sur la figure III.28.

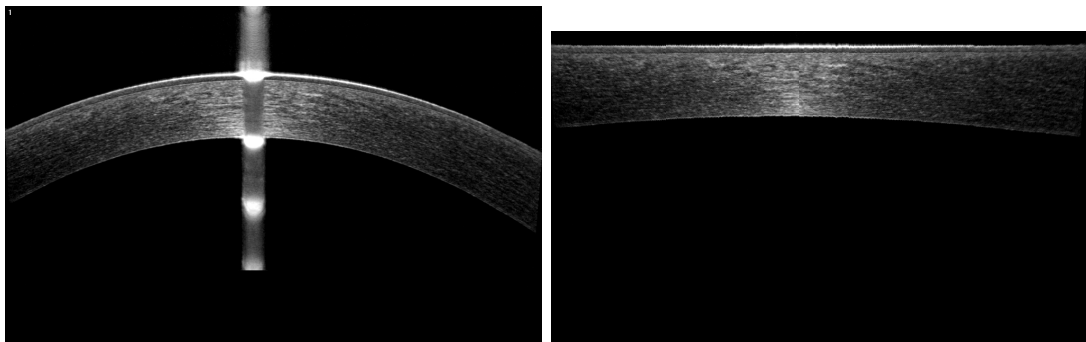


Figure III.28 – À gauche : image clinique d'une cornée présentant une réflexion spéculaire. À droite : image après avoir enlevé la réflexion et aplati la cornée.

Encart III.3 - Algorithme de détection de l'épithélium

- On cherche d'abord à détecter l'épithélium par seuillage de l'image (on doit fixer le seuil manuellement).
- On applique un filtre médian (taille de la fenêtre : 5 pixels) pour enlever les pics présents dans la détection par seuillage. Puis on applique également un filtre de Savitzky-Golay (moyenne glissante pondérée par un polynôme) d'ordre 2 et de largeur 101 pixels, pour mieux ajuster les valeurs aux bords de l'image.
- On utilise cette première estimation de la position de l'épithélium pour aplatir numériquement l'image, ce qui ne laisse (éventuellement) qu'une courbure résiduelle.
- Un deuxième décalage est parfois nécessaire car la première estimation peut se baser sur une deuxième ligne réfléchissante sous l'épithélium. On cherche alors la position de l'épithélium en cherchant les maxima de chaque colonne de l'image sur une profondeur restreinte (10 pixels).
- Comme aux étapes précédentes on applique un filtre médian puis un filtre de Savitzky-Golay (mêmes paramètres que précédemment) pour lisser le profil estimé de l'épithélium.

Après l'aplatissement numérique on normalise chaque colonne de l'image par l'intensité au niveau de l'épithélium, pour compenser la perte d'intensité sur les bords à cause de la courbure de la cornée. L'effet de cette normalisation sera discuté dans la section suivante. On peut alors calculer l'intensité moyenne de chaque ligne de l'image et segmenter le stroma à partir du profil d'intensité moyenne. Cette étape est illustrée sur la figure III.29.

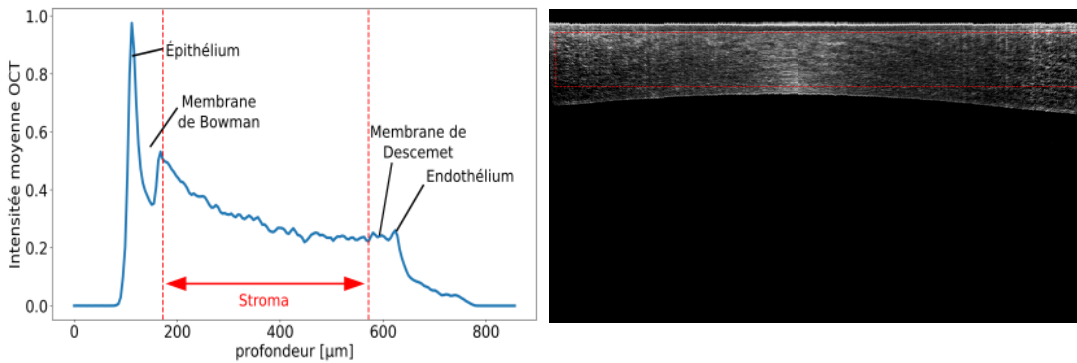


Figure III.29 – À gauche : profil en profondeur de l'intensité moyenne et délimitation du stroma (pointillé rouge). À droite : image normalisée avec sélection de la zone d'intérêt correspondant à la délimitation du stroma faite à partir de la courbe d'intensité moyenne.

III.4.2 Analyse de précision et répétabilité

Modélisation mathématique du signal du stroma

On vérifie que notre algorithme est capable de retrouver les paramètres d'une courbe générée par ordinateur dans différents cas. On génère une courbe avec les paramètres suivant :

- $\ell_s = 340 \mu\text{m}$
- $I_0 = 0,35$
- $C = 0,35$

Puis on génère une courbe avec ces paramètres et on ajoute un bruit gaussien. On génère également des courbes sur lesquelles on ajoute une gaussienne, représentant une hétérogénéité, à différentes positions du stroma. Il existe en effet des pathologies qui vont affecter la stroma antérieur, postérieur, l'épithélium ou l'endothélium.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau III.3.

Profil modélisé	SNR dB	B_r	$\ell_s \mu\text{m}$
Pure exponentielle - bruit très faible	38,8	1	340
Pure exponentielle - bruit modéré	19,2	1,16	337
Pure exponentielle - bruit important	11,1	1,34	304
Exponentielle et gaussienne vers l'endothélium	19,5	49,5	167
Exponentielle et gaussienne vers l'épithélium	19,7	7,72	207
Exponentielle et gaussienne au centre du stroma	19,4	10,6	528

Tableau III.3 – Résultats de l'algorithme sur différents signaux générés par ordinateurs.

Effet de la normalisation du signal SD-OCT

Les images d'OCT clinique de la cornée ont un champ de vue latéral qui peut varier de 2 à 8 mm, ce qui implique une perte du signal OCT lorsque l'on s'éloigne de l'apex, à cause de la courbure de la cornée. En moyenne le rayon de courbure de la face antérieure de la cornée est de 7,8 mm, variant entre 7,2 et 8,4 mm³. Cette atténuation latérale du signal OCT pondère notre analyse de décroissance en profondeur, privilégiant les régions proches de l'apex au détriment de la périphérie. Pour éviter ce phénomène on peut normaliser l'intensité de chaque colonne de l'image (ou A-scan) par l'intensité au niveau de l'épithélium de cette colonne. Cependant les images OCT sont parfois saturées (quand la réflexion spéculaire est trop forte), ce qui introduit un défaut de normalisation et peut assombrir artificiellement les zones proches de l'apex, ou encore créer des changements d'intensité d'une colonne à l'autre ressemblants à des stries verticales (voir figure III.30). Ces défauts entraînent un changement de pondération incontrôlé, dont nous avons analysé les effets sur notre analyse pour plusieurs exemples. L'effet sur le signal de l'intensité moyenne cohérente est faible, comme la montre la figure III.31.

3. <https://www.gatinel.com/recherche-formation/topographie-corneenne/topographie-corneenne-cartes-de-courbure/>

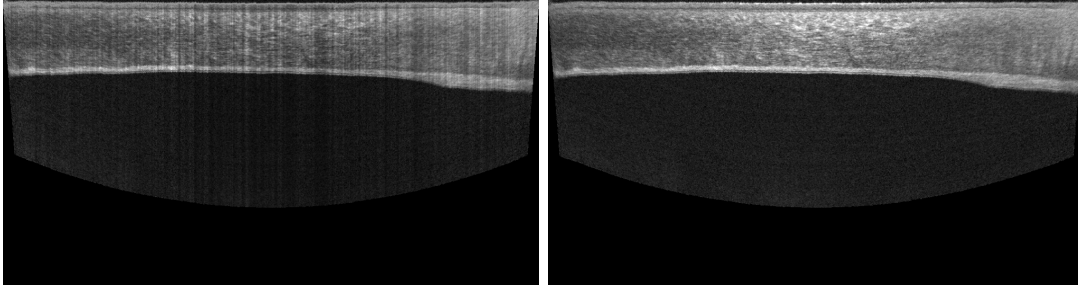


Figure III.30 – À gauche : image normalisée par l'intensité de l'épithélium, présentant des stries. À droite : image non normalisée.

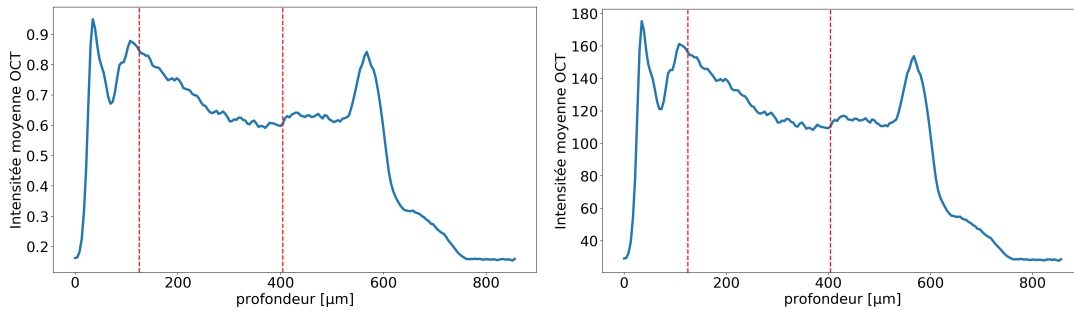


Figure III.31 – À gauche : profil d'intensité moyenne de l'image normalisée. À droite : profil d'intensité de l'image non normalisée.

Corrélation des mesures par SD-OCT

Pour vérifier que notre algorithme donne des résultats reproductibles, nous avons analysé 7 cornées de patients sains, en prenant pour chaque cornées deux images OCT orthogonales, comme indiqué sur la figure III.32.

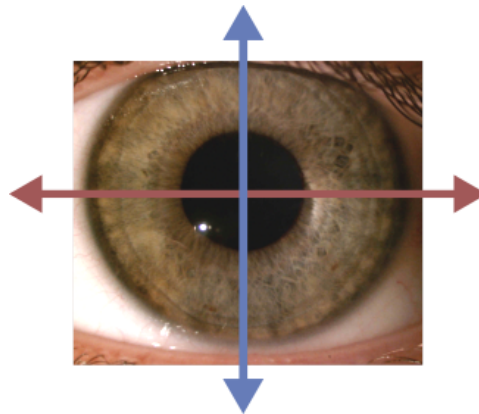


Figure III.32 – Schéma de l'orientation des images OCT acquises sur chacune des 7 cornées analysées.

Les résultats d'analyse des images de chaque cornée sont représentés sur la figure III.33. On observe une très grande reproductibilité dans la mesure du libre parcours moyen.

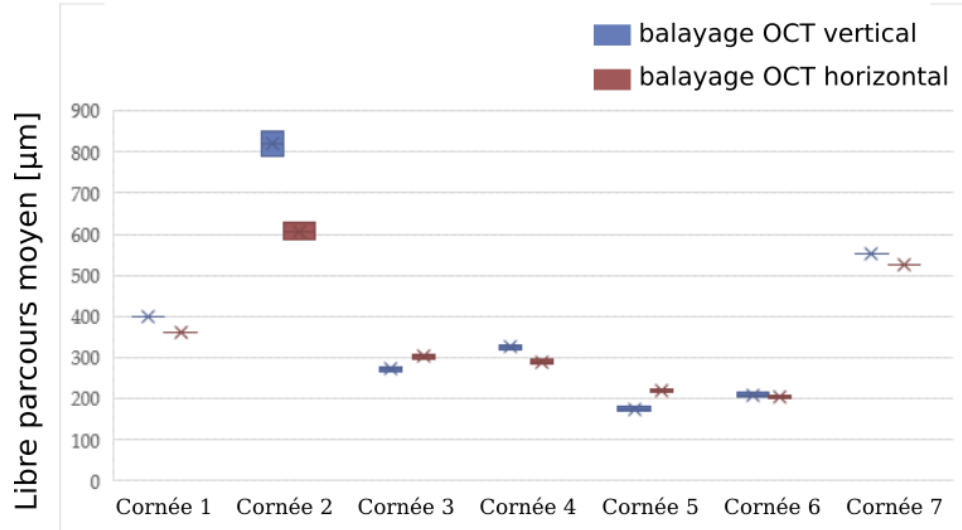


Figure III.33 – Mesures du libre parcours moyen des cornées analysées. Les valeurs des images en coupe verticale sont indiquées en bleu et celles des images en coupe horizontale sont indiquées en rouge.

III.4.3 Cas cliniques typiques

Nous avons analysé des images de patients obtenues depuis la base de données de l'hôpital des Quinze-Vingts, en appliquant cette méthodologie puis l'algorithme d'analyse bayésienne pour extraire le libre parcours moyen de diffusion à partir de l'intensité moyenne cohérente. Il faut attirer l'attention sur le fait que l'OCT clinique et la lampe à fente mesurent des intensités, contrairement à l'OCT plein champ qui mesure des amplitudes de signal. Le signal de la moyenne cohérente est donc :

$$I(z) = I_0 \exp\left(-\frac{2z}{\ell_s}\right) + C \quad (\text{III.25})$$

où l'on a ajouté un facteur 2 dans l'exponentielle.

En analysant plusieurs dizaines d'images de patients sains et pathologiques, nous avons pu systématiquement classer les cornées suivant 4 cas typiques :

1. signal trop bruité ;
2. stroma hétérogène ;
3. stroma homogène et fortement diffusant ;
4. stroma homogène transparent.

Ces 4 cas typiques et les paramètres permettant de les distinguer sont présentés dans la figure III.34. Le premier cas est identifié par le calcul du rapport signal sur bruit, dans ce cas $\text{SNR} = 16,4 \text{ dB}$. Il y peut y avoir des différences de qualité d'image car l'appareil d'OCT moyenne un nombre de B-scans variable pour créer une image ; s'il n'y a pas assez d'images moyennées les fluctuations du signal sont trop fortes et on ne peut pas obtenir de résultat fiable.

Le deuxième cas est identifié par le rapport de Birge ($B_r = 99,3$). La cornée présente une cicatrice qui modifie beaucoup le profil de la moyenne cohérente ; on voit que la courbe s'écarte beaucoup d'une exponentielle.

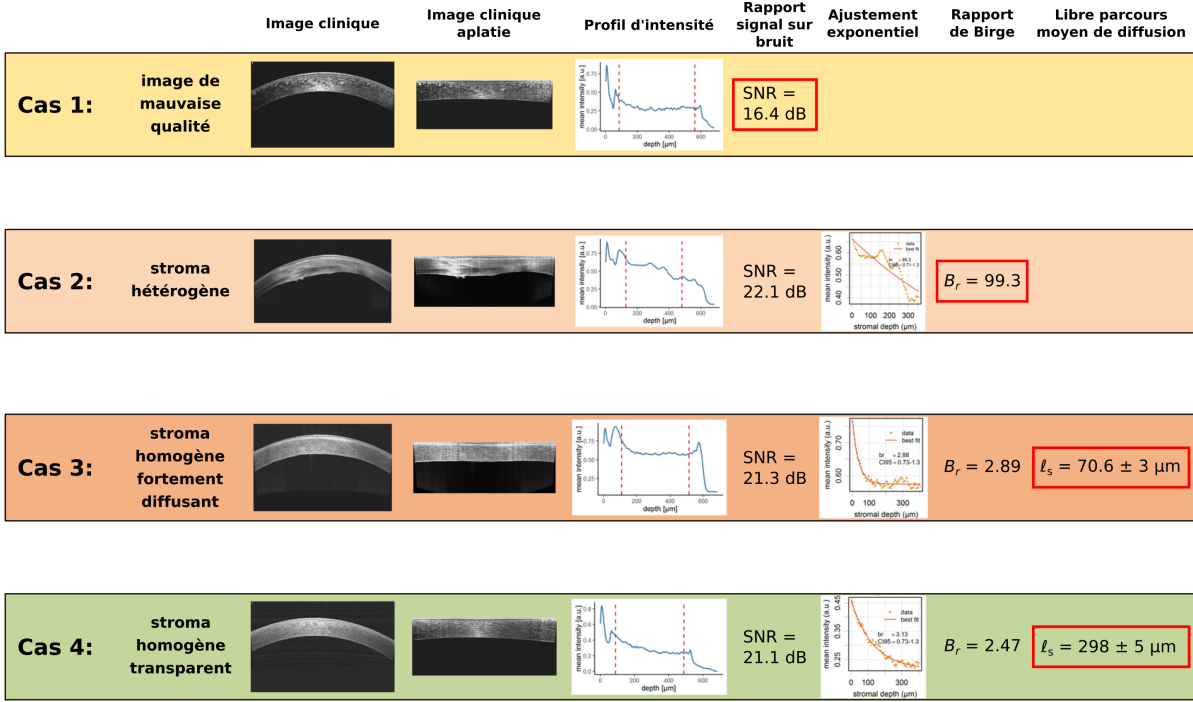


Figure III.34 – Quatre cas typiques observés pour les images d'OCT clinique, avec les résultats de l'analyse et les paramètres permettant de les distinguer (encadrés en rouge).

Les troisième et quatrième cas sont des cornées homogènes (B_r proche de 1), mais que l'on peut distinguer par la valeur du libre parcours moyen de diffusion. La cornée fortement diffusante a un libre parcours moyen de diffusion mesuré à $\ell_s = 70,6 \mu\text{m}$, alors que pour la cornée transparente $\ell_s = 298 \mu\text{m}$.

III.4.4 Étude comparative avec la méthode de référence

Nous avons analysé 66 cornées de patients, dont 30 étaient sains et 36 pathologiques. Pour chaque patient nous avons une image d'OCT clinique et une image par lampe à fente. Nous avons analysé les images d'OCT avec notre méthode objective et les images de lampe à fente ont été évaluées par des ophtalmologues et des orthoptistes de l'hôpital des Quinze-Vingts en utilisant la méthode de référence, basée sur une analyse subjective de l'image de lampe à fente avec une échelle de 0 à 4 [26]. Cette méthode est définie comme la méthode de référence et elle correspond à une tentative de standardisation de l'analyse de transparence des cornées.

Les notes attribuées par les spécialistes sont moyennées et l'écart-type des notes sert d'incertitude sur la note.

Nous avons d'abord classé les cornées analysées selon les quatre cas définis précédemment. Les cornées du premier cas, présentant un niveau de bruit trop élevé ont été retirée de l'analyse, ou une autre image d'OCT a été utilisée. Nous avons alors réparti les cornées selon les trois cas restants, en utilisant les critères suivant :

- le seuil d'hétérogénéité a été fixé à $B_r = 10$;
- le seuil de transparence a été défini par la moyenne du libre parcours moyen des cornées

saines $\langle \ell_s \rangle_{\text{sain}} = 441 \mu\text{m}$.

La comparaison de la classification avec l'évaluation par la méthode de référence est présentée dans la figure III.35

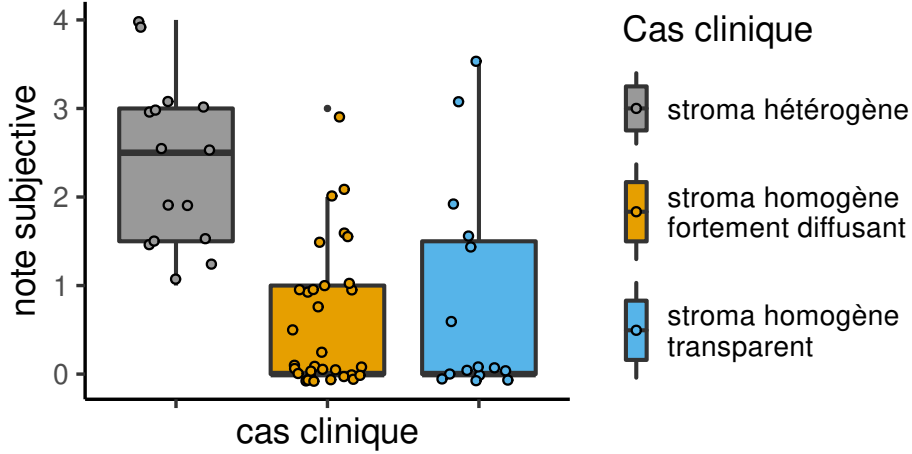


Figure III.35 – Distribution des notes de transparence par évaluation subjective par lampe à fente en fonction des différents cas cliniques déterminé par notre analyse des images d'OCT clinique.

On constate que l'évaluation subjective par lampe à fente est capable de distinguer les cornées hétérogènes des cornées homogènes, mais elle ne distingue pas les cornées classées comme fortement diffusantes de celles classées transparentes par notre algorithme.

Nous avons ensuite comparé directement les résultats des deux méthodes d'évaluation de transparence. Pour une plus grande pertinence clinique, nous avons converti nos valeurs de libre parcours moyen en fraction cohérente de lumière transmise, que l'on peut définir comme :

$$T = \frac{I_{\text{sortie}}}{I_{\text{entrée}}} = \exp\left(-2\frac{e}{\ell_s}\right) \quad (\text{III.26})$$

où e est l'épaisseur de la cornée. Cette grandeur représente l'atténuation de la moyenne cohérente, elle prend en compte le libre parcours moyen de diffusion et l'épaisseur de la cornée. Elle est directement reliée à la vision puisque l'atténuation de la moyenne cohérente correspond à une diminution de la partie centrale de la PSF sur la rétine, donc de l'acuité visuelle. La figure III.36 montre la distribution des notes de transparence attribuées par l'analyse subjective des images de lampe à fente, rangées par intervalles de valeurs de la fraction cohérente de lumière transmise T mesurées par notre algorithme. Sur cette figure on observe que les faibles valeurs de fraction cohérente de lumière transmise sont associées à une plus grande dispersion des notes de transparence. En revanche on n'observe pas de corrélation forte entre ces deux mesures.

Une autre façon de représenter ces données est de tracer les valeurs de fraction cohérente de lumière transmise en fonction des notes de transparence. Les données sont d'abord classées par note subjective de transparence, puis pour chaque groupe on calcule la valeur moyenne et l'écart-type des fractions cohérente de lumière transmise. Ce qu'on observe sur la figure III.37

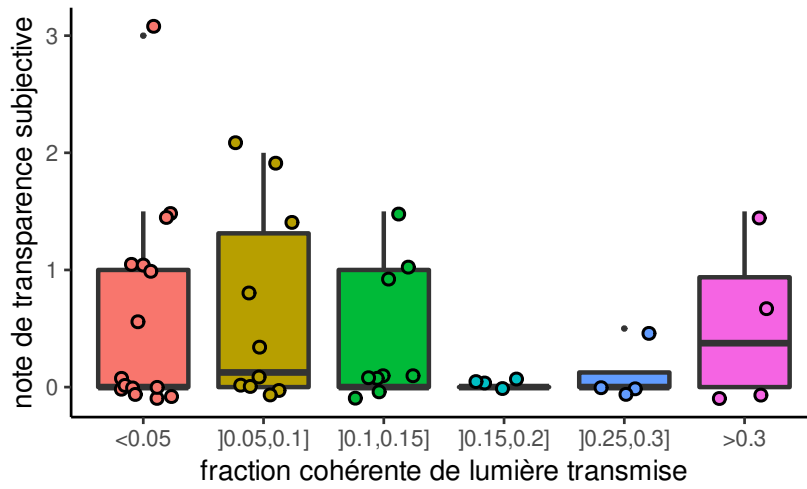


Figure III.36 – Distribution des notes de transparence par intervalle de valeur de fraction cohérente de lumière transmise mesurée par notre analyse.

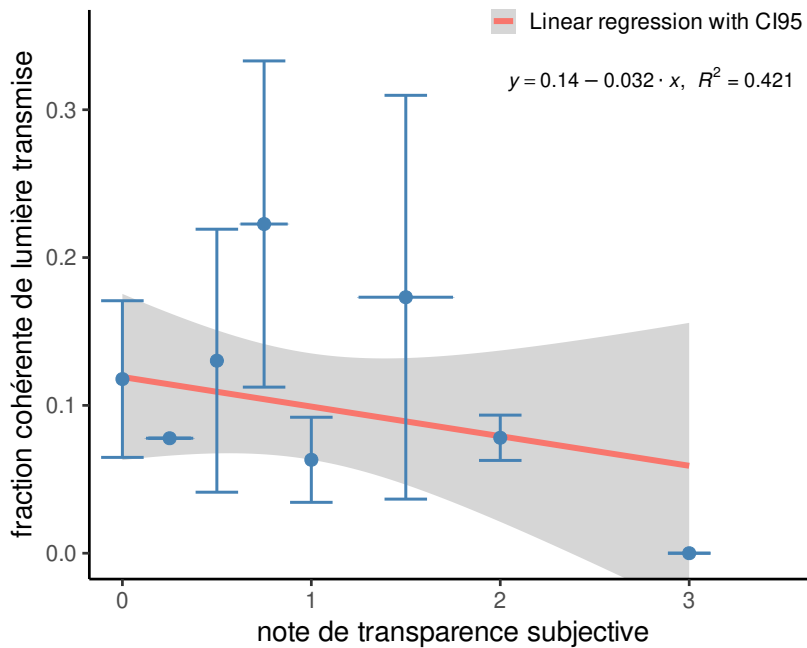


Figure III.37 – Distribution des fractions cohérentes de lumière transmise réparties en fonction des notes de transparence. Chaque point correspond à la moyenne des fractions transmises pour les cornées ayant une certaine note de transparence. Les barres d'incertitudes correspondent à l'écart-type des valeurs de fraction transmises. L'ajustement linéaire a été effectué en pondérant chaque point par son incertitude.

montre une faible corrélation linéaire entre ces deux méthodes.

Notre hypothèse est que la méthode subjective, bien qu'étant la méthode standard, est trop imprécise pour pouvoir distinguer les différents cas que l'on a identifiés avec notre algorithme. Ce qu'on observe peut s'expliquer par la grande variabilité inter-opérateur de cette méthode de notation. Pour confirmer cette hypothèse il faudra augmenter le nombre de médecin et orthoptistes analysant ces données pour voir si l'on augmente ainsi les barres d'erreur pour les notes attribuées par lampe à fente. Cela expliquerait que l'on ne observe pas de corrélation avec notre méthode objective basée sur l'analyse physique du signal OCT.

III.4.5 Analyse des images de lampe à fente

Bien que couramment utilisé en clinique, il n'existe pas de protocole bien établi pour l'acquisition d'images par lampe à fente. Il existe donc dans la base de données de l'hôpital une grande variété d'images, avec des grossissements et des angles entre la fente et l'objectif différents, et ces paramètres ne sont pas enregistrés par l'appareil. Nous avons choisi des images acquises dans les mêmes conditions, avec un angle de 45° entre la fente de lumière et l'axe de l'objectif. Nous avons utilisé l'objectif de plus fort grossissement : $40\times$.

Nous avons analysé plusieurs images de lampe à fente pour vérifier que nous pouvons en exploiter les images et notamment avec les trois canaux de la caméra séparant le spectre de la lumière visible.

La figure III.38 nous montre une image de lampe à fente à partir de laquelle on sélectionne la partie de la cornée qui se trouve devant la pupille. Puis on applique le même traitement que pour les images OCT, pour chacun des canaux de la caméra. Les trois profils sont représentés sur la figure.

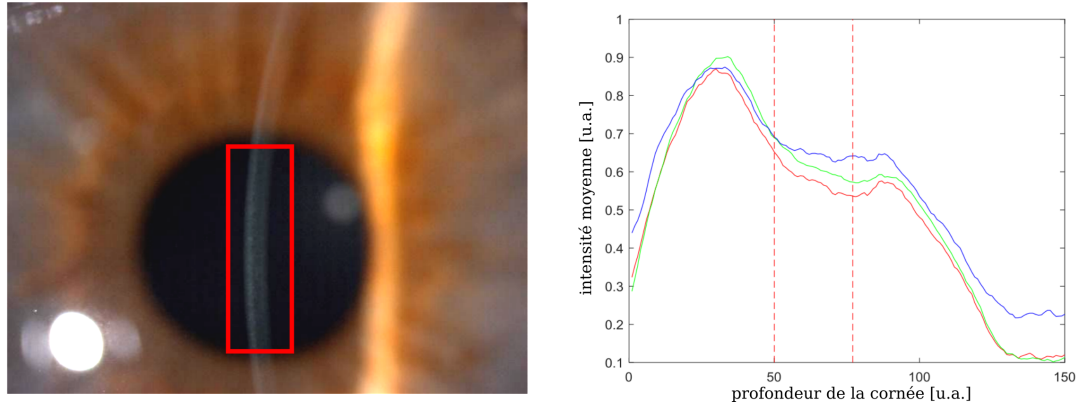


Figure III.38 – À gauche : délimitation du signal d'intérêt à partir de l'image de lampe à fente (encadré en rouge). À droite : signal de l'intensité moyenne pour les trois canaux de la caméra, obtenu après analyse identique à celles des images OCT. Les couleurs indiquent les canaux de la caméra.

Les libres parcours moyens des profils des trois canaux sont : $\ell_s^{\text{rouge}} = 157 \pm 7 \mu\text{m}$, $\ell_s^{\text{vert}} = 106 \pm 7 \mu\text{m}$ et $\ell_s^{\text{bleu}} = 75,2 \pm 7 \mu\text{m}$. On retrouve l'ordre que l'on attendait : la lumière bleue est plus atténuée que la lumière verte, elle-même plus atténuée que la lumière rouge. Sur le graphique la courbe bleue est au dessus des autres, mais cela s'explique par une constante additive plus élevée.

Encart III.4 - Résumé des principaux résultats

- ✓ Nous avons développé un algorithme permettant d'analyser le signal de la moyenne cohérente par inférence bayésienne, pour en extraire les paramètres de l'atténuation de la lumière dans le stroma cornéen, notamment le libre parcours moyen de diffusion ℓ_s .
- ✓ Nous avons validé cette méthode par l'analyse des données d'OCT plein champ, dont les résultats ont été publiés [73]. Nous avons montré que l'on pouvait distinguer le stroma des cornées homogènes du stroma des cornées hétérogènes par le paramètre du rapport de Birge B_r ; et parmi les cornées homogènes on peut distinguer les cornées transparentes des cornées diffusantes par la mesure du libre parcours moyen ℓ_s .
- ✓ Nous avons intégré l'importance des conditions d'illumination, notamment la cohérence spatiale, sur la moyenne du signal OCT. Si la cohérence spatiale de la source est inférieure à la longueur de corrélation du milieu imagé, notamment pour des ouvertures numérique élevées, il y a une déviation par rapport à une atténuation mono-exponentielle.
- ✓ L'analyse par OCT plein champ d'échantillons tests a confirmé une corrélation entre le libre parcours moyen mesuré et la valeur réelle calculée par la théorie de Mie. Cependant il faudra réaliser d'autres expériences sur des échantillons mieux contrôlés pour vérifier que la mesure est bien quantitative, ou comprendre d'où provient la déviation.
- ✓ Nous avons enfin appliqué la méthode à l'analyse d'images cliniques d'OCT spectral et de lampe à fente. Les analyses d'images OCT ont montré une bonne reproductibilité et nous avons pu classer chaque image parmi quatre cas cliniques :
 1. signal du stroma trop bruité \Rightarrow SNR faible ;
 2. stroma hétérogène \Rightarrow rapport de Birge $B_r \gg 1$;
 3. stroma homogène mais fortement diffusant $\Rightarrow B_r \approx 1$ et ℓ_s faible ;
 4. stroma homogène transparent $\Rightarrow B_r \approx 1$ et ℓ_s grand.

Notre mesure est faiblement corrélée avec la méthode de référence (échelle subjective basée sur les images de lampe à fente), nous supposons que cela provient de l'imprécision de la méthode de référence subjective. La prochaine étape est de créer une base de données normative en appliquant notre analyse sur un grand nombre de cornées saines et pathologique et de déterminer les seuils pour les valeurs du rapport de Birge et du libre parcours moyen.

- ✓ L'analyse des images de lampe à fente par notre algorithme permet d'extraire trois libre parcours moyens, aux longueurs d'ondes centrales des canaux de la caméra (rouge, vert et bleu). Il faudra définir un protocole d'acquisition des images de lampe à fente et éventuellement supprimer les réflexions aux interfaces (épithélium et endothélium) pour permettre une meilleure analyse du signal du stroma.

Chapitre IV

Évaluation de la transparence par holographie numérique en transmission

*Si haut que l'on soit placé, on n'est jamais assis
que sur son cul.*

Michel de Montaigne

Sommaire

IV.1 Principe de l'holographie	88
IV.1.1 Holographie hors axe	89
IV.1.2 Holographie numérique	89
IV.1.3 Démodulation	91
IV.2 Dispositif de microscopie holographique numérique	93
IV.2.1 Sources laser	93
IV.2.2 Microscope	94
IV.2.3 Porte échantillon et platines de translation	94
IV.2.4 Caméra	94
IV.2.5 Interface graphique	95
IV.3 Caractérisation du système	96
IV.3.1 Grandissement	96
IV.3.2 Reconstruction d'un hologramme d'une mire de résolution	97
IV.3.3 Démodulation par déplacement de l'échantillon	97
IV.4 Mesure de sensibilité du système	100

Dans ce chapitre nous allons étudier la diffusion dans une géométrie en transmission. Dans cette géométrie nous pouvons observer directement l'effet de la diffusion sur la PSF sur la rétine et donc l'effet sur l'acuité visuelle. Nous avons choisi la méthode de microscopie par holographie numérique, car cette méthode permet d'observer le front d'onde en amplitude et en phase après diffusion dans la cornée. Nous présenterons d'abord le principe d'holographie numérique, et les

différentes méthodes de propagation de front d'onde permettant de reconstruire numériquement le front d'onde dans un plan d'intérêt. Nous décrirons ensuite le montage expérimental de microscopie holographique et les méthodes utilisées pour récupérer le signal d'intérêt en réduisant le bruit cohérent. Puis nous donnerons les caractéristiques du système, en quantifiant le bruit cohérent présent dans le montage, et nous illustrerons cette méthode en imageant des solutions test plus ou moins diffusantes.

IV.1 Principe de l'holographie

L'holographie est une technique d'imagerie cohérente qui permet de mesurer le front d'onde d'une lumière cohérente par interférométrie. Elle a été d'abord proposée par Dennis Gabor en 1948 [74], qui souhaitait développer une méthode d'imagerie sans lentille. La méthode de Gabor, appelée aujourd'hui holographie en ligne consiste à envoyer une onde sur un petit objet diffusant et à enregistrer (à l'époque de façon analogique avec une plaque holographique) l'interférence formée par l'onde incidente et l'onde diffusée par l'objet. En éclairant ensuite la plaque holographique avec la même onde utilisée pour l'enregistrement, on observe l'image de l'objet. L'holographie de Gabor est illustrée sur la figure IV.1.

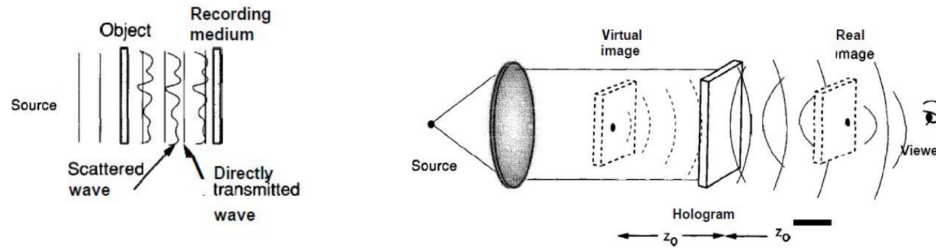


Figure IV.1 – Schéma de l'holographie en ligne de Gabor. À gauche : enregistrement des interférences entre l'onde incidente et l'onde diffusée par l'objet. À droite : image de la plaque holographique par l'onde incidente et formation de l'image objet. Issu de [75].

En 1962 Leith et Upatnieks [76] ont proposé une méthode qui repose sur le même principe que l'holographie de Gabor, mais dans une géométrie différente. Un des problèmes inhérents à la configuration en ligne de Gabor est que la majorité du signal que l'on enregistre provient de l'onde incidente, et l'objet est donc une petite perturbation de ce signal. De plus, les images réelle et virtuelle sont superposées dans cette géométrie. Le principe proposé par Leith et Upatnieks est de séparer l'onde de référence et l'onde diffusée par l'objet en introduisant un angle entre ces deux ondes. De cette façon l'information de l'objet est toujours codée dans le motif des interférences enregistrées, et l'angle introduit permet de séparer le signal provenant de l'objet de celui de l'onde de référence en passant dans l'espace de Fourier. En effet l'onde objet arrivant avec un angle produit des franges à une certaine fréquence spatiale dépendant de l'angle d'incidence. Dans l'espace de Fourier le signal provenant de l'objet est donc décalé vers des fréquences spatiales plus élevées alors que le signal de l'onde de référence est centré sur la fréquence nulle. Les images réelle et virtuelle sont à des fréquences différentes et l'onde de référence se trouve dans le terme d'autocorrélation de l'image. Cette technique a été rendue possible par le développement des lasers qui présentent une longueur de cohérence permettant d'obtenir des interférences entre les deux ondes. Le schéma de la figure IV.2 montre

la configuration de Leith et Upatnieks.

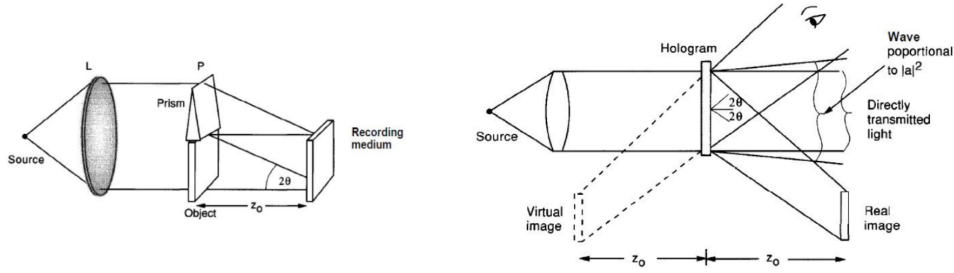


Figure IV.2 – Schéma de l'holographie hors axe. À gauche : configuration de l'éclairage de l'objet avec un angle entre l'onde de référence et l'onde objet. À droite : reconstruction de l'image objet. Issu de [75].

On appelle cette configuration, l'holographie hors axe. C'est cette configuration que nous allons utiliser car elle présente l'avantage d'utiliser toute la dynamique de la caméra pour imager l'objet.

IV.1.1 Holographie hors axe

L'holographie consiste donc à enregistrer un front d'onde en amplitude et en phase. Dans la configuration hors axe, la caméra reçoit une intensité que l'on peut écrire :

$$\begin{aligned} I(x, y) &= |R(x, y) + O(x, y)|^2 \\ &= |R(x, y)|^2 + |O(x, y)|^2 + O(x, y)R^*(x, y) + O^*(x, y)R(x, y) \end{aligned} \quad (\text{IV.1})$$

où $R(x, y)$ est le champ de l'onde de référence, $O(x, y)$ est le champ objet et le symbole $*$ désigne le complexe conjugué. On souhaite isoler un des deux derniers termes incluant le champ objet. Ces deux derniers termes sont complexes conjugués l'un de l'autre.

Ayant introduit un angle entre l'onde de référence et l'onde objet, cela permet de séparer les deux derniers termes. En effet, on peut écrire l'onde de référence :

$$R(x, y) = \exp(-ikx \sin \theta).$$

Quelque soit le montage expérimental, il est équivalent de considérer que seule l'onde de référence est inclinée et l'onde objet est parallèle au plan de la caméra. Cela simplifie l'écriture de ramener tout le décalage angulaire dans l'onde de référence.

En passant dans l'espace de Fourier on obtient une répartition des termes de l'équation IV.1 comme dans la figure IV.3.

On peut alors sélectionner les termes d'intérêt (image objet réelle ou virtuelle) en filtrant dans l'espace de Fourier, puis en faisant une transformée de Fourier inverse et en normalisant par l'intensité de l'onde de référence on obtient le champ objet.

IV.1.2 Holographie numérique

L'intérêt d'une version numérique de l'holographie est que si l'on connaît le front d'onde en amplitude et en phase dans un plan, on peut propager numériquement ce front d'onde dans n'importe quel plan. Cela permet par exemple de corriger la mise au point en post-traitement.

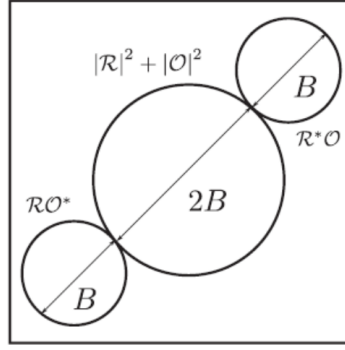


Figure IV.3 – Représentation des termes de l'intensité sur la caméra dans l'espace de Fourier. Issu de [77].

Cette propriété vient du fait que la théorie de la diffraction nous permet de calculer la propagation d'un front d'onde d'un plan vers un autre, par un calcul d'intégrale que l'on peut rapidement réaliser numériquement.

Cela permet d'optimiser l'utilisation de la dynamique de la caméra. Si les objets que l'on veut imager sont petits par rapport à la résolution du système, il est intéressant d'enregistrer le front d'onde dans un plan légèrement décalé par rapport au plan de mise au point, de ce fait l'intensité des points sera plus basse et répartie sur plusieurs pixels. Dans notre cas, les cornées ne présentent pas de pics d'intensité et on veut observer le front d'onde transmis par la cornée.

Il existe plusieurs méthodes de propagation qui ont été implémentées par l'équipe. Ces méthodes sont décrites dans les références [77] et [78]. Ces algorithmes de propagations sont :

- méthode de la transformation de Fresnel (FTM)
- méthode de la convolution de Huygens (HCM)
- méthode du spectre angulaire (ASM)

Propagation par la transformation de Fresnel

Cette méthode utilise une seule transformée de Fourier, et est utilisée pour les hologrammes larges, enregistrés loin du plan image.

Il y a une distance de propagation minimale avec cette méthode, décrite dans [78] qui vaut : $z_{\min} = \frac{X_0^2}{\lambda N}$ où X_0 est la largeur de l'image en micron, N la largeur en pixels et λ la longueur d'onde. En dessous de cette distance de propagation on ne retrouve pas le front d'onde correct et il peut y avoir des phénomènes de repliement de spectre.

Avec cette méthode la résolution dépend de la distance de propagation. La taille des pixels $\Delta\xi$ évolue avec la distance de propagation z suivant la relation suivante :

$$\Delta\xi = \frac{\lambda z}{N\Delta x}$$

où Δx est la distance entre les pixels de la caméra [79].

L'équation de propagation, donnée à une dimension pour simplifier l'expression, est [77] :

$$E(p) = \frac{\exp(ikz)}{\sqrt{i\lambda z}} \exp\left(i\frac{\pi\lambda zp^2}{N^2\Delta x^2}\right) \mathcal{F}\left\{E(n) \exp\left(i\frac{\pi}{\lambda z}(n\Delta x)^2\right)\right\} \quad (\text{IV.2})$$

Convolution de Huygens

Cette méthode est typiquement utilisée pour des petits hologrammes, proche du plan image. Pour propager le front d'onde, on calcule une convolution spatiale en utilisant la réponse impulsionnelle donnée par $h_z(z) = \exp(i\frac{\pi}{\lambda z}x^2)$ [78]. Pour calculer cette convolution on passe dans l'espace de Fourier et il suffit alors de faire le produit des transformations de Fourier du front d'onde et de la réponse impulsionnelle, puis de faire une transformation de Fourier inverse.

On obtient alors l'équation de propagation [77] :

$$E(\xi) = \frac{\exp(ikz)}{\sqrt{i\lambda z}} \mathcal{F}^{-1} [\mathcal{F}\{E(x)\} \times \mathcal{F}\{h_z(z)\}] \quad (\text{IV.3})$$

Cette méthode a la même contrainte que la méthode de transformation de Fresnel, à savoir la nécessité de propager sur une distance minimale donnée par $z_{\min} = \frac{X_0^2}{\lambda N}$. Cette distance minimale correspond à la limite de résolution de la caméra et la taille des franges. Pour des distances de propagation plus courtes, on ne satisfait plus le critère de Nyquist [78].

Il y a également une limite de propagation maximale, au-delà de laquelle cette méthode ne permet pas de retrouver un front d'onde correct. Si la distance de propagation est plus grande que $z_{\max} = \frac{X_0^2}{2\lambda}$ la période des franges devient plus grande que la taille du capteur de la caméra. Cela signifie que l'on perd progressivement les hautes fréquences en augmentant la distance de propagation, jusqu'à perte complète du signal.

Spectre angulaire

Cette méthode utilise aussi un calcul de convolution, et nécessite le calcul de 2 transformées de Fourier. On propage le spectre angulaire de l'onde, en utilisant la fonction de transfert du spectre angulaire donnée par [77] :

$$H(f_x) = \exp \left[2i\frac{\pi z}{\lambda} \left(1 - \frac{1}{2}f_x^2\lambda^2 \right) \right] \quad (\text{IV.4})$$

Cette méthode convient aux courtes distances, y compris $z = 0$.

$$E(\xi) = \frac{1}{\sqrt{i\lambda z}} \mathcal{F}^{-1} [\mathcal{F}\{E(x) \times H(f_x)\}] \quad (\text{IV.5})$$

Il y a une instabilité numérique pour les longues distances. En pratique cette instabilité ne nous concerne pas puisque nous ne propagerons pas sur de telles distances.

Le tableau IV.1 résume les propriétés des 3 méthodes de propagation présentées.

IV.1.3 Démodulation

Dans les méthodes d'holographie présentées on est souvent limités par la présence du terme constant, module carré des champs de référence et objet, qui donne un terme large dans l'espace de Fourier, se superposant parfois avec le champ objet que l'on veut isoler dans l'espace de Fourier. Des méthodes ont donc été mises au point pour supprimer ce terme constant, ainsi que pour réduire le bruit cohérent qui peut également se superposer avec notre signal d'intérêt.

	FTM	HCM	ASM
Nombre de FFT	1	3	2
Distances limites de propagation	$z_{min} = \frac{X_0^2}{\lambda N}$	$z_{min} = \frac{X_0^2}{\lambda N}$ et $z_{max} = \frac{X_0^2}{2\lambda}$	instabilité à très longue distance
type de front d'onde	approximation parabolique des fronts d'onde sphériques	fronts d'onde sphériques	ondes planes
Grandissement	change avec z	constant	constant

Tableau IV.1 – Résumé des propriétés des trois principales méthodes de propagation de front d'onde.

La méthode de démodulation consiste à acquérir plusieurs hologrammes avec des déphasages différents entre l'onde de référence et l'onde objet. Cela a pour effet de déplacer les franges sur la caméra. En général cette méthode est mise en place à l'aide d'un miroir monté sur un élément piézoélectrique placé dans l'un des deux bras du système. Le piézoélectrique permet de changer rapidement le déphasage entre les deux ondes en déplaçant le miroir d'une distance connue. On peut alors créer des déphasages contrôlés.

La méthode la plus courante est d'acquérir 5 images : une de l'onde de référence seule, pour obtenir l'amplitude de l'onde de référence \mathcal{E}_R et une pour chaque déphasage $\alpha = 0, \frac{\pi}{2}, \pi$ et $\frac{3\pi}{2}$. On parle alors de démodulation 4 phases. Le champ objet se calcule à partir de l'équation suivante [78] :

$$E_o(x, y) = \frac{1}{4\mathcal{E}_R} \left[(I_0 - I_\pi) + i(I_{3\pi/2} - I_{\pi/2}) \right] \quad (\text{IV.6})$$

Il existe également une démodulation à 2 phases, que l'on peut utiliser lorsque l'on ne connaît pas le déphasage que l'on impose. Il faut alors enregistrer deux hologrammes déphasés et enregistrer l'image de la référence seule et l'image de l'objet seul [78]. On peut calculer le déphasage α et le champ objet :

$$\alpha = \cos^{-1} \left[1 - \frac{\langle (I_0 - I_\alpha)^2 \rangle}{2\mathcal{E}_R^2 (\langle I_0 + I_\alpha \rangle - 2\mathcal{E}_R^2)} \right]$$

$$E_o(x, y) = \frac{I_0 - u}{2\mathcal{E}_R} + i \frac{-I_0 \cos \alpha + I_\alpha + u(1 - \cos \alpha)}{2\mathcal{E}_R \sin \alpha} \quad (\text{IV.7})$$

où $u = |E_o|^2 + |E_R|^2$ et $\langle . \rangle$ indique une moyenne sur l'ensemble des pixels.

Cette méthode à 2 phases fait l'hypothèse que la phase est suffisamment aléatoire (car on effectue des moyennes d'intensité sur l'ensemble des pixels) et que l'intensité de référence est beaucoup plus grande que l'intensité de l'objet.

Nous avons adapté le principe de la démodulation à notre configuration expérimentale pour essayer de réduire le bruit cohérent provenant des différents éléments optiques. Au lieu de déplacer les franges sur la caméra en créant un déphasage entre les deux bras, nous avons

décalé l'échantillon latéralement de façon à reproduire le décalage des franges sur la caméra. On déplace alors l'échantillon 4 fois d'un quart d'interfrange dans la direction perpendiculaire aux franges, et on peut utiliser les équations IV.6 ou IV.7.

IV.2 Dispositif de microscopie holographique numérique

Nous disposons d'un système de microscopie holographique numérique dont le schéma du montage est représenté sur la figure IV.4.

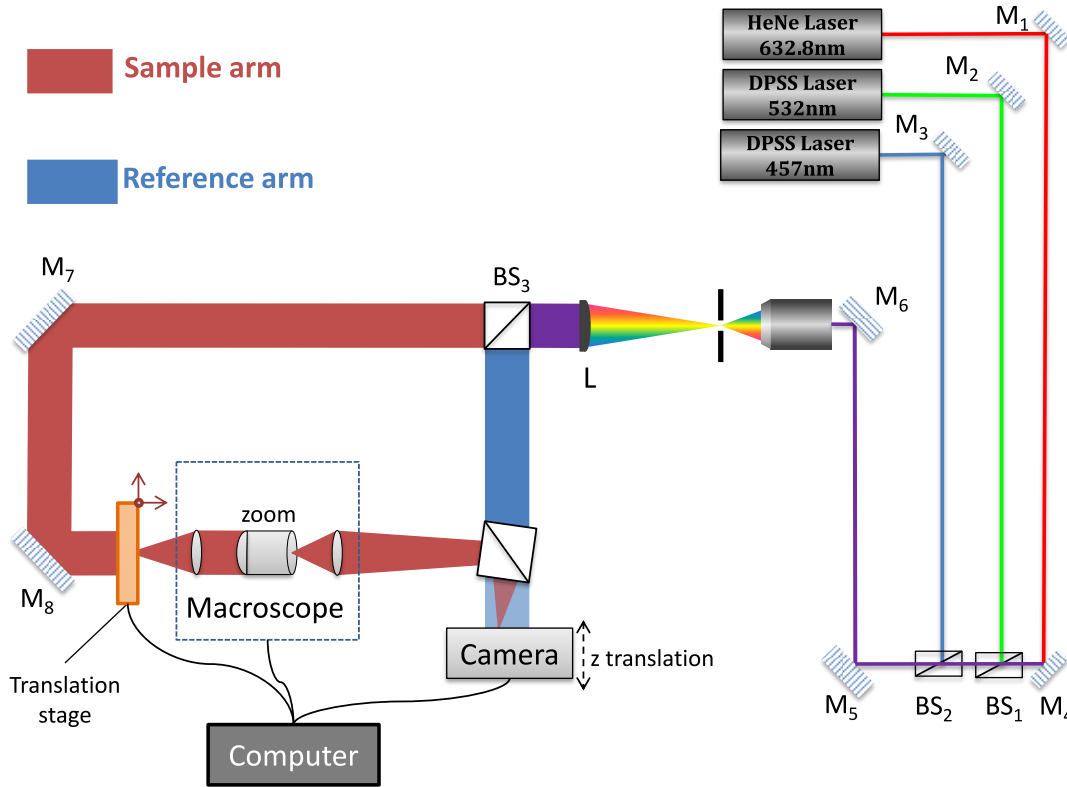


Figure IV.4 – Schéma du montage de microscopie holographique numérique hors axe, utilisant trois longueurs d'ondes (457nm, 532nm et 633nm).

IV.2.1 Sources laser

Nous disposons de trois sources lasers à des longueurs d'onde différentes dans le spectre visible. Nous utilisons une longueur d'onde à la fois car pour l'holographie il faudrait séparer les trois longueurs d'onde dans l'espace de Fourier en introduisant des angles différents pour chacune d'entre elles. Bien qu'il soit possible de séparer complètement trois longueurs d'ondes dans l'espace de Fourier [80], cela nécessite un montage plus complexe et nous n'avons pas de contrainte de rapidité d'acquisition.

Les lasers que l'on utilise sont donc :

- un laser solide (DPSS) bleu à 457 nm ;
- un laser solide (DPSS) à 532 nm ;
- un laser HeNe à 633 nm.

Les trois faisceaux lasers sont alignés et épurés au moyen d'un objectif d'ouverture numérique $NA = 0,2$ et d'un trou de $20\text{ }\mu\text{m}$ de diamètre. Le faisceau est ensuite élargi puis séparé en deux bras. Le faisceau objet illumine l'échantillon en transmission et est capté par l'objectif du microscope, puis le faisceau est envoyé sur la caméra. Le faisceau de référence est envoyé en haut du microscope et recombinaison avec le faisceau objet sur la caméra par un film séparateur de faisceau dont l'angle est réglable par des vis micrométriques. Ce film séparateur a été placé entre la sortie du microscope et la caméra en réalisant à l'atelier une plaque en métal vissée sur le microscope permettant l'ajout de matériels optique, tout en conservant la distance prévue entre la sortie du microscope et la caméra.

Les sources lasers ont été remplacées par de nouvelles sources avec une meilleure stabilité des modes spatiaux ; les précédentes sources (notamment le laser HeNe et le laser solide bleu) présentaient des fluctuations d'intensité importantes sur une période de l'ordre de la seconde. Les nouvelles sources ont été choisies aux mêmes longueurs d'onde que les précédentes. Ces lasers sont couplés dans une fibre monomode, ce qui remplace l'alignement et l'épuration laser dans le montage. Nous avons également ajouté un élargisseur de faisceau qui produit en sortie de fibre un faisceau d'environ 15 mm de diamètre (largeur mesurée à $\frac{1}{e^2}$) pour des longueurs d'onde dans le visible et dont la focale est réglable ce qui permet d'assurer une bonne collimation pour chaque longueur d'onde.

IV.2.2 Microscope

On utilise un microscope optique Nikon motorisé (AZ100M). Ce microscope à zoom polyvalent est un microscope présentant des possibilités de zoom allant d'un faible grossissement à des grossissements classiques de microscope optique. Ces appareils sont destinés à l'imagerie de cellules ou tissus biologiques en laboratoire. Le microscope est composé d'objectifs grossissants de 1 à 5 fois, d'un zoom réglable de 1 à 8 fois et d'une lentille de tube qui envoie l'image vers la caméra ou l'oculaire. Le niveau de zoom réglable présente l'inconvénient d'ajouter une courbure variable au front d'onde sortant. Pour l'imagerie classique, une telle courbure n'est pas un problème, mais dans notre cas nous souhaitons faire interférer deux fronts d'onde de même courbure, il faudra alors utiliser le niveau de zoom pour lequel le front d'onde est plan, ou appliquer une lentille numérique au cours de la propagation pour compenser cette courbure.

Pour un meilleur réglage du niveau de zoom, il est préférable d'utiliser le logiciel Nikon qui permet de régler le niveau zoom par des moteurs intégrés au microscope, ce qui est plus précis que manuellement. De plus il existe une hystérésis dans la position du niveau de zoom, le réglage peut être assez fin pour obtenir un front d'onde plan.

IV.2.3 Porte échantillon et platines de translation

Le porte échantillon du microscope est remplacé par une plaque en métal avec une ouverture circulaire pour pouvoir éclairer l'échantillon. La plaque est fixée à un système de platines de translations Newport (GTS150) permettant des mouvements précis dans les trois directions de l'espace. Chaque moteur a une amplitude de déplacement de 150 mm et une précision de 50 nm . Les moteurs sont contrôlés par une interface internet.

IV.2.4 Caméra

Nous utilisons une caméra couleur PixeLINK M-15 (PixeLINK, Ottawa, Canada) de 15 mégapixels (4608×3288), avec une taille de pixels de $1,4\text{ }\mu\text{m}$, une profondeur de 12 bits et une

cadence d'image maximale de 13 Hz (si l'on capture sur toute la surface du capteur).

IV.2.5 Interface graphique

Lucie Dilhan et Bathilde Rivière ont implémenté une interface graphique sous Matlab permettant de réaliser toutes les opérations allant de la capture des hologrammes par la caméra à la démodulation, en passant par la propagation dans un autre plan et la correction de courbure par une lentille numérique. La figure IV.5 est une image de cette interface avec les différentes options.

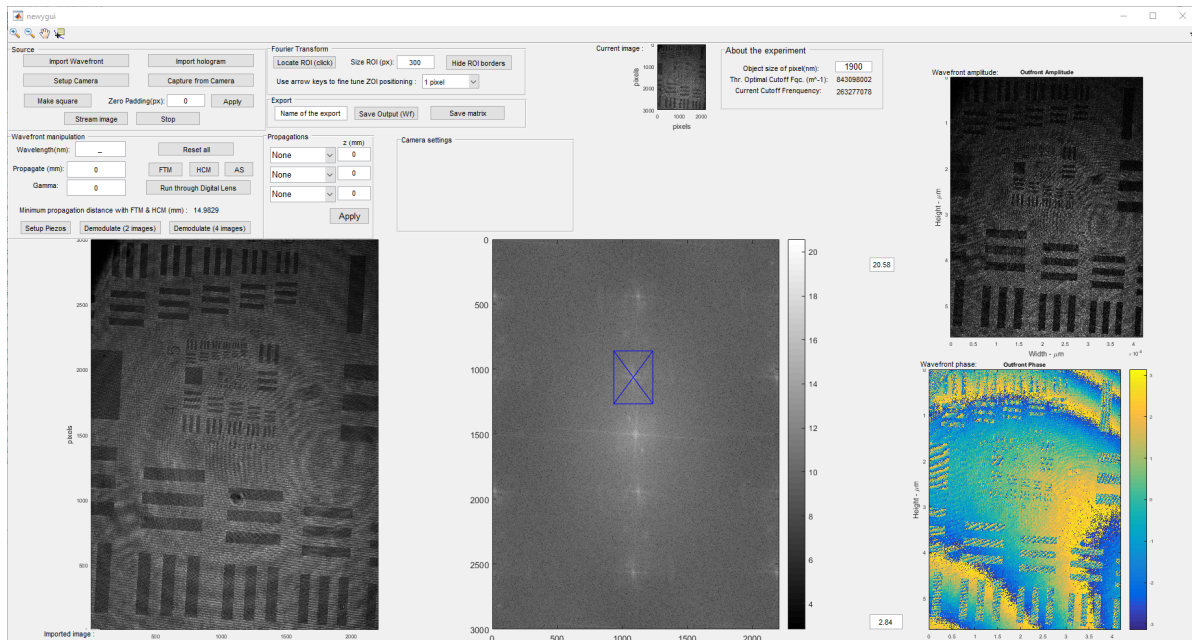


Figure IV.5 – Interface graphique développée par Lucie Dilhan et Bathilde Rivière en Matlab. La zone d'intérêt est indiquée par le rectangle bleu dont la taille est ajustable pour éviter de sélectionner une partie du terme central.

Pour l'acquisition d'un hologramme on utilise cette interface qui permet de regarder en direct l'image sur la caméra et sa transformée de Fourier, ce qui permet de régler l'angle entre les deux faisceaux de façon à optimiser la position du champ objet dans le domaine de Fourier. On sélectionne en suite la zone d'intérêt, c'est-à-dire le centre de la transformée de Fourier du champ objet. Ce réglage est particulièrement important car si l'on n'est pas parfaitement centré il restera une modulation résiduelle après transformée de Fourier inverse. Pour cela l'interface permet de sélectionner le centre de la zone d'intérêt en cliquant sur la transformée de Fourier, puis l'on peut réaliser un réglage fin en utilisant les flèches du clavier. On peut alors définir le pas en pixel de chaque pression sur une des flèches du clavier.

La taille de la zone d'intérêt est également réglable. Celle-ci définira la résolution de notre front d'onde reconstruit.

Pour améliorer la vitesse et la facilité des réglage il sera intéressant par la suite d'utiliser les pilotes de la caméra (présents dans le *Software Development Kit*) pour permettre une communication rapide entre la caméra et l'interface. Actuellement nous utilisons un pilote

Matlab qui n'est pas prévu pour l'acquisition d'images en continu et la cadence d'image est donc extrêmement réduite puisque pour chaque image le logiciel initialise une connexion avec la caméra, acquiert l'image, puis ferme la connexion avant de recommencer tout le processus pour l'image suivante.

IV.3 Caractérisation du système

IV.3.1 Grandissement

Les système commerciaux utilisent la notion de grossissement commercial qui est défini par $G_c = \frac{\alpha'}{\alpha}$, α étant l'angle sous lequel l'objet apparaît à 25 cm et α' l'angle sous lequel il apparaît à l'infini à travers le microscope.

Cette définition n'est pas utilisable pour nous car elle suppose que l'on utilise le microscope avec ses oculaires, ce qui n'est pas le cas dans notre montage. Il nous faut donc déterminer le grandissement du système, défini par :

$$\Gamma = \frac{P_{\text{caméra}}}{P_{\text{échantillon}}}$$

où $P_{\text{caméra}}$ et $P_{\text{échantillon}}$ sont respectivement les tailles des pixels dans le plan de la caméra et le plan de l'échantillon. Le constructeur nous donne $P_{\text{caméra}} = 1,4 \mu\text{m}$. On peut mesurer $P_{\text{échantillon}}$ avec une mire de résolution comme la mire 1951 USAF (pour 1951 *U.S. Air Force resolution test chart*). Avec cette mire on mesure en pixels la taille d'un élément de la mire et comme on connaît sa dimension réelle on peut remonter à la taille d'un pixel dans le plan de la mire.

Les mesures ont été effectuées avec le laser à 532 nm, utilisant les objectifs $1\times$, $2\times$ et $4\times$. Le zoom a été fixé à 2,9, valeur pour laquelle le front d'onde est plan. On peut également mesurer l'ouverture numérique effective du système avec la mire de résolution, en cherchant la limite de résolution δ , qui est liée à l'ouverture numérique NA par la relation

$$\delta = \frac{0,61\lambda}{\text{NA}}.$$

Les résultats des mesures sont présentés dans le tableau IV.2.

Objectif	NA	$P_{\text{échantillon}} [\mu\text{m}]$	grandissement Γ
$1\times$	0,07	$2,0 \mu\text{m}$	1,8
$2\times$	0,14	$1,0 \mu\text{m}$	3,6
$4\times$	0,28	$0,5 \mu\text{m}$	7,1

Tableau IV.2 – Résumé des mesures de grandissement et d'ouverture numérique pour $\lambda = 532 \text{ nm}$ et le zoom du microscope à 2,9.

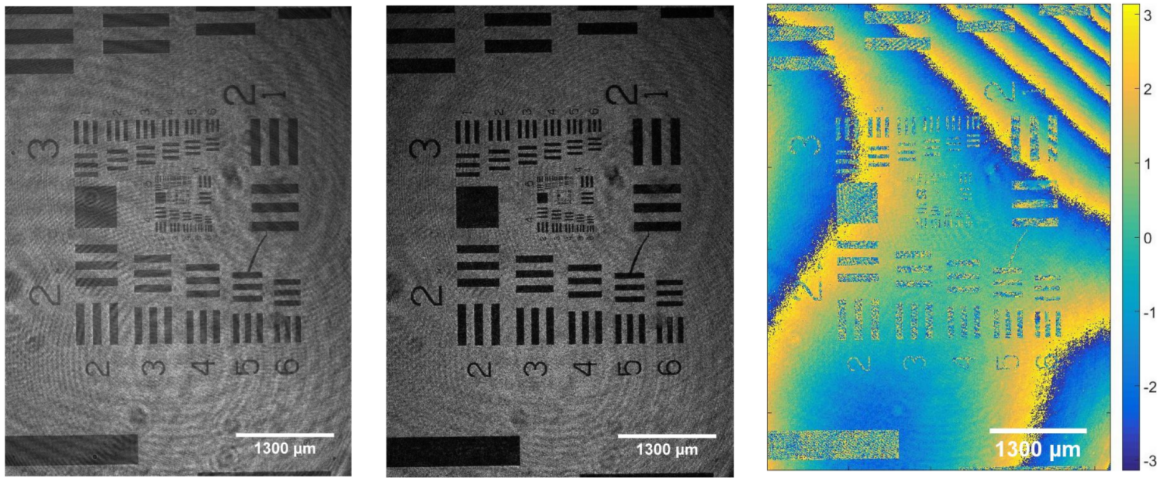
Le niveau de zoom du microscope a également un effet sur l'ouverture numérique effective du système, les mesures de résolution ont données les valeurs reportées dans le tableau IV.3.

Zoom	NA	Résolution [μm]
$\times 1$	0,03	11,05
$\times 3$	0,07	4,38
$\times 8$	0,13	2,46

Tableau IV.3 – Effet du zoom du microscope sur l’ouverture numérique effective et donc la résolution du système. L’objectif utilisé est l’objectif $1\times$ et la longueur d’onde du laser est 532 nm.

IV.3.2 Reconstruction d’un hologramme d’une mire de résolution

Nous illustrons le fonctionnement du dispositif par l’acquisition d’un hologramme de la mire de résolution 1951 USAF.



(a) Hologramme enregistré par la caméra (b) Amplitude du champ objet reconstruit (c) Phase du champ objet reconstruit

Figure IV.6 – Reconstruction d’un front d’onde en amplitude et en phase à partir de l’image enregistrée sur la caméra.

On observe alors des images supplémentaires « parasites ». Leur origine n’est pas complètement déterminée mais on peut remarquer que ces images fantômes sont positionnées à des fréquences correspondant à la différence entre la fréquence maximale et la fréquence à laquelle se trouve l’image objet ou virtuelle. Cela ressemble ainsi à un repliement du spectre (ou *aliasing* en anglais), mais nous n’avons pas déterminé ce qui pourrait causer ce phénomène dans notre système (la résolution de la caméra nous permet de respecter le critère de Nyquist). La figure IV.7 permet d’identifier les relations entre les positions de ces images et la fréquence maximale observable par la caméra.

IV.3.3 Démodulation par déplacement de l’échantillon

Cette méthode a été implémentée par Lucie Dilhan. Nous en résumons ici le principe.

Au lieu de déphaser un faisceau par rapport à l’autre, nous décalons l’échantillon par rapport aux franges et nous acquérons quatre images où les franges sont décalées par rapport à l’objet

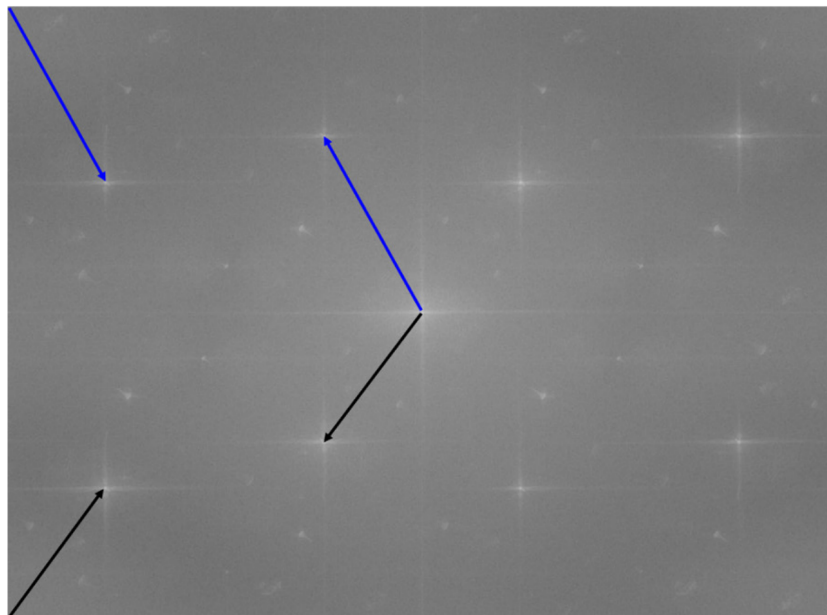


Figure IV.7 – Images fantôme dans la transformée de Fourier de l'hologramme d'une mire de résolution, correspondant à des fréquences suggérant un repliement de spectre.

d'une distance équivalente à un déphasage de $\pi/2$ à chaque fois. On peut alors appliquer la démodulation 4 phases. Cette méthode est plus lente que la démodulation classique car il est nécessaire de décaler l'échantillon avec les moteurs, au lieu de déplacer un miroir avec un piézoélectrique. Comme nous n'avons pas de contrainte temporelle, on peut utiliser cette méthode qui présente l'avantage de supprimer toute partie du signal qui ne provient pas de l'objet, puisque seul l'objet est déplacé. On supprime alors le bruit du bras échantillon.

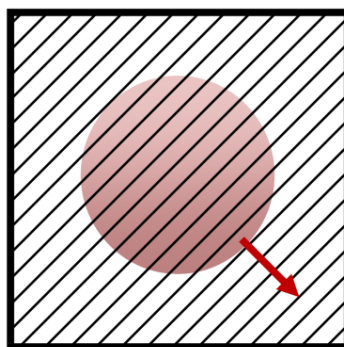


Figure IV.8 – Principe de démodulation par décalage de l'échantillon. Le signal de l'échantillon est représenté en rouge et les hachures représentent les franges sur la caméra.

Dans la pratique, il peut exister un angle ϕ entre l'axe x des moteurs de translation et l'axe x de la caméra. Il faut en tenir compte en appliquant une matrice de rotation R entre les coordonnées de la caméra et les coordonnées que l'on utilise pour déplacer l'échantillon. Avec

le grandissement Γ du système on a alors :

$$\begin{pmatrix} x' \\ y' \end{pmatrix} = \Gamma R \begin{pmatrix} x \\ y \end{pmatrix} \quad (\text{IV.8})$$

où (x, y) sont les coordonnées dans le plan de la caméra et (x', y') dans le plan échantillon.

On mesure alors la matrice de rotation R en calculant la corrélation croisée entre deux images où l'on a décalé l'échantillon d'une distance connue (par exemple $100 \mu\text{m}$) (figure IV.9).

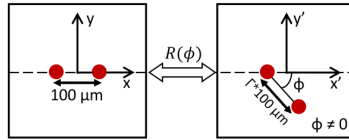


Figure IV.9 – Mesure par corrélation croisée de la matrice de rotation entre le plan échantillon et le plan de la caméra.

Pour mettre en place une telle démodulation, il faut aussi connaître l'orientation θ des franges sur la caméra et réaliser le déplacement de l'échantillon dans la direction perpendiculaire aux franges. On peut mesurer cette direction sur l'image de transformée de Fourier de l'hologramme. Le décalage en fréquence du champ objet nous permet de connaître la direction des franges et l'interfrange d_f (figure IV.10).

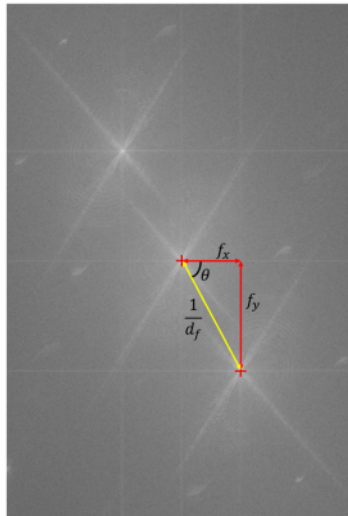


Figure IV.10 – Détermination de l'angle θ d'orientation des franges sur la caméra et de l'interfrange d_f .

Dans le plan échantillon il faut alors déplacer les moteurs suivant un angle $\beta = \frac{\pi}{2} - \theta - \phi$, en définissant β comme indiqué sur la figure IV.11.

Pour décaler l'échantillon de façon à varier la phase de 2π , il faut déplacer les moteurs de

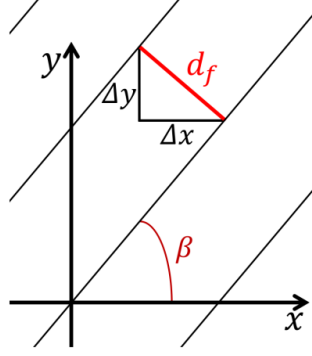


Figure IV.11 – Angle β des franges par rapport au référentiel de l'échantillon.

Δx et Δy , avec :

$$\begin{aligned}\Delta x &= d_f \sin \beta \\ \Delta y &= d_f \cos \beta\end{aligned}\tag{IV.9}$$

La figure IV.12 montre le résultat d'une telle démodulation. On récupère bien le champ objet en amplitude et en phase. Cependant une des limitations technique de notre appareil provient de l'instabilité mécanique des éléments optiques du microscope. Le système de zoom n'est pas suffisamment stabilisé pour observer des franges très stable ainsi les méthodes de démodulations sont limitées, surtout si l'on applique un angle important entre les deux faisceaux et qu'on obtient des franges très fines.

IV.4 Mesure de sensibilité du système

Pour vérifier que notre système est capable d'observer l'élargissement du front d'onde après traversée d'un milieu diffusant, on prépare un milieu dont on peut contrôler la valeur du libre parcours moyen de diffusion. Pour cela on utilise, comme dans le chapitre précédent, une solution aqueuse de billes de polystyrène comme milieu modèle.

On utilise une solution de billes de polystyrène de diamètre $0,51\ \mu\text{m}$. On prépare deux solutions à des concentrations différentes pour comparer les fronts d'onde. La première solution est préparée en diluant 50 fois la solution de base, la deuxième est diluée 500 fois. Les fractions volumiques sont donc respectivement $V_f = 0,0005$ et $V_f = 0,00005$. Les libres parcours moyen de diffusion de ces solutions varient de 455 à $860\ \mu\text{m}$ pour la solution diluée 50 fois et de 4500 à $8600\ \mu\text{m}$ pour la solution diluée 500 fois, sur la plage de longueurs d'ondes des trois lasers (de $457\ \text{nm}$ à $633\ \text{nm}$).

On enregistre les hologrammes de ces deux solutions en utilisant le laser à $532\ \text{nm}$ qui présente la plus grande stabilité des modes spatiaux.

Ces solutions n'ont pas de structures que l'on pourrait imager. Cependant si l'on se place dans le plan où le champ objet est focalisé sur la caméra (soit en réglant la configuration du

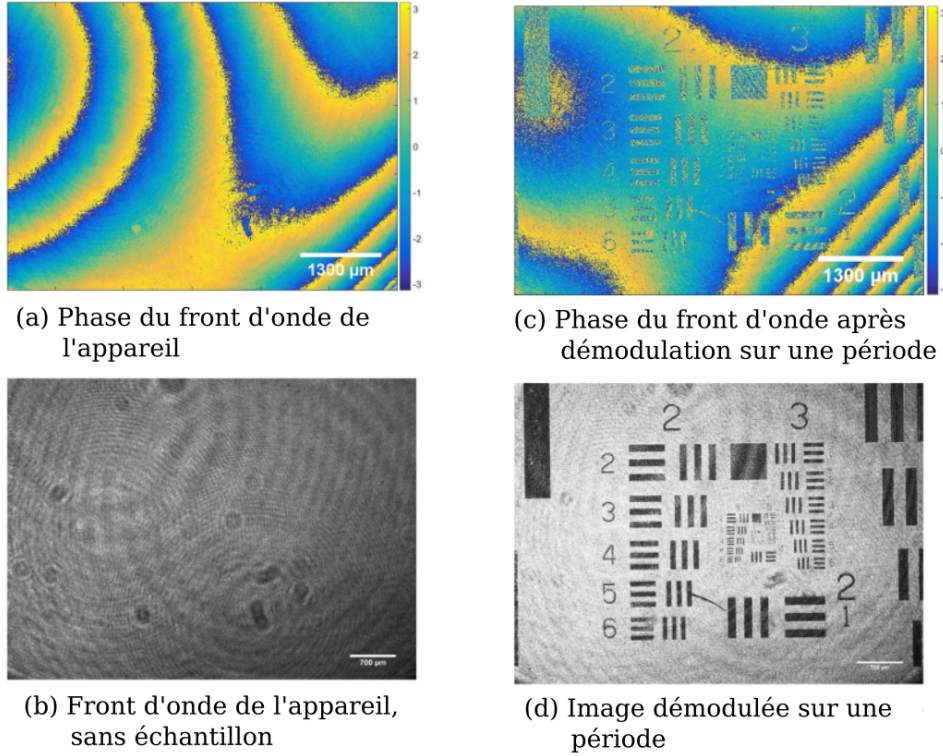


Figure IV.12 – À gauche : amplitude et phase du front d'onde de l'appareil. À droite : amplitude et phase du front d'onde d'une mire USAF après démodulation sur une période (4 images avec un déphasage de $0, \pi/2, \pi$ et $3\pi/2$).

système avant l'acquisition, soit en enregistrant le champ objet dans le plan image puis en propageant), lorsqu'on effectue la transformée de Fourier de l'hologramme, les images réelles et virtuelles de l'objet correspondent à la PSF de l'objet. On devrait donc observer un élargissement de la PSF pour la solution de billes de polystyrène la plus concentrée.

La figure IV.13 montre le module des transformées de Fourier des champs objet des deux solutions de billes de polystyrène. On remarque que la PSF que l'on observe a la forme de la PSF d'une pupille rectangulaire. Cela est dû au fait que notre champ de vue est limité par la caméra qui a une forme rectangulaire. Pour comparer les profils des PSF on trace leur moyenne circulaire, affichés sur la figure IV.14 en échelle logarithmique. Les PSF ont été normalisées et l'angle de diffusion a été calculé à partir de l'ouverture numérique effective du système et de l'étendue en pixels de l'image objet sur la caméra en considérant que cette étendue vaut $2\theta_{\max}$ avec $\theta_{\max} = \sin^{-1}(\text{NA})$. Cette mesure a été effectuée avec l'objectif 4× et le zoom 2,9× ; l'ouverture numérique effective a été mesurée à 0,28 (cf IV.2).

Les deux PSF sont très proches l'une de l'autre. La PSF de la solution la plus concentrée semble plus large, ce qui est cohérent. Mais en prenant en compte les écart-types sur les points on s'aperçoit que malgré l'écart important dans le libre parcours moyen (d'un facteur 10), la différence sur les PSF que l'on observe est faible. Cela signifie que notre système n'a pas la sensibilité suffisante pour observer les phénomènes de diffusion qui nous intéressent.

Une méthode alternative pour observer les effets de la diffusion sur la lumière transmise serait

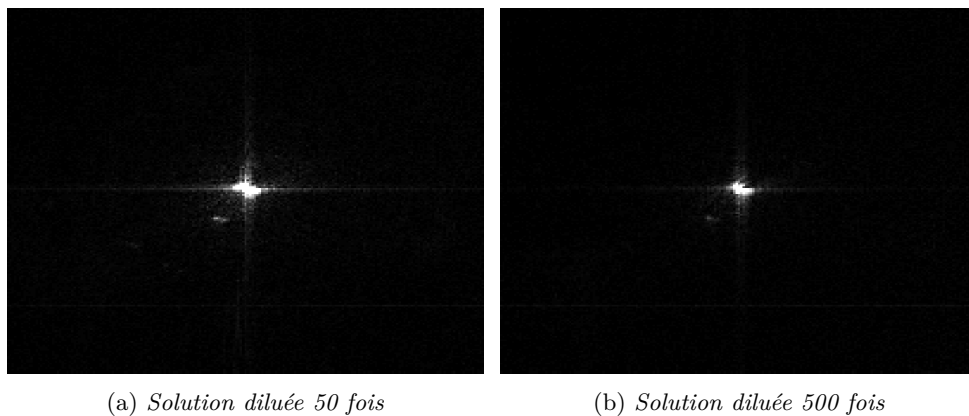


Figure IV.13 – Module des transformées de Fourier des champs objet des solutions de billes de polystyrène à deux concentrations différentes.

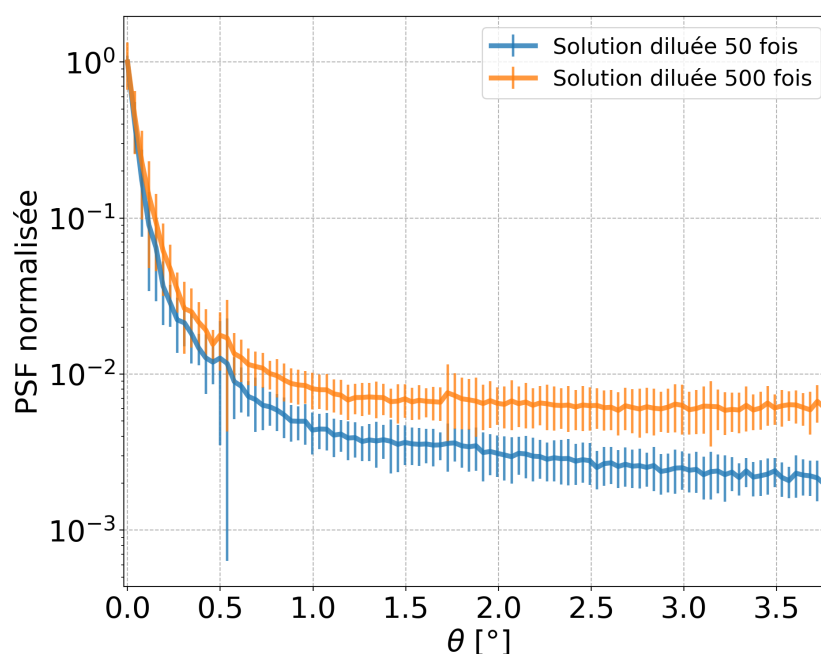


Figure IV.14 – PSF radiales des solutions de billes de polystyrène diluées 50 et 500 fois. Les PSF ont été normalisées pour permettre une comparaison de leur largeur. Les barres d'erreur représentent les écart-types des points moyennés radialement.

d'utiliser un montage beaucoup plus simple où l'on envoie un faisceau à travers l'échantillon diffusant et on focalise ce faisceau sur une caméra avec une lentille. De cette façon on réduit le bruit cohérent produit par toutes les impuretés sur les optiques de notre microscope, et la précision avec laquelle on peut mesurer un élargissement de la PSF dépendra essentiellement de la dynamique de la caméra.

Encart IV.1 - Résumé des principaux résultats

- ✓ Nous avons mis en place un montage de microscopie holographique numérique, fonctionnant à trois longueurs d'ondes dans le visible (457 nm, 532 nm et 633 nm).
- ✓ Trois algorithmes de propagation de front d'onde ont été implémentés par l'équipe et l'ensemble de l'acquisition des hologrammes est réalisé sur une interface graphique qui permet de manipuler les hologrammes dans l'espace de Fourier pour en extraire un front d'onde.
- ✓ La résolution du système a été caractérisée pour les différents objectifs et niveau de zoom, et traduit en terme d'ouverture numérique effective.
- ✓ Une méthode de démodulation par déplacement de l'objet a été implémentée pour tenter de réduire le bruit cohérent provenant du bras objet. La méthode a été validée, cependant l'instabilité du système de zoom du microscope commercial limite l'utilisation de cette technique car les franges sont instables sur la caméra, or la démodulation nécessite de déplacer les franges avec une précision de l'ordre de l'interfrange.
- ✓ Les expériences sur les solutions de billes de polystyrène ont montré que la sensibilité du système était insuffisante pour observer l'effet de la diffusion sur le front d'onde. La sensibilité du système est réduite par la propre diffusion de ses éléments optique. Les méthodes de démodulation n'ont pas permis un gain suffisant en rapport signal sur bruit.
- ✓ Une alternative pour observer la diffusion en transmission serait de focaliser un faisceau collimaté à travers l'échantillon et placer une caméra pour observer directement la PSF résultante. Le bruit cohérent serait alors réduit et seule la dynamique de la caméra déterminera la capacité à observer un élargissement de la PSF.

Conclusions et perspectives

*La probabilité de réussir la mise sur orbite d'une
fusée est d'une chance sur un million.
Dépêchons-nous de rater 999 999 lancements!*

Les Shadoks

La perte de transparence cornéenne est un problème de santé publique majeur qui affecte plus de 10 millions de personnes dans le monde. Un diagnostic précoce permettrait une meilleure prise en charge et un meilleur pronostic des patients. Améliorer la précision du diagnostic de transparence cornéenne pourrait permettre d'augmenter le nombre de transplantations en ajoutant un critère qui permettrait d'inclure plus de greffons que le critère actuel de la densité endothéliale.

L'évaluation de la transparence de la cornée, à la fois en clinique et dans les laboratoires des banques des yeux, repose aujourd'hui sur une analyse subjective et qualitative. L'objectif de ce travail est de développer une méthode objective et quantitative fondée sur l'analyse physique de la propagation de la lumière au sein de la cornée.

Dans un premier temps nous avons élaboré un modèle physique avec une équipe spécialisée dans le domaine de la propagation des ondes en milieu complexe (Rémi Carminati, Institut Langevin, ESPCI, CNRS). Ce modèle contient aussi peu de paramètres que possible et décrit la diffusion de la lumière dans le stroma cornéen. Dans ce modèle nous prenons en compte deux familles de diffuseurs : les fibrilles de collagène (diffuseurs de Rayleigh) et les structures micrométriques comme les kératocytes ou les lacs (diffuseurs de Mie). Notre modèle décrit l'organisation des fibrilles de collagène et quantifie les liens entre cette organisation structurale et la transparence, ainsi que l'effet des kératocytes et des lacs. Nous avons notamment pu établir une expression quantitative du libre parcours moyen de diffusion des kératocytes et des lacs à partir des données disponibles dans la littérature en prenant en compte leur densité, leur contraste optique avec la matrice extra-cellulaire, leur largeur caractéristique et leur épaisseur.

Pour les fibrilles de collagène nous avons analysé des images de microscopie électronique en transmission pour calculer des fonctions de corrélation de paires, mesure de l'ordre dans la distribution des positions des fibrilles. Ces fonctions de corrélation de paires permettent de calculer le libre parcours moyen de diffusion d'une telle distribution de fibrilles.

Les valeurs de libre parcours moyen calculées pour les kératocytes et les fibrilles de collagène sont cohérentes avec les mesures de transmission de la lumière à travers la cornée que l'on trouve dans la littérature. L'apparition de lac, associée à un degré d'œdème important, diminue fortement le libre parcours moyen de diffusion.

L'interaction entre les fibrilles de collagène correspond à une interaction électrostatique entre les charges situées autour des fibrilles. Nous avons pu réduire cette interaction à un modèle de disques durs. Avec ce modèle nous avons modélisé l'organisation des fibrilles à partir d'un

seul paramètre, la densité de remplissage des disques. Ce seul paramètre a été suffisant pour décrire l'organisation des cornées saines, en revanche il a fallu ajouter un deuxième paramètre pour décrire les cornées œdémateuses. Une amélioration possible du modèle serait de modifier la forme du potentiel d'interaction entre fibrilles pour le rendre plus proche du potentiel réel. Ce modèle nous a permis de calculer des grandeurs thermodynamiques, comme le facteur de compressibilité qui nous a permis d'établir une courbe pression-volume qui est en très bon accord avec les mesures macroscopiques de pachymétrie de la cornée en fonction de la pression osmotique appliquée.

L'objectif étant d'apporter un outil clinique de quantification de la transparence, nous avons mis en place une méthodologie pour mesurer les paramètres de notre modèle de diffusion à partir des méthodes d'imagerie en réflexion ayant une résolution en profondeur. Nous avons choisi l'OCT comme méthode d'imagerie car elle est largement répandue et possède une bonne résolution axiale. Notre algorithme, développé en collaboration avec Pascal Pernot (expert en analyse de données au LCP, Université Paris-Sud, CNRS), permet d'extraire les paramètres de la courbe de la moyenne cohérente du signal OCT, avec leurs incertitudes données par des intervalles de confiance. Notre analyse repose sur l'hypothèse que le stroma cornéen sain est un milieu homogène donnant lieu à une atténuation mono-exponentielle du signal. Notre algorithme permet de vérifier ou invalider cette hypothèse grâce à un paramètre statistique, le rapport de Birge, validant le modèle mono-exponentiel.

Nous avons d'abord validé notre méthode sur des données *ex vivo* acquises par OCT plein champ, en montrant que nous pouvons distinguer des cornées au stroma homogène de cornées au stroma hétérogène grâce au rapport de Birge, et parmi les cornées homogènes celles qui sont transparentes de celles diffusantes avec le libre parcours moyen de diffusion. Pour valider l'aspect quantitatif nous avons analysé des solutions monodisperses de billes de polystyrène dont on peut calculer le libre parcours moyen par la théorie de Mie. Les valeurs expérimentales que nous mesurons sont corrélées avec les prédictions de la théorie de Mie, mais différent d'un facteur dont la valeur s'explique vraisemblablement par la nature de l'échantillon qui présente des structures de dimensions inférieures la limite de résolution. Cette question doit être clarifiée par des expériences complémentaires.

Nous avons appliqué notre méthode à des données cliniques, d'OCT dans le domaine spectral et de biomicroscope à lampe à fente. Concernant les analyses d'images d'OCT clinique, toutes les images que nous avons analysées ont pu être classées en quatre cas clinique par notre algorithme :

1. signal trop bruité (SNR faible) ;
2. cornée hétérogène ($B_r \gg 1$) ;
3. cornée homogène diffusante ($B_r < \text{seuil}$, ℓ_s faible) ;
4. cornée homogène transparente ($B_r < \text{seuil}$, ℓ_s grand) ;

Nous avons comparé notre mesure à la méthode de classification subjective, et nous avons observé que la méthode subjective permet de distinguer les cornées homogènes des cornées hétérogènes, mais parmi les cornées homogènes elle ne permet pas de distinguer les cornées transparentes des cornées diffusantes. La méthode subjective ne définit pas pour nous un standard auquel se comparer mais plutôt un standard à dépasser. Pour cela il nous faudra inclure plus de médecins et orthoptistes pour mettre en évidence l'incertitude importante sur cette méthode subjective.

Les valeurs typiques du libre parcours moyen que nous mesurons en clinique sont plus élevées que celles mesurées par OCT plein champ, mais inférieures aux valeurs attendues pour des cornées saines dont la transparence est proche de 90 %. Les mesures par OCT plein champ se font sur des cornées *ex vivo* qui sont parfois restées dans des solutions de conservation pendant plusieurs mois, et sont donc très oedémateuse. Pour de telles cornées il est difficile de retrouver une transparence normale même après mise en déturgescence. Cela peut expliquer en partie la différence observée entre les mesures *ex vivo* et *in vivo*. La différence avec les valeurs attendues par la théorie et mesurées en transmission, doit encore être comprise. Les expériences sur les billes de polystyrène, ou d'autres milieux aux propriétés de diffusion connues, pourrait également aider à comprendre cette différence, notamment en faisant varier les paramètres de l'illumination comme la cohérence spatiale, pour voir l'effet de chaque paramètre de l'acquisition et éventuellement apporter des facteurs correctifs.

En clinique, il reste à déterminer par une analyse statistique sur un grand nombre d'échantillons, et éventuellement l'utilisation d'un réseau de neurones, les valeurs précises des seuils du rapport de Birge et du libre parcours moyen permettant respectivement de classer une cornée comme homogène ou hétérogène et transparente ou diffusante. Il serait également intéressant de corréler notre mesure avec l'acuité visuelle, par exemple en analysant le suivi des patients après une greffe endothéliale, pour lesquels l'acuité visuelle s'améliore progressivement sur plusieurs mois.

Il est encore nécessaire de standardiser les mesures faites par lampe à fente, et éventuellement améliorer la précision en ajoutant deux polariseurs croisés (un à l'émission et l'autre à la détection) pour supprimer les fortes réflexions aux interfaces donnant de larges pics. La possibilité d'avoir des mesures à plusieurs longueurs d'onde par la lampe à fente est intéressante pour apporter des informations sur la microstructure du stroma, comme l'éventuelle désorganisation des fibrilles, diffuseurs Rayleigh, ou l'apparition de lacs, diffuseurs Mie.

Enfin, pour observer l'effet direct de la diffusion sur la vision nous avons mis en place un système de microscopie holographique numérique en transmission. L'objectif était d'observer un élargissement de la PSF après passage au travers d'un échantillon diffusant. Malheureusement nous avons constaté que notre système ne possédait pas la dynamique nécessaire pour observer l'élargissement de la PSF, notamment à cause du bruit cohérent important. Par la suite nous allons utiliser un système plus simple dans lequel on focalise un faisceau sur une caméra par une lentille, l'objet diffusant étant placé devant la lentille. Avec la faible ouverture numérique d'une lentille on évite que la PSF soit trop fine, ce qui nécessiterait une grande dynamique de la caméra, et l'observation d'un élargissement de la PSF sera alors plus simple.

Annexe A

Fonction de corrélation de paires et fonction d'autocorrélation

La fonction d'autocorrélation de densité d'une lamelle se définit comme

$$R_\rho = \langle \delta\rho(\vec{r}_1) \delta\rho(\vec{r}_2) \rangle$$

où $\delta\rho(\vec{r}) = \rho(\vec{r}) - \langle \rho(\vec{r}) \rangle$ est la variation de densité locale. À 2 dimensions, la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation est liée au facteur de structure $S(\vec{q})$ de la façon suivante¹ :

$$\begin{aligned} S(\vec{q}) &= \langle \rho \rangle (2\pi)^2 \delta(\vec{q}) + \frac{1}{\langle \rho \rangle V} \iiint R_\rho e^{-i\vec{q} \cdot (\vec{r}_1 - \vec{r}_2)} d^2r_1 d^2r_2 \\ &= \langle \rho \rangle (2\pi)^2 \delta(\vec{q}) + \frac{1}{\langle \rho \rangle V} \mathcal{F}\{R_\rho\} \end{aligned}$$

où V est le volume du système (dans le cas d'une lamelle de fibrilles de collagène il s'agit de la surface transverse de la lamelle considérée) et $\langle \rho \rangle$ est la densité moyenne du milieu, c'est-à-dire $\langle \rho \rangle = \frac{1}{V} \iint \rho(\vec{r}) d^2\vec{r}$. En reprenant l'équation II.15 reliant le facteur de structure à la transformée de Fourier de la fonction de corrélation de paires on trouve :

$$\text{TF}\{g(\vec{r})\} = (2\pi)^2 \delta(\vec{q}) + \frac{1}{\langle \rho \rangle^2 V} \mathcal{F}\{R_\rho\} - \frac{1}{\langle \rho \rangle}$$

et donc la relation entre la fonction de corrélation de paire et la fonction d'autocorrélation de densité du milieu :

$$g(\vec{r}) = 1 + \frac{1}{\langle \rho \rangle^2 V} R_\rho - \frac{\delta(\vec{r})}{\langle \rho \rangle}. \quad (\text{A.1})$$

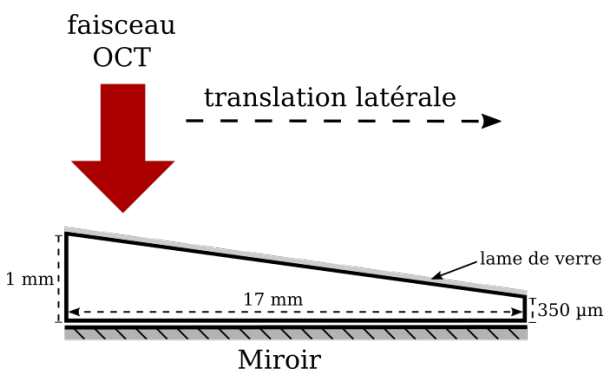
1. <https://physics.stackexchange.com/questions/23719/autocorrelation-functions-pair-correlation-functions>

Annexe B

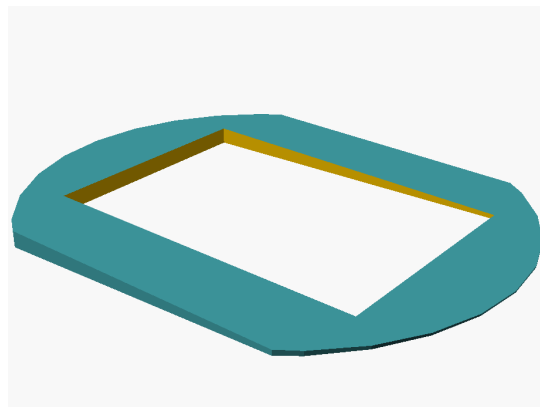
Complément sur la précision de la mesure du libre parcours moyen par OCT plein champ

Pour valider l'extraction du libre parcours moyen de diffusion par OCT plein champ, nous la comparons avec le calcul par la théorie de Mie du libre parcours moyen de diffusion d'une solution monodisperse de billes de polystyrène.

Pour s'affranchir de l'absence de réflexion spéculaire par les billes de polystyrène, puisqu'elles sont de taille inférieure à la résolution de notre OCT plein champ, nous avons décidé de comparer les valeurs de réflexion à l'interface d'un miroir, après traversée de la solution diffusante. Pour cela nous avons dessiné puis imprimé par impression 3D une cuve dont l'épaisseur varie latéralement (la figure B.1 représente le schéma du montage et le dessin 3D de la cuve).



(a) Schéma de profil de la cuve et positionnement du faisceau de l'OCT plein champ.



(b) Image 3D de la cuve.

Figure B.1 – Schéma (a) et image 3D (b) de la cuve avec gradient d'épaisseur de la solution traversée.

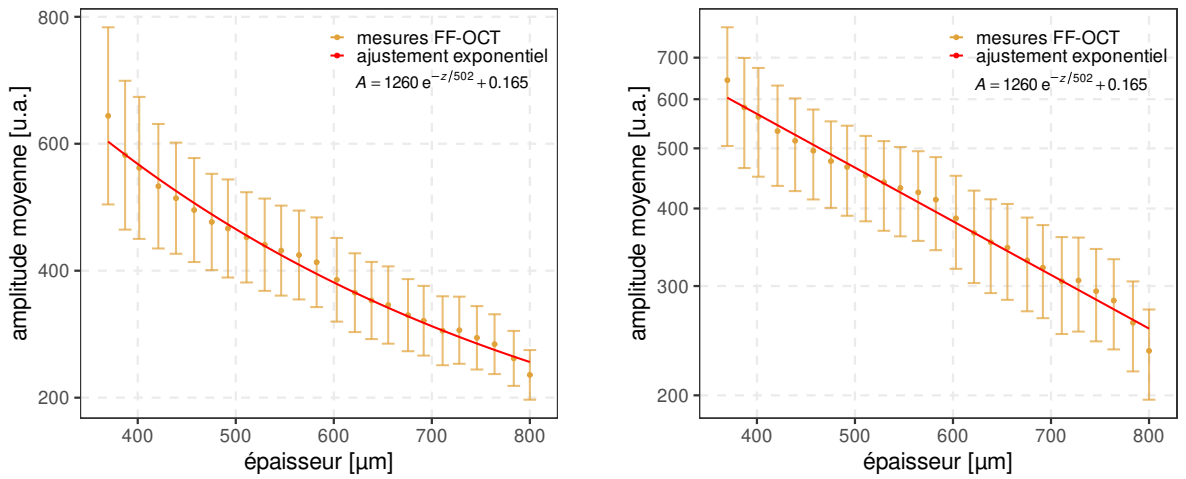
La cuve a une forme et des dimensions qui permettent de la poser sur un miroir standard d'un pouce de diamètre. L'épaisseur de milieu traversé varie entre environ 350 µm du côté le plus fin et 900 µm du côté le plus épais.

On a alors dilué 50 fois une solution de billes de polystyrène d'un micron de diamètre de façon à obtenir une solution dont le libre parcours moyen de diffusion calculé par la théorie de Mie vaut : $\ell_s \approx 540 \mu\text{m}$ pour une longueur d'onde de 650 nm. On choisit une telle solution pour

observer une décroissance assez importante tout en restant dans la limite de faible diffusion ($L \lesssim \ell_s$).

On acquiert les images des franges d'interférence sur le miroir par OCT plein champ. Sur notre système il existe toujours un angle d'inclinaison entre le plan échantillon et le miroir du bras de référence, ce qui implique que les franges d'interférence ne sont observées que sur une petite partie du champ de vue. On acquiert alors une pile d'images sur une dizaine de microns de profondeur, de façon à faire défiler les franges sur tout le champ de vue. On reconstruit ensuite une image de la réflexion sur le miroir en réalisant une projection de la moyenne des images sur *Fiji* (à l'aide de la fonction *Z Project - averaged intensity*). On calcule alors la moyenne et l'écart-type de la réflexion spéculaire sur notre champ de vue. On considère que l'épaisseur de milieu traversée reste constante sur notre champ de vue ($780 \times 780 \mu\text{m}^2$), et on obtient ainsi une valeur de l'amplitude moyenne de la réflexion pour une valeur d'épaisseur de solution traversée. L'épaisseur de solution traversée est mesurée par la distance entre les franges observées sur le miroir et celles observées au niveau de la lame de verre.

On répète cette mesure en translatant l'échantillon latéralement comme illustré sur le schéma de la figure B.1 pour mesurer l'amplitude pour différentes épaisseurs de solution. La figure B.2



(a) Courbe d'atténuation de la réflexion du miroir en fonction de l'épaisseur de milieu traversée.

(b) Courbe en échelle logarithmique.

Figure B.2 – Atténuation du signal de réflexion à l'interface d'un miroir pour différentes épaisseurs de milieu traversé. La largeur d'une barre d'erreur est d'un écart-type.

montre le profil d'atténuation de l'amplitude réfléchi par le miroir avec l'épaisseur de solution traversée. On remarque que chaque point de mesure est assorti d'une incertitude assez importante, ce qui traduit les variations de la surface du miroir. En effet comme il s'agit d'une mesure d'interférométrie, nous sommes sensibles à de faibles défauts de surface du miroir. On observe cependant que ces défauts sont répartis de façon homogène sur la surface du miroir et l'incertitude de mesure est donc proportionnelle au signal, ce que l'on observe sur la courbe en échelle logarithmique (où les barres d'incertitude sont de même amplitude).

La courbe expérimentale suit bien une loi de décroissance exponentielle ; et notre algorithme d'ajustement présenté au chapitre III nous permet d'extraire comme valeur du libre parcours moyen : $\ell_s \approx 502 \mu\text{m}$. Cette valeur est en accord avec le calcul par la théorie de Mie (où l'on

trouvait 540 μm).

Cette mesure valide notre méthode d'analyse, et permet de vérifier que l'on peut obtenir une information quantitative précise à partir des mesures par OCT plein champ. En revanche, ce résultat est établi par des mesures de réflexion spéculaire, et il reste à vérifier expérimentalement que l'on peut obtenir le même résultat par la mesure de l'atténuation du signal OCT en profondeur.

Annexe C

Fonction de transfert en éclairage cohérent et incohérent

C.1 Éclairage cohérent

C.1.1 PSF

Pour un système optique en éclairage cohérent, la PSF est la transformée de Fourier de la pupille. Pour une pupille circulaire cela donne la tache d’Airy :

$$\text{PSF}_{\text{cohérent}} = \mathcal{F}[E_{\text{pupille}}] = A_0 \left(\frac{2J_1(\pi x)}{\pi x} \right), \quad (\text{C.1})$$

avec A_0 l’amplitude au centre de la tache d’Airy, J_1 la fonction de Bessel de première espèce du premier ordre, $x = \frac{d \sin \theta}{\lambda}$, d le diamètre de l’ouverture, θ l’angle entre l’axe au centre de la pupille et la direction considérée, et λ la longueur d’onde.

C.1.2 Fonction de transfert

La fonction de transfert optique (FTO) est la transformée de Fourier de la PSF. Pour un éclairage cohérent et une pupille circulaire, c’est la transformée de Fourier de la tache d’Airy, ce qui redonne la fonction pupille :

$$\text{FTM}_{\text{cohérent}} = |\text{FTO}_{\text{cohérent}}| = |\mathcal{F}[\text{PSF}_{\text{cohérent}}]| = E_{\text{pupille}}. \quad (\text{C.2})$$

C.2 Éclairage incohérent

Un système d’imagerie en lumière incohérente est linéaire en intensité, et non pas en amplitude. Cela implique qu’en éclairage spatialement incohérent, la PSF du système est le module carré de la transformée de Fourier de la pupille :

$$\text{PSF}_{\text{incohérent}} = |\mathcal{F}[E_{\text{pupille}}]|^2. \quad (\text{C.3})$$

C.2.1 Fonction de transfert

La fonction de transfert optique est toujours la transformée de Fourier de la PSF. D'après le théorème de Wiener-Khintchine, la FTO est donc l'autocorrélation de la pupille :

$$\text{FTO}_{\text{incohérent}} = \mathcal{F} \left[|\mathcal{F}[E_{\text{pupille}}]|^2 \right] = \overline{E_{\text{pupille}} * E_{\text{pupille}}^*} \quad (\text{C.4})$$

Bibliographie

- [1] Robert W RODIECK et Robert W RODIECK : *The first steps in seeing*, volume 1. Sinauer Associates Sunderland, MA, 1998.
- [2] Imène SALAH-MABED : *Anatomical and methodological descriptions leading to optimize corneal refractive surgery procedures*. Theses, Université Paris-Saclay, juin 2018.
- [3] S. A. HUSSAIN, F. ALAHYANE, C. CROTTI, Z. ESSAÏDI, L. KOWALCZUK, K. PLAMANN et M. SCHANNE-KLEIN : Cell viability in the endothelium of porcine cornea exposed to ultrashort laser pulses. *In 2015 International Conference on BioPhotonics (BioPhotonics)*, pages 1–3, mai 2015.
- [4] P. GAIN, G. THURET, L. KODJIKIAN, Y. GAVET, P. H. TURC, C. THEILLERE, S. ACQUART, J. C. Le PETIT, J. MAUGERY et L. CAMPOS : Automated tri-image analysis of stored corneal endothelium. *British Journal of Ophthalmology*, 86(7):801–808, juillet 2002.
- [5] Gilles THURET, Chloé MANISSOLLE, Sophie ACQUART, Olivier GARRAUD, Lydia CAMPOS-GUYOTAT, Jean MAUGERY et Philippe GAIN : Urgent Need for Normalization of Corneal Graft Quality Controls in French Eye Banks. *Transplantation*, 78(9):1299, novembre 2004.
- [6] David M. MAURICE : The structure and transparency of the cornea. *J. Physiol.*, 136:263–286, 1957.
- [7] Alfred VOGEL et Vasan VENUGOPALAN : Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues. *Chemical Reviews*, 103(2):577–644, 2003. PMID : 12580643.
- [8] Tore FEUK : On the transparency of the stroma in the mammalian cornea. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, (3):186–190, 1970.
- [9] R W HART et R a FARRELL : Light scattering in the cornea. *Journal of the Optical Society of America*, 59(6):766–774, 1969.
- [10] G. B. BENEDEK : Theory of Transparency of the Eye. *Applied Optics*, 10(3):459–473, mars 1971.
- [11] V TWERSKY : Transparency of pair-correlated, random distributions of small scatterers, with applications to the cornea. *J Opt Soc Am*, 65(5):524–530, 1975.
- [12] K. M. MEEK, D. W. LEONARD, C. J. CONNOR, S. DENNIS et S. KHAN : Transparency, swelling and scarring in the corneal stroma. page 927, novembre 2003.

- [13] Xi CHENG et Peter M. PINSKY : Mechanisms of self-organization for the collagen fibril lattice in the human cornea. *Journal of the Royal Society Interface*, 10(87), 2013.
- [14] Xi CHENG et Peter M. PINSKY : The balance of fluid and osmotic pressures across active biological membranes with application to the corneal endothelium. *PLoS ONE*, 10(12), 2015.
- [15] Xi CHENG, Steven J PETSCHKE et Peter M PINSKY : A structural model for the in vivo human cornea including collagen-swelling interaction. *Journal of the Royal Society, Interface*, 12(109):20150241, août 2015.
- [16] K PLAMANN, F APTEL, C L ARNOLD, A COURJAUD, C CROTTI, F DELOISON, F DRUON, P GEORGES, M HANNA, J-M LEGEAIS, F MORIN, É MOTTAY, V NUZZO, D A PEYROT et M SAVOLDELLI : Ultrashort pulse laser surgery of the cornea and the sclera. *Journal of Optics*, 12:084002, 2010.
- [17] Richard O PRUM et Rodolfo TORRES : Structural colouration of avian skin : convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *Journal of Experimental Biology*, 206(14):2409–2429, 2003.
- [18] R. O. PRUM : Structural colouration of mammalian skin : convergent evolution of coherently scattering dermal collagen arrays. *Journal of Experimental Biology*, 207(12):2157–2172, mai 2004.
- [19] T. J. T. P. van den BERG, L. FRANSSEN et J. E. COPPENS : Ocular media clarity and straylight. *Encyclopedia of Eye*, 3:173–183, 2010.
- [20] Virendra N. MAHAJAN : Strehl ratio for primary aberrations : some analytical results for circular and annular pupils. *Journal of the Optical Society of America*, 72(9):1258, septembre 1982.
- [21] John P WHITCHER, M SRINIVASAN et Madan P UPADHYAY : Corneal blindness : a global perspective. *Bulletin of the world health organization*, 79:214–221, 2001.
- [22] Philippe GAIN, Rémy JULLIENNE, Zhiguo HE, Mansour ALDOSSARY, Sophie ACQUART, Fabrice COGNASSE et Gilles THURET : Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmology*, 134(2):167–173, février 2016.
- [23] P GARG, PV KRISHNA, AK STRATIS et U GOPINATHAN : The value of corneal transplantation in reducing blindness. *Eye*, 19(10):1106, 2005.
- [24] World Health ORGANIZATION *et al.* : Action plan for the prevention of avoidable blindness and visual impairment, 2009-2013. 2010.
- [25] Richard E BRAUNSTEIN, Sandeep JAIN, Russell L MCCALLY, Walter J STARK, Patrick J CONNOLLY et Dimitri T AZAR : Objective measurement of corneal light scattering after excimer laser keratectomy. *Ophthalmology*, 103(3):439–443, 1996.

-
- [26] Francisco E. FANTES, Khalil D. HANNA, George O. WARING, Yves POULIQUEN, Keith P. THOMPSON et Michelle SAVOLDELLI : Wound Healing After Excimer Laser Keratomileusis (Photorefractive Keratectomy) in Monkeys. *Archives of Ophthalmology*, 108(5):665–675, mai 1990.
 - [27] Clare O'DONNELL et James S WOLFFSOHN : Grading of corneal transparency. *Contact Lens and Anterior Eye*, 27(4):161–170, 2004.
 - [28] Chris P LOHMANN, George T TIMBERLAKE, Fred W FITZKE, David S GARTRY, Malcolm Kerr MUIR et John MARSHALL : Corneal light scattering after excimer laser photorefractive keratectomy : the objective measurements of haze. *Journal of Refractive Surgery*, 8(2):114–121, 1992.
 - [29] Corina van de POL, Koichi SOYA et David G HWANG : Objective assessment of transient corneal haze and its relation to visual performance after photorefractive keratectomy. *American journal of ophthalmology*, 132(2):204–210, 2001.
 - [30] Pierre-Jean PISELLA, Olivier AUZERIE, Yves BOKOBZA, Caroline DEBBASCH et Christophe BAUDOUIN : Evaluation of corneal stromal changes in vivo after laser in situ keratomileusis with confocal microscopy. *Ophthalmology*, 108(10):1744–1750, 2001.
 - [31] Jianhua WANG, Trefford L SIMPSON et Desmond FONN : Objective measurements of corneal light-backscatter during corneal swelling, by optical coherence tomography. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(10):3493–3498, 2004.
 - [32] Marion GIL, Silvia SOARE, Gaëlle GEORGES, Laure Siozade LAMOINE, Matthieu GONZALVEZ, Louis HOFFART, Camille GUERIN, Carole GARD, Gaëlle Ho Wang YIN et Carole DEUMIE : Detection of fine modifications in bulk corneal grafts based on backscattered light quantification. *Optics Communications*, 434:246–252, mars 2019.
 - [33] Edward A BOETTNER et Reimer WOLTER : Transmission of the ocular media. *Investigative Ophthalmology*, 1(6):8, 1962.
 - [34] Caroline CROTTI, Florent DELOISON, Fatima ALAHYANE, Florent APTEL, Laura KOWALCZUK, Jean Marc LEGEAIS, Donald A. PEYROT, Michèle SAVOLDELLI et Karsten PLAMANN : Wavelength optimization in femtosecond laser corneal surgery. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(5):3340–3349, 2013.
 - [35] J I PRYDAL, F FRANC, P N DILLY, M G KERR MUIR, M C CORBETT et J MARSHALL : Keratocyte density and size in conscious humans by digital image analysis of confocal images. *Eye (London, England)*, pages 337–42, 1998.
 - [36] S PATEL, J McLAREN, D HODGE et W BOURNE : Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Investigative ophthalmology & visual science*, 42(2):333–339, 2001.
 - [37] Steven J. GARDNER, Nick WHITE, Julie ALBON, Carlo KNUPP, Christina S. KAMMALORGER et Keith M. MEEK : Measuring the refractive index of bovine corneal stromal cells using quantitative phase imaging. *Biophysical journal*, 109(8):1592–1599, Oct 2015.
-

- [38] D. H. NAPPER : A diffraction theory approach to the total scattering by cubes. *Kolloid-Zeitschrift und Zeitschrift für Polymere*, 218(1):41–46, May 1967.
- [39] Keith M. MEEK, Sally DENNIS et Shukria KHAN : Changes in the refractive index of the stroma and its extrafibrillar matrix when the cornea swells. *Biophysical Journal*, 85(4):2205–2212, octobre 2003.
- [40] R. SCHIFFER et K. O. THIELHEIM : Light scattering by dielectric needles and disks. *Journal of Applied Physics*, 50(4):2476–2483, avril 1979.
- [41] Lord Rayleigh F.R.S : On the electromagnetic theory of light. *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science*, 12(73):81–101, août 1881.
- [42] Gustav MIE : Beiträge zur optik trüber medien, speziell kolloidaler metallösungen. *Annalen der Physik*, 330(3):377–445, 1908.
- [43] Donald A MCQUARRIE : *Statistical mechanics*. Harper & Row, New York, 1975. OCLC : 1529460.
- [44] Yifei HUANG et Keith M. MEEK : Swelling studies on the cornea and sclera : The effects of ph and ionic strength. *Biophysical Journal*, 77(3):1655–1665, septembre 1999.
- [45] Christian HAHNEL, Susanne SOMODI, Dieter WEISS et Rudolf GUTHOFF : The keratocyte network of human cornea : A three-dimensional study using confocal laser scanning fluorescence microscopy. *Cornea*, 19(2):185–193, mars 2000.
- [46] Xiaoi GUO et Ulrich RIEBEL : Theoretical direct correlation function for two-dimensional fluids of monodisperse hard spheres. *The Journal of Chemical Physics*, 125(14):144504, octobre 2006.
- [47] Jerome K. PERCUS et George J. YEVICK : Analysis of classical statistical mechanics by means of collective coordinates. *Physical Review*, 110(1):1–13, avril 1958.
- [48] Yuhua SONG, EA MASON et Richard M STRATT : Why does the carnanhan-starling equation work so well? *The Journal of Physical Chemistry*, 93(19):6916–6919, 1989.
- [49] C. BARRIO et J. R. SOLANA : Contact pair correlation functions and equation of state for additive hard disk fluid mixtures. *The Journal of Chemical Physics*, 115(15):7123–7129, octobre 2001.
- [50] M. BAUS et J. L. COLOT : Thermodynamics and structure of a fluid of hard rods, disks, spheres, or hyperspheres from rescaled virial expansions. *Physical Review A*, 36(8):3912–3925, octobre 1987.
- [51] Jerome J. ERPENBECK et Marshall LUBAN : Equation of state of the classical hard-disk fluid. *Phys. Rev. A*, 32:2920–2922, Nov 1985.
- [52] Thomas OLSEN et Steffen SPERLING : The swelling pressure of the human corneal stroma as determined by a new method. *Experimental Eye Research*, 44(4):481–490, janvier 1987.

- [53] D. HUANG, E. A. SWANSON, C. P. LIN, J. S. SCHUMAN, W. G. STINSON, W. CHANG, M. R. HEE, T. FLOTTE, K. GREGORY, C. A. PULIAFITO et Al ET : Optical coherence tomography. *Science*, 254(5035):1178–1181, novembre 1991.
- [54] Wolfgang DREXLER et James G. FUJIMOTO : *Optical Coherence Tomography : Technology and Applications*. Springer Science & Business Media, décembre 2008.
- [55] Johannes F. de BOER, Rainer LEITGEB et Maciej WOJTKOWSKI : Twenty-five years of optical coherence tomography : the paradigm shift in sensitivity and speed provided by fourier domain oct [invited]. *Biomedical Optics Express*, 8(7):3248, juillet 2017.
- [56] E. BEAUREPAIRE, A. C. BOCCARA, M. LEBEC, L. BLANCHOT et H. SAINT-JALMES : Full-field optical coherence microscopy. *Optics Letters*, 23(4):244–246, février 1998.
- [57] Arnaud DUBOIS, Laurent VABRE, Albert-Claude BOCCARA et Emmanuel BEAUREPAIRE : High-resolution full-field optical coherence tomography with a linnik microscope. *Applied Optics*, 41(4):805–812, février 2002.
- [58] Viacheslav MAZLIN, Peng XIAO, Eugénie DALIMIER, Kate GRIEVE, Kristina IRSCH, José-Alain SAHEL, Mathias FINK et A Claude BOCCARA : In vivo high resolution human corneal imaging using full-field optical coherence tomography. *Biomedical optics express*, 9(2):557–568, 2018.
- [59] Ugo TRICOLI et Rémi CARMINATI : A model for full-field optical coherence tomography in scattering media. *arXiv e-prints*, page arXiv :1908.01049, Aug 2019.
- [60] Boris KARAMATA : *Multiple scattering in wide-field optical coherence tomography*. Thèse de doctorat, École polytechnique fédérale de Lausanne, 2004.
- [61] Peng XIAO : A resolution insensitive to geometrical aberrations by using incoherent illumination and interference imaging. *The European Physical Journal Special Topics*, 226:1603 – 1621, 2017.
- [62] Joseph W GOODMAN : *Statistical optics*. John Wiley & Sons, 2015.
- [63] Andrew GELMAN, Daniel LEE et Jiqiang GUO : Stan : A Probabilistic Programming Language for Bayesian Inference and Optimization. *Journal of Educational and Behavioral Statistics*, 40(5):530–543, octobre 2015.
- [64] Stan.
- [65] R : The R Project for Statistical Computing.
- [66] Trevor PARK et George CASELLA : The Bayesian Lasso. *Journal of the American Statistical Association*, 103(482):681–686, juin 2008.
- [67] Himel MALLICK et Nengjun YI : A new Bayesian lasso. *Statistics and Its Interface*, 7(4):571–582, 2014.
- [68] Pascal PERNOT : The parameter uncertainty inflation fallacy. *The Journal of Chemical Physics*, 147(10):104102, septembre 2017.

- [69] Pascal PERNOT et Andreas SAVIN : Probabilistic performance estimators for computational chemistry methods : The empirical cumulative distribution function of absolute errors. *The Journal of Chemical Physics*, 148(24):241707, mars 2018.
- [70] IEC BIPM, ILAC IFCC, IUPAC ISO et OIML IUPAP : Evaluation of measurement data-guide to the expression of uncertainty in measurement (gum 1995 with minor corrections). *Joint Committee for Guides in Metrology, JCGM*, 100, 2008.
- [71] Kristina IRSCH, Kate GRIEVE, Marie BORDERIE, Djida GHOUBAY, Cristina GEORGEON et Vincent BORDERIE : Full-field optical coherence microscopy for histology-like analysis of stromal features in corneal grafts. *J. Vis. Exp.*
- [72] Steven L. JACQUES, Bo WANG et Ravikant SAMATHAM : Reflectance confocal microscopy of optical phantoms. *Biomedical Optics Express*, 3(6):1162–1172, mai 2012.
- [73] Romain BOCHEUX, Pascal PERNOT, Vincent BORDERIE, Karsten PLAMANN et Kristina IRSCH : Quantitative measures of corneal transparency, derived from objective analysis of depth-resolved corneal images, demonstrated with full-field optical coherence tomographic microscopy. *PLOS ONE*, 14(8):1–10, 2019.
- [74] Dennis GABOR : A new microscopic principle. 1948.
- [75] Joseph W GOODMAN : *Introduction to Fourier optics*. Roberts and Company Publishers, 2005.
- [76] Emmett N. LEITH et Juris UPATNIEKS : Reconstructed Wavefronts and Communication Theory*. *JOSA*, 52(10):1123–1130, octobre 1962.
- [77] Nicolas VERRIER et Michael ATLAN : Off-axis digital hologram reconstruction : some practical considerations. *Applied Optics*, 50(34):H136, 2011.
- [78] Myung K KIM : Digital holographic microscopy. In *Digital Holographic Microscopy*, pages 149–190. Springer, 2011.
- [79] Ulf SCHNARS, Claas FALLDORF, John WATSON et Werner JÜPTNER : Digital holography. In *Digital Holography and Wavefront Sensing*, pages 39–68. Springer, 2015.
- [80] Tatsuki TAHARA, Yasunori ITO, Yonghee LEE, Peng XIA, Junichi INOUE, Yasuhiro AWATSUJI, Kenzo NISHIO, Shogo URA, Toshihiro KUBOTA et Osamu MATOBA : Multiwavelength parallel phase-shifting digital holography using angular multiplexing. *Optics letters*, 38:2789–91, août 2013.

Titre : Caractérisation objective et quantitative de la transparence cornéenne par OCT plein champ et microscopie holographique

Mots clés : cornée, transparence, objectif, quantitatif, diffusion

Résumé : L'absence de transparence cornéenne est une cause majeure de cécité au plan mondial affectant plus de 10 millions de personnes. Cependant il n'existe pas d'outil clinique fiable permettant un diagnostic objectif et quantitatif. L'objectif de cette thèse est de répondre à ce besoin.

Nous avons d'abord développé un modèle de diffusion de la lumière dans la cornée, en collaboration avec Rémi Carminati (Institut Langevin), qui comprend peu de paramètres et rend compte des différents phénomènes de diffusion au sein de la cornée. Nous avons également analysé la nanostructuration des fibrilles de collagène (principaux constituants du stroma cornéen) à partir d'images de microscopie électronique en transmission, en modélisant le potentiel d'interaction entre les fibrilles avec un modèle simple à un seul paramètre.

En complément de cette analyse théorique nous avons étudié expérimentalement la lumière diffusée en transmission par un système de microscopie holographique numérique (DHM) et en réflexion à

l'aide d'un système de tomographie en cohérence optique plein champ (FF-OCT). La géométrie en transmission nous permet d'observer directement les effets de la diffusion sur la rétine et donc sur l'acuité visuelle des patients. La géométrie en réflexion est la seule utilisable en clinique.

Nous avons alors mis au point, en collaboration avec Pascal Pernot (Laboratoire de Chimie Physique), une analyse bayésienne qui permet d'extraire le libre parcours moyen de diffusion et ses éventuelles fluctuations en profondeur à partir d'images de cornées résolues en profondeur. Nous avons d'abord validé cette analyse sur des images d'OCT plein champ obtenues *ex vivo*. Puis nous avons montré la faisabilité de cette analyse *in vivo* en l'appliquant à des images d'OCT clinique et de lampe à fente, et nous avons obtenu une très bonne reproductibilité de nos mesures ainsi qu'une corrélation entre les mesures effectuées par les deux méthodes d'imagerie.

Title : Objective and quantitative assessment of corneal transparency using full-field OCT and digital holographic microscopy

Keywords : cornea, transparency, objective, quantitative, scattering

Abstract : Lack of corneal transparency is one of the leading causes of blindness worldwide, affecting over 10 million people. However, in current clinical and eye-bank practice there is a critical need for a reliable and easy-to-use tool for objective and quantitative characterisation, including monitoring ability, of corneal transparency. The goal of this thesis is to address this unmet need.

We have developed a physical model of light scattering in the cornea, in collaboration with Rémi Carminati (Institut Langevin), including as few parameters as possible, able to describe scattering properties of the cornea. We have also analysed the nanostructure of the collagen fibrills (main components of the corneal stroma) from transmission electron microscopy images, modeling the interaction potential between fibrils with only one parameter.

In addition to this theoretical analysis we have stu-

died scattered light in transmission using digital holographic microscopy (DHM) and in reflection using full field optical coherent tomography (FF-OCT). Transmission geometry enables us to observe the effects of light scattering on the retina and therefore to the visual acuity. Reflection geometry is the only one available in clinical practice. We have then developed, in collaboration with Pascal Pernot (Laboratoire de Chimie Physique), a Bayesian analysis that allows us to extract the scattering mean free path and its eventual fluctuations in depth. We first validated this analysis on *ex vivo* FF-OCT corneal images. Then we have demonstrated the feasibility of this analysis *in vivo* by applying it to clinical OCT and slit lamp images, and we have obtained very good reproducibility of our measurements as well as a correlation between the measurements made by the two imaging methods.