

COMPRENDRE

L'OCT plein champ

Arnaud DUBOIS¹, Claude BOCCARA²

¹ Laboratoire Charles Fabry, Institut d'Optique Graduate School, Université Paris Saclay, Palaiseau, France

² Institut Langevin, ESPCI Paris, CNRS, PSL University, Paris, France

arnaud.dubois@institutoptique.fr

Une première version de ces travaux est parue dans médecine/sciences vol. 22 (2006),

<https://doi.org/10.1051/medsci/20062210859> ; extraits reproduits avec la permission de médecine/sciences

La tomographie par cohérence optique, plus communément appelée par son acronyme anglais OCT (*optical coherence tomography*), est une technique d'imagerie non invasive des milieux biologiques, à résolution micrométrique, dont l'impact le plus remarquable concerne l'ophtalmologie. L'OCT « plein champ » est une approche originale de l'OCT, inventée par les auteurs de cet article, qui est désormais disponible commercialement. Après avoir exposé le principe de l'OCT plein champ, nous détaillerons ses performances en soulignant les avantages et les inconvénients par rapport à l'OCT classique. Les potentialités de cette technique seront illustrées par quelques exemples d'applications dans les domaines de l'embryologie, la biologie du développement, l'ophtalmologie et la cancérologie. Enfin, nous présenterons différentes extensions de l'OCT plein champ, exploitant la biréfringence des tissus ainsi que leurs propriétés spectroscopiques et élastiques. Les mouvements des structures intracellulaires dans les tissus fraîchement prélevés peuvent également constituer une source de contraste complémentaire pour l'imagerie par OCT plein champ.

L'OCT et ses variantes

L'OCT est fondée sur l'interférométrie en lumière polychromatique dite faiblement cohérente. Dans cette introduction, nous citons différentes variantes de l'OCT. Classiquement, l'OCT produit des images en coupe axiale (mode B comme en imagerie échographique), la dimension transverse de l'image étant obtenue par balayage d'un faisceau lumineux et la dimension axiale (la profondeur) en faisant varier la différence de marche dans l'interféromètre. Depuis son invention au début des années 1990 [1], l'OCT a connu de nombreux développements. Dans l'OCT spectrale (ou OCT de Fourier), le balayage de la différence de marche est remplacé par une mesure du spectre du signal interférométrique, ce qui conduit à une réduction spectaculaire du temps d'acquisition [2]. L'OCT en lumière polarisée, capable de révéler les propriétés optiques de

biréfringence, apporte des informations supplémentaires sur la structure et la composition des tissus [3]. L'OCT Doppler, permettant de mesurer des vitesses de déplacement, a ouvert la voie à l'étude des écoulements sanguins de très petite vitesse [4]. Par l'analyse de la variance du *speckle* présent dans les images d'OCT, on peut réaliser des cartographies angiographiques à haute résolution des tissus [5]. L'OCT plein champ est une approche conceptuellement différente de l'OCT classique qui utilise comme détecteur une caméra matricielle (CCD ou CMOS). Des images en coupes transverses sont obtenues sans balayage à partir d'une combinaison d'images interférométriques acquises au moyen d'un microscope interférométrique éclairé par une source de lumière de faible cohérence, initialement une source de lumière thermique (lampe halogène) [6] et plus récemment une diode électroluminescente (LED) [7].

Principe et performances de l'OCT plein champ

Le dispositif expérimental de l'OCT plein champ (*figure 1*) est basé sur un interféromètre de Michelson avec un objectif de microscope placé dans chacun des deux bras, configuration dite de Linnik. Le système d'illumination représenté ici est une lampe halogène à filament de tungstène. À cause du spectre très large de cette lumière, des interférences se produisent à condition que la différence de marche dans l'interféromètre soit très proche de zéro. La longueur du bras de référence de l'interféromètre détermine, au niveau de l'objet à imager, une tranche d'épaisseur Δz fixée par la largeur du spectre de la source lumineuse. Seule la lumière réfléchie par les structures de l'objet situées dans cette tranche crée des interférences. Ces structures peuvent être imagées si l'on parvient à extraire l'amplitude du signal d'interférence. Pour cela, on combine

plusieurs images interférométriques déphasées entre elles grâce à l'oscillation du miroir de référence [6]. On obtient ainsi par calculs, à la cadence de quelques hertz, l'image d'une fine tranche dans l'objet, orientée transversalement.

La résolution transverse des images d'OCT plein champ est similaire à celle des images fournies par un microscope, soit environ 1 µm. En OCT traditionnelle, la résolution transverse est largement inférieure car une grande profondeur de champ est requise pour produire des images orientées axialement sans réajuster la mise au point. Notons que des images transverses peuvent également être obtenues en OCT traditionnelle en balayant un faisceau spatialement cohérent dans le plan transverse [8]. La résolution transverse peut alors atteindre celle de l'OCT plein champ.

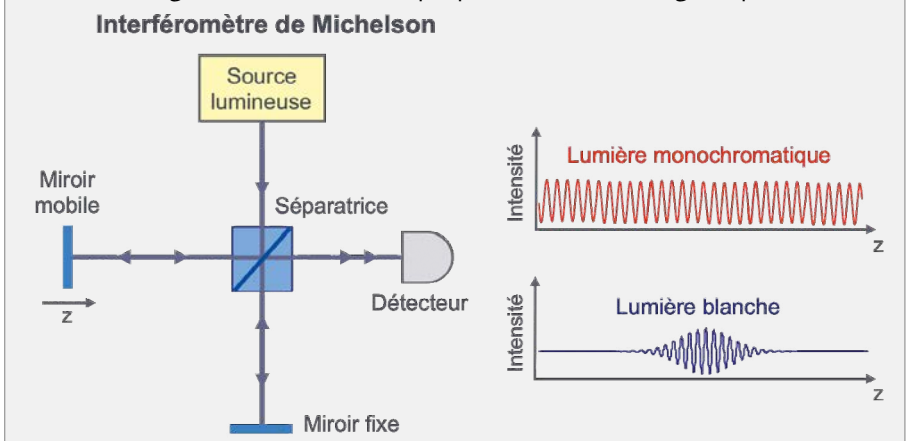
En OCT, la résolution axiale est indépendante de la résolution transverse ; elle est déterminée par la largeur du spectre de la source de lumière. Dans notre cas, le spectre effectif est limité par la réponse spectrale de la caméra. Ce spectre est centré ici à la longueur d'onde $\lambda = 0,8 \mu\text{m}$ et présente une largeur à mi-hauteur $\Delta\lambda = 300 \text{ nm}$. La résolution axiale, donnée par la formule

$$\Delta z = \frac{2 \ln 2}{\pi} \left(\frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} \right)$$

vaut alors $\Delta z = 0,7 \mu\text{m}$ lorsque l'objet est constitué d'eau essentiellement (indice

Influence de la largeur spectrale en interférométrie

Dans l'interféromètre de Michelson, le faisceau lumineux émis par la source est divisé en deux par une interface semi-réfléchissante (séparatrice). Après l'aller-retour dans les deux bras de l'interféromètre, les faisceaux sont recombinaés et interfèrent. L'intensité lumineuse résultante dépend de la différence de trajet optique dans les deux bras (différence de marche). On fait varier la différence de marche en déplaçant l'un des miroirs. Si la lumière est monochromatique, l'intensité détectée varie sinusoidalement. Si la lumière est blanche (spectre large), les interférences sont observables seulement au voisinage de la différence de marche nulle. La plage sur laquelle se produisent les interférences correspond à la longueur de cohérence de la lumière, grandeur inversement proportionnelle à la largeur spectrale.



de réfraction $n = 1,33$). L'utilisation d'objectifs à immersion à eau permet de maintenir la résolution axiale au cours de l'exploration en profondeur de l'objet en maintenant la même dispersion chromatique dans les deux bras de l'interféromètre. Avec une simple lampe halogène ou une LED large bande, la résolution est identique à

celle obtenue en OCT à balayage avec un laser émettant des impulsions de 5 femtosecondes. Le spectre d'une source thermique ou d'une LED est plus lisse, ce qui évite les artefacts dans les images résultant de la présence d'oscillations dans l'enveloppe de interférogramme.

Finalement, l'OCT plein champ offre une résolution spatiale isotrope d'environ 1 µm sans avoir recours, comme en microscopie confocale, à des objectifs de microscope de très grande ouverture numérique qui limitent l'imagerie en profondeur à cause des aberrations optiques.

La sensibilité de détection et la dynamique de l'OCT sont capitales pour réaliser des images dans la profondeur des milieux biologiques malgré la diffusion importante de la lumière. Les performances de l'OCT plein champ dépendent essentiellement de la capacité de charge des pixels de la caméra, c'est-à-dire du nombre de photoélectrons pouvant être stockés dans le « puits » de chaque pixel. La faiblesse de cette capacité de charge (10^5 à 10^6) peut être compensée par l'accumulation de plusieurs images. Une sensibilité de l'ordre de 90 dB peut être atteinte (un coefficient

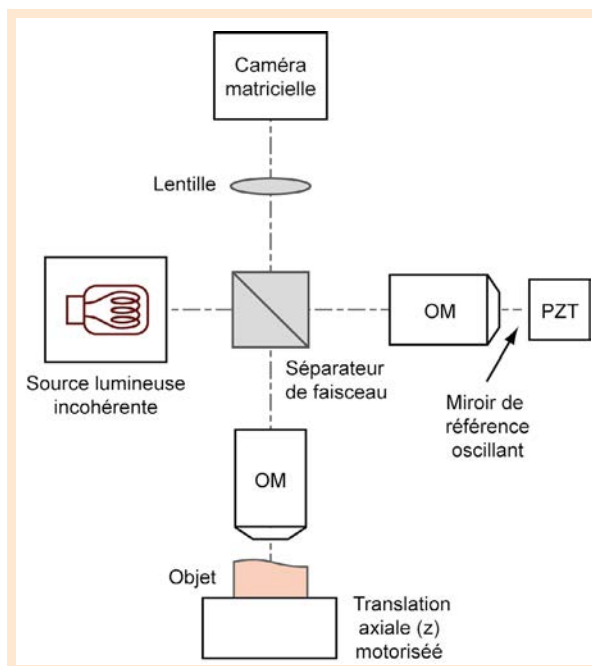


Figure 1. Schéma de principe de l'OCT plein champ, basé sur un interféromètre de Michelson avec des objectifs de microscope (OM) à immersion à eau, éclairé au moyen d'une source de lumière incohérente. Les images tomographiques (coupes transverses) sont calculées à partir d'images interférométriques, enregistrées par une caméra matricielle (CCD ou CMOS), et déphasées entre elles grâce à l'oscillation du miroir de référence induite par un système piézoélectrique (PZT).

de réflexion de 10^{-9} soit 90 dB est équivalent à un miroir qui, recevant un milliard de photons, n'en réfléchirait qu'un seul).

La caméra matricielle utilisée en OCT plein champ permet l'acquisition du signal en parallèle par des millions de pixels à la cadence vidéo. Toutefois, le temps d'acquisition de chaque pixel est considérablement plus long que dans la technique d'OCT à balayage où le temps d'acquisition par pixel, très bref, évite le brouillage éventuel du signal d'interférence à cause des mouvements. Ces derniers peuvent seulement engendrer des distorsions dans l'image, corrigées numériquement après l'acquisition. Malgré une plus grande sensibilité aux mouvements de l'objet, l'OCT plein champ présente un avantage certain : sa très haute résolution spatiale obtenue avec une source de lumière simple. En outre, l'OCT plein champ évite le recours à un système de balayage de faisceau lumineux. L'OCT plein champ constitue une alternative avantageuse à l'OCT à balayage pour les applications d'imagerie tridimensionnelle à très haute résolution spatiale de la structure interne d'objets biologiques quasi-statiques.

Applications de l'OCT plein champ

Les examens histologiques sont très courants en biologie et en médecine. Ils nécessitent une préparation parfois longue et délicate de l'échantillon avant

l'observation au microscope. Une coloration est généralement nécessaire pour apporter du contraste à l'image. L'OCT plein champ peut être utilisée pour effectuer des examens histologiques beaucoup plus rapidement, sans préparation de l'échantillon et sans utiliser d'agent de contraste. À partir d'une pile d'images en coupe, on peut ensuite calculer des coupes selon des orientations quelconques. Des images en trois dimensions peuvent également être produites avec une résolution spatiale proche de celle de l'histologie standard. Nous avons utilisé l'OCT plein champ pour des études dans le domaine de l'embryologie. On peut voir sur la *figure 2* un exemple d'images réalisées chez le têtard de grenouille africaine *Xenopus Laevis*. L'animal (*ex vivo*) était placé dans une solution de DPBS (Dulbecco's phosphate buffered saline) pour conservation, et une pile de 500 images tomographiques a été enregistrée avec un pas de $0,5 \mu\text{m}$. Diverses structures, notamment les noyaux et membranes de cellules, sont révélées. Cet animal modèle des batraciens pour la biologie du développement a été très utilisé pour démontrer les performances de l'OCT à haute résolution.

L'embryon de souris est un modèle de choix pour l'étude du développement des mammifères. La *figure 3* montre des images d'un embryon âgé de 6,5 jours. L'OCT plein champ s'est avérée être un outil précieux pour l'étude, de manière

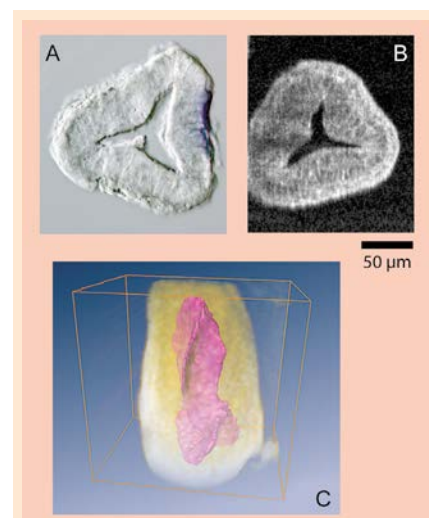


Figure 3. Images d'un embryon de souris âgé de 6,5 jours. A. Coupe histologique observée au microscope de Nomarski. B. Image tomographique obtenue par OCT plein champ à partir d'un embryon entier sans préparation. C. Image 3D de la cavité proamniotique reconstruite à partir d'une pile d'images tomographiques (comme l'image B). Extrait de : A. Dubois, A.C. Boccara, Full-Field OCT, *Medicine Sciences* **22**, 859-864 (2006).

non invasive, des mécanismes régissant l'établissement de l'axe antéro-postérieur [9]. Outre un gain en temps considérable, l'OCT plein champ a permis d'éviter tout risque d'endommager ou de déformer l'embryon.

Nous avons réalisé des images par OCT plein champ des différents éléments constitutifs des segments antérieurs et postérieurs de l'œil de diverses espèces animales (rat, lapin, chat et porc) [10]. Un exemple d'images de la cornée, du cristallin et de la rétine de l'œil de rat est présenté sur la *figure 4*. Les échantillons prélevés étaient placés dans un récipient rempli d'une solution de DPBS. Dans la cornée, on peut discerner les cellules épithéliales. Les membranes de Bowman et de Descemet sont visibles, ainsi que la structure du stroma contenant des kératocytes. Notons que le contour irrégulier de la membrane basale résulte vraisemblablement d'un endommagement de l'échantillon lors du transport. Dans le cristallin, la capsule, la couche de cellules épithéliales et les fibres corticales sont révélées. Enfin, les différentes couches de la rétine sont parfaitement identifiables. Le réseau de fibres nerveuses peut être visualisé sur

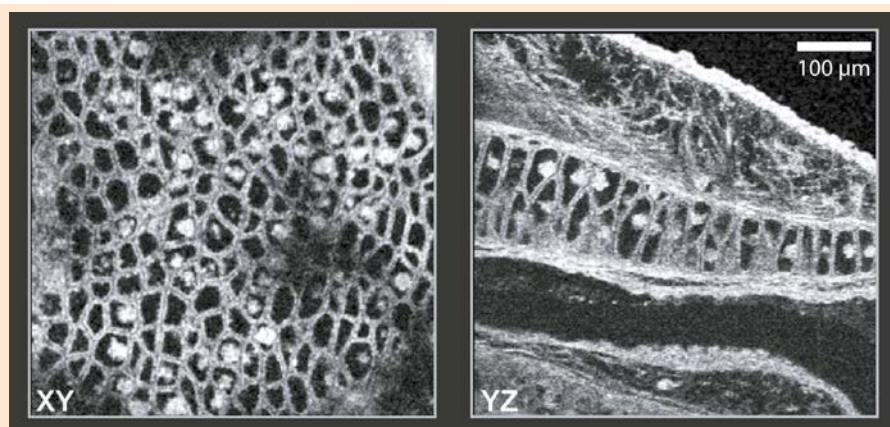


Figure 2. Images tomographiques réalisées dans la tête du têtard de grenouille africaine *Xenopus Laevis* (*in vitro*). L'axe Z est l'axe optique de l'objectif de microscope. Les images sont prises sous forme de piles de coupes transverse (XY). À partir de ces piles, nous reconstituons d'autres coupes, ici dans le plan YZ. La résolution isotrope de 1 micromètre de l'OCT plein champ permet la visualisation de structures cellulaires. Différents stades de la mitose peuvent être observés. Extrait de : A. Dubois, A.C. Boccara, Full-Field OCT, *Medicine Sciences* **22**, 859-864 (2006).

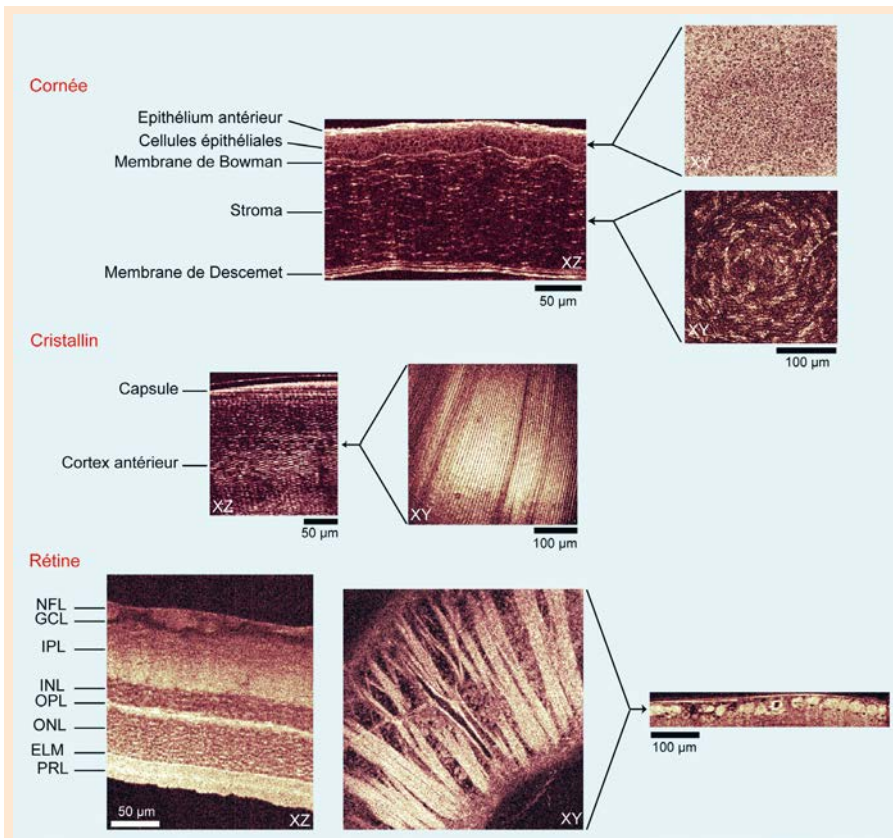


Figure 4. Images obtenues par OCT plein champ de cornée, cristallin et rétine prélevés dans un œil de rat. NFL : couche des fibres nerveuses ; GCL : couche des cellules ganglionnaires ; IPL : couche plexiforme interne ; INL : couche granulaire interne ; OPL : couche plexiforme externe ; ONL : couche granulaire externe ; ELM : membrane limitante externe ; PRL : couche des photorécepteurs. Extrait de : A. Dubois, A.C. Boccara, Full-Field OCT, *Medecine Sciences* 22, 859-864 (2006).

l'image transverse (XY), ainsi que des cellules ganglionnaires sur la coupe axiale.

L'application au diagnostic « peropératoire » ou à l'analyse des biopsies dans le traitement du cancer du sein a fait l'objet de nombreuses études pour lesquelles le contraste morphologique des tissus a suffi pour obtenir de très bons scores en termes de sensibilité et en spécificité [11]. À titre d'exemple, la figure 5 montre une zone cancéreuse intra canalaire *in situ* avec la structure du collagène qui entoure la zone. Cependant les cellules cancéreuses sont quasiment invisibles car ce sont des objets très transparents qui rétrodiffusent très peu de lumière à la différence du collagène.

Pour quitter le domaine biomédical et toucher au domaine de la sécurité nous avons utilisé l'OCT plein champ pour imager les empreintes digitales internes qui se trouvent à plusieurs centaines de microns sous la surface de la peau, ne s'érodent pas par frottement ou attaque chimique et sont infalsifiables [12].

Extensions de l'OCT plein champ

Les propriétés de réflexion et d'absorption de la lumière par les tissus sont la source du contraste des images d'OCT, révélatrices d'informations

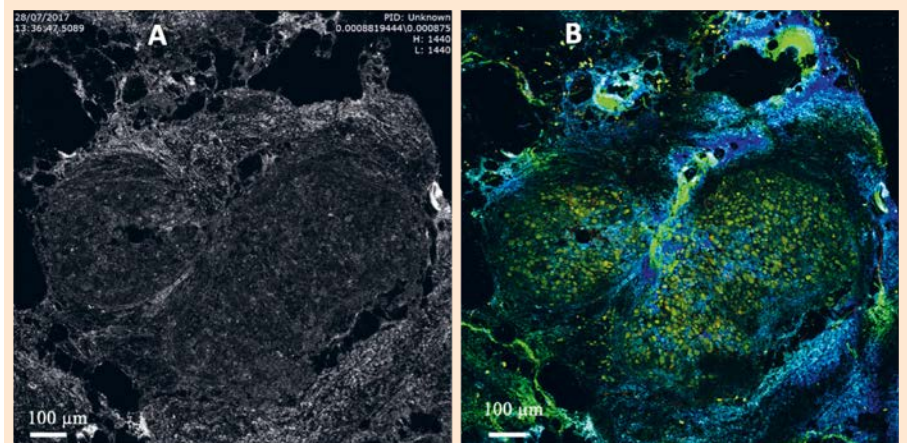


Figure 5. OCT plein champ statique (A) et OCT plein champ dynamique (B) d'une tumeur intra canalaire *in situ*. L'activité métabolique apporte un contraste cellulaire exploité en OCT plein champ dynamique. Images LLTech et Institut Gustave Roussy. Sur le sujet cancer, voir les nombreuses images sur le site : <http://www.lltechimaging.com/>

morphologiques. Nous avons développé une extension à l'OCT plein champ pour mesurer également la biréfringence, une propriété optique qui se traduit par une modification de la polarisation de la lumière [13]. Ce mode de contraste apporte des informations supplémentaires sur la structure et la composition de l'objet.

La profondeur pouvant être explorée par l'OCT est déterminée par les phénomènes de diffusion et d'absorption de la lumière. La diffusion diminue rapidement quand la longueur d'onde augmente depuis le visible jusqu'à l'infrarouge. L'absorption dans les milieux biologiques est dominée par diverses bandes de résonance. Dans le proche infrarouge, autour de 0,8 µm, l'absorption est relativement faible. La diffusion est alors le mécanisme d'atténuation largement prédominant. À des longueurs d'ondes plus grandes, au-delà de 2 µm, l'absorption par l'eau devient prédominante. Des études comparatives, dans les milieux fortement diffusants tels que la peau, ont montré une meilleure pénétration autour de la longueur d'onde de 1,3 µm plutôt que 0,8 µm, mais avec une résolution réduite [14]. C'est pourquoi nous avons développé des dispositifs d'OCT plein champ multispectraux pour imager dans plusieurs bandes spectrales distinctes. En utilisant une seule source de lumière de très large spectre (lampe halogène) et deux caméras différentes dont une ayant un capteur en arséniure

de gallium indium (InGaAs) dont la réponse spectrale se situe entre 0,9 μm et 1,7 μm , des images d'OCT plein champ peuvent être acquises simultanément aux longueurs d'ondes centrales de 0,7 μm et 1,2 μm [15]. Avec une seule caméra InGaAs à réponse spectrale étendue dans le visible, nous avons démontré la possibilité d'acquérir des images dans 3 bandes spectrales centrées à 635 nm, 870 nm et 1170 nm [16].

Toujours à la recherche de nouvelles formes de contraste qui puissent enrichir les images morphologiques fournies par l'OCT plein champ, mentionnons les mesures des propriétés élastiques des tissus : la carte d'élasticité peut être obtenue en statique par corrélation 3D [17] en dynamique en mesurant la vitesse des ondes de cisaillement [18] avec une caméra ultrarapide ou par des méthodes de corrélation liées à l'utilisation de l'opérateur de renversement temporel [19].

En ce qui concerne le diagnostic peropératoire, nous avons pu tirer parti du fait que les cellules ont encore une activité métabolique (qui se maintient de quelques heures à une journée selon les tissus) pour enregistrer la dépendance temporelle des signaux de chaque pixel du champ d'observation. Les structures comme le collagène ou les axones sont fixes à l'échelle du temps d'enregistrement (de l'ordre de la seconde), aussi les mouvements des structures intracellulaires comme les mitochondries ou des vésicules peuvent-ils être enregistrés. Dans la représentation de la zone cancéreuse de la *figure 5*, l'intensité est liée à la puissance du signal, tandis que la couleur et sa saturation sont liées à la fréquence du signal et à son spectre [20].

POUR EN SAVOIR PLUS

[1] Huang D. et al. *Science* 1991; 254 : 1178
 [2] Leitgeb R.A. et al. *Opt Express* 2004; 12 : 2156
 [3] De Boer J.F. et al. *Opt Lett* 1997; 22 : 934
 [4] Westphal V. et al. *Opt Lett* 2002; 27 : 34
 [5] Mahmud M.S. et al. *Biomed Opt* 2013 ; 18 : 50901
 [6] Vabre L. et al. *Opt Lett* 2002; 27 : 530
 [7] Ogien J., Dubois A. *Opt Express* 2016; 24 : 9922
 [8] Izatt J.A. et al. *Opt Lett* 1994; 19 : 590
 [9] Perea-Gomez A. et al. *Curr Biol* 2004; 14 : 197
 [10] Grieve K. et al. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45 : 4126
 [11] Assayag O. et al. *TCRT Express* 2014; 13 : 455
 [12] Aukorius E., Boccara C. *Biomedical Optics Express* 2015; 6 : 4465
 [13] Moneron G. et al. *Opt Lett* 2007; 32 : 2058
 [14] Alex A. et al. *Biomed Opt* 2010; 15 : 026025
 [15] Sacchet D. et al. *Opt Express* 2008; 16 : 19434
 [16] Federici A., Dubois A. *Opt Lett* 2014; 39 : 1374
 [17] Nahas A. et al. *Biomedical Optics Express* 2013; 4 : 2138
 [18] Nahas A. et al. *Biomed Opt* 2013; 18 : 121514
 [19] Nguyen T. et al. *Biomed Opt* 2016; 21 : 126013
 [20] Apelian C et al. *Biomedical Optics Express* 2016; 7 : 1511



HORIBA Scientific développe des instruments haut de gamme pour la science et l'industrie

Analyse moléculaire et microanalyse

- Spectroscopie Raman et AFM
- Cathodoluminescence
- Fluorescence
- Résonance de Plasmons de Surface par imagerie

Analyse élémentaire

- ICP-OES
- Analyseurs C/S et O/N/H
- Analyseurs XRF et μXRF
- Analyseurs S dans les produits pétroliers
- Préparation des échantillons

Spectroscopie optique

- Réseaux de diffraction
- Détecteurs
- Spectromètres OEM
- Monochromateurs

Caractérisation de Surfaces et Couches Minces

- Ellipsométrie
- GD-OES
- PP-TOFMS™

Caractérisation des particules

- Diffraction laser
- Diffusion de la lumière
- Potentiel zéta

Sciences criminalistiques

- Sources de lumière
- Logiciel de traitement de l'image
- Bases de données