Chirurgie du segment antérieur de l'oeil et traitement du glaucome par laser femtoseconde et imagerie de tomographie par cohérence optique

Caroline Crotti

▶ **To cite this version:**

Caroline Crotti. Chirurgie du segment antérieur de l'oeil et traitement du glaucome par laser femtoseconde et imagerie de tomographie par cohérence optique. Optique [physics.optics]. Ecole Polytechnique X, 2011. Français. NNT : . tel-00655580

HAL Id: tel-00655580
https://theses.hal.science/tel-00655580

Submitted on 31 Dec 2011

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

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

Thèse
Présentée pour obtenir le titre de
Docteur de l'École Polytechnique
Spécialité : Physique

par
Caroline Crotti

Chirurgie du segment antérieur de l'œil et traitement du glaucome assistés par laser femtoseconde et imagerie de tomographie par cohérence optique

Thèse soutenue le 30 septembre 2011

Membres du Jury :

Antoine Courjaud	
Frédéric Druon	
Benoît C. Forget	Rapporteur
Philippe Gain	Rapporteur
Manuel Joffre	Président du jury
Jean-Marc Legeais	
Karsten Plamann	Directeur de thèse
Marie-Claire Schanne-Klein	

Préparée au Laboratoire d'Optique Appliquée
ENSTA ParisTech – École polytechnique – CNRS UMR 7639
Palaiseau, France

Remerciements

Je remercie Antoine Rousse, directeur du Laboratoire d'Optique Appliquée de m'avoir accueillie ces trois années au laboratoire. Je remercie le CNRS pour la bourse de doctorat qui m'a été accordée pour ces trois années, ainsi que l'école doctorale de l'École Polytechnique et l'Agence Nationale de la Recherche pour le financement de deux projets de recherche obtenu par le groupe OPS. Je remercie le Pr. Benoit Forget de l'Université Paris Descartes et le Pr. Philippe Gain du Laboratoire d'Ingénierie et d'Imagerie biomédicale de Saint Etienne pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon manuscrit, et également les autres membres du jury : le Dr. Antoine Courjaud de la société Amplitude Systèmes (Pessac), le Dr. Frédéric Druon de l'Institut d'Optique, le Pr. Manuel Joffre et le Dr. Marie-Claire Schanne-Klein du Laboratoire d'Optique et Bioscience, ainsi que le Pr. Jean-Marc Legeais de l'hôpital l'Hôtel Dieu de Paris. Je remercie la Banque Française des Yeux et Isabelle Sourati en particulier pour les cornées obtenues, m'ayant permis d'obtenir de tels résultats.

J'ai eu le plaisir de travailler pendant ces trois années au sein du groupe dynamique et très sympathique qu'est le groupe « Optique, Photonique et Santé » (OPS), groupe qu'il est difficile de quitter sans éprouver de regret.

Je tiens tout d'abord à remercier Karsten Plamann pour m'avoir proposé un sujet passionnant, pour m'avoir guidée dans mes recherches au cours de ces trois années, pour m'avoir donné de judicieux conseils, pour m'avoir soutenue jusque dans les dernières étapes du doctorat, pour avoir été attentif et rigoureux pour l'écriture de ce manuscrit, pour avoir proposé aux membres du groupe de si nombreux et agréables moments chez lui ou ailleurs, et finalement pour avoir été un super directeur de thèse.

Je tiens ensuite à remercier les différents membres actuels et passés du groupe OPS. Je tiens en premier lieu à remercier Florent Deloison avec qui j'ai appris beaucoup notamment sur la technologie des lasers, grâce aux expériences partagées au cours de mes deux premières années de doctorat. Je lui souhaite beaucoup de bonheur sur Bordeaux avec sa petite famille.

Je remercie Donald Peyrot, avec qui j'ai partagé le bureau pendant près de deux ans et de nombreuses discussions. Il a également été d'une aide précieuse lors de mes premières expériences.

Je remercie Florent Aptel pour m'avoir beaucoup aidé lors de mes premiers mois au sein du groupe et pour avoir toujours été présent pour répondre à mes questions au cours de ces trois années. Je le remercie pour le temps qu'il a passé sur des yeux de porc pour essayer d'en prélever un échantillon fin et homogène de sclère!

Je remercie Laura Kowalczuk pour m'avoir aidée à obtenir de si beaux résultats au cours de cette année. Je la remercie aussi pour tous ses conseils et ses connaissances concernant l'œil, en particulier ses relectures attentives de mon manuscrit. Je la remercie aussi pour la motivation mutuelle à participer aux cours de fitness du midi.

Je remercie Fatima Alahyane pour le travail effectué à la suite de mon stage de master 2 sur les programmes de la fameuse mire… Je la remercie également pour sa bonne humeur et son aide.

Je remercie Mas Bayleyegn pour sa gentillesse et nos moments partagés autour de l'OCT du projet NOUGAT. Je lui souhaite une belle réussite pour la fin de sa thèse.

Je remercie Tal Marciano et Asad Hussain et je leur souhaite de s'épanouir au sein du groupe pendant leurs années de doctorat.

Je remercie également Simon Lemaire pour avoir été un super stagiaire. Je lui souhaite également beaucoup de réussite pour son doctorat dans la voie des mathématiques appliquées!

Je remercie Valeria Nuzzo qui m'a permis, suite à notre rencontre fin 2007, de prendre la bonne décision de faire mon doctorat au sein du groupe OPS.

Je remercie Barbara Mansart et Nunzia Savoia, qui ont toutes deux quittées le laboratoire, pour m'avoir soutenue jusqu'au bout de ma thèse. A l'issue de ce doctorat, je rejoins d'ailleurs Barbara en Suisse, à quelques dizaines de km de son laboratoire.

Je remercie Gaël Latour pour son aide et ses connaissances, ainsi que pour le partage de ses émotions à l'arrivée de Titouan.

Je remercie chaleureusement Michèle Savoldelli sans qui tous ces résultats ne pourraient pas être présentés. Je la remercie d'être toujours disponible pour discuter ou boire un café, de toujours avoir trouvé du temps pour me faire quelques coupes (d'histologie). Je la remercie aussi pour sa gentillesse. Je lui souhaite beaucoup de bonheur avec Enzo et Luka…

Merci à Jean-Lou pour toutes les pièces faites dans l'urgence ou non, qui correspondaient toujours à nos attentes voire encore mieux. Je le remercie pour tous les cafés offerts, pour tous les repas partagés ensemble, ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité. Je lui souhaite de belles virées avec sa Ducati. Merci également à Mickael pour les pièces réalisées.

Merci à Alain pour sa présence et son aide, notamment lors d'impression de documents importants… Je le remercie aussi pour ses conseils avisés concernant l'escalade. Merci également à Maxime.

Je remercie Olivier Albert pour ses conseils et sa bonne humeur. Je remercie également les secrétaires Sandrine, Claudine, Octavie et Patricia.

Finalement, je remercie tous mes amis, dont certains soutiennent leurs thèses en cette fin d'année 2011, je remercie Pierre tout particulièrement (l'année 2012 sera riche en émotions), je remercie ma mère, ma grand-mère et ma sœur, ainsi que le reste de ma famille, pour m'avoir soutenue et encouragée tout au long de ces trois années. Merci à tous ceux qui sont venus m'encourager le vendredi 30 septembre et merci à tous les lecteurs de ce manuscrit.

Résumé en français

Mon projet de thèse est étroitement lié au projet ANR NOUGAT, « Nouvel OUtil pour la chirurgie du Glaucome Assistée par laser femtoseconde et Tomographie par cohérence optique » (ANR-08-TECS-012), coordonné par le groupe « Optique, Photonique, Santé » (OPS) du Laboratoire d'Optique Appliquée (LOA), et dont les partenaires sont : l'hôpital Hôtel-Dieu de Paris, le laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique *Graduate School*, la société Amplitude Systèmes.

Le glaucome est une maladie oculaire associée à une pression intraoculaire élevée. Les traitements chirurgicaux classiques visent à créer des canaux filtrants dans la sclère pour baisser la pression, mais les bénéfices ne sont souvent que temporaires. La greffe de cornée est indiquée lors d'opacités du tissu ou pathologies affectant la transparence cornéenne. Elle est largement pratiquée mais certaines limites existent, notamment lorsque la découpe doit se faire en profondeur d'un tissu pathologique.

Mes travaux ont d'abord consisté à caractériser les trois principaux éléments constitutifs du segment antérieur de l'œil : la cornée, la sclère et le cristallin. Suite aux recherches précédentes menées par notre équipe, la diffusion de la cornée est maintenant un phénomène compris et quantifiable. L'étude du tissu scléral a permis de mettre en évidence une fenêtre de relative transparence optique centrée à la longueur d'onde de 1650 nm ; des expériences préliminaires ont été menées sur le cristallin. Grâce à l'optimisation de sources laser existantes au sein de l'équipe, en particulier du générateur paramétrique optique, de nouvelles séries d'incisions ont ensuite été réalisées dans des cornées humaines (obtenues auprès de la Banque Française des Yeux), avec des longueurs d'onde situées entre 1500 et 1800 nm. Les analyses histologiques et par microscopie électronique en transmission et à balayage de ces découpes confirment que l'utilisation d'une longueur d'onde entre 1600 et 1700 nm réduit le phénomène de diffusion dans le tissu par rapport à la longueur d'onde appliquée dans les systèmes commerciaux (1000 nm).

Par ailleurs, un dispositif d'imagerie par tomographie par cohérence optique (OCT) a été développé en étroite collaboration avec l'Institut d'Optique *Graduate School*. Utilisant une longueur d'onde de 1315 nm, ce dispositif a une résolution de l'ordre de 5 µm, ce qui est compatible avec notre application ; cependant, il présente encore une rapidité d'acquisition moyenne. Les structures cornéennes ont été imagées avec trois dispositifs OCT disponibles, ce qui a permis de comparer leurs avantages et leurs inconvénients en vue de la combinaison de ce système d'imagerie à la source laser et d'une éventuelle application clinique.

Mes travaux de recherche ont finalement permis d'optimiser le développement de systèmes chirurgicaux pour les tissus du segment antérieur de l'œil et d'approfondir nos connaissances sur l'optique de ces tissus, ce qui vient compléter les études antérieures réalisées au sein de mon équipe de travail et ouvre la voie à des applications futures.

Résumé en anglais

My PhD project is closely related to the ANR project named “NOUGAT” which consists of developing a new tool for glaucoma surgery assisted by femtosecond laser and optical coherence tomography (OCT) [ANR-08-TECS-012]. This project is coordinated by the “Optics –Photonics – Health” group of the Laboratory of Applied Optics (LOA) and our partners are the Hôtel-Dieu hospital, the Charles Fabry Laboratory of the Institut d'Optique Graduate School and the company Amplitude Systèmes.

Glaucoma is an ocular disease associated with an increase of the intraocular pressure. Surgical treatments consist in creating filtrating canals in deep sclera in order to lower the pressure; however benefits are often only temporary. Corneal grafting is indicated when reduced corneal transparency (visual acuity) is observed. This is the most common transplant but some limits of the laser procedure exist, especially when the incision has to be made in the depth of a pathological tissue.

First, my PhD work consists in the characterization of the three main elements of the ocular anterior segment: the cornea, the sclera and the crystalline lens. The light scattering occurring into the cornea is now well understood and it can be quantified. Studies of the scleral tissue have also shown an optical transparency window around 1650 nm, and some preliminary experiments have been performed on the crystalline lens. Thanks to the optimization of laser sources already developed in the group, especially the optical parametric generator, new series of incisions on human corneas from the French eye bank (Paris), have been performed with wavelengths in the 1500 – 1800 nm spectral range. Analysis by histology and by transmission and scanning electronic microscopy of these new incisions confirm that the use of a longer wavelength in the 1600 – 1700 nm range greatly reduces the light scattering in the tissue compared to the one obtained with commercial systems (at 1000 nm).

In addition, a new imaging system based on OCT has been developed in close collaboration with our colleagues from the Institut d'Optique Graduate School. Using a wavelength of 1315 nm, the system has a spatial resolution of 5 µm that is compatible with our medical application even if the acquisition rate stills quite low. Corneal structures have been imaged with three different available systems which makes the comparison of the specifications possible.

Eventually, my PhD project leads to an optimization of laboratory surgical systems for the anterior segment of the eye and to the consolidation of knowledge on tissue optics, completing anterior studies conducted by my working group and opening new ways for future applications.

Table des matières

Remerciements **3**
Introduction **11**
Chapitre 1 Anatomie du segment antérieur de l'œil **15**
1 L'œil 15
1.1 Présentation générale 15
1.2 Segment postérieur de l'œil 16
1.2.1 La rétine 16
1.2.2 La choroïde 17
1.2.3 La sclère 17
1.2.4 L'humeur vitrée 17
2 Le segment antérieur de l'œil 17
2.1 La cornée 18
2.1.1 Anatomie et histologie de la cornée 18
2.1.2 Propriétés optiques de la cornée 21
2.2 La sclère 24
2.2.1 Anatomie et histologie de la sclère 24
2.2.2 Propriétés optiques de la sclère 26
2.3 L'humeur aqueuse 27
2.4 L'iris 28
2.5 Le cristallin 28
2.5.1 Structure et fonction du cristallin 28
2.5.2 Transparence du cristallin 28
2.5.3 Propriétés optiques du cristallin 29
Chapitre 2 Pathologies et chirurgies du segment antérieur de l'œil **33**
1 La greffe de cornée 33
1.1 Les principales indications de la greffe de cornée 33
1.2 Histoire de la kératoplastie 33
1.3 Le protocole 34
1.4 La réalisation de la greffe 35
1.5 Les complications des greffes transfixiantes 36
2 Le glaucome et ses traitements 36
2.1 La pathologie 36
2.1.1 Epidémiologie 36
2.1.2 Physiopathologie 36
2.1.3 Les signes cliniques de la maladie 39
2.2 Les outils du diagnostic 39
2.2.1 La lampe à fente 39
2.2.2 La mesure de la pression intraoculaire 40
2.2.3 Gonioscopie 40
2.2.4 Champ visuel 40
2.3 Les différents traitements actuels du glaucome 40
2.3.1 Le traitement pharmacologique 40
2.3.2 Le trabéculoplastie au laser 41
2.3.3 Le traitement chirurgical 42
2.4 Les nouvelles voies de traitement 43
2.4.1 Les ultrasons 43
2.4.2 Les nouveaux systèmes de drainage de l'humeur aqueuse 44

2.4.3 Les lasers 45
3 Les affections du cristallin 45
3.1 La presbytie 45
3.1.1 Définition 45
3.1.2 Traitements actuels 46
3.2 La cataracte 47
3.2.1 Pathologie 47
3.2.2 Traitement actuel 47
4 Les lasers femtoseconde et la chirurgie oculaire 48
4.1 Présentation de la chirurgie réfractive laser 48
4.2 Greffe de cornée (kératoplastie) 50
4.3 Liquéfaction du cristallin 50
Chapitre 3 Étude de la transparence et de la diffusion des tissus : cornée, sclère et cristallin 53
1 Mesures de transmissions directe et totale et calcul de la diffusion de la cornée et du cristallin 53
1.1 Contexte et montages expérimentaux 53
1.2 Préparation des cornées humaines 54
1.3 Résultats obtenus sur cornée 56
1.4 Résultats obtenus sur cristallins 59
2 Quantification de la transparence cornéenne 63
2.1 Transparence et fonction de transfert de modulation (MTF) 64
2.2 Développement du dispositif expérimental 64
2.3 Principe de mesure de la MTF 65
2.4 Résultats obtenus sur le tissu cornéen 67
2.5 Quantification de la transparence des cornées 68
2.6 Séries de mesure sur le cristallin 69
3 Mesures de diffusion de la sclère 69
3.1 Préparation des échantillons de sclère 70
3.2 Mesures de transmission directe et totale à travers la sclère 71
3.3 Calcul de diffusion dans le tissu scléral et profondeur de pénétration 72
Chapitre 4 Le développement de lasers à impulsions ultra-brèves adaptés à la chirurgie du segment antérieur de l'œil 75
1 Interaction laser-tissu 76
1.1 Ionisation non-linéaire 77
1.2 Propagation non-linéaire des impulsions ultrabrèves 79
1.3 Considérations expérimentales 80
2 Principe des lasers femtoseconde 81
2.1 Principe du laser femtoseconde 81
2.1.1 L'amplification à dérive de fréquence (CPA) 82
2.1.2 Les oscillateurs à cavité étendue 83
2.1.3 Le CPA à fibre 83
2.2 Amplification paramétrique 83
3 Développement de nouvelles sources laser 86
3.1 Besoin de nouvelles sources 86
3.2 Amplification paramétrique optique avec deux cristaux monolitithiques 87
3.3 Conversion de longueur d'onde des cristaux polarisés périodiquement 88
3.3.1 Configuration en générateur paramétrique optique 88
3.3.2 Configuration en amplificateur paramétrique optique par injection d'un continuum 90

3.3.3 Configuration en amplificateur paramétrique optique à deux cristaux successifs 91
4 Autres lasers utilisés 93
4.1 Laser fibré 93
4.2 OPA commercial 94
Chapitre 5 Expériences chirurgicales sur tissu 97
1 Dispositif expérimental 97
1.1 Sources laser 97
1.2 Préparation des échantillons humains 98
1.2.1 Pour la chirurgie 98
1.2.2 Pour les observations microscopiques 99
1.3 Découpes chirurgicales sur les tissus 100
1.4 Montage expérimental 101
2 Analyses histologiques des découpes cornéennes effectuées par laser femtoseconde 102
2.1 Découpes transfixiantes 102
2.1.1 Histologie 102
2.1.2 Microscopie électronique à transmission (MET) 109
2.1.3 Microscopie électronique à balayage (MEB) 109
2.2 Découpes lamellaires 111
2.2.1 Histologie et MET 112
2.2.2 Microscope électronique à balayage (MEB) 113
3 Analyses histologiques des découpes de sclère réalisées par laser femtoseconde 116
3.1 Découpes aux longueurs d'onde 820 nm et 1030 nm 117
3.2 Découpes aux longueurs d'onde autour de 1650 nm 118
Chapitre 6 La tomographie par cohérence optique : outil de visualisation assistant le laser femtoseconde dans la chirurgie du segment antérieur de l'œil 123
1 La tomographie par cohérence optique 123
1.1 Principe de l'OCT 125
1.2 Domaine temporel 127
1.3 Domaine fréquentiel 127
1.4 OCT plein champ 128
2 Applications de l'OCT en ophtalmologie clinique 129
2.1 Segment antérieur 129
2.2 Segment postérieur 130
3 Systèmes utilisés pour le présent travail : dispositifs commercial et expérimental 130
3.1 OCT commercial (SS-OCT) 130
3.2 OCT plein champ développé à l'Institut d'Optique 131
3.3 SD- OCT développé dans le cadre du projet NOUGAT 132
3.3.1 Importance de la source 132
3.3.2 Montage optique 134
3.4 Comparaison des systèmes OCT plein-champ, SS-OCT et SD-OCT 136
4 Premières images 136
4.1 OCT commercial 136
4.2 OCT plein champ 139
4.3 OCT expérimental développé dans le cadre du projet NOUGAT 141
5 Intégration de l'OCT et du laser 142
Conclusions et perspectives 145
Objectifs de la thèse 145
Résultats 146
Mesures de transparence : 146

Développement de sources 147
Expériences chirurgicales 147
Imagerie par OCT 147
Bilan et perspectives 148
Annexe 1 : Analyse de Fourier et Vecteur de diffusion 149
Annexe 2 : Les impulsions ultracourtes 151
Liste des publications de l'auteur 153
Références 155

Introduction

Contexte scientifique de la thèse

Mon projet de thèse s'est déroulé dans le cadre de deux projets ANR : GRECO (GREffe de COrnée automatisée par laser femtoseconde avec optimisation de la longueur d'onde et correction du front d'onde, ANR-06-TecSan-025) et NOUGAT (Nouvel OUtil pour la chirurgie du Glaucome Assistée par laser femtoseconde et Tomographie de cohérence optique, ANR-08-TECS-012) pilotés par notre groupe. Les partenaires sur ces projets sont l'hôpital Hôtel Dieu de Paris, le Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique *Graduate School* et les sociétés *Imagine Eyes* et Amplitude Systèmes.
Suite au succès de l'utilisation des lasers à impulsions ultra-rapides dans la chirurgie réfractive, il existe un intérêt d'étendre cette technologie aux autres chirurgies du segment antérieur de l'œil comme la greffe de cornée, la chirurgie du glaucome et l'opération de la cataracte.
La plupart des indications de greffe sont néanmoins associées à une qualité optique réduite de la cornée du patient, ce qui rend l'intervention par laser plus délicate à réaliser. De même, la chirurgie du glaucome prévoit la propagation du faisceau dans la sclère, tissu fortement diffusant.
Nos recherches ont démontré que la diffusion optique des faisceaux laser aux longueurs d'onde actuellement utilisées dans les cornées pathologiques peut être fortement atténuée en utilisant une longueur d'onde mieux adaptée, dans la fenêtre de relative transparence du tissu, centrée à 1650 nm.
De plus, les systèmes laser pourraient être dotés d'un dispositif d'imagerie *in situ* par tomographie de cohérence optique afin de visualiser et contrôler l'intervention en quasi-temps réel, fournissant un outil puissant au chirurgien.

Objectifs du travail de doctorat

Les principaux objectifs de mon projet de thèse concernaient l'optique des tissus, les sources laser et l'étude de l'interaction laser-tissu par analyse des découpes chirurgicales au laser femtoseconde. Les différents travaux effectués sont résumés par les points suivants :

- Étendre nos études de l'optique du tissu cornéen au tissu scléral en vue de l'opération du glaucome assistée par laser à impulsions ultra-rapides, ainsi que la réalisation d'études exploratoires sur le cristallin en vue de l'opération de la cataracte par laser grâce à une méthode déjà utilisée, puis mise en place d'une nouvelle méthode de caractérisation des tissus transparents ;

- Consolider les sources laser existantes, les caractériser en vue de leur optimisation ; notamment dans le but de maîtriser leur spectre d'émission et leur stabilité ; concevoir et réaliser de nouvelles architectures de sources laser : pompage d'un cristal non linéaire par un supercontinuum et dispositif à deux cristaux successifs, pour maîtriser par filtrage le spectre émis ;

- Réaliser des expériences chirurgicales sur les tissus cornéen et scléral par laser femtoseconde et analyser les résultats par histologie et microscopie électronique, déterminer les profondeurs de pénétration et comparer avec les données existantes ;

- Participer au développement d'un système d'imagerie *in situ* de tomographie par cohérence optique afin de contrôler le déroulement des expériences chirurgicales.

Plan du manuscrit

Cette thèse est composée de six chapitres.
Le Chapitre 1 est dédié à la présentation de l'anatomie de l'œil. Il décrit les segments antérieur et postérieur, avec une description détaillée des tissus d'intérêt que sont la cornée, la sclère et le cristallin.
Le Chapitre 2 présente les pathologies du segment antérieur et leurs traitements : la greffe de cornée, le glaucome, la cataracte et la presbytie.
Le Chapitre 3 concerne les mesures de transparence et de diffusion à travers les tissus du segment antérieur de l'œil. Après avoir rappelé les résultats obtenus dans le cadre de précédentes études sur la cornée, je montre les résultats obtenus sur le cristallin et sur la sclère en utilisant la même méthode, et permettant de déterminer la profondeur de pénétration effective que l'on peut obtenir dans chacun des différents tissus. Dans ce chapitre, je présente également une nouvelle méthode de mesure de transparence et de diffusion des tissus transparents (cristallin et cornée dans le cas du segment antérieur de l'œil), qui pourrait être utilisée par les banques des yeux pour l'analyse des greffons cornéens.
Le Chapitre 4 introduit brièvement les principes de base des lasers à impulsions ultracourtes, ainsi que les mécanismes intervenant dans l'interaction laser-tissu. La dernière section de ce chapitre présente les sources lasers développées et/ou utilisées pour la chirurgie des tissus cornéen et scléral.
Le Chapitre 5 concerne les expériences chirurgicales de découpes par ces systèmes laser femtoseconde. Il décrit la préparation des échantillons et le dispositif expérimental, puis présente les résultats obtenus en histologie, en microscopie électronique à transmission et à balayage. Une section est consacrée à chacun des tissus concernés, la cornée et la sclère.
Le Chapitre 6 porte sur la tomographie de cohérence optique (*Optical Coherence Tomography*, OCT). Après avoir succinctement présenté le principe de l'OCT, je décris les trois dispositifs avec lesquels nous avons réalisé des images du tissu cor-

néen, et, en particulier, celui développé dans le cadre du projet ANR NOUGAT. Après la comparaison des dispositifs et la présentation des images, je démontre la possibilité d'associer ce dispositif d'imagerie avec le laser.

Chapitre 1 Anatomie du segment antérieur de l'œil

Le travail de thèse présenté ici concerne les tissus oculaires. Il convient dans ce premier chapitre d'aborder l'anatomie de l'œil.

Le segment postérieur sera rapidement décrit pour laisser place à une description plus complète des principaux éléments qui composent son segment antérieur et notamment les trois tissus d'intérêt de mon projet de thèse : la cornée, la sclère et le cristallin.

L'œil est l'organe de la vision, sens dédié à la perception visuelle du monde qui nous entoure. Des processus physiologiques et psychologiques mettant en œuvre la vision nous permettent de nous représenter les formes, les couleurs, la distance, le relief…. L'œil, organe récepteur, est relié au cerveau, notamment au cortex visuel, afin que l'information soit traitée. Les illusions d'optique montrent bien que l'œil n'est pas le seul responsable de la perception de l'image.

1 L'œil

1.1 Présentation générale

Appartenant au système nerveux central, l'œil est relativement bien isolé du reste de l'organisme grâce à ses barrières hémato-rétiniennes. Il peut être décomposé en deux parties (Figure 1-1) : le segment antérieur (SA) composé de la cornée, l'humeur aqueuse, l'iris, les corps ciliaire et du cristallin ; et le segment postérieur (SP), composé du vitré, de la rétine, de la choroïde et de la sclère.

Le segment antérieur est constitué d'éléments optiques permettant de focaliser les rayons lumineux sur la rétine et de collecter les images du monde extérieur. Dans le segment postérieur, la rétine joue le rôle de récepteur de l'information lumineuse et assure l'essentiel du processus neurologique de la vision grâce à ses photorécepteurs et d'autres cellules traitant et transmettant l'information visuelle vers le cerveau *via* le nerf optique.

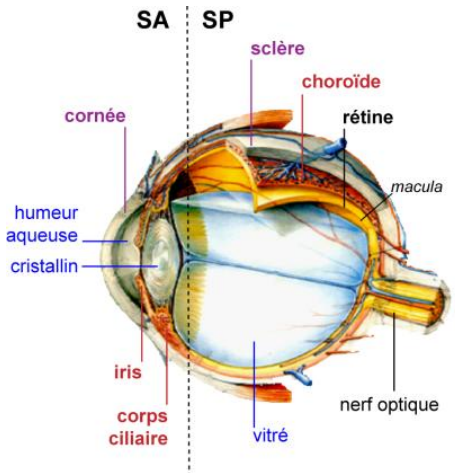


Figure 1-1 Schéma général de l'œil. En bleu, « milieux transparents » : humeur aqueuse et cristallin ; en violet, tunique externe (sclère et cornée) ; en rouge, tunique intermédiaire (choroïde, corps ciliaires et iris); en noir, tunique interne (rétine). SA, Segment Antérieur ; SP, Segment Postérieur [1].

La lumière entre par la cornée puis traverse l'humeur aqueuse et la pupille qui joue le rôle d'un diaphragme, elle est ensuite transmise par le cristallin et atteint enfin la rétine en passant par l'humeur vitrée. Les principales caractéristiques optiques de ces éléments du segment antérieur sont décrites dans le Tableau 1-1.

Structure	Rayon de courbure antérieur	Rayon de courbure postérieur	Pouvoir de focalisation	Indice de réfraction
Cornée	7,8 mm	6,8 mm	2/3	1,377
Humeur aqueuse	-----	-----	-----	1,337
Cristallin	10 mm	6 mm	1/3	1,413
Humeur vitrée	-----	-----	-----	1,336

Tableau 1-1 Caractéristiques optiques principales des éléments de l'œil traversés par la lumière lors de la formation d'une image [2].

1.2 Segment postérieur de l'œil

1.2.1 La rétine

La tunique interne de l'œil, la rétine, est la partie sensorielle de l'œil, constituée de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la rétine neurosensorielle (Figure 1-2). Au centre de l'axe optique se trouve la *macula lutea*, « la tâche jaune », au centre de laquelle est située la fovéa, la zone rétinienne la plus sensible.

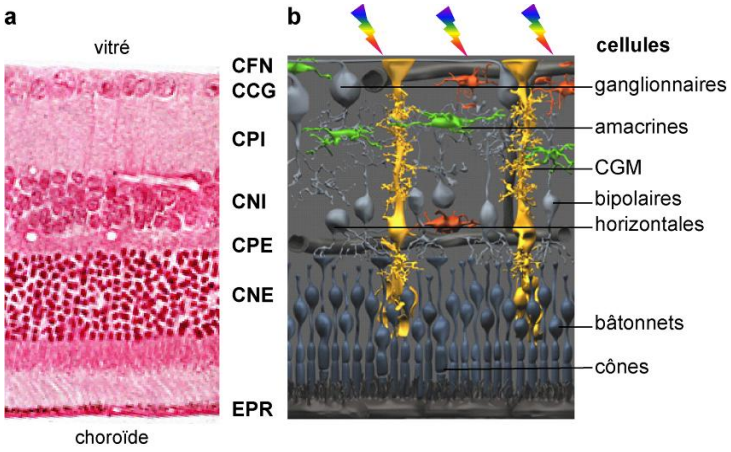


Figure 1-2 Schéma montrant l'organisation structurelle de la rétine [1].

(a) Coupe histologique de la rétine, orientée par rapport au trajet de la lumière.

- **Les photorécepteurs (PR) – cônes et bâtonnets - sont insérés dans l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR).**
- **La couche nucléaire externe (CNE) est exclusivement composée de leurs corps cellulaires.**
- **La couche plexiforme externe (CPE) est le lieu de formation des connexions synaptiques entre les photorécepteurs et les cellules bipolaires.**
- **La couche nucléaire interne (CNI) est composée des noyaux de trois types de neurones, les cellules horizontales, bipolaires et amacrines, et des noyaux de cellules gliales de Müller (CGM).**
- **La couche plexiforme interne (CPI) est le lieu de formation des connexions synaptiques entre les axones des cellules bipolaires et les dendrites des cellules ganglionnaires.**
- **La couche des cellules ganglionnaires (CCG) contient les noyaux des cellules ganglionnaires. La couche des fibres nerveuses (CFN) est la plus interne.**

(b) Schéma de la rétine. Une chaîne de trois neurones -photorécepteur, cellules bipolaire et ganglionnaire - constitue la voie la plus directe pour transmettre les informations visuelles au cerveau. Les cellules hori-

zontales et amacrines interviennent dans des interactions latérales au niveau, respectivement, de la CPE et de la CPI. Les cellules microgliales sont représentées en orange.

La rétine neurosensorielle est constituée de six types de cellules neuronales parmi lesquelles les cellules assurant le traitement de l'information lumineuse, la photo-transduction, sont les photorécepteurs : les bâtonnets et les cônes. Le nombre de bâtonnets est d'environ 130 millions ; ils sont placés autour de la fovéa. Ils sont sensibles à de très faibles intensités lumineuses et permettent donc la vision nocturne (scotopique). Les cônes sont environ 5 à 7 millions et essentiellement situés dans la fovéa. Ils sont assez peu sensibles à la lumière mais permettent la distinction des couleurs, ils assurent ainsi la vision diurne (photopique). Ces photorécepteurs sont sensibles aux photons ayant des longueurs d'onde entre 390 nm et 780 nm, c'est pour cela que l'on parle de lumière visible sur cette gamme spectrale.

Il faut noter qu'il existe une zone aveugle sur la rétine dépourvue de photorécepteurs : la papille optique. Dans cette région, près d'un million de fibres nerveuses se réunissent pour former le nerf optique avec qui cheminent les vaisseaux centraux rétiniens.

1.2.2 La choroïde

La choroïde appartient à la tunique intermédiaire de l'œil, « l'uvée ». Pigmentée par des mélanocytes, cette membrane est fortement vascularisée, permettant ainsi l'apport de nutriments et d'oxygène aux photorécepteurs de la rétine. Elle s'épaissit dans le segment antérieur pour former l'iris et les corps ciliaires.

Chez la plupart des mammifères, excepté par exemple les humains, les porcs et les lapins, derrière la rétine, se trouve également le *tapetum lucidum*. Cette couche réfléchissante agit comme un amplificateur de lumière qui est important pour les animaux particulièrement actifs la nuit.

1.2.3 La sclère

La sclère, également appelée sclérotique (du grec σκληροζ signifiant « dur »), correspond au « blanc de l'œil ». Elle constitue la tunique externe du segment postérieur et se prolonge dans le segment antérieur jusqu'à la cornée. Elle enveloppe ainsi les 5/6^{e} du globe oculaire, assurant sa rigidité et son tonus. Ce tissu de protection à structure tendineuse, particulièrement résistant, permet de contenir la pression intraoculaire tout en protégeant l'œil des agressions mécaniques et thermiques. Son épaisseur varie d'environ 530 µm à la jonction cornéo-sclérale à environ un millimètre dans sa partie postérieure où il est traversé par le nerf optique [3].

La sclère constitue un tissu d'intérêt pour notre groupe car il est fortement impliqué dans les mécanismes mis en jeu pour le traitement du glaucome. Faisant également partie du segment antérieur de l'œil, ce tissu sera décrit plus en détail par la suite (voir section 2.5).

1.2.4 L'humeur vitrée

Le vitré est une masse gélatineuse, entourée d'une fine membrane : la hyaloïde, qui contient 99% d'eau et représente un volume de 4 mL, soit 80% du volume oculaire.

2 Le segment antérieur de l'œil

Le segment antérieur de l'œil est composé de la cornée, de l'humeur aqueuse, de l'iris et du cristallin (Figure 1-3). On peut également considérer que la partie antérieure de la sclère fait partie de ce segment.

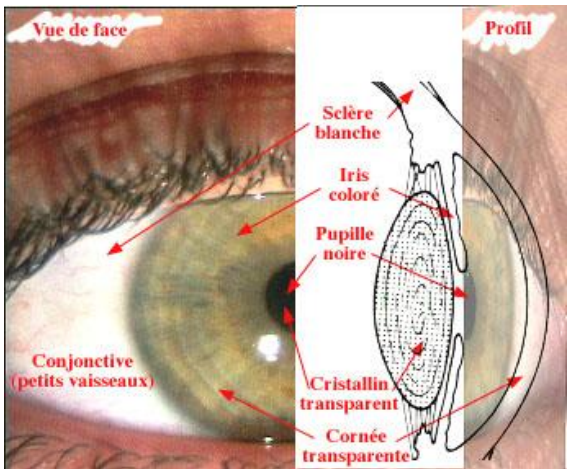


Figure 1-3 Schéma du segment antérieur de l'œil [4].

2.1 La cornée

La cornée saine est un tissu transparent et avasculaire, de 11 mm de diamètre, épais d'environ 550 µm au centre et d'environ 1000 µm en périphérie. C'est par cette fenêtre que les rayons lumineux pénètrent dans le globe oculaire, subissant un premier phénomène de réfraction. Avec son pouvoir convergent fixe de 40 à 43 dioptries, la cornée compose les 2/3 du pouvoir réfractif total de l'œil. Comme indiqué sur le Tableau 1-1, ses rayons de courbure sont de 7,8 mm et de 6,8 mm pour, respectivement, les dioptres antérieur et postérieur.

Parmi les trois tissus superposés qui composent la cornée, c'est le stroma qui est le plus épais (environ 90 % de l'épaisseur cornéenne). Il est principalement composé d'eau (80%), de fibrilles de collagène et d'une matrice extracellulaire. Sa composition définit l'indice de réfaction global de la cornée qui est de 1,377 [5] et correspond à la combinaison de ses deux principaux composants (l'indice des fibrilles de collagène est de 1,41 et celui de la matrice extracellulaire vaut 1,36).

2.1.1 Anatomie et histologie de la cornée

Normalement avasculaire, la cornée tire son énergie métabolique du film lacrymal, de la conjonctive et de l'humeur aqueuse. Elle n'est vascularisée qu'au niveau de la jonction cornéo-sclérale, c'est à dire au niveau des boucles vasculaires du limbe irriguées par les vaisseaux de la conjonctive et de la choroïde.

La cornée est également fortement innervée, ce qui la rend très sensible au contact. De plus, premier tissu en contact avec l'extérieur, elle constitue une véritable barrière à l'entrée de molécules exogènes dans le globe oculaire. Comme le montre la coupe histologique d'une cornée (Figure 1-4), ce tissu, composé de trois tissus superposés et séparés par deux membranes, est particulièrement bien organisé.

- **L'épithélium** est constitué de 5 à 7 couches de cellules (superficielles, intermédiaires et basales) et épais d'environ 50 µm. De par la présence de liaisons fortes entre ses cellules superficielles, il joue un rôle de barrière et permet la dispersion du film lacrymal. Ses cellules s'auto-renouvellent grâce à des cellules souches conservées en périphérie de la cornée. Ce tissu a ainsi la capacité de se renouveler, en seulement 7 jours.
- **La couche de Bowman** est une membrane d'environ 10 µm d'épaisseur et acellulaire. Elle correspond à une condensation du stroma antérieur, composée essentiellement de protéoglycanes et de collagènes de type I et III. Ces fibrilles de collagène sont entremêlées, contrairement à l'organisation bien ordonnée des fibrilles stromales. Son rôle

exact est mal connu mais elle est indispensable à la cicatrisation de l'épithélium. Cette membrane ne peut pas être régénérée en cas de traumatisme.

- **Le stroma cornéen** (épaisseur d'environ 500 µm) est composé à 80% d'eau, d'une matrice extracellulaire riche en glycosaminoglycanes et de fibrilles de collagène. Ces dernières sont majoritairement constituées de collagène de type I mais aussi de collagènes de type V et VI. Le collagène de type III est présent en faible proportion mais augmente en conditions pathologiques : cicatrisation ou inflammation [6].

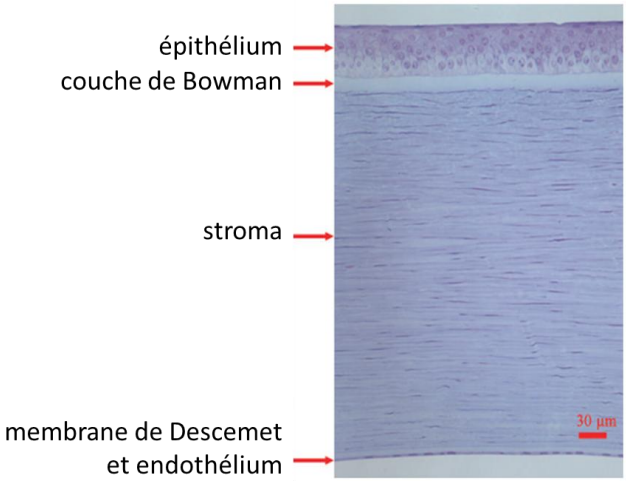


Figure 1-4 Coupe semi-fine d'une cornée humaine, colorée au bleu de toluidine. La cornée est constituée de l'épithélium qui repose sur la couche de Bowman, du stroma ou parenchyme, de la membrane de Descemet et de l'endothélium.

Le collagène fibrillaire est formé par assemblage de 6 molécules de tropocollagène. Les fibrilles, dont le diamètre est d'environ 30 nm, régulièrement espacées s'assemblent en lamelles de 1 à 2 µm qui sont distribuées selon un arrangement particulier, conférant à la cornée sa propriété de transparence et sa résistance mécanique. Au centre, le stroma contient plus de 300 lamelles parallèles à la surface et se différenciant successivement l'une par rapport à l'autre par une rotation entre 0° et 90 ° de leur orientation par rapport à la surface (Figure 1-5). La Figure 1-6 montre l'interface entre deux lamelles de collagène et, dans l'une d'entre elle, le diamètre régulier des fibrilles et l'ordre à courte distance qui existe dans leur organisation.

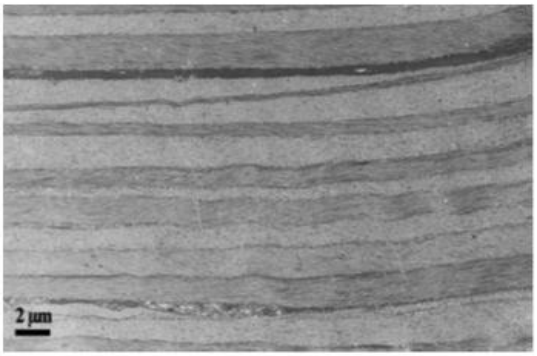


Figure 1-5 Micrographe montrant les lamelles de collagène composant le stroma cornéen.

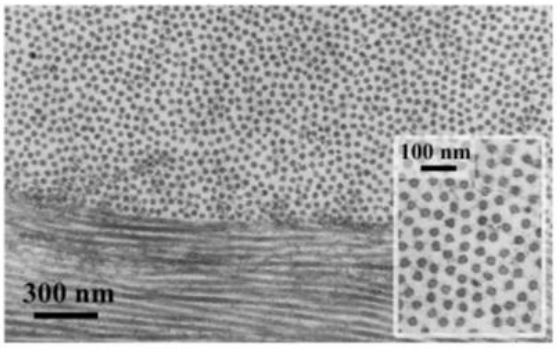


Figure 1-6 Micrographe montrant l'interface entre deux lamelles de collagène d'orientation différente.

Le stroma contient également le plexus nerveux et quelques cellules, les kératocytes. Ces derniers ne représentent que 2 à 3 % de son volume. Le rôle essentiel des kératocytes est de préserver la matrice extracellulaire en synthétisant des molécules de tropocollagène et des glycosaminoglycanes. Lors d'une agression, les kératocytes présents proches du site sont activés en fibroblastes et restaurent le stroma altéré.

- **La membrane de Descemet** est une fine couche d'une dizaine de micromètres, solide et élastique, perméable à l'eau. Elle est riche en différentes molécules : collagènes non fibrillaires de type IV et VIII, fibronectine, laminine et différents protéoglycanes. Histologiquement, la membrane de Descemet se présente sous la forme de deux couches bien stratifiées ayant une ultra-structure différente. La partie antérieure correspond à la membrane embryonnaire et la partie postérieure, amorphe, s'épaissit au cours de la vie.
- **L'endothélium** est une monocouche de cellules hexagonales, de 4 à 6 µm d'épaisseur et larges de 20 µm, organisées en nids d'abeille avec une densité d'environ 3500 cellules/cm² (Figure 1-7). Contrairement aux cellules basales de l'épithélium chez l'homme, ces dernières n'ont pas la capacité de se régénérer. L'endothélium a un rôle fondamental dans l'entretien de la transparence de la cornée. Pour contrôler son hydratation, il agit comme une pompe à eau, en assurant en permanence des mouvements ioniques entre le stroma et l'humeur aqueuse. Il assure ainsi la fonction de transmission des rayons lumineux de la cornée. Lorsque la densité de cellules endothéliales n'est pas suffisante, ce rôle régulateur n'est plus assuré et un œdème plus ou moins important peut se former.

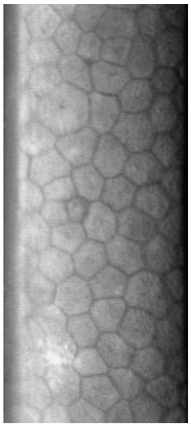


Figure 1-7 Photographie des cellules endothéliales par microscope spéculaire [7].

Le manque ou la baisse trop importante du nombre de ces cellules entraîne une perturbation de la régulation entrainant une surhydratation de la cornée, responsable de son gonflement, d'une désorganisation de la structure microscopique et ainsi de la perte de la transparence macroscopique. La plupart des indications pour une greffe de cornée est associée à la présence d'un œdème. Le nombre de ces cellules endothéliales étant fixé à la naissance, lorsque l'une d'entre elles meure, ses voisines s'étendent pour combler l'espace libéré ce qui en fait une zone extrêmement fragile qu'il est important de préserver, notamment lors d'interventions chirurgicales.

2.1.2 Propriétés optiques de la cornée

- **Biréfringence.**

Du fait de l'empilement particulier des fibrilles de collagène dans son stroma, la cornée est un tissu biréfringent. Cette propriété a été découverte par des mesures de transmission de la lumière en polarisation croisée dans une cornée de lapin en tournant la polarisation incidente sur 360° (par exemple [8]).

- **Absorption**

Comme la cornée, tissu biologique, est principalement composée d'eau, son spectre d'absorption est très proche de celui de l'eau (Figure 1-8).

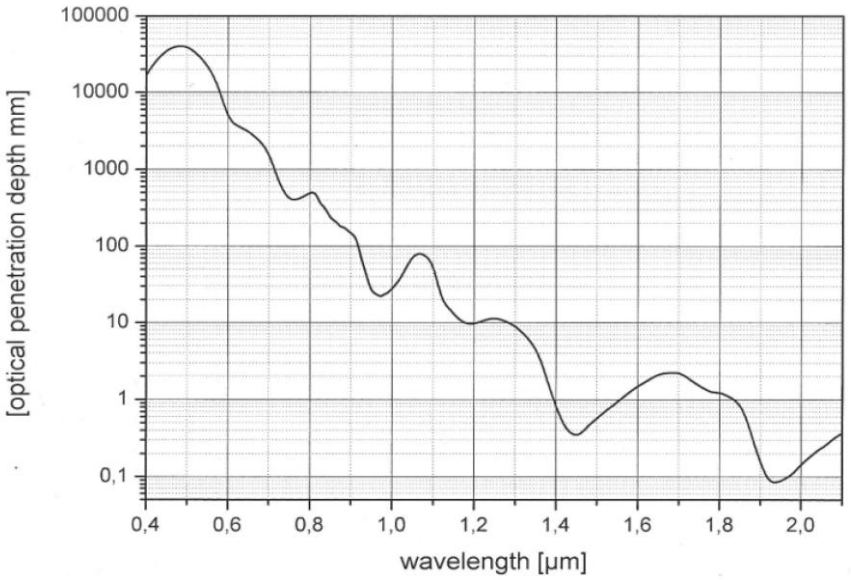


Figure 1-8 Profondeur de pénétration à *1/e* en mm dans de l'eau pure (données modifiées à partir de [9]) en fonction de la longueur d'onde.

- **Transparence**

Pendant longtemps, l'origine de la transparence de la cornée n'a pas trouvé d'explication faisant l'unanimité. Plusieurs hypothèses se sont succédées pour l'expliquer.

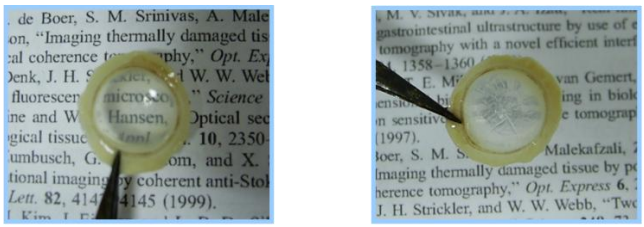


Figure 1-9 Comparaison d'une cornée saine et d'une cornée œdémateuse au-dessus d'un texte.

- Une première théorie a été construite sous les hypothèses que l'indice de la cornée était uniforme ou que la cornée était composée d'un empilement de couches parallèles présentant un indice de réfraction uniforme [10]. Cependant, comme nous avons dit précédemment, l'indice de réfraction de la cornée résulte de la combinaison de deux composantes : l'indice des fibrilles de collagène et celui de la matrice extracellulaire.
- Dans son papier emblématique de 1957, David Maurice montre par un raisonnement portant sur la biréfringence de forme et de structure que les indices de réfraction des fibrilles et de la matrice ne sont en effet pas identiques ; l'indice de la cornée n'est donc pas uniforme [11]. Il effectue un calcul de la section efficace d'une fibrille et montre que la somme des sections efficaces de toutes les fibrilles présentes dans la cornée sous l'hypothèse d'une distribution aléatoire conduisant à un pourcentage de 94% de diffusion dans la cornée et donc l'opacité du tissu. Il a donc pu conclure que les fibrilles devaient présenter une structure ordonnée expliquant la transparence du tissu.
- Maurice suppose en effet une structure « cristalline » localement hexagonale présentant un ordre à grande distance. Les ondes diffractées subiraient ainsi des interférences destructives dans toutes les directions sauf vers l'avant, aboutissant à une faible diffusion. La limite de ce modèle provient du fait que l'arrangement des fibrilles ne s'étend en effet pas à l'infini.
- Cependant, un ordre à courte distance est suffisant pour permettre la transparence, comme le montrent certaines études [12,13,14,15]. La diffusion de la cornée est provoquée par les fluctuations de densité spatiale dans la distribution des fibrilles au sein de la matrice extracellulaire, supérieures à la moitié de la longueur d'onde (à partir de 200 nm dans le cas de la lumière visible).

La comparaison des analyses dans l'espace de Fourier des tissus cornéens et scléraux (Annexe 1 et Figure 1-10) montre en effet un ordre à courte distance, avec un anneau bien visible, correspondant à la distance inter-fibrillaire de 64 nm dans une cornée saine, alors que pour une cornée œdémateuse, l'anneau est déjà moins visible, et que pour la sclère, aucun ordre n'est visible du fait de la grande disparité des dimensions des fibrilles de collagène.

Sur la Figure 1-11 : dans le cas d'une cornée saine, la transformée de Fourier fait apparaître un anneau dans les composantes de Fourier, à la valeur correspondant à l'inverse de la distance interfibrillaire. Dans le cas d'une cornée œdémateuse, cet anneau se disperse en se réduisant. Enfin, dans le cas de la sclère, aucun anneau n'apparaît, l'ordre est complètement perdu.

La quantification de la transparence est un point essentiel, en particulier dans le cadre de la greffe de cornée. Dans ce contexte, un dispositif, faisant l'objet d'un brevet [16], a été développé dans le cadre de mon master dans le but de pouvoir être adopté par les banques des yeux. Il permet notamment de déterminer la fonction de transfert de modulation du tissu

étudié, autrement dit de donner une information sur la transmission du tissu à une fréquence donnée.

L'optimisation de ce dispositif devait ainsi permettre d'avoir accès à une mesure quantitative de transparence de la cornée (voir chapitre 4.2).

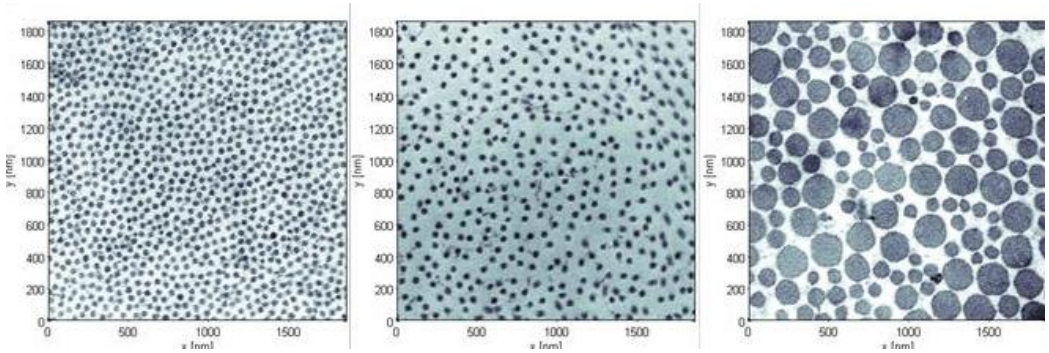


Figure 1-10 Micrographes de TEM pour une cornée saine (gauche), une cornée œdémateuse (centre) et la sclère (droite) [15].

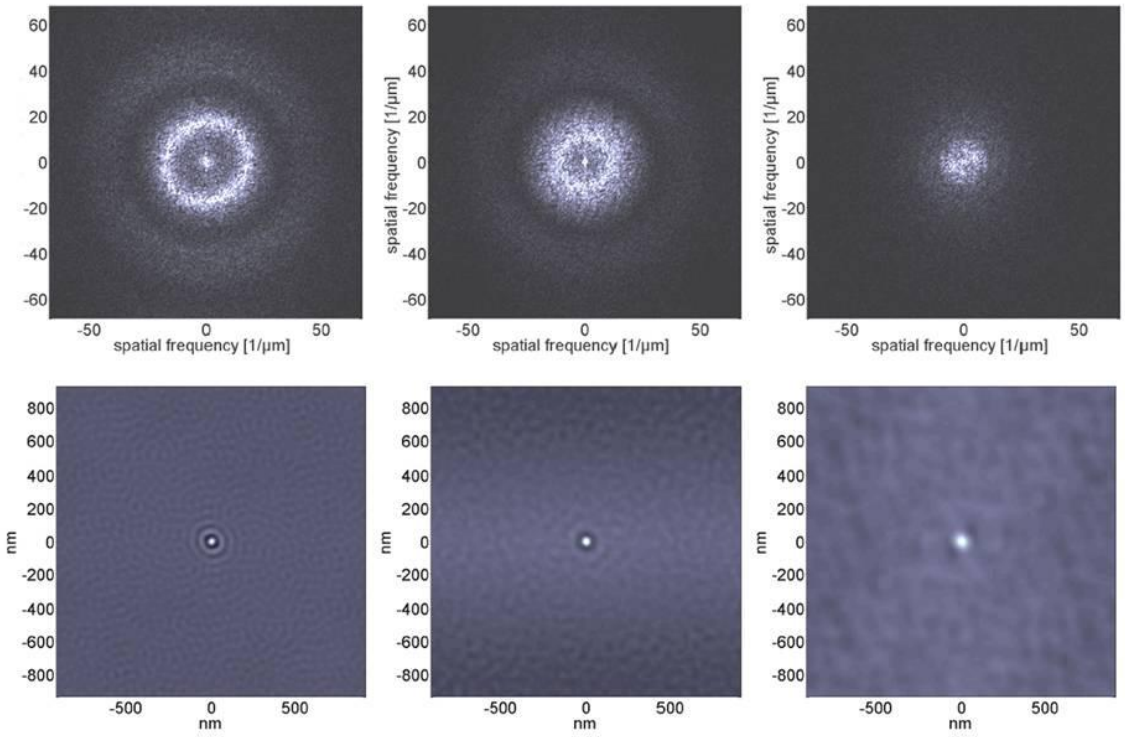


Figure 1-11En haut : transformée de Fourier en 2 dimensions des micrographes présentés en Figure 1-10 pour une cornée saine (gauche), une cornée œdémateuse (milieu) et la sclère (droite). En bas : fonction d'autocorrélation de ces mêmes images [15].

- **Diffusion**

Si le vecteur diffusion est noté $\boldsymbol{K}$, la fonction de distribution des fibrilles est notée ρ, la transformée de Fourier notée $\mathcal{F}$et la fonction d'autocorrélation notée $\mathcal{C}$, alors la densité de puissance diffusée peut être exprimée selon [15]:

$$p(\boldsymbol{K}) \propto \frac{|E_0|^2}{2\eta} |\mathcal{F}[\rho(\boldsymbol{K})]|^2 \quad \textbf{(1-1)}$$

$$p(\boldsymbol{K}) \propto \frac{|E_0|^2}{2\eta} \mathcal{F}[\mathcal{C}(\rho(\boldsymbol{K}))] \quad \textbf{(1-2)}$$

La puissance diffusée est proportionnelle à la transformée de la fonction d'autocorrélation de la distribution des fibrilles de collagène. Il existe donc une relation entre la diffusion optique d'un tissu et l'organisation de sa structure.

Dans une cornée saine, la diffusion a principalement lieu vers l'avant, expliquant le phénomène de transparence du tissu. Les composantes de Fourier sont constantes et la structure présente un ordre à courte distance. Les fibrilles de collagène, dont le diamètre est très petit par rapport à la longueur d'onde, agissent comme des diffuseurs allongés de Rayleigh et un comportement dépendant de la longueur d'onde selon une loi en λ^{-3} est attendue [15,17-19]. Pour les longueurs d'onde visibles autour de 500 nm, la valeur de la diffusion dans le tissu est en-dessous de la valeur Rayleigh attendue, signifiant qu'un facteur de forme inférieur à 1, du à l'organisation de la structure, est à prendre en compte (voir Figure 3-7).

Pour les cornées œdémateuses, les composantes de Fourier n'ont plus une valeur constante, l'ordre n'est plus aussi régulier et il est nécessaire de considérer la diffusion Mie en complément de la diffusion Rayleigh.

En effet, la diffusion de Mie doit être prise en compte lorsque la dimension des structures est supérieure ou égale à la moitié de la longueur d'onde. C'est le cas pour les cellules présentes dans le stroma (les kératocytes) et pour les zones pauvres en fibrilles des cornées œdémateuses. Le comportement observé n'est plus selon une loi en λ^{-3} mais reste très prononcé par rapport à la longueur d'onde.

2.2 La sclère

2.2.1 Anatomie et histologie de la sclère

La sclère, est une membrane blanche et opaque contrairement à la cornée et au cristallin. Dans sa partie antérieure, elle est recouverte d'un tissu translucide, la conjonctive et se prolonge par la cornée (Figure 1-12). Le limbe est une zone d'un millimètre de large, richement innervée et vascularisée, qui sépare la cornée de la sclère.

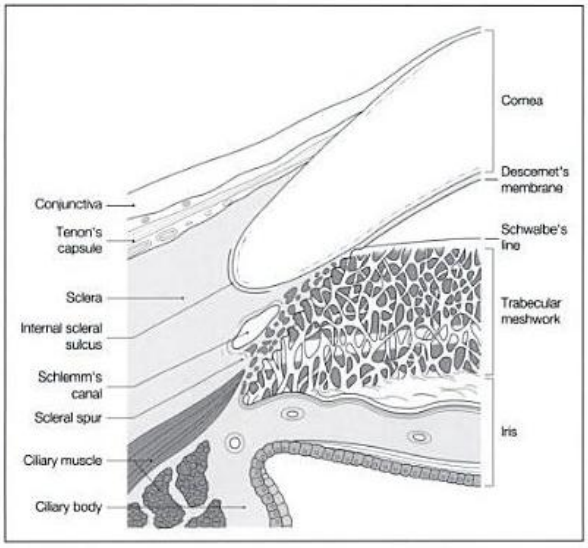


Figure 1-12 Schéma représentant la jonction cornéo-sclérale [3].
La face externe de la sclère est tapissée de la profondeur à la surface par l'épisclère, la capsule de Tenon et la conjonctive bulbaire. Episclère : tissu conjonctif lâche et vascularisé, recouvrant la sclère sans y adhérer. Capsule de Tenon : membrane fibro-élastique recouvrant la sclère du limbe jusqu'à la pénétration du nerf optique. Conjonctive bulbaire : portion de conjonctive richement vascularisée, adhérente à la capsule de Tenon et à l'épisclère au pourtour du limbe. La face interne de la sclère recouvre la tunique intermédiaire de l'œil, l'uvée, soit la choroïde, le corps ciliaire et la base de l'iris [20].

La sclère dont une coupe histologique est représentée sur la Figure 1-13, est un tissu conjonctif pauvre en fibroblastes et peu vascularisé, mais riche en fibrilles de collagène, essentiellement de type I et liées à des protéoglycanes (PG), et en fibres élastiques, au sein d'une substance fondamentale.

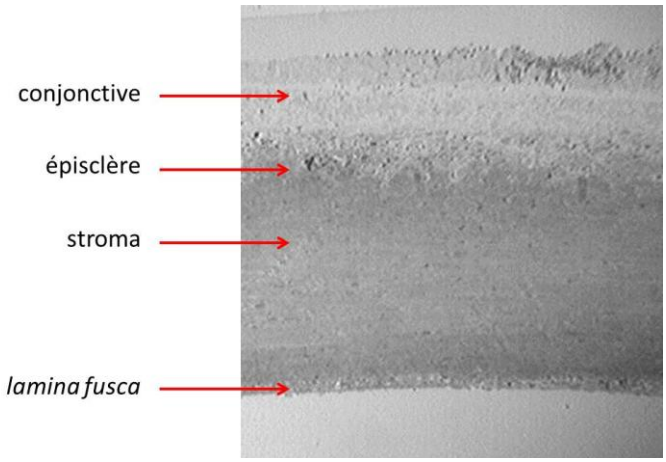


Figure 1-13 Coupe histologique du tissu scléral. La sclère est recouverte par la conjonctive et composée d'un stroma et de la *lamina fusca*.

Le tissu scléral est beaucoup moins régulièrement organisé que la cornée (Figure 1-14). Ses fibrilles de collagènes sont arrangées de manière irrégulière, grossières – comme le montre la variation importante de leur diamètre entre 28 et 300 nm. De plus, ces fibrilles s'entrecroisent dans toutes les directions, ce qui confère à la sclère sa résistance et son opacité.

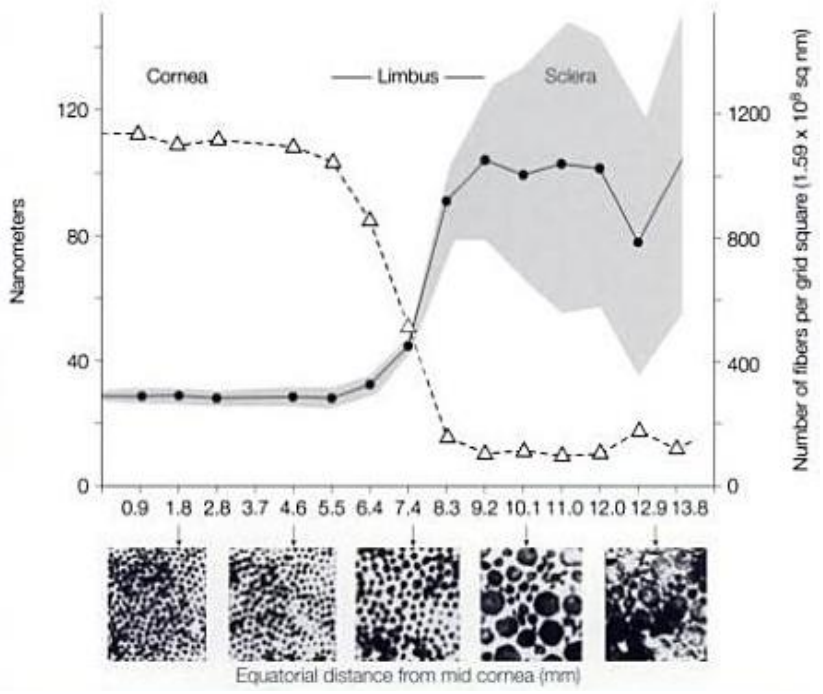


Figure 1-14 Mesure du diamètre moyen des fibrilles de collagène (points noirs) avec son écart type (grisé) et densité de fibrilles (triangle blanc) en fonction de la distance par rapport au centre de la cornée [3].

2.2.2 Propriétés optiques de la sclère

Il existe peu de données dans la littérature concernant le tissu scléral. Quelques propriétés optiques sont néanmoins disponibles.

- **Indice de réfraction** : il est estimé à 1,385 [21].

- **Absorption**

Des mesures de transmissions directe et totale à travers un échantillon de tissu scléral humain ont été réalisées par Tuchin et *al.*[22]. La Figure 1-15 montre, à titre d'exemple, les courbes de transmission directe et transmission totale dans le visible d'un échantillon de sclère humaine non traitée, fraichement prélevé, ayant une épaisseur de 660 µm. Dans le chapitre 4, nous avons renouvelé la mesure de transmission à travers le tissu scléral.

- **Transparence et diffusion**

Comme dit précédent, la sclère est un tissu opaque du fait de l'arrangement irrégulier et de l'hétérogénéité de ses fibrilles de collagène. L'analyse de Fourier permet de comparer la distance moyenne entre deux fibrilles de collagène dans les images générées par microscopie électronique à transmission de la cornée et de la sclère, telles que représentée sur la Figure 1-10 à gauche et à droite respectivement.

Alors que dans la cornée, le diamètre moyen des fibrilles de collagène est de 31 nm, soit bien inférieure à la dimension de structures induisant la diffusion optique, l'analyse des composantes de Fourier pour la sclère donne un diamètre moyen de 148 nm [23], ce qui est de l'ordre de grandeur de la dimension de structures responsables de la diffusion optique [24] (Figure 1-11).

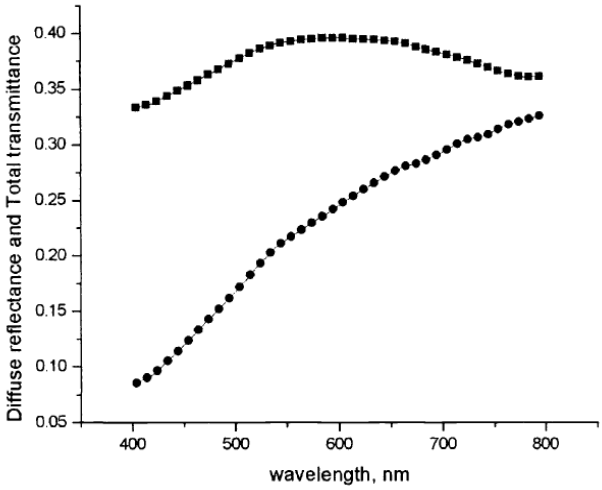


Figure 1-15 Courbes de transmission directe (cercles noirs) et transmission totale (carrés noirs) d'un échantillon de sclère humaine de 660 µm d'épaisseur [22].

2.3 L'humeur aqueuse

Il s'agit d'un liquide transparent à faible viscosité, remplissant la chambre antérieure de l'œil, l'espace entre la cornée et le cristallin. Continuellement renouvelée, avec le corps vitré, elle maintient la pression intraoculaire dont la valeur normale est de 15 mm Hg (±6mm Hg) ainsi que la forme du globe. Sécrété par les procès ciliaires dans la chambre postérieure, ce liquide est constitué à 97 % d'eau. Il gagne la chambre antérieure en passant par la pupille puis est évacué via le trabéculum dans le canal de Schlemm qui rejoint les veines aqueuses, « épi-sclérales », de la circulation générale (Figure 1-16). Si son évacuation est gênée, la pression intraoculaire s'élève et peut engendrer un glaucome.

L'humeur aqueuse possède un indice de réfraction de 1,336. Le changement d'indice de réfraction entre la cornée et l'humeur aqueuse induit une faible réfraction ayant un pouvoir de l'ordre de - 6 dioptries.

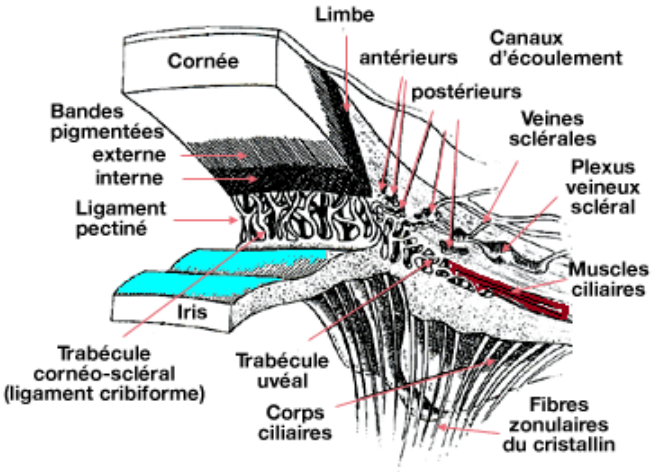


Figure 1-16 Schéma de l'angle irido-cornéen, la zone de transition entre la cornée, la sclère, l'iris et le corps ciliaire. Le trabéculum est une bande prismatique triangulaire, disposée en anneau parallèle, et située en profondeur au niveau du limbe, la zone de jonction entre la cornée transparente et la sclère opaque [25**].**

2.4 L'iris

Appartenant à l'uvée de l'œil, ce tissu est vascularisé et forme une membrane circulaire et contractile. Par sa pigmentation, il donne la couleur de l'œil et il existe un nombre infini de pigments, allant du bleu ou vert au marron. En l'absence de pigmentation, l'iris prend la couleur du sang qui y circule. Par ailleurs, l'iris est innervé par des fibres nerveuses stimulant les muscles et les sphincters qui contrôlent la dilatation et la constriction de la pupille, le diaphragme de l'œil. Ce réflexe permet d'adapter la vision à la luminosité ambiante.

2.5 Le cristallin

2.5.1 Structure et fonction du cristallin

Le cristallin joue le rôle d'une lentille biologique biconvexe. Comme tous les éléments impliqués dans le cheminement des rayons lumineux vers la rétine, ce tissu est non vascularisé et transparent (Figure 1-17).

Figure 1-17 Photographie d'un cristallin humain sain [26].

Le cristallin est situé juste en arrière de l'iris et attaché au corps ciliaire (portion antérieure de la choroïde) grâce son ligament suspenseur, la zonule de Zinn. Situé en couronne derrière l'iris, le corps ciliaire est constitué d'une série d'environ 80 procès ciliaires contenant des fibres musculaires lisses, des vaisseaux sanguins et responsables de la sécrétion d'humeur aqueuse. Il contient également le muscle ciliaire dont la contraction contrôle la forme du cristallin, et donc l'accommodation.

La structure du cristallin est unique et particulièrement organisée (Figure 1-18).Il est formé de la périphérie vers le centre par : la capsule cristalloïde (ou cristalloïde) ; le cortex, constitué des corticales antérieure et postérieure, formées par l'apposition successive des fibres cristalliniennes issues de l'épithélium de la région équatoriale ; et du noyau adulte. C'est le seul tissu humain dont la transparence est assurée par la composition de ses cellules.

2.5.2 Transparence du cristallin

La transparence du cristallin pour le spectre visible et les ultraviolets dépend de deux caractéristiques :

- sa concentration élevée en protéines solubles cytoplasmiques, les cristallines, serrées et rangées régulièrement. Leur composition physico-chimique influence la transparence, en créant notamment un indice de réfraction élevé. Par ailleurs, leur concentration est plus élevée au centre du cristallin, ce qui induit un gradient radial de l'indice de réfraction qui corrige les aberrations sphériques inhérentes [30].
- la relative déshydratation du cristallin qui est régulée par un système microcirculatoire interne, responsable de la maintenance de l'homéostasie des cellules cristalliniennes [31].

L'une des particularités du cristallin est que ses fibres restent transparentes toute la vie, sans avoir besoin de se renouveler. Ce phénomène reste encore partiellement incompris.

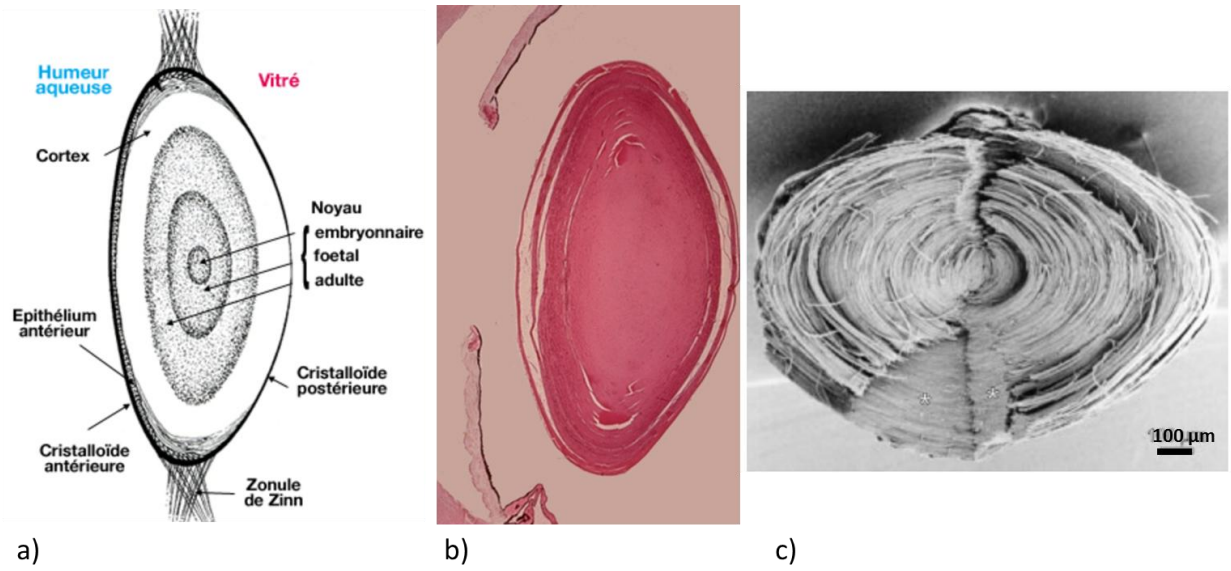


Figure 1-18 Schéma de l'organisation du cristallin [27] a), coupe histologique du cristallin [28] b) et image de microscopie à balayage d'un cristallin humain [29] c).

2.5.3 Propriétés optiques du cristallin

Le cristallin est une lentille flexible, biconvexe et convergente dont la puissance peut varier, ayant en moyenne un pouvoir réfractif équivalent au tiers du pouvoir réfractif total de l'œil, soit 19 dioptries. Il permet ainsi la focalisation de la lumière sur la fovéa. Relié aux muscles ciliaires, il a la capacité de se déformer afin que l'image obtenue sur la rétine soit toujours nette. C'est la capacité d'accommodation (Figure 1-19) [32].

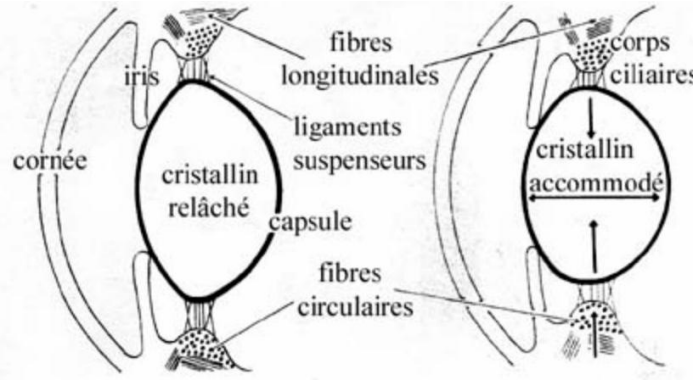


Figure 1-19 Schéma présentant la capacité de déformation du cristallin [33**].**

Les propriétés optiques particulières du cristallin sont présentées ci-dessous [34-36].

- **Indice de réfraction :**

Il n'est pas homogène dans tout son volume. Il varie de 1,38 à 1,50 de la périphérie au centre [35] du fait de l'augmentation de la concentration des protéines qui le constituent. Delaye et Tardieu ont montré que les cristallines ne sont pas des diffuseurs indépendants et qu'il existe un ordre à courte distance dans l'organisation des fibres [37].

- **Absorption :**

Le cristallin agit comme un filtre spectral absorbant les longueurs d'onde les plus énergétiques (autrement dit les longueurs d'onde dans la gamme des ultraviolets) qui sont passées à travers la cornée et qui représentent donc un danger potentiel pour la rétine. Le

cristallin transmet environ 80 % de la lumière incidente jusqu'à 1200-1300 nm et puis une fenêtre optique de faible transmission se situe autour de 1700 nm (Figure 1-20).

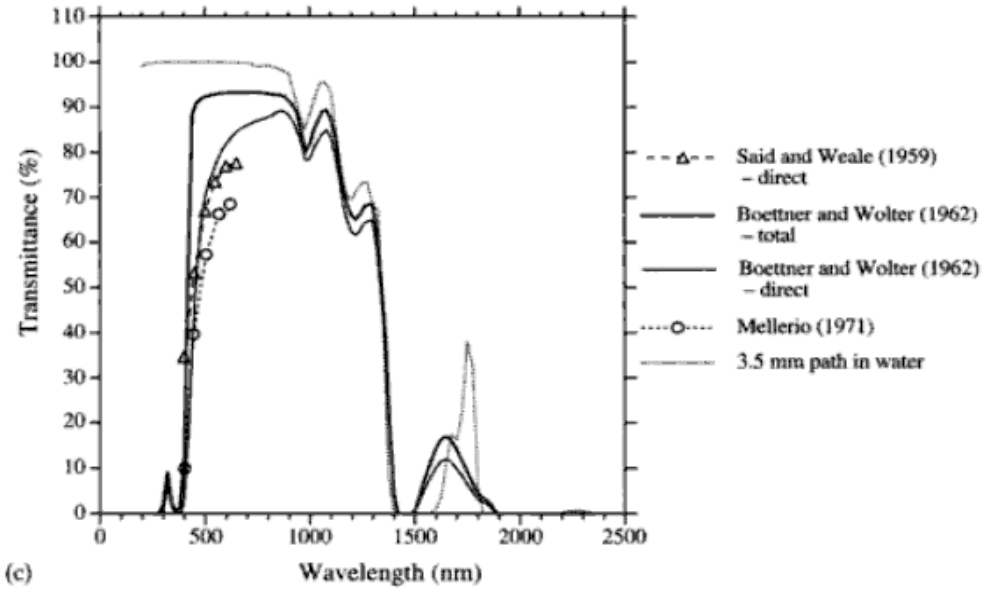


Figure 1-20 Courbe de transmission à travers le cristallin à partir de différentes sources [38-40].

- **Transparence et diffusion :**

L'analyse de Fourier des fluctuations spatiales dans une image de fibres donne une information quantitative des composantes. Dans les fibres transparentes, les dimensions des composantes de Fourier sont petites par rapport à la longueur d'onde visible. Vaezy et *al.* ont développé des méthodes de Fourier permettant une analyse quantitative des composantes de Fourier obtenus à partir du traitement de micrographes électroniques dans le cristallin [12,41,42].

Avec l'âge, les modifications des propriétés du cristallin peuvent provoquer deux types d'affections touchant une grande partie de la population : la presbytie, induite par la modification du pouvoir d'accommodation liée à la perte de l'élasticité du cristallin ; et la cataracte, une opacification du cristallin qui provoque une baisse de la vue. Ces pathologies liées au vieillissement du tissu seront décrites en détail dans le chapitre suivant.

À travers ce chapitre, nous venons de voir la description des différents tissus du segment antérieur de l'œil. Il a notamment été question des propriétés de transparence et de diffusion de ces tissus. Nous avons vu la relation entre l'organisation de la structure d'un tissu et la diffusion optique induise.

Pour la cornée claire, la diffusion suit principalement la théorie de Rayleigh et le phénomène de diffusion optique est dépendant de la longueur d'onde selon une loi en λ^{-3}.

Pour la cornée œdémateuse et la sclère, nous avons vu que la diffusion avait un comportement moins fortement dépendant de la longueur d'onde que pour la cornée claire. Dans ces tissus moins transparents et pour diminuer ce phénomène de diffusion optique,

l'intérêt est donc d'utiliser une lumière ayant une longueur d'onde plus élevée dans le proche infrarouge.

Les mesures de diffusion présentes dans la littérature sont souvent limitées à la gamme spectrale visible (400 – 800 nm). Des mesures de diffusion sur la cornée, la sclère et le cristallin ont été réalisées sur une plus large gamme spectrale et sont présentées dans le chapitre 3.

Chapitre 2 Pathologies et chirurgies du segment antérieur de l'œil

Mon projet de thèse est fortement relié au projet ANR NOUGAT[1], prévoyant notamment le développement d'un laser à impulsion ultracourtes pour le traitement du glaucome. Mon travail était également rattaché au projet ANR précédent du groupe[2], concernant la greffe de cornée par laser femtoseconde.

Dans ce deuxième chapitre, je commencerai par décrire la procédure de la greffe de cornée, une opération très répandue. Je continuerai par la description de la maladie progressive et insidieuse qu'est le glaucome, puis des traitements possibles, et des nouveaux traitements prometteurs qui devraient ralentir l'évolution de cette pathologie. Enfin, je décrirai rapidement les deux affections du cristallin liées au vieillissement de ce tissu (presbytie et cataracte).

1 La greffe de cornée

1.1 Les principales indications de la greffe de cornée

La greffe est indiquée lors d'affections induisant des opacités cornéennes (sauf dans le cas du kératocône), associées à une baisse de l'acuité visuelle. Les principales indications pour la kératoplastie transfixiante sont les séquelles dues à la perforation de la cornée, ou encore les brûlures chimiques, les dégénérescences cornéennes comme le kératocône (représentant près d'un tiers des interventions de greffe cornéenne). On peut également citer les dystrophies et les kératites infectieuses.

1.2 Histoire de la kératoplastie

La greffe de cornée est la plus ancienne greffe de tissu réalisée avec succès. Les premières greffes « lamellaires» ont été réalisées en 1888 par Von Hippel à partir d'une cornée de lapin, qui faisait l'hypothèse d'une transparence cornéenne due à l'intégrité de l'endothélium et de la membrane de Descemet. C'est en 1905 que le Dr. Zirm réalise le premier une kératoplastie transfixiante chez un homme de 45 ans, en remplaçant avec une cornée d'un œil perdu d'un enfant de 11 ans.

Cette intervention de greffe consiste à remplacer la totalité ou une partie d'une cornée souvent opacifiée (autrement dit pathologique) par une cornée saine de donneur.

La cornée est le tissu le plus fréquemment greffé car il est privilégié pour ce type d'opération : avasculaire, il contient très peu de cellules (uniquement les kératocytes et les cellules endothéliales lorsque la greffe est transfixiante, car l'épithélium est enlevé lors de la procédure) et bénéfice d'un privilège immunologique n'induisant qu'une réponse immunitaire réduite [43]. De plus, il est facile de déceler le rejet rapide de ce type de greffe car il est

[1]Projet NOUGAT : ANR-08-TecSan-012 « Nouvel OUtil pour la chirurgie du Glaucome par laser femtoseconde et imagerie par tomographie de cohérence optique », dont les partenaires sont l'hôpital l'Hôtel Dieu de Paris, le laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique *GraduateSchool* et la société Amplitude Systèmes.

[2]Projet GRECO : ANR-TecSan-2006-25 « Greffe de cornée automatisée par laser femtoseconde avec optimisation de la longueur d'onde et correction du front d'onde ».

visible et se manifeste par une baisse d'acuité visuelle. Le taux de survie du greffon sur deux ans est de 90% et à 10 ans, le taux de succès est de 70 à 80% [44,45,46].

Figure 2-1 Photographie d'une intervention du Dr. Zirm en 1905 [47].

On compte environ 5000 greffes de cornées par an en France [48], contre 150 000 procédures LASIK environ (données peu fiables pour la chirurgie réfractive).

1.3 Le protocole

- Le prélèvement et la conservation :

Un disque cornéo-scléral d'environ 11 mm est prélevé sur un cadavre, le globe oculaire restant en place. En France, ce disque cornéen (avec sa collerette de sclère) est ensuite directement placé dans un flacon de milieu nutritif de culture CorneaMax[3] contenant des antibiotiques, des antifongiques et un indicateur de pH qui change de couleur en cas de contamination[4]. Ce flacon est conservé dans une étuve à 31°C par une banque des yeux. De nouveaux milieux de culture sans composé d'origine animale, réduisant le risque de transmission d'agents infectieux tels que les prions sont en cours de développement (par Stem Alpha par exemple).

- Les tests :

Pendant environ deux semaines, l'échantillon est contrôlé de diverses façons, notamment par des contrôles bactériologiques et sérologiques. Outre ces tests, d'autres contrôles sont effectués. Un technicien évalue la transparence macroscopique de l'échantillon et le diamètre de la zone optique claire qui doit être supérieur à 8 mm (en vieillissant, la formation de dépôts lipidiques en périphérie cornéenne[5] tend à le faire décroître). La densité de cellules endothéliales est également évaluée car il s'agit d'un bon indicateur de la probabilité de succès de la greffe et du maintien de la transparence cornéenne. Afin d'estimer le taux de mort cellulaire, l'échantillon est placé une minute dans une solution de bleu trypan[6] – un colorant vital mettant en évidence les cellules mortes – et quatre minutes dans une solution de sérum physiologique[7] afin de mettre en évidence les jonctions cellulaires. La densité de cellules endothéliales est calculée à partir de 3 images successives prises grâce à un macroscope, au centre de la cornée. Une analyse morphométrique peut également être

[3]Eurobio, Courtabœuf, France.
[4]À pH neutre, le rouge de phénol est rouge et il devient jaune en cas d'acidification, soit de contamination.
[5]Formation d'un gérontoxon, arc sénile de la cornée.
[6]Bleu trypan (0,4%), Sigma-Aldricht.
[7]NaCl 0,9% ; Sigma-Aldricht.

effectuée, basée sur une détermination du coefficient de variation de l'aire cellulaire et le calcul du pourcentage de cellules hexagonales. En dessous de 2000 cellules / mm^2 (voire 3000 cellules/mm^2 pour certains chirurgiens-ophtalmologistes), un taux de mortalité des cellules > 2% ou avec une morphologie trop irrégulière de ces cellules, la cornée est jugée inapte à la greffe [49,50].

- Avant la greffe :

A l'issue de ces différents contrôles, environ 55 % des greffons prélevés sont aptes à la greffe. Ces échantillons sont alors placés dans un second milieu préparatoire à la greffe pendant 24 à 48 h avant l'intervention : un milieu de déturgescence contenant du dextran (CorneaJet[8]). Le greffon est extrait de ce milieu au début de l'intervention, découpé selon la géométrie et la taille souhaitées, puis placé et suturé sur le lit receveur.

1.4 La réalisation de la greffe

La greffe de cornée peut concerner tout ou une partie de l'épaisseur de la cornée (Figure 2-2). La kératoplastie transfixiante (KT) consiste à prélever la totalité de l'épaisseur cornéenne. Autrement, lorsqu'une partie de l'épaisseur de la cornée est remplacée, la greffe est dite « lamellaire »: « antérieure » pour la partie supérieure ou « postérieure » pour la membrane de Descemet et l'endothélium. L'avantage des greffes lamellaires est qu'il s'agit d'opérations souvent réalisées à globe fermé, présentant ainsi moins de risque infectieux. Cependant, la greffe transfixiante reste la plus pratiquée. Depuis les années 1930, les greffes lamellaires ont perdu de leur popularité et ne représentent actuellement plus que 3 à 5% des greffes de cornées. Le raffinement des techniques chirurgicales et le développement de lasers femtosecondes permettent néanmoins un certain retour aux greffes lamellaires.

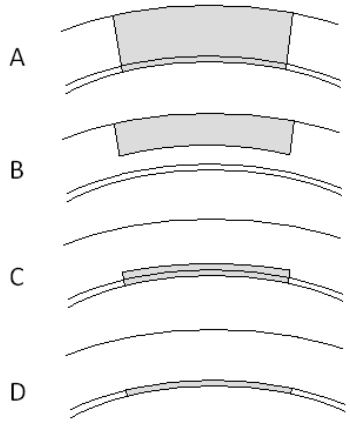


Figure 2-2 Différentes configurations possibles pour la kératoplastie transfixiante (A), lamellaire : antérieure (B), postérieure (C) ou endothéliale (D) [15].

La perte cellulaire après la greffe est moins importante lors de greffes lamellaires, notamment antérieures. On compte environ 10% de pertes après un an de suivi pour les greffes lamellaires alors que pour les greffes transfixiantes, la perte cellulaire est importante la première année puis se poursuit au fil des années. Ainsi, les greffes lamellaires peuvent être indiquées en particulier pour les patients ayant un endothélium sain et une pathologie antérieure à la membrane de Descemet.

[8]Eurobio, Courtaboeuf

La technique opératoire suit un protocole bien précis. La cornée donneuse est trépanée afin d'obtenir un disque d'un diamètre donné, souvent 8,25 mm. La cornée du patient est alors découpée sur un diamètre de 8 mm, intentionnellement plus petit afin d'assurer l'étanchéité entre le lit receveur et le greffon. A l'issue de l'opération, la collerette restante du greffon est envoyée au laboratoire d'anatomopathologie, tout comme la cornée prélevée sur le patient.

1.5 Les complications des greffes transfixiantes

Il existe des complications qui apparaissent rapidement après l'opération comme les problèmes de suture, les fuites, les infections, une pression intraoculaire trop élevée ou au contraire une hypotonie ou l'échec de la greffe. A plus long terme (semaines ou mois après l'intervention), des pathologies peuvent apparaitre comme le glaucome ou la cataracte (probablement pathologies « dormantes » avant l'opération), apparition d'astigmatisme, réapparition de la pathologie induisant la précédente baisse d'acuité visuelle.

Il est important de considérer les facteurs de risque et les taux de réussite des greffes lors d'une indication de greffe pour un patient.

2 Le glaucome et ses traitements

2.1 La pathologie

Le glaucome est une maladie très répandue à travers le monde et représente la seconde cause de cécité. C'est une maladie insidieuse, indolore et asymptomatique, qui se développe lentement dans la majorité des cas, et qui conduit à la destruction progressive et irréversible des fibres nerveuses, et donc à la réduction du champ visuel pouvant conduire à la cécité.

On peut classer les différents types de glaucome, par exemple, selon la configuration de l'angle irido-cornéen et le mécanisme : le glaucome chronique à angle ouvert et le glaucome aigu à angle fermé plus rare. C'est le glaucome chronique à angle ouvert (GCAO) qui est le plus répandu et celui qui nous concerne le plus dans nos études.

2.1.1 Epidémiologie

Le glaucome est la seconde cause de cécité dans le monde avec plus de 110 millions de personnes atteintes, dont environ 3 millions d'aveugles. En France, elle touche environ 1 million de personnes.

Les facteurs de risque de développement et d'aggravation de cette maladie sont nombreux ; le facteur de risque le plus fréquent et contrôlable par un traitement est l'élévation de la pression intraoculaire, appelée hypertonie intraoculaire. D'autres facteurs tels l'âge, la couleur de peau, le diabète, les antécédents familiaux, la myopie et les variations de pression artérielle sont bien caractérisés, mais moins facilement accessibles.

2.1.2 Physiopathologie

- Pression intraoculaire et humeur aqueuse

La pression intraoculaire est équilibrée par la sécrétion du liquide qui remplit la partie antérieure de l'œil, l'humeur aqueuse, par le corps ciliaire et sa résorption au travers des pores du réseau trabéculaire, équivalent d'un « filtre » situé dans l'angle irido-cornéen. Le trajet suivi par l'humeur aqueuse entre sa sécrétion et sa résorption est présenté sur la Figure 2-3.

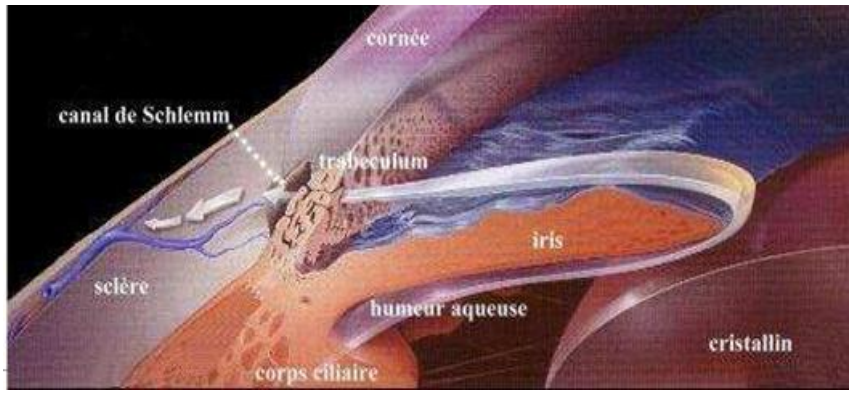


Figure 2-3 Schéma montrant le trajet de l'humeur aqueuse depuis sa production par le corps ciliaire jusqu'à son évacuation par le canal de Schlemm.

L'humeur aqueuse, sécrétée par les corps ciliaires, chemine ensuite entre le cristallin et l'iris puis entre dans la chambre antérieure pour être résorbée au niveau du trabéculum vers le canal de Schlemm.

Ce trabéculum joue un rôle essentiel de filtre dans ce processus. Sa structure particulière, constituée de collagène organisé en réseau (comme le montre l'image de microscopie non-linéaire par fluorescence à deux photons présentée en Figure 2-4 permet la filtration de l'humeur aqueuse. Alors que vers la chambre antérieure le trabéculum est lâche, plus on se rapproche du canal de Schlemm, plus les mailles se resserrent (Figure 2-5).

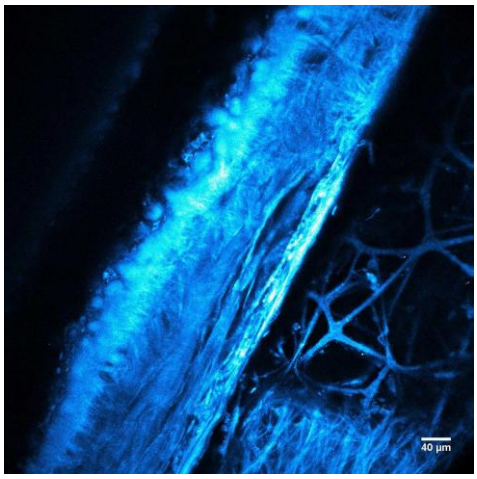


Figure 2-4 Imagerie des cellules endothéliales cornéennes, sclère et mailles (en élastine) du réseau trabéculaire par imagerie de fluorescence à deux photons [51,52].

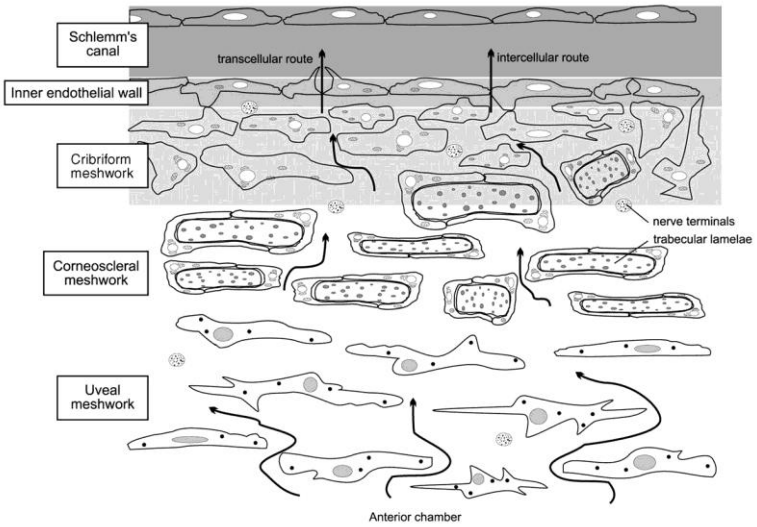


Figure 2-5 Schéma montrant l'organisation du réseau trabéculaire [53].

Finalement, l'humeur est collectée par le canal circulaire qui épouse la circonférence de l'œil en arrière de la cornée, le canal de Schlemm, puis évacuée dans la circulation générale grâce à aux veines aqueuses de la sclère. Lorsque la circulation liquidienne est équilibrée, la pression intraoculaire normale vaut environ 15 mmHg (± 6mm Hg).

- Hypertonie intraoculaire

Une pression intraoculaire normale correspond à un équilibre entre la production d'humeur aqueuse et son évacuation. Le mécanisme de survenue de cette hypertonie n'est pas parfaitement connu, mais il peut impliquer une surproduction de l'humeur aqueuse par les procès ciliaires, ou au contraire, et le plus souvent, une résistance à l'élimination de l'humeur aqueuse.

Plusieurs études ont montré que le siège de l'obstacle à l'évacuation normale se situe entre le trabéculum et le canal de Schlemm. Plusieurs mécanismes pourraient être impliqués, entre autres : un réseau trabéculaire « encombré » ou moins bien organisé empêchant une filtration normale de l'humeur ; une perte de la perméabilité de la paroi interne du canal ; ou encore, un écrasement local du canal augmentant d'autant l'hypertonie [51].

- Atteinte des fibres nerveuses optiques

Bien que l'origine du trouble de l'équilibre soit située dans la partie antérieure de l'œil, le globe oculaire n'étant pas extensible, les conséquences de la pathologie sont situées dans la partie postérieure, sur la rétine et au niveau de la papille optique.

Deux hypothèses sont avancées pour expliquer les lésions des fibres optiques sur la papille. Une première hypothèse mécanique suppose que l'augmentation de pression entraine la compression de la tête du nerf optique, aboutissant à la destruction directe des fibres optiques. Une autre hypothèse, dite vasculaire, suppose que l'hypertonie entraine un écrasement des vaisseaux irriguant le nerf optique, et donc une réduction du flux sanguin, aboutissant à une ischémie de la tête du nerf optique. Les fibres nerveuses optiques sont alors progressivement détruites.

L'enjeu du dépistage et du diagnostic est primordial, pour détecter au plus tôt le développement de la pathologie.

2.1.3 Les signes cliniques de la maladie

Il existe trois signes cliniques principaux [54] :

- Une élévation pathologique de la pression intraoculaire. Il faut noter qu'une hypertonie oculaire n'est pas forcément indicatrice d'un glaucome car elle peut être passagère ou temporaire ; de plus, il existe des glaucomes sans hypertonie oculaire.
- Un élargissement de l'excavation de la papille par destruction des fibres optiques nerveuses (dépression caractéristique du nerf optique).
- Une altération du champ visuel caractéristique de l'atteinte du nerf optique.

Les différents stades de gravité de la pathologie sont récapitulés dans le tableau ci-dessous.

Stades de gravité	Risque d'évolution vers la cécité	Caractéristiques du glaucome
Stade 1	Très élevé	- Atteinte du nerf optique + déficit visuel quel que soit le niveau de PIO
Stade 2	Important	- Atteinte du nerf optique - PIO modérément augmentée ou une PIO ≥ 30 mmHg mais avec un disque optique normal - Fermeture de l'angle avec présence de synéchies ou PIO augmentée - Néovascularisation
Stade 3	Modéré	- Disque optique normal et absence d'altération du champ visuel - PIO augmentée et disque optique subnormal - Œil controlatéral d'un œil dont la neuropathie optique a été confirmée
Stade 4	Faible	- PIO augmentée* - Vieillissement* - Fermeture de l'angle - Syndrome pigmentaire - Syndrome pseudo-exfolliatif - Hémorragie au niveau de la papille - Asymétrie de la papille - Antécédents familiaux de glaucome* - Facteurs de risque génétiques*

(*) = l'association de plusieurs facteurs de risque fait passer un sujet du groupe 4 au groupe 3.

Figure 2-6 Tableau présentant les stades de gravité du glaucome et les risques d'évolution vers la cécité [55].

2.2 Les outils du diagnostic

Le glaucome est un problème majeur de santé publique et nécessite donc un dépistage massif et systématique pour les personnes de plus de 40 ans.

Il s'agit avant tout de mesurer la pression intraoculaire, d'étudier la géométrie de l'angle irido-cornéen par gonioscopie, de rechercher au fond d'œil directement ou à l'aide de techniques d'imagerie (polarimètre à balayage laser GDxVcc, Tomographie par cohérence optique, microscope confocal HRT) d'éventuelles traces de détérioration au niveau de la rétine et enfin de rechercher un éventuel rétrécissement du champ visuel.

2.2.1 La lampe à fente

Le segment antérieur est examiné avec soin grâce à un bio-microscope, ou « lampe à fente ». Ce type d'examen doit être systématique chez un patient glaucomateux. Toutes les structures du segment antérieur de l'œil sont alors observées : les paupières, la conjonctive, la cornée, l'iris et le cristallin.

L'examen à la lampe à fente permet de réaliser une mesure de la pression intraoculaire, par tonométrie de Goldmann (se différencie de la tonométrie à air qui surestime parfois les valeurs mesurées). La rétine peut également être observée par la lampe à fente. Le

fond d'œil permet alors de mesurer la taille du disque optique et d'autres paramètres qui seront suivis lors de l'évolution du glaucome.

2.2.2 La mesure de la pression intraoculaire

La pression intraoculaire est mesurée de façon précise grâce à plusieurs types de tonomètres. Le tonomètre à air pulsé possède l'avantage d'être sans contact, l'aplanation étant obtenue par compression grâce au jet d'air de la sonde de mesure. Il existe également le tonomètre par aplanation grâce à un verre fonctionnant selon le principe d'Imbert-Fick, inventé par Goldmann. La pression est dite « anormale » lorsqu'elle est supérieure à 21 mmHg.

2.2.3 Gonioscopie

L'une des zones d'intérêt dans la pathologie du glaucome est l'angle irido-cornéen au sein duquel se trouvent les voies d'évacuation de l'humeur aqueuse. La gonioscopie permet l'observation de cet angle et la discrimination entre un angle fermé et un angle ouvert. En pratique, cette observation est réalisée indirectement à la lampe à fente, à l'aide d'un verre à 3 ou à 4 miroirs. Aujourd'hui, elle est peu à peu remplacée par les tomographes de cohérence optique (OCT) du segment antérieur qui permettent, entre autres, de visualiser et de mesurer avec précision l'angle irido-cornéen, mais aussi de connaitre la configuration de l'iris [56]. Ainsi, il est possible de distinguer le type de glaucome en présence parmi les nombreuses formes de la pathologie.

2.2.4 Champ visuel

Enfin, le champ visuel du patient est contrôlé en faisant, par exemple, un test Humphrey, au cours duquel le patient doit dire dans quelle zone il voit apparaitre successivement les stimuli lumineux (ou s'il ne les voit pas). Le champ visuel d'un œil normal s'étend jusqu'à 60° en haut, 80 ° en bas, 90° en temporal et 60° en nasal, champ limité par le nez et les orbites.

Actuellement, il n'est pas possible de guérir le glaucome. Le traitement du glaucome consiste à ralentir la progression de la maladie, en abaissant la pression intraoculaire, qui est le seul facteur de risque pouvant être corrigé.

2.3 Les différents traitements actuels du glaucome

Les traitements disponibles agissent sur la sécrétion de l'humeur aqueuse par les corps ciliaires ou sur son évacuation, afin de protéger le nerf optique en ralentissant la progression de la maladie, et donc, la destruction des fibres nerveuses.

2.3.1 Le traitement pharmacologique

C'est le traitement de première intention dans la plupart des cas. Il consiste essentiellement à l'instillation de collyres, une ou plusieurs fois par jour, selon la durée d'efficacité du collyre. C'est l'ophtalmologiste qui choisit le ou les collyre(s) hypotonisant(s) le(s) mieux adapté(s) au patient et le(s) mieux toléré(s), en fonction de l'état d'avancement du glaucome, de la pression intraoculaire et d'autres paramètres. Le traitement initial consiste en une monothérapie, puis, évolue au fur et à mesure vers une combinaison associant les différents collyres.

Il peut par exemple s'agir de β-bloquants [57], qui constituent le traitement de référence du glaucome. Ils diminuent la pression intraoculaire et permettent d'abaisser la production d'humeur aqueuse. Parmi d'autres catégories de médicaments, il y a les myotiques qui agissent en améliorant l'évacuation de l'humeur aqueuse. Cependant, les collyres

présentent souvent de nombreux effets secondaires et sont contraignants (application de gouttes plusieurs fois par jour), ce qui peut être la cause d'une mauvaise observance thérapeutique alors que le succès du traitement repose justement sur la rigueur du suivi de la prescription.

Enfin, il faut noter que ce traitement est généralement prescrit à vie et ne doit pas être arrêté sans prendre l'avis du spécialiste.

2.3.2 Le trabéculoplastie au laser

Dans le cas où le traitement médical seul ne suffit plus ou que le traitement pharmacologique est mal toléré par le patient, l'ophtalmologiste pourra indiquer un acte réalisé au laser Argon ou Nd:Yag doublé[9], c'est la trabéculoplastie. Elle consiste à provoquer la photocoagulation locale du trabéculum afin de le rendre plus perméable, en appliquant un certain nombre d'impacts tout autour de la cornée. La plus ancienne procédure est la trabéculoplastie au laser Argon (ALT), elle est depuis quelques années remplacée par la trabéculoplastie au laser sélectif (SLT).

Dans le cas de l'ALT, les impacts ont une taille de 50 µm, et une puissance de 800 mW, pendant des durées de l'ordre de la milliseconde [58,59], provoquant ainsi un effet thermique. Cette intervention a été proposée dès 1979 par les Dr. Wise et Dr. Witter. La principale longueur d'onde utilisée est comprise entre 488 et 514 nm. Ce type de laser émet différentes longueurs d'onde dans le visible, l'ultraviolet et l'infrarouge proche, entre 351 nm et 1092 nm. Cette procédure est utilisée depuis plus de trente ans et est considérée comme un choix thérapeutique valable [60]. Néanmoins, les résultats à long terme sont parfois mitigés, et l'abaissement de la pression intraoculaire n'est pas toujours suffisant. L'inconvénient de cette procédure est qu'elle ne peut pas être renouvelée.

La SLT, initialement développée par Dr. Latina en 1995, est réalisée à l'aide d'un laser Nd :Yag Q-switch doublé, émettant dont à la longueur d'onde 532 nm. Les impacts ont une taille de 400 µm, une durée d'environ 100 ns (en mode pulsé), avec une énergie de l'ordre du mJ, que l'ophtalmologiste ajustera en fonction du besoin. Une cinquantaine d'impacts placés côte à côte sur le trabéculum est appliquée. Ce type de laser présente l'avantage d'une longueur d'onde absorbée uniquement par la mélanine, agissant donc sélectivement sur les cellules pigmentées du trabéculum, sans atteindre le collagène ou les cellules adjacentes (Figure 2-7). De plus, étant moins focalisé, l'application des impacts nécessite moins de précision que l'ALT. La SLT présente ainsi une courbe d'apprentissage plus rapide.

On traite un anneau de 180° à 360 °, en une ou deux séances. Un verre de Goldmann, ou un autre verre dédié à cette procédure, est appliqué sur l'œil afin que l'ophtalmologiste visualise le trabéculum à impacter.

Contrairement à l'ALT, la SLT peut être répétée 2 ou 3 fois dans les cas où l'effet du premier traitement a été positif [62]. Cependant, l'efficacité s'amoindrit au fil des tentatives.

[9]Le laser Nd-YAG (acronyme du nom anglais : *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*) ou grenat d'yttrium-aluminium dopé au néodyme (Nd:$Y_3Al_5O_{12}$) est un cristal utilisé comme milieu amplificateur pour les lasers utilisant des milieux solides émettant à 1064 nm. Lorsqu'il est doublé, la longueur d'onde devient 532 nm.

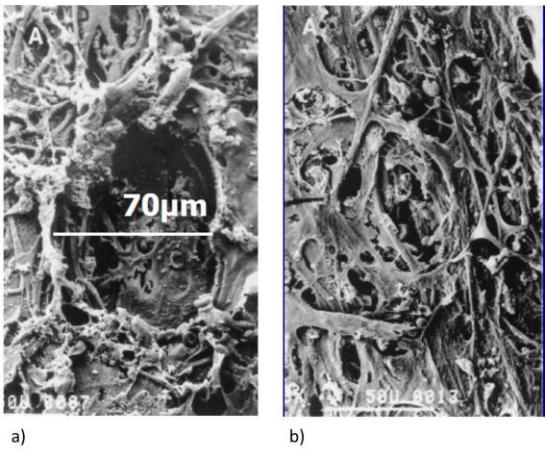


Figure 2-7 Aspect du trabéculum en microscopie électronique à balayage (MEB) après ALT a) et après SLT b) [61].

A un certain stade d'avancement de la pathologie et lorsque les traitements précédents ne sont plus efficaces, la chirurgie doit souvent être envisagée [63].

2.3.3 Le traitement chirurgical

Environ 12 000 à 15 000 procédures chirurgicales sont réalisées chaque année en France [**64**].

Deux types de chirurgie « filtrante », *i.e.* favorisant l'évacuation de l'humeur aqueuse, peuvent être indiqués par l'ophtalmologiste : les chirurgies perforante et non perforante. Dans tous les cas, ce traitement consiste à réaliser une fistule au travers de la sclère, afin d'améliorer l'évacuation de l'humeur aqueuse depuis le lieu de sa production jusque sous la conjonctive. L'œil est décomprimé en réalisant une « soupape » de décompression sous la paupière supérieure afin que la bulle générée (remplie d'humeur) soit protégée et non visible.

- La trabéculectomie

Au cours de cette chirurgie « perforante », la paroi de l'œil est complètement ouverte. L'humeur aqueuse circule librement dans la fistule créée, entrainant une baisse importante de la pression intraoculaire, mais parfois trop brutalement (hypotonie oculaire) et irrégulièrement. Les différentes étapes de cette intervention sont présentées sur la Figure 2-8.

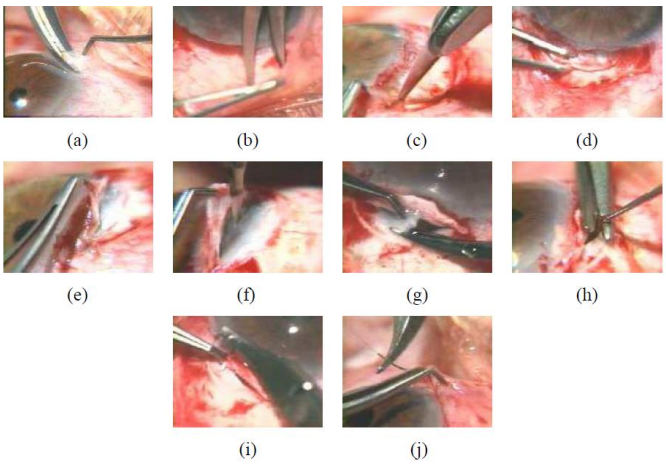


Figure 2-8 Photographies présentant les différentes étapes de la trabéculectomie [51]. Les différentes étapes représentées sont a) une incision conjonctivale en surface, b) l'incision de la capsule de Tenon, c) la réalisation d'un premier volet scléral à charnière limbique et de forme triangulaire préférentiellement ; d) réalisation d'un volet scléral plus profond et e) ablation de ce volet, f) ouverture de la chambre antérieure; g) ablation du trabéculum, h) iridectomie, i) suture sclérale et j) suture conjonctivale.

- La sclérectomie profonde non perforante

En pratique, ce deuxième type de chirurgie consiste à lamelliser la paroi de l'œil à l'extrême, sans l'ouvrir complètement. Dans ce cas, il y a filtration de l'humeur aqueuse à travers la faible épaisseur de paroi résiduelle de manière modérée, mais plus progressivement et plus régulièrement que dans le cas d'une chirurgie perforante.

La principale cause d'échec de ce type de chirurgie est l'obstruction de la fistule, par apparition d'une fibrose conjonctivale. L'incision de la conjonctive lors de la chirurgie déclenche un processus de cicatrisation, au cours duquel des fibroblastes et myo-fibroblastes vont sécréter une matrice extracellulaire en abondance, obstruant ainsi la fistule. La pression intraoculaire remonte alors à des niveaux identiques (voire supérieurs) à ceux préopératoires.

Il existe un traitement préventif de cette fibrose consistant en l'application d'antimitotiques à la surface de la sclère pendant la chirurgie, typiquement la mytomycine C ou le 5FU. Agressifs et toxiques, ces traitements sont habituellement utilisés en chimiothérapie anticancéreuse, et peuvent entrainer une absence complète de cicatrisation, nécessitant une reprise chirurgicale dans les jours suivants l'opération.

Une autre méthode consiste à poser des implants de drainage pendant la chirurgie pour assurer la fonctionnalisation de la bulle de filtration. Ces implants sont généralement constitués d'un tube de drainage – permettant de shunter les voies naturelles d'élimination de l'humeur – et un corps aplati permettant la dispersion de l'humeur aqueuse. Une valve peut être présente entre ces deux éléments. De nombreux modèles sont disponibles [65] et ces implants sont posés grâce à une incision correspondant à la trabéculectomie. D'autres implants seront présentés dans la section 2.4.2. Il faut noter que ces dispositifs sont sources de nombreuses autres complications et n'empêchent pas toujours l'obstruction de la fistule. Ils sont donc encore très peu utilisés par les chirurgiens, en Europe.

Chez les patients âgés, il est possible de pratiquer la « phaco-trabéculectomie », autrement dit la combinaison de l'opération du glaucome avec celle de la cataracte. Au cours de cette opération, le chirurgien commence par réaliser le volet scléral superficiel de la sclérectomie pour que l'œil conserve son tonus, puis le cristallin est extrait (phacoémulsification). Ensuite, la trabéculectomie est poursuivie [66].

2.4 Les nouvelles voies de traitement

2.4.1 Les ultrasons

Dans certains cas, la chirurgie n'est pas efficace ou n'est pas indiquée et certaines conditions permettent de traiter la maladie à l'aide d'ultrasons [67]. Le principe est de focaliser des ultrasons de haute intensité sur un petit volume de tissu choisi.

Une première procédure consiste à les appliquer sur la zone non fonctionnelle afin de re-perméabiliser l'ensemble du réseau trabéculaire. Les ultrasons vont désorganiser les faisceaux de collagène du tissu cicatriciel, rompre les attaches et permettre le soudage naturel de ces fibres. La deuxième procédure consiste à appliquer les ultrasons sur le corps ciliaire afin de le détruire par élévation de la température qui peut monter jusqu'à 80 ou 90°C. Dans cette procédure, seuls les procès ciliaires sont affectés et le reste de la structure reste intact et fonctionnel.

Une première étude pré-clinique sur les lapins a été réalisée [68] et une étude clinique pilote est actuellement menée sur l'humain (NCT01338467[10]). Les patients inclus dans l'étude présentent :

- Un glaucome réfractaire,
- Un échec d'une ou deux chirurgies filtrantes,
- Un glaucome agonique.

La durée totale du tir est de 3 secondes. Une baisse importante de la pression intraoculaire a été observée et aucune hypotonie majeure n'a été relevée.

A Lyon, une entreprise EyeTechCare a été fondée en juillet 2008 afin de concevoir, développer et commercialiser un dispositif médical permettant cette « cyclo-coagulation ».

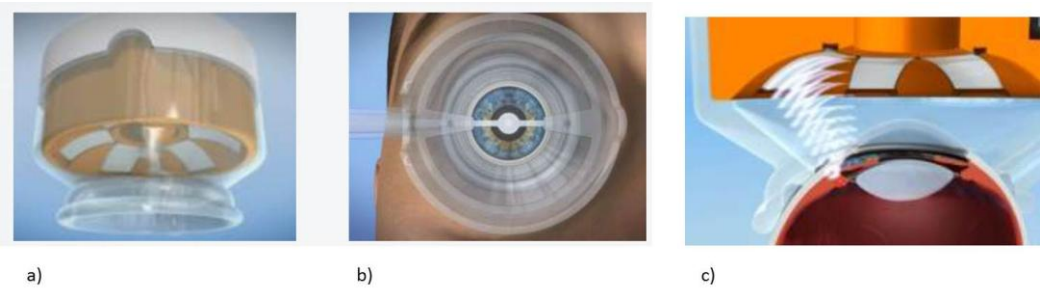


Figure 2-9 Schémas présentant le cône de positionnement équipé d'un système de ventousage et de centrage pour solidariser au globe oculaire a) et b) et réalisation de la coagulation précise contrôlée des corps ciliaires en arc de cercle grâce à 6 transducteurs piézo-électriques miniaturisés.

2.4.2 Les nouveaux systèmes de drainage de l'humeur aqueuse

Le premier dispositif de drainage de l'humeur aqueuse était un crin de cheval inséré à travers une paracentèse cornéenne, en 1906. Cependant, il a fallu attendre la fin des années 1960 pour qu'un dispositif pour le drainage – enforme de tube et plat – ne soit développé. Aujourd'hui, ces systèmes sont régulièrement utilisés, surtout en cas d'échec des traitements médicaux et/ou chirurgicaux.

Leur principe consiste à améliorer l'évacuation de l'humeur aqueuse au travers du trabéculum en créant un écoulement, depuis la chambre antérieure, tout le long d'un tube munie d'une valve contrôlant le débit d'humeur aqueuse.

De nombreux systèmes sont à l'étude aujourd'hui, et de nouveaux concepts utilisant des implants biologiques inertes ou non absorbants sont régulièrement présentés, Parmi ces systèmes, on peut citer, par exemple, le Trabectome®, l'iStent ou encore la canaloplastie.

Le Trabectome® consiste en un outil à usage unique permettant de retirer de manière précise et définitive une partie du trabéculum et de la paroi interne du canal de Schlemm, sans endommager les tissus voisins. Il comprend un système d'irrigation et d'aspiration automatique, ainsi qu'une unité d'électro-cautérisation permettant l'ablation et la coagulation des tissus ciblés. L'iStent consiste en un stent, placé directement dans le canal de Schlemm. Il vise à envoyer l'humeur aqueuse vers les canaux collecteurs permettant une meilleure évacuation. Ce système a été testé sur un nombre limité de patients et son efficacité à long terme n'a été prouvée. Enfin, la canaloplastie correspond à une procédure chirurgicale non pénétrante basée sur la viscodilatation sur toute la circonférence du canal de Schlemm par

[10]http://clinicaltrial.gov/ct2/show/NCT01338467?term=Eyetechcare&rank=1

injection progressive d'une solution d'hyaluronate de sodium. Cette opération est réalisée à l'aide d'un microcathéter flexible et d'une fibre optique afin d'illuminer le site.

Ces dispositifs de drainage permettent aux ophtalmologistes de proposer d'autres solutions et de trouver l'intervention appropriée au cas de chaque patient. Rappelons qu'actuellement, seule la trabéculectomie ou la chirurgie non perforante sont autorisées par les administrations.

2.4.3 Les lasers

Les lasers à l'étude pour le traitement du glaucome sont principalement le laser à CO_2 et les lasers femtosecondes.

- Le laser à CO_2 a été étudié dans le cadre du traitement du glaucome par une équipe israélienne et une société a également été fondée IOPtima (Figure 2-10) [69,70].

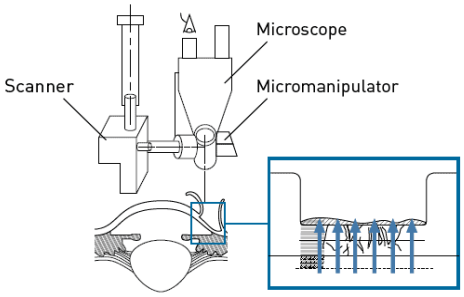


Figure 2-10 Vue schématique du principe de traitement du glaucome par laser proposé par la société IOPtima [71].

- Nous verrons dans le chapitre 4, dédié aux lasers ultra-rapides utilisés pour la chirurgie oculaire, que les lasers femtosecondes produisent une incision propre, sans endommager les tissus environnants, comme la conjonctive dans le cas du glaucome, présentant ainsi une bonne alternative aux procédures traditionnelles [72,73]. Cependant, la longueur d'onde des systèmes cliniques femtosecondes disponibles ne peut pas être utilisée pour la chirurgie des tissus opaques comme la sclère. Deux solutions envisageables consistent à changer : (1) les propriétés du tissu afin de rendre la sclère transparente ou (2) les paramètres du laser. Les premières études dans la sclère, réalisées en 2001, ont montré un intérêt pour les longueurs d'onde situées autour de 1700 nm [74]. D'autres expériences utilisant des lasers femtoseconde aux longueurs d'onde usuelles (autour de 1 µm) ont été réalisées sur du tissu scléral hydraté, et déshydraté (soit rendu transparent) [75]. Une attention particulière a notamment été portée sur la profondeur de pénétration, la taille de la tache focale et les résultats de découpes en fonction de la longueur d'onde.

3 Les affections du cristallin

3.1 La presbytie

3.1.1 Définition

La presbytie correspond à la perte d'élasticité du cristallin, modifiant ainsi le pouvoir d'accommodation du tissu. En temps normal, pour la vision de près, le cristallin permet l'augmentation de la convergence de 10 dioptries. Vers l'âge de 60 ans, l'augmentation de la convergence est nulle : la vision de près n'est plus possible, l'individu presbyte n'est pas

capable de faire le point sur un objet proche de lui. Ce n'est pas une maladie mais un processus de vieillissement normal, qui apparait en général après l'âge de 45 ans. En effet, en vieillissant, le cristallin se durcit, s'épaissit, et la capacité accommodative diminue.

Certaines études ont montré qu'effectivement, le problème de la presbytie venait du cristallin lui-même, les muscles du corps ciliaire – qui permettent la contraction et la relaxation du tissu – étant toujours opérationnels. C'est pour cela que certains ophtalmologistes proposent des incisions laser dans le cristallin afin de lui redonner une certaine élasticité, certains proposent même d'effectuer des incisions dans la cornée. Ce type de chirurgie a tendance à se répandre actuellement.

3.1.2 Traitements actuels

Il existe plusieurs solutions pour améliorer la vision. Tout d'abord, comme toute anomalie de la vision, il peut s'agir du port de lunettes ou de lentilles de contact. Actuellement, il est également possible de réaliser une intervention chirurgicale. Par laser, les procédures PrebyLasik ou IntraCor permettent à la cornée d'être dotée d'une capacité mutlifocale, autrement dit de permettre une vision de près et de loin grâce à une modification de la structure du tissu. Il est également possible de remplacer le cristallin par un implant intraoculaire, tout comme pour la cataracte.

- Le PresbyLasik

Certains lasers comme le laser Wavelight Allegretto EYE-Q (Alcon) permettent de modifier le facteur d'asphéricité de la cornée et elle est ainsi rendue multifocale, autorisant simultanément la vision de loin et celle de près.

- IntraCor

L'Intracor (pour « intrastromal correction of presbytia ») est une nouvelle technique chirurgicale destinée à corriger la presbytie. Expérimentée depuis quelques années en Colombie, le premier patient français a été opéré en mai 2009 après obtention du marquage CE. Cette intervention consiste à réaliser cinq incisions circulaires concentriques à l'aide un laser femtoseconde dans la profondeur de la cornée (Figure 2-11) axées sur le centre de la pupille, afin de rendre la cornée multifocale. Contrairement à la procédure du LASIK, aucun volet cornéen n'est réalisé, tout risque infectieux ou de sécheresse oculaire est supprimé. Il s'agit d'une intervention indolore et très rapide (une dizaine de secondes).

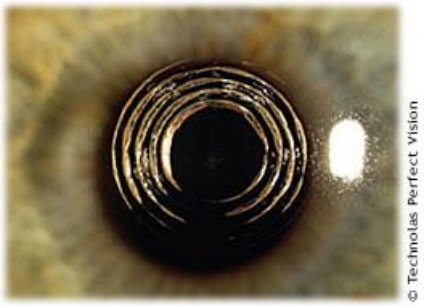


Figure 2-11 Bulles de cavitation d'incisions circulaires réalisées à l'aide du laser femtoseconde Technolas Perfect Vision, ayant le module IntraCor [76].

La vision de près est améliorée sans que la vision de loin ne soit trop altérée. Des premiers résultats à court terme sont publiés et semblent prometteurs. Cependant, le manque de recul et le faible nombre de patients opérés ne permettent pas encore de conclure quant à l'efficacité de ce nouveau traitement.

3.2 La cataracte

3.2.1 Pathologie

La cataracte correspond à l'opacification du cristallin, entrainant une baisse de la vue. Ces opacités peuvent être associées à une rupture dans l'architecture du cristallin ou à la précipitation de ses protéines solubles, ou aux deux ; ce qui induit des changements dans l'indice de réfraction sur des distances de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde visible (Figure 2-12).

Cette pathologie touche plus de 20 % de la population chez les plus de 65 ans, et plus de 60 % chez les plus de 85 ans. C'est la première cause de cécité au monde.

Plusieurs signes cliniques sont évocateurs de la cataracte, notamment la baisse de l'acuité visuelle. Le diagnostic est clinique car la cataracte est facilement détectée grâce à l'examen à la lampe à fente. Il existe une gradation des cataractes : de la cataracte molle (grade 1) à la cataracte dure (grade 4). Les facteurs de risque sont environnementaux, individuels et génétiques, mais aussi le diabète, le tabagisme, l'exposition au soleil, etc.

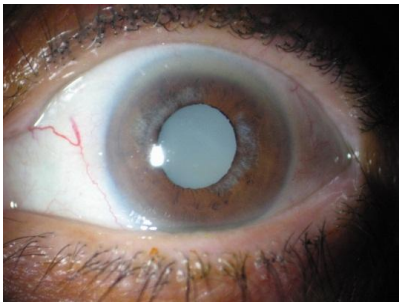


Figure 2-12 Photographie d'un œil présentant une cataracte.

3.2.2 Traitement actuel

Le seul traitement efficace pour la cataracte est la chirurgie. L'opération, inventée dès le XVI^{e} siècle, consiste à retirer le cristallin opaque et à le remplacer par un cristallin artificiel, ou « implant intraoculaire ». Les techniques les plus anciennes consistaient en l'exérèse totale ou partielle du cristallin sans qu'il ne soit préalablement fragmenté, et donc au travers d'une large incision. Aujourd'hui, la phacoémulsification consiste en une extraction extra-capsulaire (autrement dit en laissant en place la capsule du tissu) du cristallin par ultrasons.

Le cristallin pathologique est fragmenté *in situ* par ultrasons, puis aspiré au travers d'une petite incision limbique ou cornéenne de faible longueur (2 à 3,2 mm) [**77**]. Le diamètre équatorial du cristallin est de l'ordre de 12 mm. Il existe plusieurs systèmes sur le marché. Les phacoémulsificateurs (Figure 2-13) comprennent 3 éléments : un générateur d'ultrasons, une pompe d'aspiration et un système d'irrigation.

Figure 2-13 Exemple de système à ultrasons pour la phacoémulsification [78**].**

L'anesthésie est en générale locale, soit par injection orbitaire de produits anesthésiques soit par l'instillation de gouttes anesthésiques (anesthésie topique). Le caractère peu invasif de cette intervention autorise généralement la réalisation de cette chirurgie en ambulatoire**.** Le traitement chirurgical permet une récupération fonctionnelle dès le lendemain dans 90% des cas. C'est l'acte chirurgical le plus pratiqué en France avec environ 560 000 interventions par an en France [79].

4 Les lasers femtoseconde et la chirurgie oculaire

*Dès 1960, Maiman met au point le premier laser [*80*]. Les principales applications envisagées sont alors les applications industrielles. Quelques années plus tard, les lasers à impulsions courtes (durées de l'ordre de la picoseconde) ont été développés [81]. Les premières expériences de chirurgie oculaire par ce type de laser sont menées dès les années 1980. Dans la décennie suivante, les premiers lasers compacts pompés par diode sont utilisés pour la chirurgie oculaire. A la même période, la procédure du LASIK* (pour *LAser assisted in-Situ Keratomileusis) se répand, avec l'utilisation combinée d'un microkératome et d'un laser excimer. Dès les années 2000, le microkératome est remplacé par le laser femtoseconde [*82*]. Ces systèmes laser pour le LASIK (« LASIK tout laser » ou « femto-LASIK ») proposent alors une option pour la greffe de cornée. Depuis 2010, les lasers femtoseconde sont également proposés pour la chirurgie de la cataracte.*

Les lasers sont utilisés pour de nombreuses applications médicales depuis les années 1970. Leurs applications en ophtalmologie sont également assez nombreuses, et on peut citer entre autres, la chirurgie réfractive, la greffe de cornée ou la chirurgie de la cataracte, en plein essor.

4.1 Présentation de la chirurgie réfractive laser

C'est notamment grâce à la chirurgie réfractive que les systèmes lasers femtosecondes se sont imposés dans le domaine de l'ophtalmologie.

Inventée dès les années 1950, la procédure du LASIK (pour *LAser assisted in-Situ Keratomileusis),* illustrée par la Figure 2-14 n'apparait en pratique qu'au début des années 1990. Elle combine la découpe d'un volet cornéen par un microkératome avec l'application d'un laser excimer pour remodeler le stroma cornéen et corriger les amétropies de l'œil du patient. Au cours des années 2000, la découpe du volet cornéen par microkératome a peu à peu été remplacée par la découpe par laser femtoseconde, faisant du femto-LASIK une procédure « 100 % laser » rassurante pour le patient. L'utilisation du laser femtoseconde pour la création de ce volet a permis de gagner en précision et prédictibilité, mais la suprématie par rapport au microkératome n'est pas prouvée [84-86].

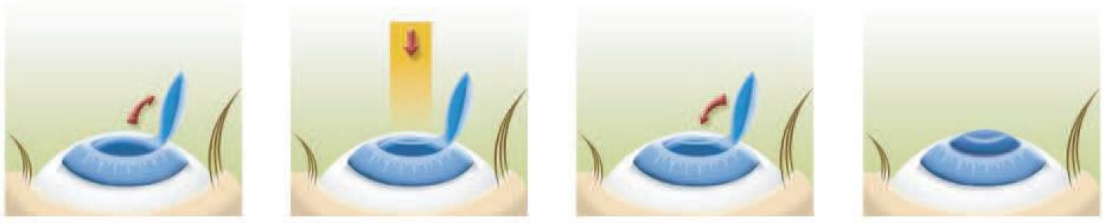


Figure 2-14 Les étapes de la procédure LASIK, dont la première correspond à la création d'un volet cornéen [83**].**

En 2000, le laser IntraLase était le seul système femtoseconde disponible sur le marché de la chirurgie réfractive. En 2010, il en existait quatre sur le marché et leurs caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 2-1.

	IntraLase FS	Femtec	FemtoLDV	Visumax
Principe	oscillateur amplifié	oscillateur amplifié	oscillateur non amplifié	oscillateur fibré amplifié
Longueur d'onde	1 µm	1 µm	1 µm	1 µm
Taux de répétition	60 ou 100 kHz	40 ou 80 kHz	MHz	500 kHz
Durée d'impulsion	entre 400 et 800 fs	entre 500 et 800 fs	entre 200 et 300 fs	entre 220 et 580 fs
Energie des impulsions	1 µJ	1 µJ	<< 1 µJ	< 1 µJ
Taille de la tache focale	quelques µm	quelques µm	< 1 µm	1 µm
Encombrement	Volumineux	Volumineux	Compact et transportable	Volumineux

Tableau 2-1 Tableau récapitulatif des caractéristiques des lasers femtosecondes disponibles pour la chirurgie oculaire [15]. Les données du cinquième laser (Wavelight, Alcon) n'ont pas été disponibles.

En 2011, ils sont au nombre de cinq et sont représentés sur la Figure 2-15.

Figure 2-15 Les cinq systèmes femtoseconde disponibles pour la chirurgie du segment antérieur de l'œil (images reprises des sites web des constructeurs).

Comme nous l'avons dit plus haut, les systèmes lasers femtosecondes, introduits sur le marché de la chirurgie ophtalmique pour la chirurgie réfractive, présentent tous l'option pour la greffe de cornée. La procédure du LASIK est l'opération qui rentabilise l'investissement fait dans les lasers femtoseconde. On compte environ 150 000 LASIK par an, contre environ 4500 greffes de cornée.

4.2 Greffe de cornée (kératoplastie)

La greffe de cornée, décrite au dans la section 1 de ce chapitre, a pu bénéficier des avantages du laser femtoseconde. En effet, il est important pour cette chirurgie que le greffon et le lit receveur aient une géométrie complémentaire, afin d'optimiser la suture du tissu. Il existe de nombreuses géométries ainsi que plusieurs modalités afin de répondre au mieux au besoin du patient.

Là encore, ce sont les avantages de précision et de reproductibilité qui font du laser femtoseconde un outil précieux.

4.3 Liquéfaction du cristallin

Jusqu'à récemment, la chirurgie de la cataracte – opération la plus pratiquée en France – consistait uniquement à la phacoémulsification. Depuis peu, le laser femtoseconde est également utilisé pour cette application. Il permet d'augmenter la sécurité de l'intervention et sa précision.

Le cristallin étant un tissu particulièrement fragile et sa capsule ne devant pas être endommagée, l'opération peut être optimisée grâce à l'association du laser avec une technique d'imagerie *in vivo* et en quasi temps-réel. Le laser femtoseconde est également utilisé pour réaliser les incisions en périphérie de la cornée utiles pour cette phacoémulsification.

On peut noter qu'à ce jour, les ultrasons sont toujours nécessaires pour terminer le fractionnement du noyau cristallinien (l'intensité à apporter est moindre que dans le cas de l'utilisation seule des ultrasons) et que la sonde d'aspiration reste indispensable pour retirer ce tissu pathologique fragmenté.

Trois systèmes laser sont actuellement présentés pour la chirurgie de la cataracte : le système de LensAR, le système de LenSx Lasers Inc et Catalys de la société Optimedica (Figure 2-16).

Figure 2-16 Systèmes laser femtoseconde disponibles pour la chirurgie de la cataracte (images prises sur les sites web des différents constructeurs).

Parmi ces trois systèmes, seul celui de LenSx a reçu l'accord de la FDA[11] pour commercialiser la première génération de laser pour la chirurgie de la cataracte. Selon la documentation disponible, la procédure laser dure environ 35 secondes [87,88].A ce jour, les deux autres systèmes sont encore en attente de cette autorisation.

Ces deux premiers chapitres ont permis de décrire les tissus d'intérêt pour nos études ainsi que les principaux traitements les concernant.

Les propriétés de transparence et de diffusion de ces tissus ont été mesurées au cours de mon projet de thèse et sont présentées dans le chapitre suivant.

[11]*Food and Drug Administration*, dont l'autorisation est indispensable pour lancer la commercialisation d'un médicament ou d'un système clinique.

Chapitre 3 Étude de la transparence et de la diffusion des tissus : cornée, sclère et cristallin

Dans ce chapitre, je décrirai plusieurs expériences que nous avons menées au laboratoire concernant la transparence et la diffusion des tissus du segment antérieur de l'œil.

Dans un premier temps, nous avons complété les données existantes sur la transmission et la diffusion au travers de cornées humaines, saines et œdémateuses. Comme nous l'avons vu au chapitre 1, la transparence cornéenne est liée à sa structure particulière. Afin de quantifier cette transparence cornéenne ou le degré d'œdème, nous avons développé un nouveau dispositif, notamment dans le cadre d'un projet ASTRE financé par le Conseil régional de l'Essonne, correspondant à un outil simple qui pourrait être utilisé par les banques des yeux pour caractériser davantage les greffons.

Ces expériences de mesures de transmission et de diffusion ont ensuite été réalisées sur les autres éléments du segment antérieur de l'œil : des échantillons de sclère et à des cristallins, prélevés sur des yeux de porcs. Les résultats concernant la sclère sont rapportés dans la dernière section de ce chapitre.

1 Mesures de transmissions directe et totale et calcul de la diffusion de la cornée et du cristallin

Une première méthode de mesure de la diffusion cornéenne en volume a été mise en place dans le cadre du projet postdoctoral de Donald A. Peyrot au sein de notre groupe de travail [89]. Les résultats ont en particulier permis de compléter les données de la littérature.

1.1 Contexte et montages expérimentaux

Dans une cornée, la lumière incidente subit une diffusion optique et de l'absorption. Ainsi, lorsque la lumière interagit avec le tissu, on distingue l'intensité lumineuse transmise $T_{Transmise}$, de l'intensité rétrodiffusée T_{Retro} et enfin de celle absorbée $T_{Absorbée}$. La lumière directement transmise, qui sera définie dans le paragraphe suivant, et la lumière diffusée sont respectivement notées : $T_{Directe}$ et $T_{Diffusée}$. Après normalisation, les relations entre ces grandeurs peuvent s'écrire :

$$\boldsymbol{T_{Transmise} + T_{Retro} + T_{Absorbée} = 1} \quad \textbf{(3-1)}$$

Or, il est possible de décomposer la lumière transmise selon l'équation :

$$\boldsymbol{T_{Transmise} = T_{Directe} + T_{Diffusée}} \quad \textbf{(3-2)}$$

Finalement, la quantité de lumière diffusée en dehors de l'axe optique peut s'exprimer :

$$\boldsymbol{S = \frac{T_{Transmise} - T_{Directe}}{T_{Transmise}} = 1 - \frac{T_{Directe}}{T_{Transmise}}} \quad \textbf{(3-3)}$$

Chacun des termes définis peut être exprimé en fonction de la profondeur de pénétration qui lui est associée $\delta_{Absorbée}$ pour la composante due à l'absorption, $\delta_{Diffusée}$ pour la composante de diffusion et $\delta_{effective}$ pour évaluer la profondeur de pénétration réellement atteinte par la lumière incidente (dans un faible angle solide) :

$$T_{Transmise} = 1 - T_{Absorbée} = e^{-\frac{L}{\delta_{Absorbée}}} \quad \textbf{(3-4)}$$

$$\boldsymbol{T_{Directe} = e^{-\frac{L}{\delta_{effective}}} = e^{-\frac{L}{\delta_{Absorbée}}} \cdot e^{-\frac{L}{\delta_{Diffusée}}}} \quad \textbf{(3-5)}$$

Ainsi, la profondeur de pénétration liée à l'absorption $\delta_{Absorbée}$ est directement obtenue du spectre de transmission totale $\boldsymbol{T_{Transmise}}$et sera représentée par la courbe rouge dans les graphiques suivants**.** Le spectre de transmission directe $\boldsymbol{T_{Directe}}$ donnera directement la profondeur de pénétration effective dans le tissu $\delta_{effective}$ représentée par la courbe noire. Enfin, $\delta_{Diffusée}$ sera déduite des précédentes et sera présentée en bleu.

Deux dispositifs optiques ont été montés afin de mesurer les quantités $T_{transmise}$ et $T_{Directe}$ à travers un échantillon. Le premier montage (Figure 3-1 a) consiste à la mesure spectrale du nombre de photons total transmis par le tissu, grâce à une sphère intégrante, soit $T_{transmise}$. Le deuxième montage (Figure 3-1 b) correspond à la mesure spectrale des photons « balistiques », autrement dit qui n'ont pas subi le phénomène de diffusion (autre que la diffusion vers l'avant) au cours de la traversée du tissu, soit $T_{Directe}$. Ces photons balistiques n'existant pas réellement, ils correspondent aux photons qui sont diffusés dans un faible angle solide et qui vaut $\Omega = 1.10^{-7}$ sr dans notre cas.

Ces deux montages ont été réalisés avec l'illumination d'une lampe halogène ayant un spectre étendu de 400 à 2000 nm, et la mesure est effectuée grâce à deux spectromètres[12].

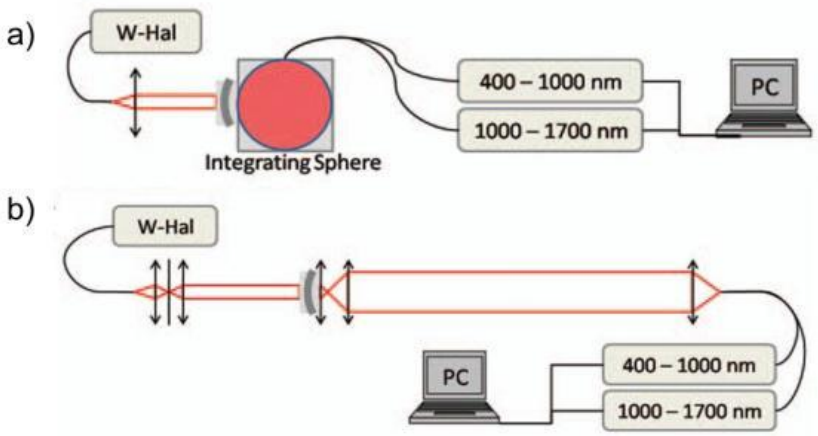


Figure 3-1 Montages optiques ayant permis les mesures de transmission directe et totale [89].

1.2 Préparation des cornées humaines

Toutes nos études ont été réalisées conformément aux accords de la déclaration d'Helsinki et selon la législation française en rigueur.

[12] Spectromètre visible (400 – 1000 nm) et spectromètre infrarouge (1000 – 1700 nm), Avantes.

Les cornées utilisées dans cette étude ont été fournies par la Banque Française des Yeux de Paris. Ces greffons sont dits « à but scientifique » car ils ne sont pas aptes à être greffés, en général à cause d'une densité endothéliale trop faible (< 2000 cellules/mm²) ou d'une zone optique de diamètre insuffisant (<8 mm).

- Déturgescence :

Du fait de leur mauvaise qualité endothéliale, et donc de la perturbation de la fonction de pompe de l'endothélium décrite au chapitre 1, les cornées utilisées sont particulièrement œdémateuses. L'épaisseur physiologique est d'environ 550 µm tandis que l'épaisseur typique des cornées œdémateuses que nous obtenons est plutôt de l'ordre de 1000 µm. Afin de pouvoir caractériser la transmission de la lumière dans des cornées transparentes, nous avons utilisé un processus qui provoque l'évacuation du surplus d'eau contenue dans le tissu, la « déturgescence ». Il est appliqué par les banques des yeux avant les greffes de cornée.

Après son prélèvement, la cornée est conservée dans un milieu de culture[13] pendant environ deux semaines, le temps de réaliser tous les tests nécessaires à la vérification de la qualité du greffon. Si le greffon est apte, autrement dit que les critères de sélection définis précédemment sont remplis (chapitre 2, section 1), il est placé dans un milieu de déturgescence contenant 5% de Dextran T500[14] pendant 24 à 48 heures, préalablement à la greffe. Le Dextran T500 est un polymère de glucose de masse moléculaire égale à 500 kDa qui, par effet osmotique, permet à la cornée de recouvrer son taux d'hydratation normal (~80%) et, ainsi sa transparence, avant d'être greffée[15].

Le contrôle de ce processus de déturgescence permet d'ajuster l'épaisseur de la cornée et donc sa transparence.

- Porte-échantillon dédié à la cornée :

Comme l'épithélium et l'endothélium des cornées peuvent présenter des plis et donc induire une diffusion de surface, autrement dit des erreurs de mesure pour nos mesures de diffusion en volume, nous avons mis au point un porte échantillon permettant de s'en affranchir. Ce système permet également de compenser une partie de la convergence cornéenne naturelle et de ne mesurer que la diffusion intervenant dans le volume. Pour cela, la cornée est placée entre deux lentilles de rayons de courbure proches de ses rayons antérieur et postérieur. Endothéliales.

[13]CorneaMax, Eurobio.
[14]CorneaJet (dans le cas de la banque de Paris), Eurobio.
[15]Certaines études ont montré que l'utilisation du Dextran dans les milieux de déturgescence pouvait être toxique pour les cellules endothéliales [90]. C'est pourquoi l'utilisation de composés alternatifs a été étudiée. Il s'agit par exemple des pluronics, c'est-à-dire des polymères tri-blocs, également appelés « poloxamères », tels que : le Lutrol F68 (ou P188), le Pluronic F87 (ou P237), le Lutrol F127 (ou P407) ou le Pluronic F108 (ou P338). Ayant montré leur efficacité, certains de ces composés tels que le poloxamère P188, sont en cours de développement pour supplémenter des milieux de culture préparés sans sérum d'origine animale (Stemalpha.fr) [91,92].

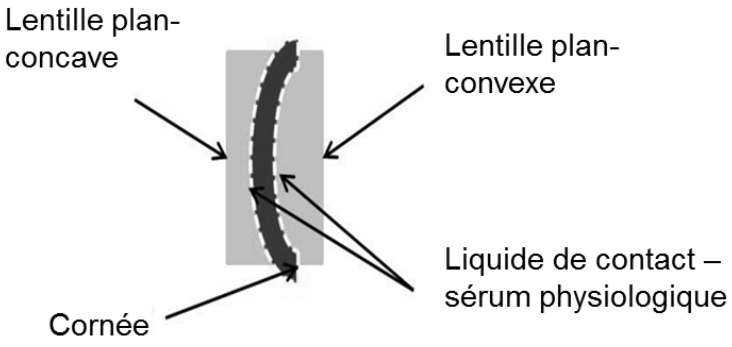


Figure 3-2 Porte-échantillon élaboré par Donald A. Peyrot pour la mesure de transmission directe et totale à travers une cornée.

1.3 Résultats obtenus sur cornée

- Caractérisation de la déturgescence :

Afin de contrôler l'épaisseur des cornées à usage scientifique, autrement dit œdémateuses, nous avons utilisé un Dextran de 500 kDa[16]. Le protocole de déturgescence a été étudié afin de caractériser le comportement du tissu en fonction de la concentration en polymère dans une solution saline[17] et de déterminer, pour une concentration donnée, la durée optimale du temps de déturgescence. Au cours de la déturgescence, les épaisseurs cornéennes ont été suivies par mesures pachymétriques[18].

Nous avons montré qu'il existe un temps optimal de déturgescence – dépendant de la concentration en dextran – avant l'altération irréversible de l'endothélium (Figure 3-3). Pour une concentration de 5 % de dextran, le temps optimal de déturgescence a été estimé à environ 7 h.

L'étude systématique de l'épaisseur *y(t)* de la cornée étudiée à une certaine concentration de dextran (dont dépendent les paramètres A_0 : paramètre caractéristique de déturgescence et T_0 : durée caractéristique de déturgescence) tout au long du processus de déturgescence a permis de quantifier l'épaisseur finale (résiduelle) Y_0 du tissu :

$$\boldsymbol{y(t) = Y_0 + A_0 . e^{-t/T_0}} \quad \textbf{(3-6)}$$

[16]Sigma Aldrich.
[17]Hanks' Balanced salt solution, Sigma Aldrich
[18]Pachymètre à ultrasons, Pocket II, QuantelMedical

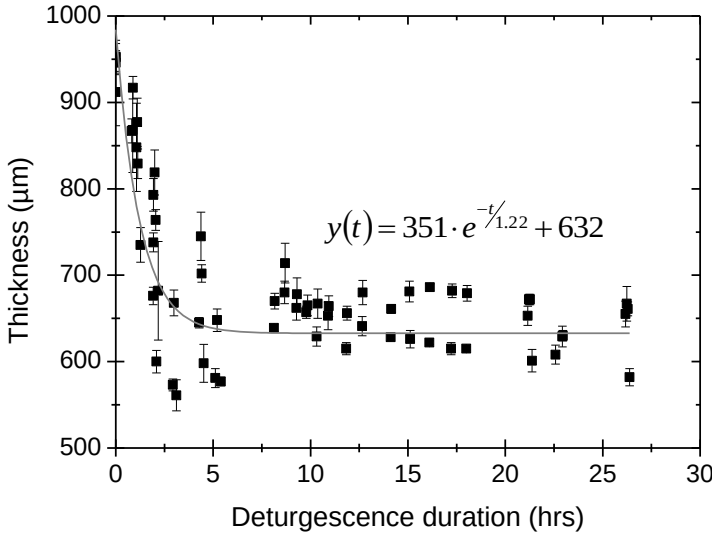


Figure 3-3 Courbe des mesures d'épaisseur de cornée en fonction du temps de déturgescence (en heures) à une concentration de 5% de Dextran.

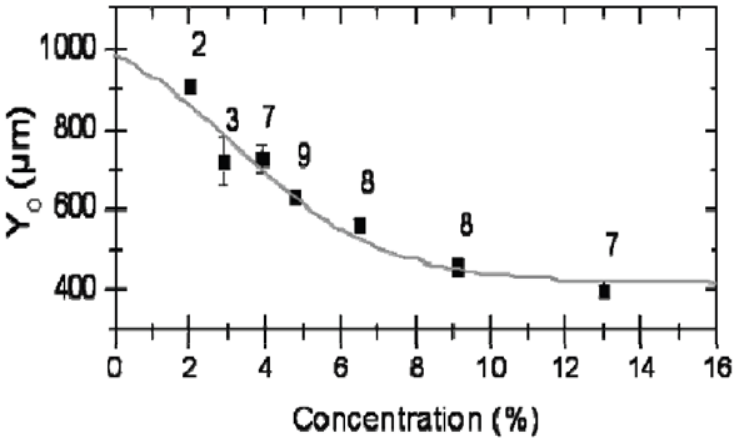


Figure 3-4 Courbe donnant l'épaisseur résiduelle (après un dizaine d'heure de déturgescence, tout dépend de la concentration utilisée) de la cornée en fonction de la concentration de Dextran. Le nombre de cornées utilisées pour chaque condition est indiqué au-dessus de la donnée.

Les conditions optimales de déturgescence sont obtenues pour des concentrations de l'ordre de 5 à 8 % de dextran (Figure 3-4), il est alors possible d'atteindre l'épaisseur physiologique de 500 µm. Dans le cas où l'utilisation d'un tel procédé sera nécessaire par la suite, c'est une concentration de 5 % de Dextran qui sera considérée.

- Détermination de la diffusion dans les cornées humaines :

Les mesures de transmission directe et totale, dans le visible et l'infrarouge, puis le calcul de la diffusion ont été réalisées dans des cornées œdémateuses, donc opacifiées (Figure 3-5), puis dans des cornées rendues transparentes par déturgescence. L'ensemble des mesures a été réalisé sur 50 cornées humaines non aptes à la greffe. Grâce aux mesures de transmissions, nous avons pu calculer la profondeur de pénétration due à l'absorption et à la diffusion et ainsi la profondeur de pénétration effective dans le tissu (Figure 3-6).

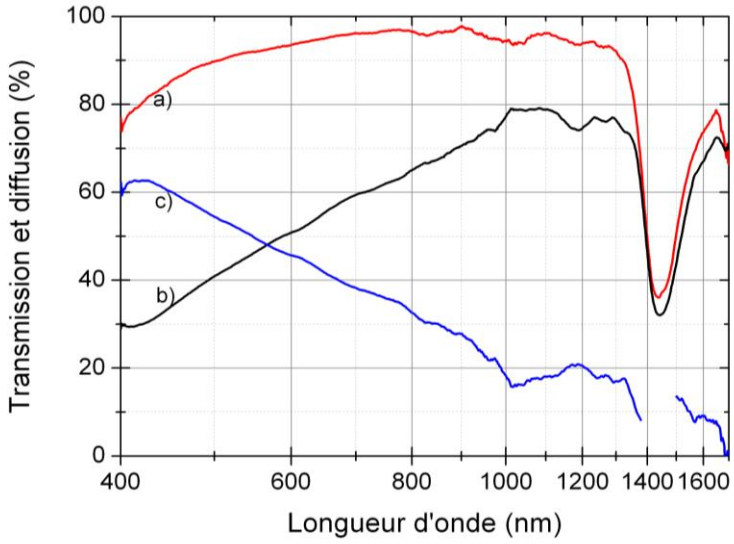


Figure 3-5 Spectres de transmission directe (courbe noire et b)), spectre de transmission totale (courbe rouge et a)) et spectre de diffusion (courbe bleue et c)) pour une cornée œdémateuse d'épaisseur environ 1000 µm ; à partir de [89].

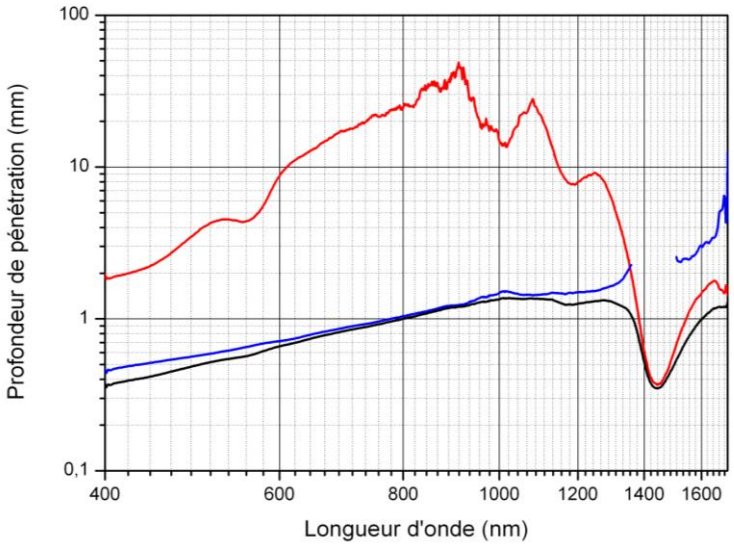


Figure 3-6 Profondeur de pénétration calculées à partir des spectres présentés sur la figure : profondeur de pénétration due à l'absorption optique (courbe rouge), profondeur de pénétration liée à la diffusion optique (courbe bleue) et profondeur de pénétration effective (courbe noire) ; à partir de [89].

Les résultats montrent clairement qu'il existe une fenêtre de relative transparence centrée à 1650 nm induisant un minimum de diffusion optique, comme indiqué dans le Tableau 3-1.

	Pourcentage de diffusion	
Longueur d'onde	1000 nm	1650 nm
Cornée transparente	17 %	5 %
Cornée œdémateuse	45 %	10 %

Tableau 3-1 Comparaison du pourcentage de diffusion entre 1000 nm et 1650 nm pour les deux états possibles de la cornée (saine et œdémateuse).

Pour chaque longueur d'onde, le pourcentage de diffusion calculé en fonction de l'épaisseur de la cornée se comporte de la même manière (Figure 3-7). Par ailleurs, il est intéressant de noter que pour chacune des longueurs d'onde indiquées, la courbe de diffusion présente un minimum pour une épaisseur particulière d'environ 480 µm, ce qui correspond à l'épaisseur d'une cornée humaine dans son état sain sans prendre en compte l'épithélium. Autrement dit, l'arrangement naturel des fibrilles de collagène stromal, dans une cornée physiologiquement normale, minimise la diffusion.

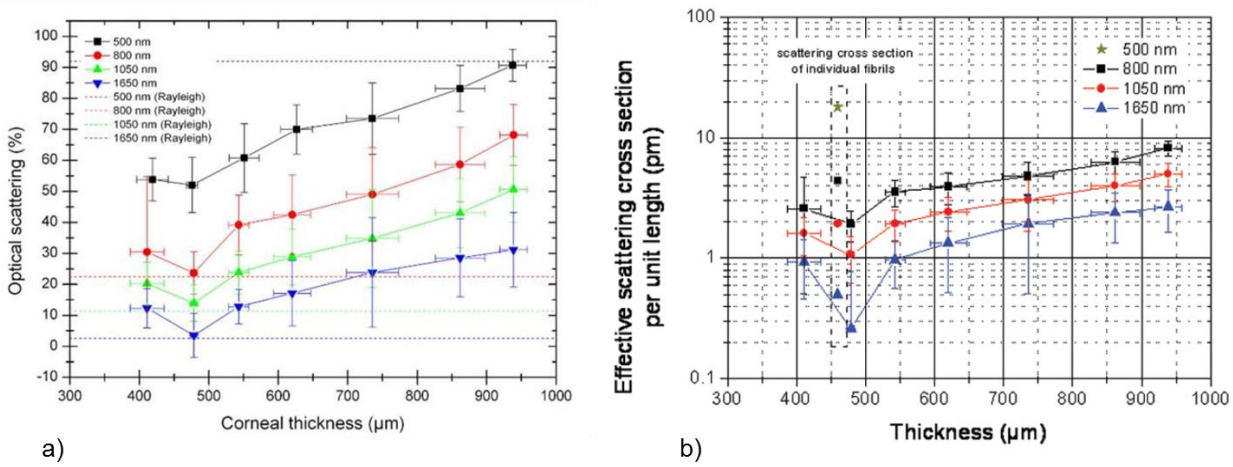


Figure 3-7 Graphique présentant le pourcentage de diffusion optique (par rapport à l'intensité incidente) dans la cornée pour différentes longueurs d'onde typiques (500nm, 800 nm, 1050 nm et 1650 nm), avec indication de la valeur de la diffusion Rayleigh pour chaque longueur d'onde (en pointillés) a) et section efficace de diffusion par unité de longueur b)en fonction de l'épaisseur des cornées [89]. Sur a) Pour la longueur d'onde visible, la diffusion mesurée est en dessous de la valeur de Rayleigh, ceci est dû à l'organisation de la structure avec un facteur de forme (<1) alors que pour les autres longueurs d'onde, la diffusion mesurée est au-dessous de la valeur de Rayleigh pour une épaisseur non physiologique, ainsi nous ne sommes plus dans le même régime de diffusion par la présence d'œdème et de lacs, il est alors nécessaire de prendre en compte la diffusion de Mie également.

1.4 Résultats obtenus sur cristallins

Le cristallin est un autre tissu transparent du segment antérieur de l'œil et il est le tissu d'intérêt pour la chirurgie de la cataracte. Sa transparence n'a pas la même origine que la transparence cornéenne (chapitre 1) et il est intéressant de renouveler les mesures effectuées précédemment sur la cornée sur des cristallins. Le tissu cristallinien a été placé dans les montages optiques présentés en Figure 3-1 et les résultats obtenus sont présentés ici.

- Préparation des cristallins de porc :

Étant donné qu'il est difficile d'obtenir des cristallins d'origine humaine, nous avons choisi d'avoir recours à des yeux de porcs car leurs tissus apparaissent être de bons modèles pour en étudier les caractéristiques optiques [93]. Le cristallin de porc est principalement composé de trois protéines, les « crystallines α, β, γ ». Ses propriétés optiques sont proches du cristallin humain, malgré une différence notable d'épaisseur et de convergence (Tableau 3-2). Le cristallin de porc est un bon modèle dans le cadre de notre étude, mais n'est pas un modèle pertinent pour l'étude des lentilles intraoculaires par exemple.

	cristallin de porc	cristallin humain
épaisseur au centre (mm)	7,4	4
indice de réfraction	1,4686	1,413
convergence (dioptries)	50	19
rayon de courbure antérieur (mm)	7,08	10
rayon de courbure postérieur (mm)	5,08	6

Tableau 3-2 Comparaison des principales propriétés optiques du cristallin de porc et du cristallin humain [93].

Les yeux utilisés ont été livrés au laboratoire, entiers, dans les heures qui ont suivi leurs prélèvements au sein des abattoirs Guy Harang[19]. Après dissection du segment antérieur, les cristallins ont été délicatement détachés des corps ciliaires, à l'aide d'une anse prévue à cet effet, puis conservés dans un tampon salin[20]. Comme ce tissu se détériore très rapidement, formant notamment une cataracte détectable par la formation d'un « Y » dans sa structure, les mesures ont été réalisées dans les heures qui ont suivies leur extraction.

Comme pour la cornée, il a été nécessaire de réaliser un porte-échantillon adapté à ce tissu. Ne souhaitant pas induire de pression sur ce tissu fragile, le porte échantillon est composé d'un tube en acier ayant une ouverture d'un diamètre de 10,4 mm (Figure 3-8), dans lequel on vient glisser le cristallin, puis un fin cylindre creux en plexiglas vient s'appuyer légèrement sur les bords du tissu pour le tenir en place lors des mesures.

Figure 3-8 Porte-échantillon pour le cristallin, muni de sa bague en plexiglas permettant le maintien du tissu pendant les expériences.

- Détermination de la diffusion dans les cristallins de porcs :

Ce tissu étant beaucoup plus épais en son centre que la cornée, les mesures de transmission directe ont été plus délicates à réaliser. Par rapport à la mesure de transmission totale, le nombre de photons atteignant le détecteur est plus faible. Comme décrit par Boettner et Wolter dès le début des années 1960, du fait de l'épaisseur du cristallin, les longueurs d'onde 1200-1300 nm sont fortement atténuées (chapitre 1, section 2.4.3).

Une première série de mesures de transmission totale a été effectuée sur cinq cristallins (Figure 3-9).

[19] Etablissements Guy Harang, F-78550 Houdan.
[20] Balancedsalt solution, BSS, Alcon.

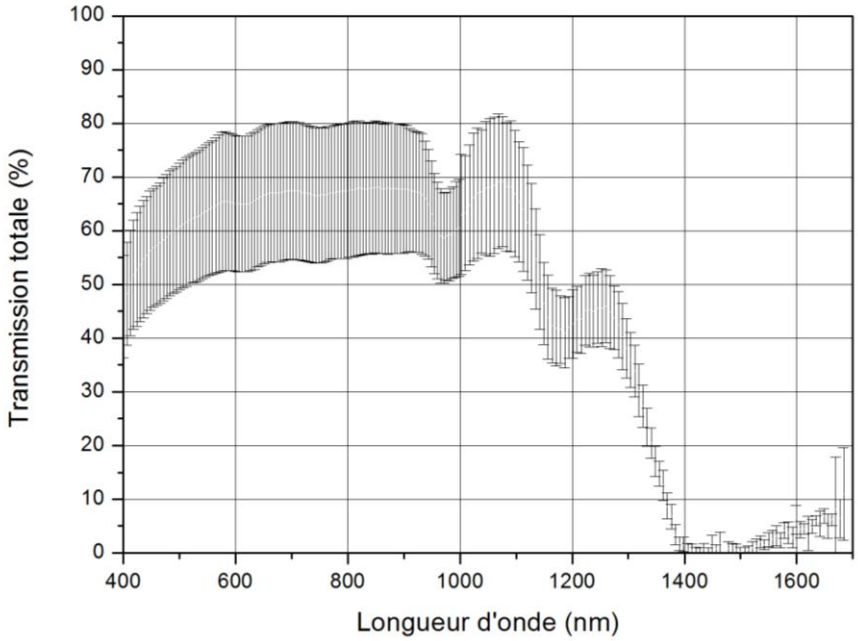


Figure 3-9 Spectre de transmission totale moyenne obtenue pour cinq cristallins de porc fraichement prélevés (dans la journée).

Ces courbes montrent que la transmission totale du cristallin frais est de l'ordre de 40 à 80 % jusqu'à 1100 nm puis la transmission est ensuite plus faible pour les plus longues longueurs d'onde, avec à nouveau une transmission faible à partir de 1600 nm.

Après avoir optimisé le dispositif optique, il a été possible de mesurer les transmissions totale et directe pour la plupart des longueurs d'onde dans deux cristallins totalement transparents (Figure 3-10). On peut noter que dès 1650 nm, les données ne sont plus significatives du fait du faible nombre de photons (absorption trop forte) ainsi que du manque de sensibilité du spectromètre dans cette gamme spectrale.

La courbe de diffusion déterminée suite à ces mesures est indiquée par la courbe bleue sur la Figure 3-10. Du fait des valeurs non significatives pour les longueurs d'onde élevées, les résultats ne sont présentés que pour les longueurs d'onde inférieures à 1370 nm environ. Dans cette gamme spectrale, comme observé dans le tissu cornéen, le pourcentage de diffusion diminue lorsque la longueur d'onde augmente.

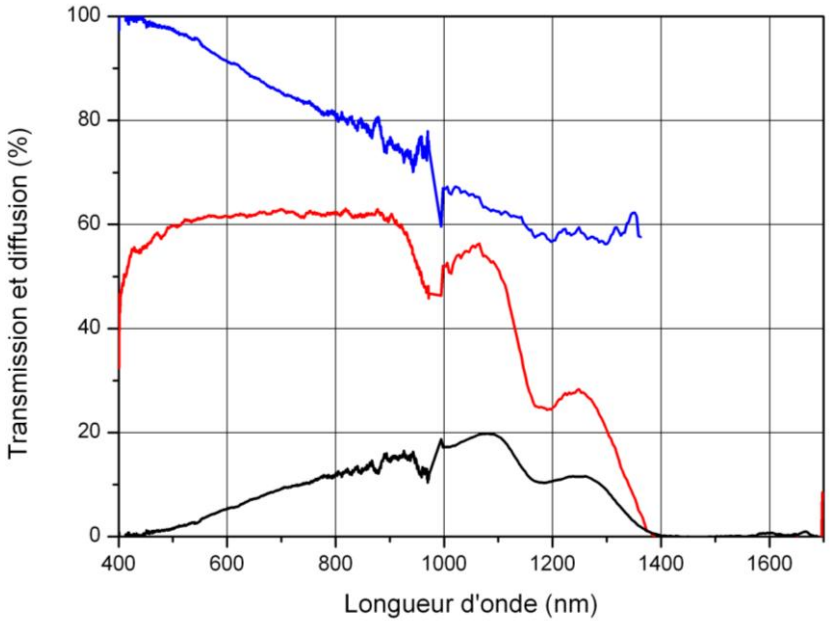


Figure 3-10 Spectres de transmission totale (courbe rouge) et directe (courbe noire) pour un cristallin de porc transparent sur la gamme de longueur d'onde 400 – 1700 nm. Le spectre de diffusion (courbe bleue) n'est tracé que jusqu'à 1370 nm.

Ces spectres peuvent être comparés à la courbe de transmission à travers une cuvette d'eau épaisse de 6 mm (Figure 3-11). Cette dernière est en accord avec les mesures effectuées à travers les cristallins de porc. Du fait de l'épaisseur du cristallin de porc, environ 7,4 mm au centre du tissu, une faible quantité de photons est transmis lorsque la longueur d'onde est supérieure à 1300 nm, ce qui suggère l'intérêt pour la chirurgie en profondeur dans le tissu d'utiliser une longueur d'onde située avant la bande d'absorption de l'eau.

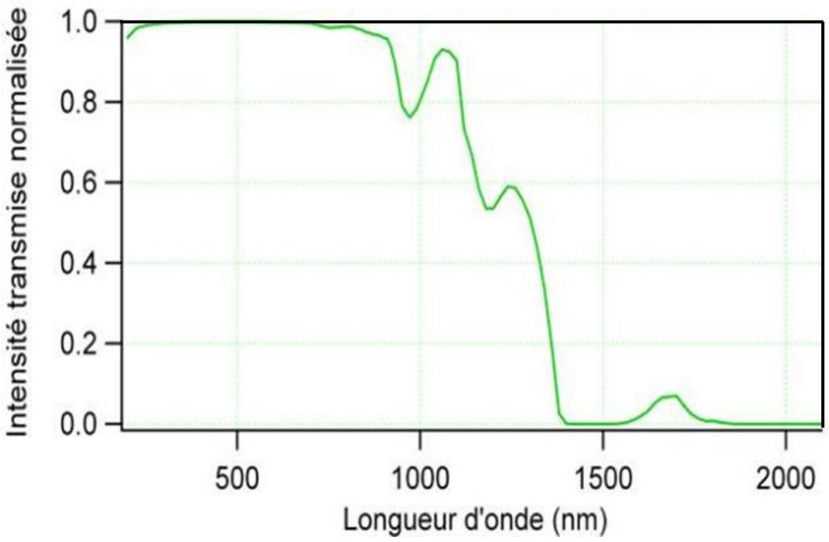


Figure 3-11 Courbe de transmission à travers 6 mm d'eau pure [94].

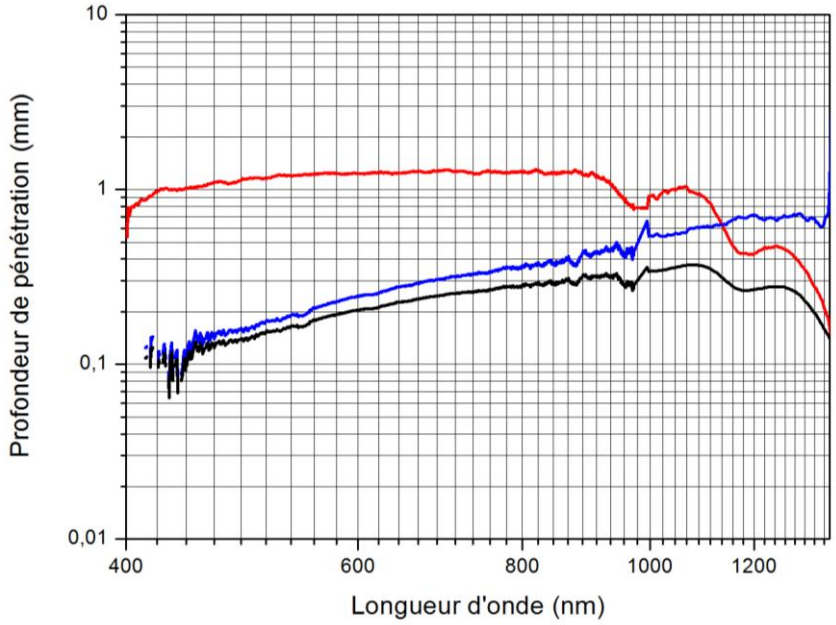


Figure 3-12 Profondeur de pénétration en mm obtenue dans le cristallin : profondeur de pénétration liée à l'absorption (courbe rouge), profondeur de pénétration liée à la diffusion (courbe bleue) et profondeur de pénétration effective dans le tissu.

Les résultats présentés ici ne permettent pas de conclure quant au choix d'une longueur d'onde sur la gamme 1300 – 1800 nm, contrairement au cas de la cornée.

Cependant, il est possible de conclure sur la gamme spectrale 400 – 1300 nm, et là, c'est la longueur d'onde 1250 nm qui semble être optimale pour minimiser le phénomène de diffusion dans le cristallin.

Il n'est pas *a priori* nécessaire d'envisager la chirurgie dans le cristallin à une longueur d'onde plus élevée pour deux raisons :

- Le cristallin a une épaisseur propre de l'ordre de 7 mm et conduira à une absorption forte, qu'il faudra compenser par une élévation de l'énergie incidente,
- Le cristallin est un tissu situé en profondeur dans la chambre antérieure de l'œil et l'absorption des tissus traversés en amont forcera à une nouvelle élévation de l'énergie incidence.

2 Quantification de la transparence cornéenne

Comme nous l'avons déjà dit dans les précédents chapitres, la transparence est un point essentiel dans le contrôle de la qualité des tissus destinés à être greffé. En France, les banques des yeux n'ont pas un protocole national concernant l'étude, le suivi ou la conservation des greffons, mais toutes prêtent une attention particulière à leur transparence macroscopique de manière qualitative.

C'est pourquoi nous avons choisi de développer un outil permettant de quantifier le degré de transparence, ou bien le degré d'opacité induit par l'œdème, des greffons. Ce protocole utilise une mesure de la fonction de transfert de modulation (MTF, *Modulation Transfer Function*) de la cornée (ou de tout tissu transparent) par une méthode d'analyse d'image décrit par la suite.

Comme pour l'étude de la diffusion présentée dans la section précédente, nous avons utilisé des cornées à usage scientifique, obtenues auprès de la banque française des yeux.

Nous avons pu faire varier leur épaisseur, et ainsi leur degré d'opacité, *via* le processus de déturgescence (voir section 1.1 - Caractérisation de la déturgescence).

2.1 Transparence et fonction de transfert de modulation (MTF)

La fonction de transfert de modulation d'un système optique fournit des informations sur sa capacité à transmettre les fréquences spatiales. Pour l'étudier, des mires, circulaires ou à traits, sont utilisées afin de faire varier la fréquence spatiale.

Brièvement, l'objet optique à analyser est placé au-dessus de la mire, puis, après acquisition de son image, par exemple, avec un macroscope, cette dernière est analysée par traitement numérique.

2.2 Développement du dispositif expérimental

Ce projet a été initié lors de mon stage de Master 2. Dans le premier dispositif expérimental, l'éclairement était réalisé à l'aide de diode électroluminescente, présentant des inconvénients d'inhomogénéité ; et la mire utilisée était simplement imprimée sur un film transparent, induisant une limite de résolution au cours du traitement d'image. Les premières images, générées courant 2008 *via* une webcam (Logitech), ont motivé le dépôt d'un brevet [16] sur le principe de la quantification de la transparence cornéenne : mesure et traitement d'image permettant de calculer la MTF.

Le montage expérimental a ensuite été optimisé afin d'obtenir une configuration plus favorable à son adoption par les banques des yeux. Les banques des yeux utilisent un « macroscope » notamment pour déterminer la densité endothéliale des greffons. Nous avons basé notre dispositif sur un macroscope[21]du même type que ceux utilisés par les banques, afin d'adapter notre analyse d'image.

Afin de s'affranchir de la limite de résolution induite par la mire initialement utilisée, un porte-échantillon incrusté par une mire de Siemens circulaire à 36 traits[22] et pouvant contenir la cornée, a été confectionné (Figure 3-13).

Figure 3-13 Porte-échantillon comprenant la mire et dans lequel la cornée à étudier est placée. Cet ensemble est à positionner sous l'objectif du macroscope. Ce porte échantillon a été élaboré par Tal Marciano dans le cadre du projet ASTRE et de son travail de doctorat.

[21]Macroscope : modèle AZ100, Nikon. Grossissement disponible de 5x à 20x (version avec les trois objectifs 0,5x, 1x et 2x), à la binoculaire ou sur ordinateur muni du logiciel *NIS-Elements Microscope Imaging Software*.
[22]*Star Taget 10° wedge pair angle (1 Black, 1 White),* Edmund Optics Ltd.

Lors de la mesure, le porte-échantillon est rempli de sérum physiologique afin de ne pas dessécher la cornée analysée, et les images du tissu positionné au-dessus de la mire générées sont comparées à celle de la mire seule qui constitue l'image de calibration de la méthode (Figure 3-14).

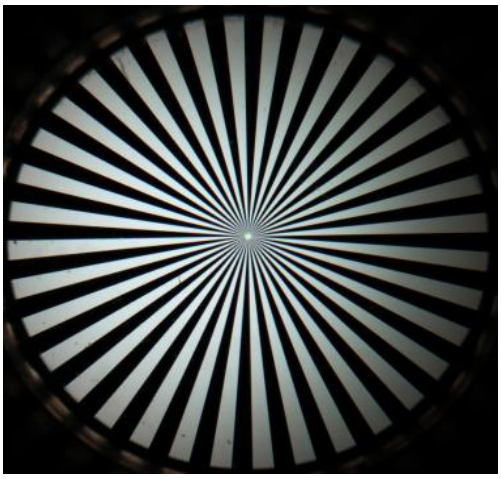


Figure 3-14 Mire de Siemens circulaire à N = 36 traits, positionnée dans le porte échantillon et observée à travers le macroscope, sans échantillon, image utilisée pour calibrer notre traitement numérique.

Le développement d'un porte-échantillon stérile à usage unique et incrusté par une mire pourrait constituer une potentielle application industrielle afin que la MTF soit facilement mesurée dans les banques des yeux.

2.3 Principe de mesure de la MTF

Une fois les images de l'échantillon et de la mire générées *via* le logiciel du macroscope, le traitement d'image est réalisé en utilisant le logiciel Matlab[23].

La première phase du traitement consiste à « dérouler » la mire circulaire en une matrice (*X, Y*) en (r,θ) - *r* étant le rayon (pris par rapport au centre de la mire) - qui est ensuite transformée en (ν,θ) à l'aide de l'expression : $\nu = \frac{N}{G.2\pi.r}$,dans laquelle *G* est un facteur multiplicatif lié aux optiques utilisées pour l'acquisition de l'image.

Dans le cas du macroscope, l'échelle est directement indiquée sous l'image : par exemple, dans la plupart de nos études, nous pouvons lire la valeur 10,83 µm / pixel. Pour illustration, cette première phase de traitement a été simulée sous Matlab pour deux images de mires circulaires à 12 traits (Figure 3-15).

[23]Matlab, MathWorks, France.

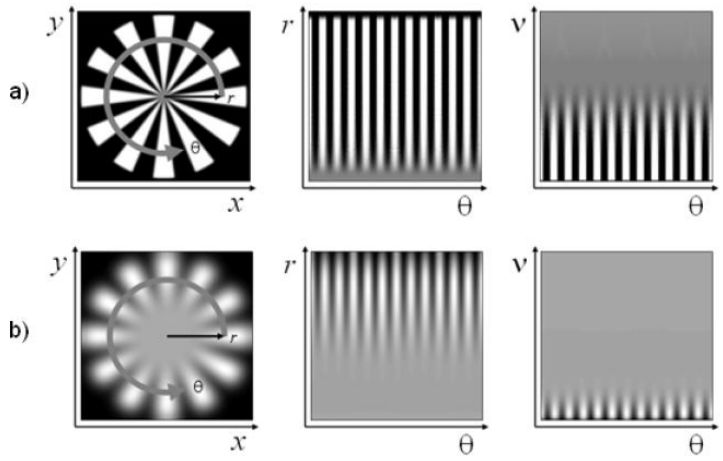


Figure 3-15 Première phase de traitement simulée sous Matlab d'une image nette (a) et d'une image plus floue (filtrage du signal par une gaussienne dans l'espace de Fourier)(b) [16].

La matrice en (ν,θ) subit ensuite une transformée de Fourier à une dimension (sur l'axe correspondant à θ), faisant ainsi apparaitre la fréquence fondamentale ω_0 qui doit correspondre au nombre de traits, soit 36 dans notre cas. Au cours de la simulation, nous pouvons noter que des harmoniques aux valeurs $(n+1).\omega_0$ sont également générées à partir des deux images utilisées (Figure 3-16).

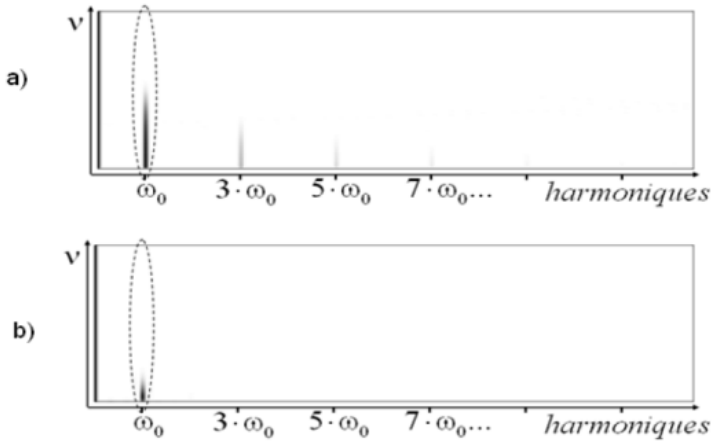


Figure 3-16 Affichage des composantes de Fourier pour des images de mire à 12 traits, nette (a) et floue (b) [16].

La dernière phase consiste à tracer le profil du signal à la fréquence ω_0, ce qui permet de tracer les courbes de la MTF en fonction de la fréquence spatiale (Figure 3-17). La normalisation est réalisée de façon à ce que la courbe corresponde à un taux de modulation pour chacune des fréquences spatiales.

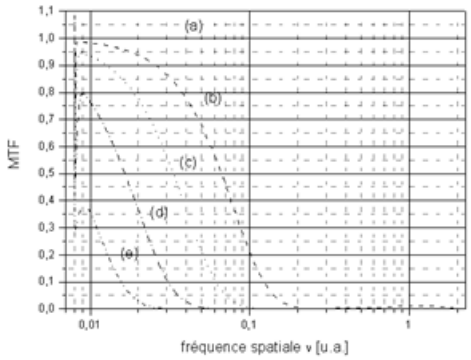


Figure 3-17 Fonction de transfert de modulation pour quatre images de mire, peu (b) à très (e) floues, comparées à un système idéal (a) [16].

Un programme développé sous LabView[24] par Fatima Alahyane[25], basé sur les sous-programmes Matlab des étapes décrites ci-dessus, a finalement été développé afin d'analyser toutes les images d'une même cornée, et donc d'évaluer l'efficacité de la méthode de mesure.

2.4 Résultats obtenus sur le tissu cornéen

Les images des cornées humaines, au cours de leur déturgescence ont été générées au macroscope avec un grossissement x5. Les fonctions de transfert pour une même cornée dans différents états ont ainsi pu être calculées, représentées et comparées à la fonction de transfert du dispositif contenant la mire uniquement (sans tissu dans le porte échantillon) (Figure 3-18).

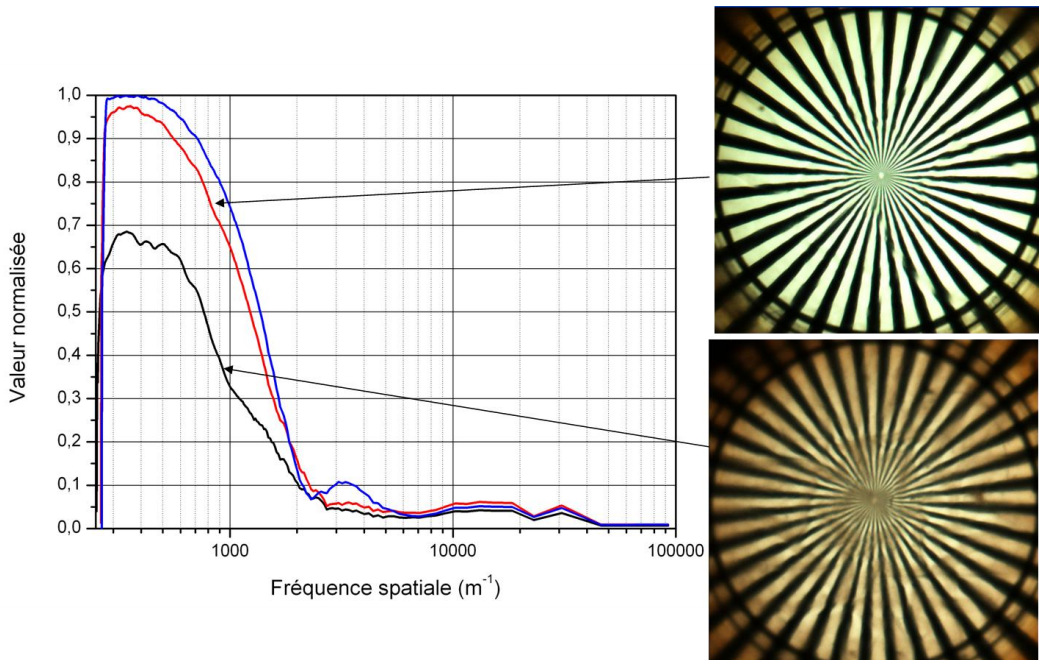


Figure 3-18 Fonctions de transfert de modulation obtenues pour une même cornée dans deux états différents : l'un fortement diffusant (en rose), l'autre transparent (en vert), comparées à la courbe de calibration générée à partir de la mire seule (en bleu).

[24]Labview, National Instruments.
[25] Ingénieur de recherche au sein de notre groupe.

Finalement, le comportement monotone de la MTF en fonction de l'épaisseur de la cornée, et donc de sa transparence ou de son degré de diffusion (Figure 3-19), confirme notre hypothèse et suggère que cet outil constitue une méthode de mesure quantitative puissante de la transparence d'un greffon.

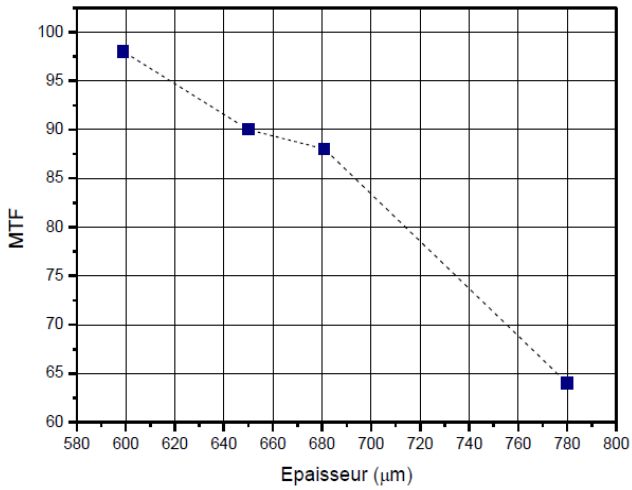


Figure 3-19 Évolution de la valeur normalisée de la fonction de transfert en fonction de l'épaisseur de la cornée, données traitées par Tal Marciano.

2.5 Quantification de la transparence des cornées

La Figure 3-20 indique quatre niveaux de MTF, qui pourraient constituer un « abaque » utilisé par les banques des yeux, sur lequel serait placée la MTF de la cornée à évaluer. Il constituerait ainsi un outil commun et reconnu par la communauté des ophtalmologistes.

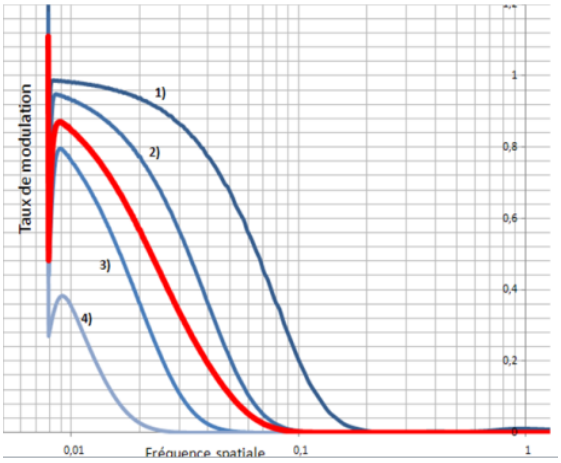


Figure 3-20 Fonctions de transfert de modulation théoriques calculées pour différents états de transparence, du niveau 1 : cornée saine au niveau 4 : cornée fortement œdémateuse. Ce graphique est un exemple d'« abaque » sur lequel la MTF de la cornée étudiée pourrait être placée.

2.6 Séries de mesure sur le cristallin

La méthode de quantification de la transparente présentée dans les sections précédentes a également été appliquée à l'étude des cristallins de porc. Comme le cristallin est un tissu qui se cataracte et s'opacifie très rapidement, nous avons pu générer des images de cristallins clairs, juste après leur extraction du segment antérieur ainsi que des images de cristallins « cataractés » (« Y » visible sur la capsule), dès leur extraction ou après conservation à +4°C. La Figure 3-21présente les fonctions de transfert de modulation obtenues à partir des deux images ci-dessus, pour deux cristallins présentant des états de transparence différents. L'image de calibration a permis de normaliser les courbes.

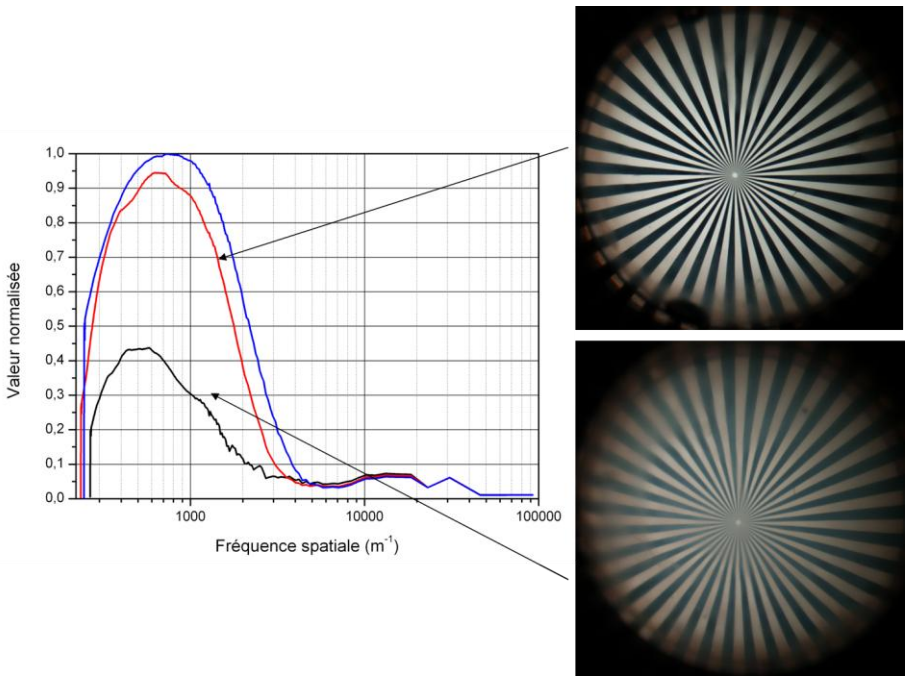


Figure 3-21 Fonctions de transfert obtenues pour un cristallin sain (courbe rouge) et pour un cristallin moins transparent (courbe noire), comparée à une image de calibration (courbe bleue). Le cristallin sain donne une courbe proche de la calibration tandis que le cristallin caractacté ne transmet pas aussi bien les basses fréquences et il y a une atténuation rapide de la fonction de transfert.

Finalement, les deux tissus transparents du segment antérieur de l'œil ont été caractérisés par le calcul de la diffusion, obtenu directement par les mesures de transmission et par le calcul de leur fonction de transfert de modulation. Cette deuxième caractéristique est reliée à la transparence du tissu et donc à la diffusion.

3 Mesures de diffusion de la sclère

Comme expliqué dans le chapitre 2, la sclère est le tissu d'intérêt dans le cadre des traitements du glaucome, notamment pour le traitement chirurgical. Dans le cas d'un développement laser pour une telle chirurgie, le faisceau devra traverser le tissu scléral. Cependant, il s'agit d'un tissu assez peu connu. Nous avons étudié les caractéristiques optiques de ce tissu opaque, en déterminant notamment son spectre de diffusion et la profondeur de pénétration que l'on peut atteindre, afin d'étudier l'intérêt d'utiliser des sources laser émettant dans l'infrarouge, hors de la fenêtre d'absorption de l'eau, comme il est envisagé pour la cornée.

3.1 Préparation des échantillons de sclère

Pour cette étude, les échantillons de sclère ont été prélevés sur des globes oculaires de porc, car la collerette de sclère sur les cornées de banque n'est pas de dimension suffisante. L'épaisseur de la sclère de porc varie de 830 à 1250 µm [93], soit légèrement plus épaisse que la sclère humaine. La sclère de porc contient environ 70 % d'eau et, histologiquement, bien que son organisation soit plus irrégulière, elle apparaît très proche de la sclère humaine. Par ailleurs, du fait de leur élasticité et de leur opacité, les échantillons de sclère ont été plus difficiles à manipuler que les cornées ou les cristallins.

Le montage expérimental pour la mesure de transmission directe ne permettant pas de recueillir un nombre suffisant de photons à travers la sclère entière, deux possibilités de préparation des échantillons ont été testées.

La première possibilité a consisté à préparer de fines lamelles de sclère, d'abord manuellement, puis avec un appareil dédié aux découpes de tissus. En effet, la sclère de porc étant beaucoup moins facile à manipuler que la sclère humaine, il n'a pas été possible de préparer des lamelles assez fines et homogènes au couteau chirurgical. Nous avons donc utilisé un Vibratome[26] disponible chez nos collègues du Laboratoire d'Optique et Biosciences (LOB, ÉcolePolytechnique). Des lamelles épaisses de 250 µm et de 300 µm, moins opaques, ont ainsi pu être préparées afin de tester la transmission à travers ces échantillons de sclère.

L'autre solution a été de déshydrater la sclère afin de la rendre translucide *via* l'utilisation du glycérol[27].Cet agent « clarifiant » provoque sur la sclère un phénomène décrit par Tunaka et al. [95] (Figure 3-22). Une fois l'eau évacuée du tissu stromal, les fibrilles de collagène se retrouvent concentrées et l'ensemble formant un tissu d'indice de réfaction homogène provoque une diffusion moindre, ce qui rend la sclère translucide.

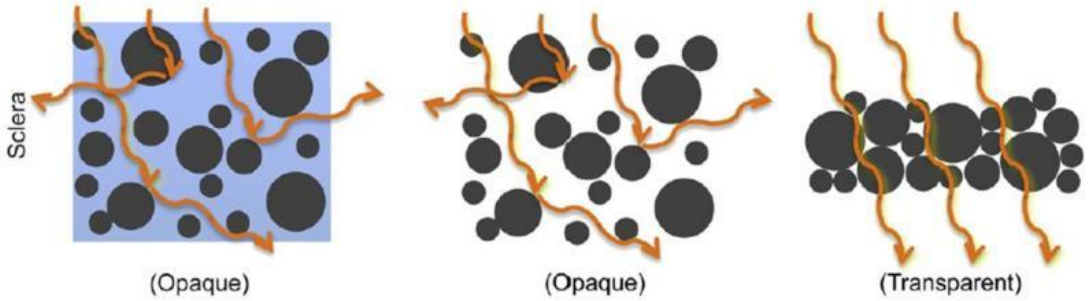


Figure 3-22 Effet du glycérol sur le tissu scléral [95] comme expliqué dans le paragraphe ci-dessus.

En 1957, David Maurice a exprimé la puissance diffusée comme suit, avec m représentant du rapport de l'indice des fibrilles sur l'indice de la matrice [11] :

$$P = \frac{l}{4} \cdot \frac{E_0^2}{\eta} \cdot \frac{\pi^2 \cdot a^4}{4} \cdot \left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 \cdot (m^2 - 1)^2 \cdot \left(1 + \frac{2}{(m^2+1)^2}\right) \quad \textbf{(3-7)}$$

On comprend bien alors que la dépendance en longueur d'onde (comportement spectral) de la puissance n'est pas affectée par un changement d'organisation des fibrilles dans la matrice, mais seulement son importance sera modifiée.

[26]Vibratome VT1000 S, Leica ; appareil utilisant une lame vibrante permettant la découpe de fines lamelles de tissu biologique frais ou fixé dans les conditions physiologiques (sans congélation, sans inclusion).
[27] Sigma Aldrich

3.2 Mesures de transmission directe et totale à travers la sclère

Contrairement à la cornée qui devait être placée dans un porte-échantillon particulier afin de supprimer la diffusion de surface et de compenser son effet convergent, la sclère est placée entre deux lamelles de verre car sa courbure n'est pas très prononcée sur une surface d'un cm².

La première lamelle de sclère de porc obtenue manuellement a permis de tracer les premières courbes de transmission à travers la sclère, de calculer les profondeurs de pénétration dans ce tissu (Figure 3-23).

Comme il n'a pas été possible de reproduire cette expérience du fait de la complexité à obtenir des lamelles de sclère très fines et peu opaques, les expériences suivantes ont consisté à appliquer la deuxième solution, soit à clarifier des lamelles de sclère dans une solution de glycérol. La première mesure de transmission directe a été réalisée, validant cette solution.

Une nouvelle série de mesures a été réalisée, en incubant des échantillons de pleine épaisseur de sclère dans une solution de glycérol, et comparée à des mesures faites sur des échantillons de sclère affinés au vibratome, notamment pour retirer les pigments de l'épithélium pigmentaire rétinien résiduels, puis incubés dans du glycérol. Les résultats sont semblables et la moyenne des spectres sur quatre échantillons est présentée en Figure 3-24.

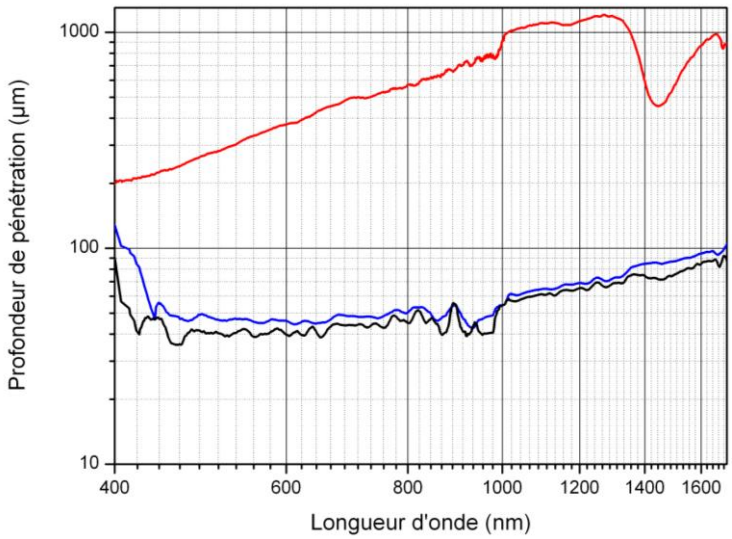


Figure 3-23 Profondeur de pénétration obtenue pour un échantillon de sclère de porc d'épaisseur 140 µm. Courbe rouge: profondeur de pénétration liée à l'absorption optique, courbe bleue : profondeur de pénétration liée à la diffusion optique et courbe noire : profondeur de pénétration effective dans le tissu.

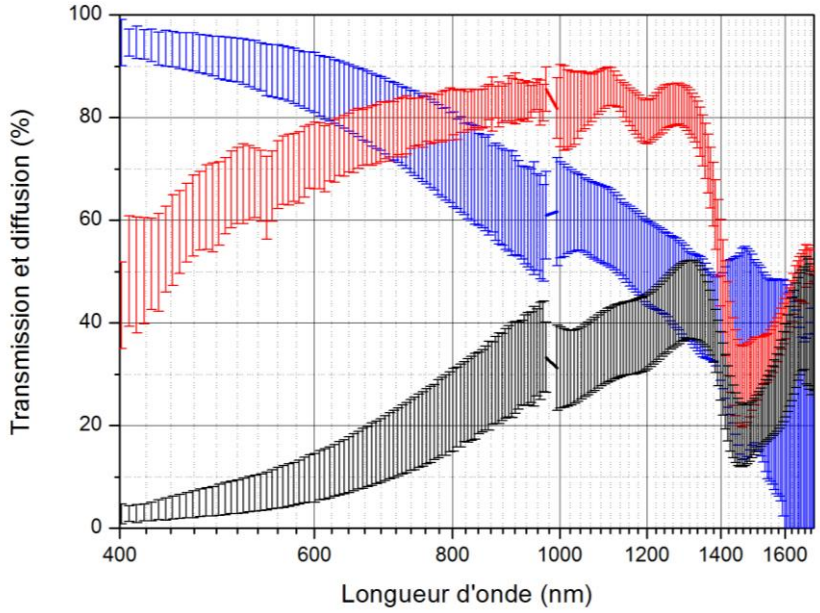


Figure 3-24 Moyenne des spectres (en pourcentage) de 4 échantillons de sclère de porc : transmission directe (courbe noire), transmission totale (courbe rouge) et diffusion optique (courbe bleue), en fonction de la longueur d'onde.

3.3 Calcul de diffusion dans le tissu scléral et profondeur de pénétration

Ces mesures de transmission ont permis de calculer la diffusion en fonction de la longueur d'onde (Figure 3-24) ainsi que la profondeur de pénétration dans le tissu (Figure 3-25).

Grâce aux spectres mesurés et calculés présentés sur les graphiques précédents, nous pouvons tracer la profondeur de pénétration pour chacune des composantes : absorption et diffusion puis la profondeur de pénétration effective dans l'échantillon étudié, en utilisant les équations (3-5) et (3-4).

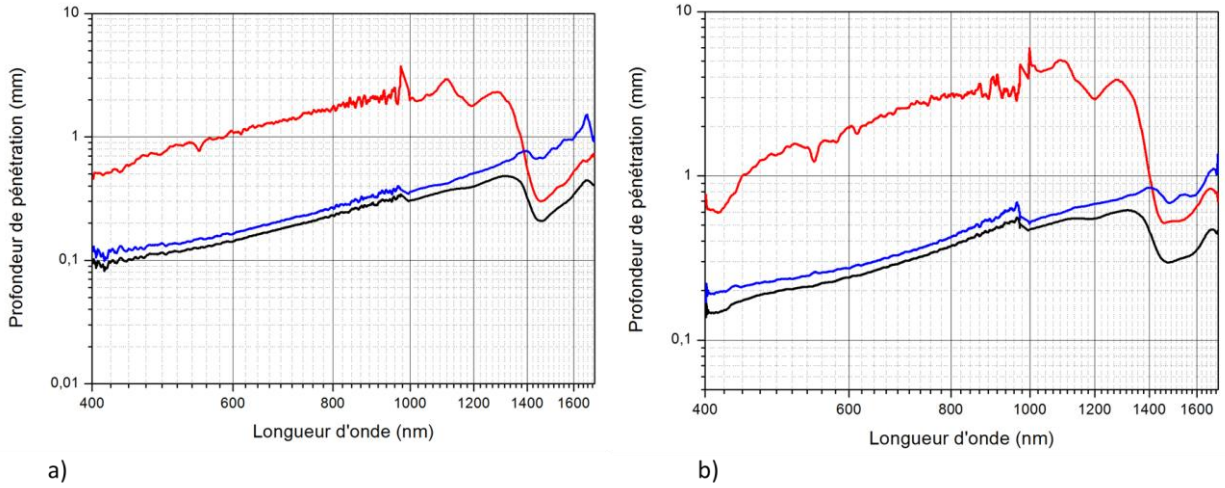


Figure 3-25 Profondeur de pénétration pour les différentes composantes en fonction de la longueur d'onde pour deux échantillons de sclère de pleine épaisseur (environ 600 µm), immergé dans une solution contenant 75% de glycérol et 25% de solution saline a) et immergé dans une solution à 100 % de glycérol b).

Les figures concernant les mesures dans le tissu scléral montrent le comportement dépendant de la longueur d'onde de la diffusion, tout comme cela avait été montré pour la cornée. Ces résultats confirment l'existence d'une fenêtre de relative transparence pour ce tissu autour de 1650 nm. Le choix d'utiliser un laser émettant autour de cette longueur d'onde pour la chirurgie du glaucome parait donc judicieux.

Dans ce chapitre, nous avons montré que pour le tissu scléral, tout comme pour le tissu cornéen, l'utilisation de la longueur d'onde de 1650 nm permet de conserver une profondeur de pénétration suffisante en réduisant le phénomène de diffusion de manière conséquente.

De plus, les premières expériences menées sur le cristallin montrent l'utilisation d'une longueur d'onde optimale autour de 1200-1300 nm, gamme spectrale sur laquelle l'atténuation du faisceau est moindre qu'à des longueurs d'onde plus élevées, tout en réduisant le phénomène de diffusion. La profondeur de pénétration obtenue sur cette gamme de longueurs d'onde est comparable à celle déterminée pour une longueur d'onde autour de 1000 nm. Les études sur ce tissu seront poursuivies au sein du groupe afin de valider l'utilisation privilégiée de l'une ou l'autre gamme de longueurs d'onde.

Un compromis pourrait même être envisagé avec l'utilisation de cette longueur d'onde intermédiaire 1300 nm (très utilisée pour l'imagerie par OCT par exemple) pour la chirurgie des autres tissus du segment antérieur de l'œil (cornée et sclère) plutôt que la longueur d'onde 1000 nm, qui est la longueur d'onde des systèmes cliniques actuellement disponibles, permettant déjà une réduction de la diffusion

Chapitre 4 Le développement de lasers à impulsions ultra-brèves adaptés à la chirurgie du segment antérieur de l'œil

Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, il existe une fenêtre de relative transparence pour la cornée et pour la sclère centrée à la longueur d'onde 1650 nm.

Après avoir décrit brièvement l'interaction laser-tissu et le principe des lasers femtoseconde, je présenterai les sources qui ont été développées au sein du laboratoire afin de réaliser des découpes dans le tissu dans cette nouvelle gamme spectrale. Je terminerai par décrire succinctement deux autres sources laser également utilisées pour ces expériences sur tissu.

Selon les caractéristiques des lasers femtosecondes (longueur d'onde, régime impulsionnel ou continu, durée d'impulsion en mode pulsé, énergie, ouverture numérique utilisée pour la focalisation du faisceau…), on peut distinguer différents types d'interaction avec le tissu, et le Tableau 4-1 récapitule le type d'interaction en fonction de la durée d'impulsion du laser [15].

Durée d'interaction	Processus d'interaction
> 100 ms	Interaction photothermique et photobiostimulée
entre 10^{-5}s et 1 s	Interaction photothermique
entre 10^{-9}s et 10^{-7}s	Photoablation
entre 10^{-12}s et 10^{-8}s	Interaction photochimique
entre 10^{-13}s et 10^{-10}s	Interaction par génération de plasma
< 10^{-12}s	photodisruption (régime des impulsions ultracourtes)

Tableau 4-1 Tableau indiquant l'influence de la durée de l'impulsion dans le mécanisme d'interaction laser-tissu [15].

Le régime qui nous intéresse ici est le régime femtoseconde permettant d'obtenir un effet très localisé dans le tissu. Ces impulsions ultracourtes induisent des phénomènes ultrarapides et il est alors nécessaire de considérer la physique des hautes intensités (forte puissance crête des impulsions). Ce type d'impulsions induit des phénomènes non-linéaires dans les matériaux et tissus traversés, parmi lesquels on trouve la conversion de longueur d'onde. Une grande partie des nouvelles sources laser développées dans le cadre de découpes sur tissus se base sur ce principe de conversion de fréquence, elles seront présentées en section 4.

1 Interaction laser-tissu

Lorsqu'une impulsion ultracourte se propage dans le tissu, plusieurs phénomènes se produisent comme l'indique la Figure 4-1. Le processus d'interaction des lasers femtoseconde avec le tissu est la photodisruption.

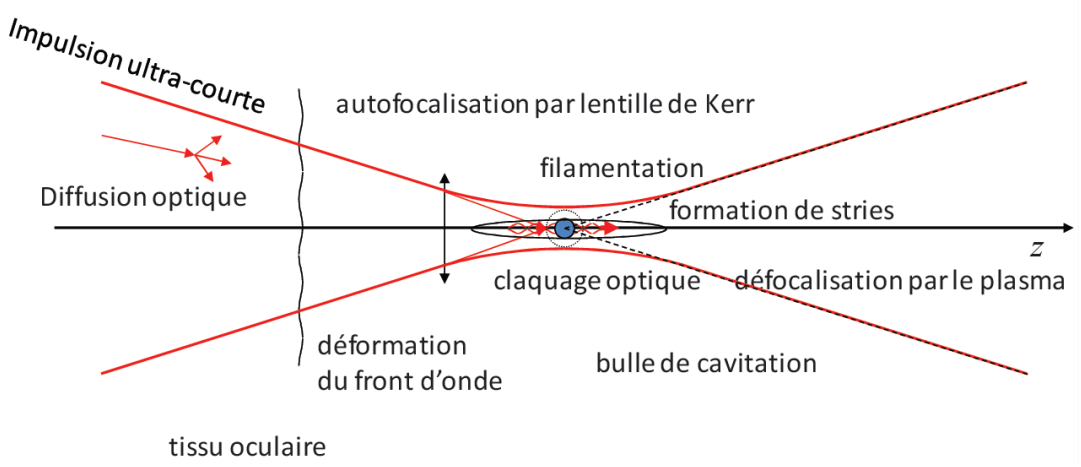


Figure 4-1 Processus d'interaction laser-tissu et phénomènes physiques, conduisant à la photodisruption et à la découpe laser [15].

Lorsque l'intensité du laser au point focal atteint une valeur seuil, il y a génération d'un plasma dans le tissu par ionisation non-linéaire. Si l'énergie déposée est suffisante pour modifier de façon permanente les propriétés du tissu, alors le seuil de claquage optique est atteint, une bulle de cavitation est formée engendrant une disruption qui est localisée au volume de focalisation.

Le seuil de claquage optique est obtenu par combinaison de différents processus d'ionisation comme indiqué sur Figure 4-2. Les premiers électrons libres seront créés à partir de l'excitation d'électrons par photoionisation multiphotonique ou par effet tunnel. Dans le régime des lasers femtoseconde, l'intensité nécessaire pour induire la photoionisation est de l'ordre de 10^{12} à 10^{13} W.cm^{-2} [96-100]. En faisant l'analogie avec les matériaux diélectriques pour les tissus biologiques, comme on le fait pour l'eau liquide, les électrons sont excités depuis de la bande de valence vers la bande de conduction. Les deux bandes sont séparées par un gap de Δ =6,5 eV [101].

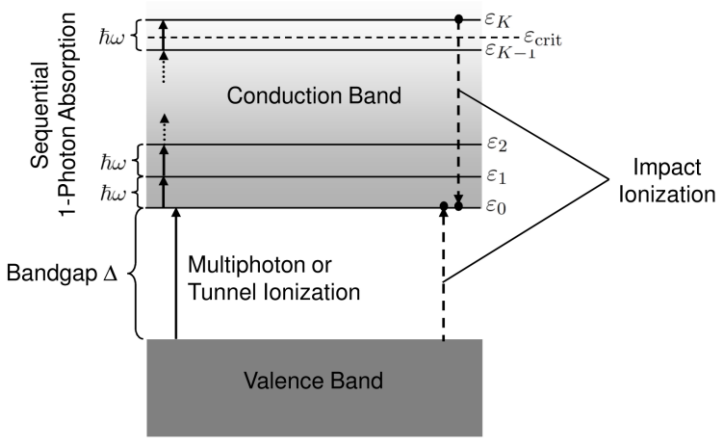


Figure 4-2 Schéma montrant les différents processus impliqués dans l'ionisation non-linéaire [15].

Une fois excités, les électrons vont pouvoir entrer en collision avec des atomes et les molécules constituants le milieu et seront accélérés sous l'effet du champ électrique du laser par absorption linéaire, autrement appelée Bremsstrahlung inverse [96,102-105]. Lorsque l'électron aura absorbé un certain nombre de photons, son énergie cinétique excédera l'énergie nécessaire au processus d'ionisation par collision et sera donc à l'origine de la création de nouveaux électrons libres, qui seront eux même accélérés par la suite, générant de nouveaux électrons, et ainsi de suite. Ce processus d'ionisation est appelé ionisation par effet avalanche et génère un plasma de faible densité électronique.

On considère que la densité critique d'électrons libres nécessaire pour induire le claque optique est de l'ordre de $\rho=10^{21}$ cm^{-3} [102].

Lorsque le plasma est généré, la température s'équilibre au point focal à l'échelle de la picoseconde [102]. Ainsi, le processus d'interaction des impulsions ultra-courtes avec le tissu est indépendant pour les impulsions successives, on peut donc considérer l'effet total par juxtaposition des effets de chaque impulsion, pour des cadences de 1 kHz à 1 MHz.

1.1 Ionisation non-linéaire

L'ionisation non-linéaire est généralement décrite à l'aide de l'expression exprimant la densité d'électrons libres générés, $\rho(t)$ [96,102] :

$$\frac{d\rho(t)}{dt} = \boldsymbol{W_{PI}(I) + \eta_{cascade}\cdot\rho.I + \eta_{diffusion}\cdot\rho + \eta_{recomb}\cdot\rho^2 + \frac{\rho}{\tau_{cap}}} \qquad \textbf{(4-1)}$$

Dans l'équation ci-dessus, W_{PI} est le taux de photoinisation non-linéaire, I étant l'intensité incidente de l'impulsion laser, $\boldsymbol{\eta_{cascade}\cdot\rho.I}$étant le taux d'ionisation par cascade. Les trois derniers termes de l'équation n'ont qu'un rôle mineur dans les conditions de notre étude. $\boldsymbol{\eta_{diffusion}\cdot\rho}$ correspond au taux de diffusion des électrons libres en dehors du volume focal, $\boldsymbol{\eta_{recomb}\cdot\rho^2}$correspond au taux de recombinaison des électrons. Ces deux termes n'apparaissent réellement que sur des échelles de l'ordre de la nanosceconde. Enfin, le dernier terme $\frac{\rho}{\tau_{cap}}$ correspond au taux d'électrons piégés dans les états d'énergie interbandes. Ce terme ne sera pas considéré dans notre étude, même si pour certains matériaux, cette quantité peut avoir un rôle à jouer [106].

La photoionisation non-linéaire est décrite par la théorie de Keldysh [107]. Sa théorie est valable lorsque l'énergie d'un photon du champ laser est petite par rapport au potentiel d'ionisation du milieu : $\hbar.\omega << \Delta$[28].

Comme indiqué plus haut, la photoionisation peut être décrite par deux phénomènes : l'ionisation multiphotonique et l'ionisation par effet tunnel. Pour connaître l'effet dominant, Keldysh a introduit un paramètre γ :

$$\boldsymbol{\gamma = \frac{\omega}{e.E}.\sqrt{m'.\Delta} = \frac{\omega}{e}.\sqrt{\frac{m'.\Delta.c.\varepsilon_0 n}{2.I}}} \quad \textbf{(4-2)}$$

Dans cette expression, *e* est la charge de l'électron, *E* est le champ électrique, *m'*est la masse réduite de l'électron. En considérant *c* la célérité de la lumière dans le vite, ε_0 la permittivité du vide et *n* l'indice de réfraction, l'intensité peut être exprimée : $I = \frac{|E|^2}{2.c.\varepsilon_0.n}$.

Le taux de photo-ionisation non-linéaire W_{PI} selon Keldysh est représenté sur la Figure 4-3. Pour une valeur du paramètre $\gamma >> 1$ (faible intensité), l'ionisation multi-photonique domine. Au contraire, quand le paramètre $\gamma << 1$ (forte intensité), c'est le phénomène d'ionisation par effet tunnel qui domine.

L'intensité I correspondant à $\gamma = 1$ est $I = 1{,}9.10^{13}$ W.cm^{-2}. Sachant que l'intensité nécessaire pour induite le claquage optique par des impulsions ultrabrèves est du même ordre de grandeur, la théorie complète de Keldysh doit être considérée (trait plein), et non seulement l'ionisation multi-photonique (trait pointillé).

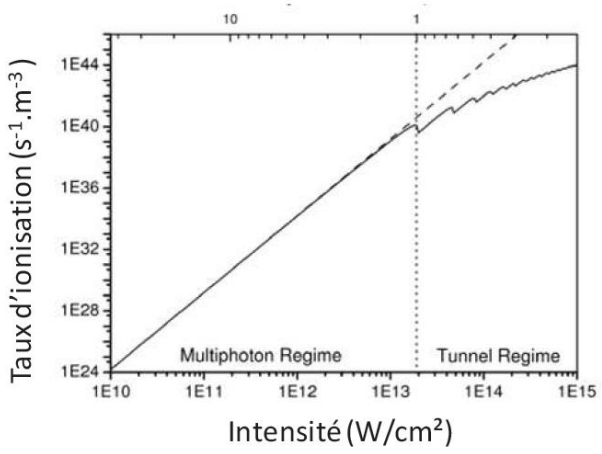


Figure 4-3 Taux d'ionisation non-linéaire totale WPI (trait plein) et réduit à la seule absorption multiphotonique (trait pointillé) en fonction de l'intensité et du paramètre de Keldysh pour λ = 780 nm et Δ = 6,56eV [107].

L'ionisation par effet avalanche peut être décrite selon le modèle de Drude [96,103-105]. On a

$$\boldsymbol{\eta_{casc} = \frac{\sigma}{\varepsilon_{crit}}}, \quad \textbf{(4-3)}$$

où σ est la section efficace pour le phénomène de Bremsstrahlung inverse [96] et s'écrit :

$$\boldsymbol{\sigma = \frac{n}{c}.\frac{e^2}{\varepsilon_0.n^2.m*}.\frac{\tau_p}{1+\omega^2.\tau_p{}^2}} \ . \quad \textbf{(4-4)}$$

[28] C'est bien le cas dans notre étude car $\hbar.\omega$ = 1,59 eV pour un photon à la longueur d'onde 780 nm (laser Ti :Sa), et le gap Δ=6,5 eV.

Dans cette équation, m^* est la masse effective des électrons quasi libres, τ_p est le temps de collision plasma, correspondant au temps moyen de collision entre un électron libre avec une particule lourde du milieu. Comme les photons peuvent seulement être absorbés directement pendant les collisions, τ_p détermine la vitesse de l'ionisation par effet avalanche.

Le taux d'ionisation par effet avalanche est proportionnelle à la densité totale d'électrons libres. Pour les impulsions ultrabrèves, cette contribution est probablement surestimée car seule une petite fraction des électrons libres ont l'énergie cinétique ε_{crit} et seule cette fraction est capable de provoquer une collision donnant lieu à l'ionisation.

Récemment, plusieurs approches ont permis à B. Rethfeld [108,109] de proposer un modèle plus complet que celui du Drude. Ce nouveau modèle a d'ailleurs été utilisé pour la simulation du seuil de claquage optique dans les tissus biologiques [110,111].

1.2 Propagation non-linéaire des impulsions ultrabrèves

Comme nous l'avons dit plus haut, l'intensité nécessaire pour atteindre le claquage optique est de l'ordre de 10^{13}W/cm^{-2}. Lorsqu'une impulsion ultrabrève d'une telle intensité se propage dans un tissu, de nombreux phénomènes se produisent, comme le suggère la Figure 4-1. On peut citer l'autofocalisation, l'automodulation de phase, la génération d'un continuum, la génération de seconde harmonique, la formation de stries, la filamentation ou encore la défocalisation du plasma généré au point focal.

L'interaction entre le tissu et le laser dépend de nombreux paramètres parmi lesquels on trouve la puissance de l'impulsion, l'intensité de l'impulsion, l'énergie par impulsion, la durée de l'impulsion ou encore la focalisation du faisceau laser.

En général, lorsque le faisceau laser est focalisé en volume, des effets collatéraux sont possibles autour du volume focal, en particulier pour des faibles ouvertures numériques, pour lesquelles on peut observer de la filamentation [112,113] et la formation de stries [99,100,110,114].

Le premier phénomène, la filamentation, résulte d'un équilibre entre l'autofocalisation et la défocalisation induite par le plasma généré [112]. L'autofocalisation est produite par l'effet Kerr car l'indice de réfraction du milieu n dépend de l'intensité du champ laser, avec l'équation : $n = n_0 + n_2.I(r,t)$, avec n_0 l'indice de réfraction linéaire du milieu et n_2 l'indice de réfraction non-linéaire [115]. Ainsi, les composantes haute intensité du faisceau – proches de l'axe – sont retardées et induisent un profil de phase transverse équivalent à une lentille convergente supplémentaire. Ce phénomène d'autofocalisation domine la propagation lorsque la puissance crête est supérieure à la puissance critique P_{crit} définie par l'équation [116,117]:

$$\boldsymbol{P_{crit} = \alpha.\frac{\lambda^2}{8.\pi.n_0.n_2}} \qquad \textbf{(4-5)}$$

α est un paramètre valant environ 4 et qui dépend de la géométrie du faisceau. Ainsi, le faisceau continue d'être autofocalisé, diminuant son diamètre et augmentant la puissance de la lentille jusqu'à la création d'un plasma absorbant et provoquant la défocalisation. Lorsque les conditions d'équilibre entre autofocalisation et défocalisation sont réunies, la propagation par filamentation peut s'étendre sur des distances bien supérieures à la distance de Rayleigh. Ainsi, le point de focalisation non-linéaire peut être très éloigné du point de focalisation géométrique. Typiquement, l'intensité permettant cet équilibre est de l'ordre de 10^{13}W.cm^{-2} dans l'eau [112]. Il a été montré que pour de faibles ouvertures numériques, la filamentation a plus de probabilités d'avoir lieu que le claquage optique. Plus l'ouverture numérique

augmente, plus le phénomène de claquage optique devient dominant [118-120]. Dans l'eau (λ=780 nm et n_2=2.10^{-20}m^2.W [97]), la puissance critique vaut P_{crit} = 3,4.10^6 W[29].

Le deuxième phénomène non-linéaire qui concurrence l'obtention du seuil de claquage est la formation de stries [99,100,110,114,121,122]. Ce phénomène est lié à la défocalisation générée par le plasma lors du claquage optique. La densité du plasma augmente au fur et à mesure de la propagation de l'impulsion ; ainsi, le début de l'impulsion n'est pas affecté par le plasma tandis que la fin de l'impulsion subit une forte absorption et une forte défocalisation. Cela induit une asymétrie temporelle et spatiale, géométrie allongée du plasma (forme de stries). Le collagène est modifié selon cette géométrie également.

On peut noter que la propagation non-linéaire d'une impulsion ultrabrève dans le tissu peut modifier le spectre de l'impulsion. En effet, le spectre peut être élargi significativement par l'auto-modulation de phase. Outre la filamentation, la génération d'un continuum [98,123,124] et la séparation temporelle de l'impulsion à cause d'un élargissement spectral et de la dispersion [125,126] peuvent être observées.

1.3 Considérations expérimentales

D'un point de vue pratique, il est important de prendre en considération différents aspects concernant le claquage optique dans le tissu. Afin de minimiser les dommages collatéraux par des effets mécaniques ou thermiques, il est conseillé d'utiliser la plus faible énergie par impulsion ainsi que la plus faible fluence possible. Les différents paramètres expérimentaux comme la durée d'impulsion, la longueur d'onde ou encore l'ouverture numérique peuvent influencer les valeurs d'énergie et les seuils, la précision et l'apparition des effets collatéraux.

La dépendance du seuil de claquage optique par rapport à la durée d'impulsion a été mesurée par de nombreux auteurs and différentes milieux transparents comme l'eau, la silice ou encore la cornée [127-135]. De manière générale, la fluence nécessaire pour induire le claquage optique décroît lorsque la durée d'impulsion diminue. Entre 100 femtoseconde et 1 picoseconde, la pente du seuil de claquage augmente faiblement [102].

Les conditions de claquage optique et les effets collatéraux sont sensibles aux paramètres expérimentaux. En effet, les variations d'organisation du tissu ou la qualité de surface peuvent modifier les conditions et les résultats. En général, c'est le claquage optique en surface du matériau que nous considérons, mais on doit garder à l'esprit qu'en volume, la génération du plasma devient dépendantes des conditions de la propagation de l'impulsion dans le milieu, rendant l'analyse des résultats plus délicate.

Par exemple, la longueur d'onde est un paramètre très important dans ces études, et pourtant, on trouve peu de données concernant son influence sur le seuil de claquage optique, dans l'eau ou les milieux biologiques. Le seuil de claquage optique a été mesuré par Vogel *et al.*dans l'eau en volume à 1040 nm, à la fréquence double et triple [136]. Puis Olivié *et al.*ont mesuré le seuil en surface d'une cornée à différentes longueurs d'onde entre 800 et 1450 nm [137]. Dans ces deux études, une dépendance très faible a été trouvée entre le seuil et la longueur d'onde. Lorsque la longueur d'onde de l'impulsion est modifiée, il faut tenir compte du changement de la taille de la tache focale et des propriétés de propagation. En effet, la tache focale a une dimension caractéristique A_{Foc} proportionnelle à λ^2, et le volume focal a une dimension caractéristique V_{Foc} proportionnelle à λ^3. Pour la propagation non-linéaire de

[29]Pour des impulsions ultrabrèves, cette puissance critique peut être obtenue à des énergies d'impulsion bien inférieures à 1 µJ.

l'impulsion, la puissance critique pour l'auto-focalisation P_{crit}est proportionnelle à λ^2, si n_2 est considéré constante. Ainsi, on considérant une longueur d'onde deux fois plus grande de l'impulsion incidente, l'énergie correspond au seuil de claquage optique devrait augmenter au moins d'un facteur 4, pour une fluence identique. En revanche, les effets non-linéaires au cours de la propagation de l'impulsion ne devraient pas être modifiés par ce changement de longueur d'onde.

2 Principe des lasers femtoseconde

Les impulsions ultrabrèves sont rapidement décrites en annexe 2 de ce manuscrit.

2.1 Principe du laser femtoseconde

Une source laser est une source de lumière spatialement et temporellement cohérente basée sur l'effet laser, processus au cours duquel il y a amplification cohérente de la lumière par émission stimulée.

Le rayonnement laser est généré dans une cavité constituée de deux miroirs afin de permettre l'amplification de la lumière. Dans cette cavité, un milieu particulier dit « actif » sera inséré afin d'amplifier les photons, comme par exemple des cristaux, des liquides, des gaz ou encore des diodes. En général, ce milieu actif donne son nom au laser : laser à CO_2, laser YAG, laser excimer… Dans le cas du laser femtoseconde, son nom indique le mode original de fonctionnement.

Tout d'abord, il faut noter qu'un laser (surtout de par son milieu actif) possède une largeur spectrale de fonctionnement, plage de longueurs d'onde qui pourront exister dans la cavité et que l'on peut extraire. Par exemple, un laser He-Ne possède une disponibilité spectrale de 0,002 nm autour de la longueur d'onde centrale 633 nm alors qu'un laser Ti:Sa possède une disponibilité spectrale de 300 nm autour de sa longueur d'onde centrale 800 nm.

Ensuite, selon la configuration de la cavité laser et les miroirs choisis, il y aura des allers-retours dans la cavité et des modes longitudinaux vont se mettre en place, à des fréquences définies discrètes et généralement régulièrement espacées. Ces seules fréquences peuvent osciller dans la cavité, les autres fréquences étant supprimées par interférence destructive.

Si la longueur de la cavité est L, en notant c la vitesse de la lumière dans le vide, la différence de fréquence $\Delta\nu$ entre deux modes successifs est de :

$$\Delta\boldsymbol{\nu} = \frac{\boldsymbol{c}}{\boldsymbol{2L}} \qquad \textbf{(4-6)}$$

Ces différents modes oscillent indépendamment les uns des autres, sans relation de phase fixe. Lorsque le nombre de modes est faible, il est possible de faire apparaître des battements entre ceux-ci, ce qui entraîne une fluctuation de l'intensité du laser. Au contraire, pour les lasers présentant un nombre très important de modes, cet effet est beaucoup moins visible et l'intensité est plus stable, le laser est alors continu.

Il existe différents moyens pour effectuer le blocage de mode. On peut par exemple citer le blocage de mode actif, avec l'utilisation de modulateur acousto-optique et le blocage de mode passif avec l'utilisation d'un absorbant saturable ou basé sur l'effet Kerr.

Certains lasers cliniques pour la chirurgie réfractive (et/ou la greffe de cornée) sont basés sur des oscillateurs non amplifiés et d'autres sur des oscillateurs suivi par un système

d'amplification. Vu que tous ces lasers utilisent le néodyme ou l'ytterbium comme milieu actif, ils émettent à des longueurs d'onde proche de 1 µm.

Dans le cadre de la chirurgie, la durée de l'intervention ne doit pas excéder quelques minutes car le patient n'est endormi que localement ou parfois même n'est pas endormi. Typiquement, la cadence des lasers doit donc être supérieure à la dizaine de kHz. L'oscillateur est l'élément de base des lasers, mais il ne produit des impulsions qu'à des énergies de quelques nanojoules et la cadence est de l'ordre de 40 à 80 MHz.

Trois architectures sont possibles afin de rendre ces impulsions plus énergétiques : l'amplification d'impulsion par dérive de fréquence (CPA, *Chirped Pulse Amplification*) grâce à l'amplificateur régénératif, les oscillateurs à cavité étendue et les CPA à fibre amplificatrice.

2.1.1 L'amplification à dérive de fréquence (CPA)

Inventée quelques années auparavant, l'application de l'amplification à dérive de fréquence aux lasers a été testée au milieu des années 1980 à l'Université de Rochester par Strickland et Mourou [140]. La technique d'amplification à dérive de fréquence permet d'amplifier des impulsions ultra-courtes de la gamme d'énergie de quelques nanojoules jusqu'aux kilojoules. Grâce à cette technique, l'amplification des impulsions se fait à une intensité laser suffisamment faibles pour ne pas engendrer d'effets non-linéaires dans les matériaux[30]. Cette technique peut être décrite en 3 étapes. Dans un premier temps, les impulsions produites par l'oscillateur sont étirées temporellement, autrement dit les composantes spectrales sont décalées dans le temps[31].

Ensuite, ces impulsions sont amplifiées par des passages répétés dans des milieux laser. Enfin, ces impulsions sont recomprimées à leur durée initiale. C'est grâce à la dispersion des matériaux que l'étirement et la compression des impulsions sont possibles[32] [141].

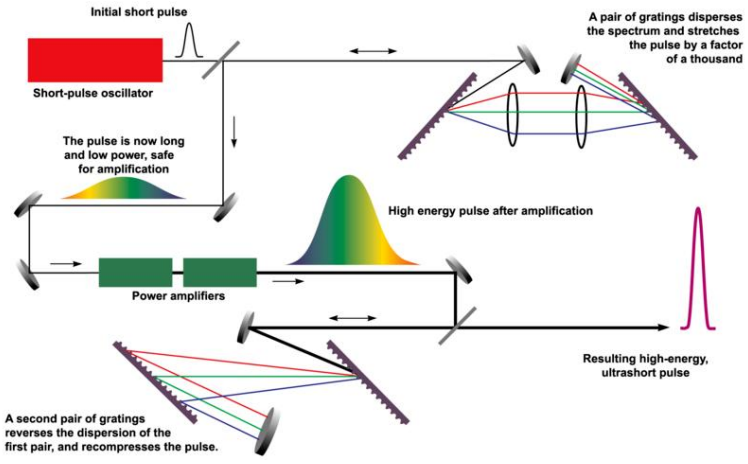


Figure 4-4 Principe de l'amplification à dérive de fréquence [142].

[30] Ainsi, aucune distorsion de l'impulsion n'est possible et les matériaux optiques ne sont pas endommagés.
[31] Ce qui conduit à l'allongement de la durée d'impulsion.
[32] On peut citer par exemple les primes ou réseaux de diffraction, ou d'autres matériaux massifs qui utilisent la dispersion de l'indice de réfraction.

2.1.2 Les oscillateurs à cavité étendue

Ce type de laser présente l'avantage de sa simplicité : il ne s'agit que d'une cavité laser. La cadence reste de l'ordre du MHz et les impulsions sont moins énergétiques qu'après amplification. Cela signifie que le faisceau laser devra être focalisé plus fortement sur le tissu pour atteindre le seuil de claquage optique. Typiquement, la durée des impulsions est de l'ordre de 200 à 300 fs avec des énergies de l'ordre de 200 à 400 nJ.

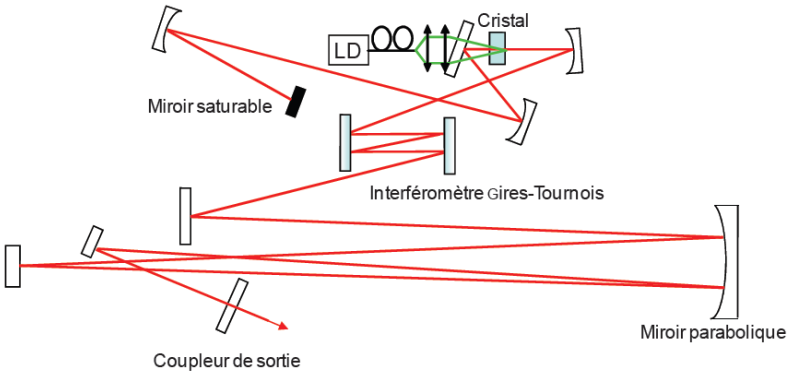


Figure 4-5 Schéma de l'oscillateur à cavité étendue [2].

2.1.3 Le CPA à fibre

Cette dernière technique consiste en l'utilisation des fibres dopées par des terres rares comme l'ion erbium ou l'ion ytterbium. L'utilisation de fibres présente de nombreux avantages comme la compacité ou l'efficacité mais l'inconvénient principal vient des effets non-linéaires qui peuvent potentiellement être générés lors de la propagation d'impulsions ultra-courtes aux énergies nécessaires pour la chirurgie. En effet, le seuil de dommage d'une fibre optique est plus faible que le seuil de dommage d'un cristal massif par exemple. L'invention de la fibre à double cœur a permis de dépasser cette limitation. Pour des cadences de 100 kHz à 100 MHz, des puissances de l'ordre du Watt [143] et des énergies de l'ordre du milliJoule [144] ont été obtenues. Le laser commercial[33] dont il sera question par la suite est d'ailleurs basé sur cette technologie.

2.2 Amplification paramétrique

Lorsque l'on s'intéresse à l'optique linéaire et non-linéaire, on doit prendre en compte le vecteur polarisation, qui est défini selon [145] :

$$\boldsymbol{\mathcal{P}} = \boldsymbol{\varepsilon_0}(\boldsymbol{\chi} \cdot \boldsymbol{\mathcal{E}} + \boldsymbol{\chi^{(2)}} \cdot \boldsymbol{\mathcal{E}^2} + \boldsymbol{\chi^{(3)}} \cdot \boldsymbol{\mathcal{E}^3} + \cdots) \quad \textbf{(4-7)}$$

$$\boldsymbol{\mathcal{P}} = \boldsymbol{\varepsilon_0} \cdot \boldsymbol{\chi} \cdot \boldsymbol{\mathcal{E}} + \boldsymbol{\mathcal{P}_{NL}} \quad \textbf{(4-8)}$$

Il se décompose en une partie linéaire et une partie non-linéaire. Le vecteur polarisation concernant les non-linéarités d'ordre 2 est défini par :

[33] Laser s-pulse HP, Amplitude Systèmes.

$$\mathcal{P}_{NL} = \varepsilon_0 \cdot \chi^{(2)} \cdot \mathcal{E}^2 \quad \textbf{(4-9)}$$

La génération de seconde harmonique est une non-linéarité d'ordre 2. Le mélange à 3 ondes pour obtenir une somme ou une différence de fréquence est également une non-linéarité d'ordre 2. Ce mélange a 3 ondes est parfois appelé interaction paramétrique et fait intervenir des termes correspondant aux différentes fréquences $0{,}2\omega_1$, $2\omega_2$, $\omega_1 + \omega_2$ et $\omega_1 - \omega_2$, et c'est ce processus qui nous intéresse ici.
Ces trois ondes doivent simultanément vérifier la relation d'accord de phase d'une part et la relation d'accord de fréquence d'autre part :

$$\boldsymbol{k_3 = k_2 + k_1} \quad \textbf{(4-10)}$$
$$\boldsymbol{\omega_3 = \omega_1 + \omega_2} \quad \textbf{(4-11)}$$

Dans le cas où les ondes se propagent dans la même direction, la relation concernant les vecteurs d'onde peut s'écrire :

$$\frac{n_1\omega_1}{c_0} + \frac{n_2\omega_2}{c_0} = \frac{n_3\omega_3}{c_0} \quad \textbf{(4-12)}$$

Dans le cas de milieux non dispersifs, autrement dit lorsque l'indice de réfraction ne dépend pas de la longueur d'onde, $n_1 = n_2 = n_3$ et l'équation de condition d'accord de phase est identique à l'équation de la condition d'accord de fréquence. Dans le cas de milieux dispersifs, il faut tenir compte de la dépendance de l'indice optique avec la longueur d'onde des 3 ondes en présence. On peut alors écrire :

$$\boldsymbol{n_1\omega_1 + n_2\omega_2 = n_3\omega_3} \quad \textbf{(4-13)}$$

L'équation de conservation du nombre de photons et l'équation de Manley-Rowe sont présentées ici:

$$\frac{d\phi_1}{dz} = \frac{d\phi_2}{dz} = -\frac{d\phi_3}{dz} \quad \textbf{(4-14)}$$

$$\frac{d}{dz}\left(\frac{I_1}{\omega_1}\right) = \frac{d}{dz}\left(\frac{I_2}{\omega_2}\right) = -\frac{d}{dz}\left(\frac{I_3}{\omega_3}\right) \quad \textbf{(4-15)}$$

Les amplificateurs paramétriques utilisent le principe de mélange à 3 ondes, à travers un cristal. L'onde 3 est appelée la pompe, de forte intensité, les ondes 1 et 3 sont appelées signal et complémentaire respectivement. L'onde à la fréquence ω_1, dont l'intensité est faible en entrée, est l'onde à amplifier.
On définit le désaccord de phase $\boldsymbol{\Delta k}$ par :

$$\boldsymbol{\Delta k = k3 - k2 - k1} \quad \textbf{(4-16)}$$
$$\boldsymbol{\Delta k = \frac{2\pi}{L_C}} \quad \textbf{(4-17)}$$

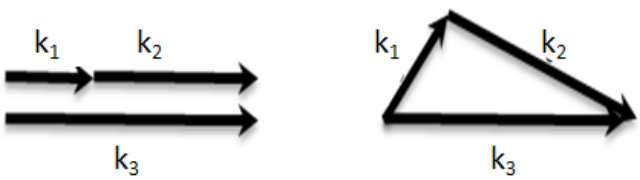


Figure 4-6 Accord de phase colinéaire à gauche et accord de phase non colinéaire à droite [2].

La longueur de cohérence L_c est la longueur permettant d'obtenir un signal (à ω_1) maximum. Au bout d'une longueur correspondant à $2L_c$, le signal est de nouveau nul.

En cas d'accord de phase, $\Delta\boldsymbol{k}$ est nul. Un accord de phase peut être réalisé de plusieurs manières, par exemple :

- En utilisant un cristal biréfringent dont l'indice optique diffère l'axe de propagation de l'onde,
- l'accord de phase par dispersion anormale,
- l'accord de phase par biréfringence de Fresnel.

En revanche, pour le générateur paramétrique optique dont il est question par la suite, il n'y a pas accord de phase à proprement parler, c'est le quasi-accord de phase. Le quasi-accord de phase est en général utilisé lorsque l'accord de phase par biréfringence n'est pas possible. Ce principe d'accord de phase a initialement été proposé par Bloembergen [146]. Une périodicité est introduite dans le cristal, par alternance de l'indice optique ou par alternance du coefficient non-linéaire (lié à χ^2). Cette technique est très pratique car toutes les longueurs d'onde peuvent être générées à condition de choisir judicieusement la période du cristal. De plus, elle permet l'utilisation de cristaux non-linéaires non biréfringents dont certains ont un fort χ^2.

Dans le cas du quasi-accord de phase, il existe alors un $\Delta\boldsymbol{k}$ qui est relié à la période du cristal, afin de générer un quasi-accord de phase. Le principe est d'amplifier le signal au fur et à mesure de la propagation à travers le cristal.

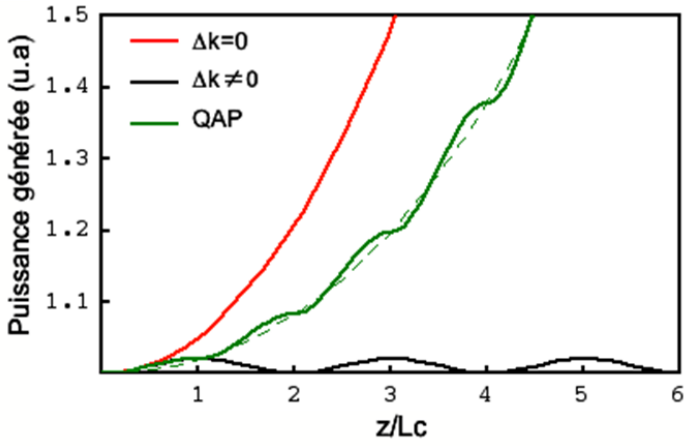


Figure 4-7 Schéma montrant l'évolution de la puissance du signal en sortie de cristal selon l'accord de phase réalisé [2].

Le quasi-accord de phase est obtenu en utilisant un cristal polarisé périodiquement (Figure 4-8). En effet, à chaque longueur L_c, l'axe du cristal sera inversé dans le but de toujours obtenir une amplification du signal (courbe verte de la Figure 4-7). Afin d'obtenir une amplification optimale, la période du cristal doit être égale à $2L_c$.

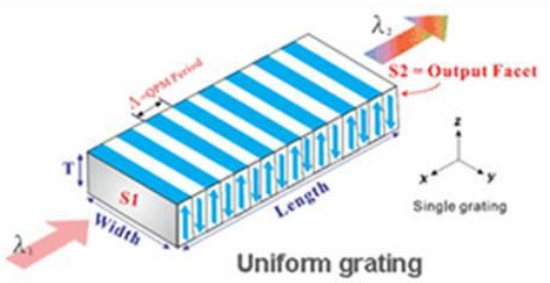


Figure 4-8 Schéma du cristal de PPMLN[34]

En ce qui concerne les non-linéarités d'ordre 3, la partie concernée du vecteur polarisation est notée :

$$\mathcal{P}_{NL} = \varepsilon_0 \cdot \chi^{(3)} \cdot \mathcal{E}^3 \qquad \textbf{(4-18)}$$

Parmi les différentes linéarités d'ordre 3, on peut citer la génération de troisième harmonique, l'effet Kerr optique avec la dépendance de l'indice optique ($n(I) = n_0 + n_2 \cdot I$). Cet effet donne lieu à l'automodulation de phase et à l'autofocalisation [145].

3 Développement de nouvelles sources laser

Parmi les sources lasers décrites dans ce paragraphe, toutes sont accordables en longueur d'onde sauf la première qui consiste en un laser fibré émettant à la longueur d'onde 1590 nm. Toutes sont basées sur des principes de l'optique non-linéaire. Une démonstration complète des principes physiques en jeu pour le développement de ces nouvelles sources laser est disponible dans la thèse de Nicolas Forget [147].

3.1 Besoin de nouvelles sources

Les systèmes laser actuellement disponibles ont une longueur d'onde d'émission autour de 1000 nm. Il n'existe aucun système commercial ayant une longueur d'onde plus lointaine dans l'infrarouge. Or, nous avons vu au chapitre précédent que le phénomène de diffusion pouvait être fortement atténué dans les tissus cornéen et scléral en utilisant une longueur d'onde dans la fenêtre de relative transparence centrée à 1650 nm.

Ainsi, de nouvelles sources laser ont été développées en laboratoire afin d'avoir accès à la gamme spectrale 1600 – 1700 nm. Les lasers développés et utilisés pour les expériences de découpe sur le tissu sont présentés dans la section suivante.

Dans le cadre de la chirurgie, la durée de l'intervention ne doit pas excéder quelques minutes car le patient n'est anesthésié que localement ou parfois même n'est pas endormi et il faut éviter au maximum les mouvements de l'œil. Typiquement, la cadence des lasers doit donc être supérieure ou de l'ordre de la dizaine de kHz.

Par contre, cette cadence ne doit pas excéder quelques MHz pour éviter les possibles effets thermiques sur le tissu, par accumulation de chaleur entre les différentes impulsions. Si la cadence est inférieure à la dizaine de MHz, la chaleur générée par une impulsion a le temps de se dissiper avant l'arrivée de l'impulsion suivante.

[34] HC Photonics, Taiwan.

Enfin, afin de pouvoir inciser dans le tissu, l'énergie nécessaire est de l'ordre du microJoule. Pour induire le phénomène de photodisruption, la durée des impulsions doit être inférieure à 1 ps et de l'ordre quelques centaines de fs.

3.2 Amplification paramétrique optique avec deux cristaux monolitithiques

La première source laser montée pour nos propres expériences au sein du laboratoire a été l'amplificateur paramétrique optique (OPA), developpée dans le cadre du projet de thèse de Florent Deloison [2]. Ici, la conversion de fréquence est réalisée grâce à un accord de phase par biréfringence.

Dans cette première configuration, deux cristaux successifs sont pompés séparément par un laser Titane:Saphire de laboratoire, ayant une durée d'impulsion de 50 fs environ et un taux de répétition de 1 kHz [2]. Le premier cristal utilisé est un cristal de bêta barium borate (BBO) dont l'accord de phase à la longueur d'onde souhaitée est déterminé selon son orientation. Ce premier étage sert à l'initiation des premiers photons à la longueur d'onde désirée, grâce à l'injection d'un supercontinuum généré dans une lame de verre. Le deuxième étage est constitué d'un cristal de Bismuth triborate (BiBO) qui n'est pas très sélectif en longueur d'onde : pour une certaine orientation, le gain est plat pour une large plage de longueur d'onde 1200 – 2000 nm. La majeure partie de la pompe est conservée pour ce deuxième étage qui sert à amplifier considérablement le faible signal généré au premier étage. Les spectres obtenus par ce système sont présentés en Figure 4-10 b).

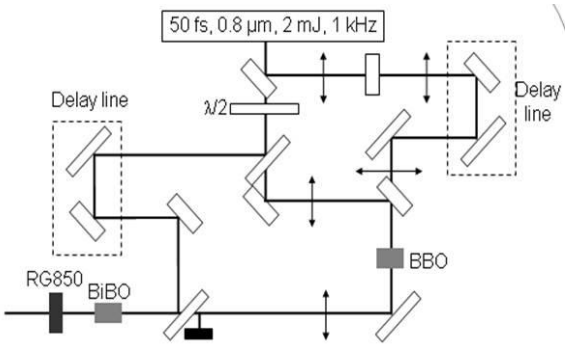


Figure 4-9 Schéma du montage expérimental de l'OPA [2].

La longueur d'onde de sortie d'un tel système est accordable sur la plage 1200 – 2000 nm et l'énergie en sortie est largement suffisante pour nos expériences : une énergie d'environ 200 µJ disponible à 1600 nm.

Cependant, un tel système nécessite une pompe stable (à mieux que 5 % de variation) avec une énergie par impulsion de quelques mJ. Il nécessite aussi un contrôle permanent des conditions environnantes et un réalignement constant. Il ne serait pas envisageable d'intégrer un tel laser dans un système destiné aux hôpitaux, vue sa lourdeur, son utilisation reste réservée aux laboratoires.

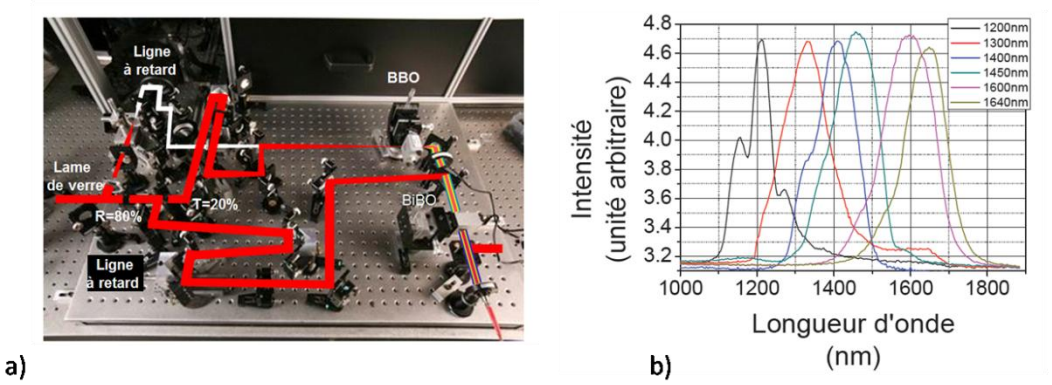


Figure 4-10 Montage optique de l'OPA en salle d'expérience a) et spectres obtenus en sortie de l'OPA, en variant l'angle du cristal de premier étage b) [2].

3.3 Conversion de longueur d'onde des cristaux polarisés périodiquement

3.3.1 Configuration en générateur paramétrique optique

Du fait des inconvénients importants de la source OPA, nous avons développé une seconde source laser selon la configuration d'un générateur paramétrique optique (OPG) simple passage, notamment au cours du projet de thèse de Florent Deloison.

Il se compose d'un cristal polarisé périodiquement de lithium niobate dopé au magnésium PPMLN[35] (Figure 4-8) ayant une dimension de $2\times2\times5$ mm^3. Etant fortement hygroscopique[36], ce cristal doit être placé dans un four électrique afin d'être chauffé à une température comprise entre 60 et 200°C. Ce cristal est pompé par un système femtoseconde commercial[37] qui délivre des impulsions d'une durée de 600 fs environ à la longueur d'onde 1030 nm. Le taux de répétition peut être choisi entre 1 et 100 kHz, et nous travaillons typiquement avec une fréquence de 10 kHz.

L'OPG est basé sur le principe de quasi-accord de phase. La pompe étant à la longueur d'onde 1030 nm et souhaitant générer des longueurs d'onde dans la gamme 1600 – 1800 nm, la période typique à utiliser est de l'ordre de 30 µm. Pour une période de 29 µm, la longueur d'onde de sortie peut être comprise entre 1450 et 1750 nm[38] en variant seulement la température du four dans lequel est place le cristal. En effet, la variation de température va induire de petites modifications de longueur de période grâce à la dilatation.

Contrairement à l'OPA décrit précédemment, ce montage ne nécessite pas d'étage initiateur de photons à la longueur d'onde souhaitée. L'origine de l'émission lumineuse est la fluorescence paramétrique, c'est le bruit ambiant[39] qui est initiateur des photons. Seuls les photons à la longueur d'onde souhaitée pourront être amplifiés car pour les autres, la période du cristal induira des interférences destructives.

---

[35] Cristal de PPMLN, HC Photonics, Taiwan.
[36] Composé d'éléments ayant tendance à absorber l'humidité de l'air environnant.
[37] Laser de pompe du cristal : laser s-pulse HP, Amplitude Systèmes, Pessac.
[38] Selon SNLO
[39] Tout comme dans le cas de l'émission spontanée amplifiée (ASE).

Période	1	2	3	4	5	6
Longueur d'onde centrale (nm)	1505	1531	1573	1626	1735	1985
Largeur spectrale (FWHM, nm)	39	43	63	85	146	390

Tableau 4-2 Tableau donnant la longueur d'onde centrale émise ainsi que la largeur spectrale à mi hauteur pour les différentes périodes, à 120 °C et avec une focale de 1000 mm.

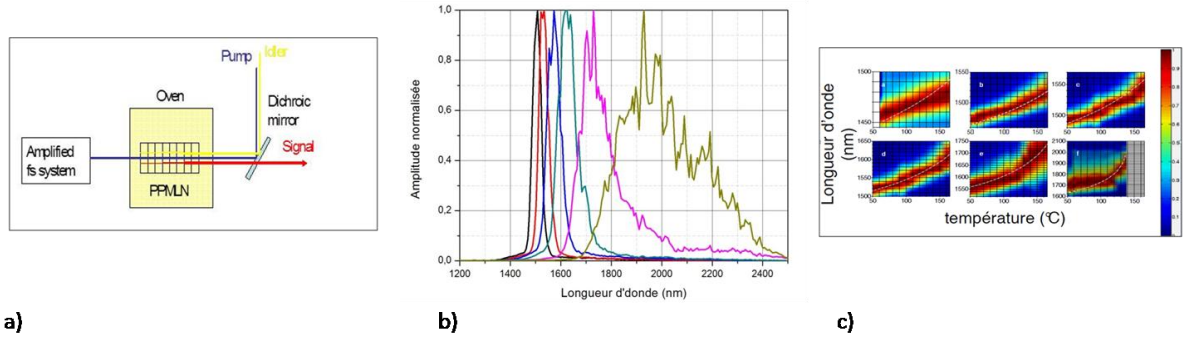


Figure 4-11 Schéma simplifié du fonctionnement du cristal de PPMLN a) Spectres obtenus en sortie du cristal de PPMLN à 120 °C sur les 6 réseaux du cristal b) et évolution du spectre pour chacun des réseaux de période a) 29,6 µm à f) 32 µm avec la température entre 50 et 160°C, et en pointillé, la longueur d'onde théorique prévue par SNLO [2].

En sortie du système, la durée d'impulsion est toujours de 600 fs, à la cadence de 10 kHz. L'énergie disponible en sortie du PPMLN à 1650 nm est de l'ordre de quelques µJ, soit bien inférieure à la source OPA précédente (mais qui elle, est composée de 2 étages). Cette source présente de nombreux avantages comme sa compacité, sa robustesse, sa simplicité (un seul cristal qui est utilisé en simple passage) et est donc envisageable dans le cadre d'un système clinique.
Nous nous sommes intéressés de près au spectre en sortie d'un tel système. Basé sur le principe de génération de différence de fréquence, pour notre application, ce système présente l'inconvénient d'avoir un spectre qui s'élargit lorsque la température augmente ou que la période est plus longue, autrement dit lorsque la longueur d'onde augmente. Dans ce cas, en effet, on s'approche de la dégénérescence (double de la longueur d'onde de pompe, soit 2060 nm) et l'effet non-linéaire est alors moins sélectif en longueur d'onde, d'où une amplification sur une plus large plage spectrale, comme l'indiquent les spectres de la Figure 4-11et le Tableau 4-2.

Cette largeur spectrale peut être gênante pour deux raisons :

- Plus le spectre est large, plus les longueurs d'onde proches de la bande d'absorption de l'eau peuvent affecter les découpes, pouvant conduire à un bénéfice moindre du changement de longueur d'onde.
- L'aberration chromatique sera davantage présente, surtout lorsque l'objectif de focalisation utilisé n'est pas corrigé.

Le spectre en sortie du système OPG est particulièrement large aux longueurs d'onde d'intérêt pour nos études, et l'énergie disponible en sortie n'est pas suffisante pour envisager l'utilisation de filtres avec ce montage. Souhaitant contrôler l'allure et en particulier la largeur

du spectre grâce à des filtres passe-bande, de nouvelles configurations ont été envisagées afin de rendre la source plus énergétique.

Il est intéressant d'utiliser la configuration à deux étages dans ce cas. En effet, comme dans le cas de l'OPA décrit précédemment, un premier étage servira à l'initiation des premiers photons à la longueur d'onde souhaitée (OPG qui vient d'être décrit) et un deuxième étage servira à amplifier ce signal filtré ou non.

3.3.2 Configuration en amplificateur paramétrique optique par injection d'un continuum

Les premières expériences concernant cette source ont été initiées chez Amplitude puis le montage a été réalisé au sein du LOA. Dans cette nouvelle configuration, un supercontinuum est général dans une lame de verre épaisse de 10 mm et est envoyé colinéairement à la pompe (toujours à 1030 nm) dans le cristal de PPMLN (Figure 4-12).

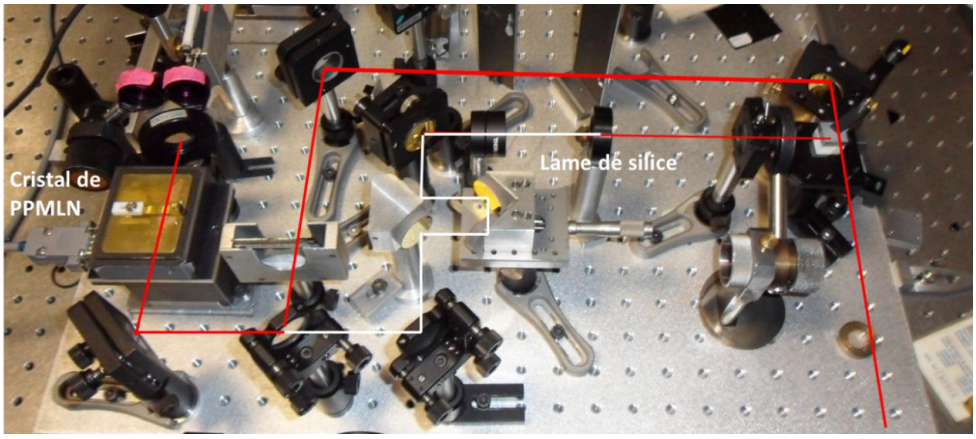


Figure 4-12 Montage de l'OPA avec un seul cristal de PPMLN dans son four. Une partie du faisceau du laser commercial est prélevé et focalisé dans une lame en silice afin d'obtenir un continuum, ce bras étant muni d'un délai. Le résidu de la pompe et ce continuum se recombine et pompent colinéairement le cristal de PPMLN.

Quelques mesures de puissance et spectrales de cette configuration sont présentées sur les Figure 4-13 et Figure 4-14.

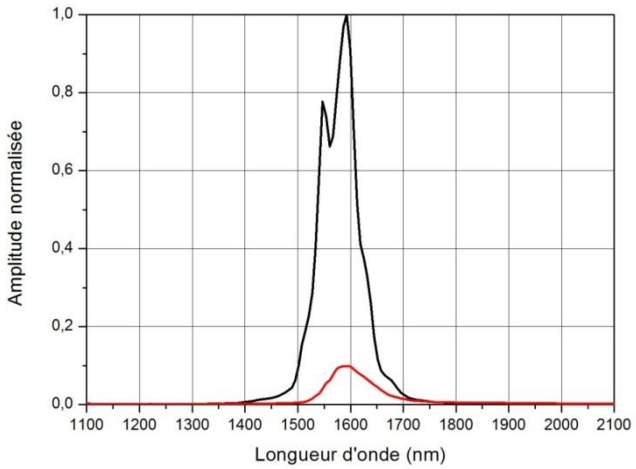


Figure 4-13 Spectres présentant le gain obtenu en injectant un continuum dans le cristal de PPMLN (courbe noire) déjà en configuration OPG (courbe rouge), sur la troisième période du cristal (pas de 30,46 µm) à une température de 120°C et une énergie en entrée de 480 mW, la lentille focalisant sur le cristal de distance focale 1000 mm.

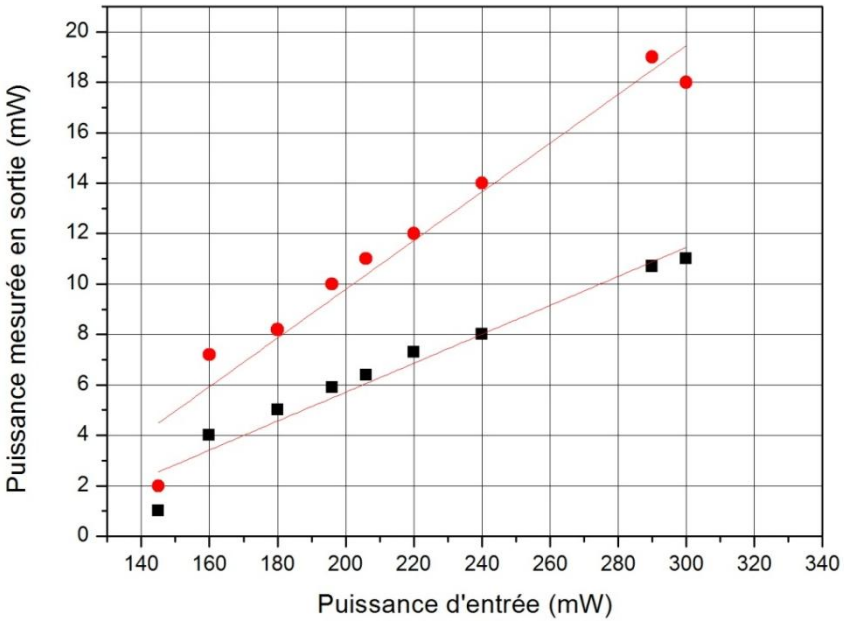


Figure 4-14 Mesures de la puissance en sortie du cristal avec injection du continuum (points rouges) et sans injection du continuum (carrés noirs)(3^{e} période à110°C –lentille de focale de 800 mm pour focaliser dans le cristal– filtres 1200 et 1064 nm).

Cette configuration avec un cristal de PPMLN pompé par un laser commercial et un continuum permet d'obtenir une énergie plus importante d'un facteur au moins 1,5 dans la gamme des longueurs d'onde d'intérêt. Ainsi, des filtres passe-bandes peuvent être utilisés, l'atténuation du faisceau ne limitant pas les expériences de découpes.

De plus, un autre intérêt d'une telle configuration est le maintien de la finesse spectrale lorsque le filtre passe-bande (10 ou 50 nm) est placé sur le bras du continuum. L'injection d'un spectre de largeur 50 nm dans le second cristal permet de réduire la largeur spectrale de 95 à 85 nm pour une longueur d'onde centrale de 1580 nm.

L'inconvénient de ce montage peut être l'instabilité du continuum. En effet, il faut être proche du seuil de claquage pour que le filament généré dans la lame de silice soit propre et dès que le seuil de claquage n'est plus atteint, le continuum disparait et l'amplification est perdue.

3.3.3 Configuration en amplificateur paramétrique optique à deux cristaux successifs

Une telle géométrie de double étage est également utilisée par d'autres équipes de recherche pour des lasers non amplifiés de PPLN [148] à une cadence de 1 MHz et une durée d'impulsion d'environ 200 fs.

Comme nous venons de le voir, l'inconvénient du continuum est sa faible stabilité. L'utilisation d'une configuration à deux cristaux de PPMLN successifs permet de contourner ce problème. La lame de verre précédemment utilisée pour générer le continuum a été remplacée par un cristal de PPMLN[40] (Figure 4-15). Une partie des résultats obtenus est présentée sur le graphique de la Figure 4-16.

[40] Focalisation *via* une lentille de 40 mm de focale.

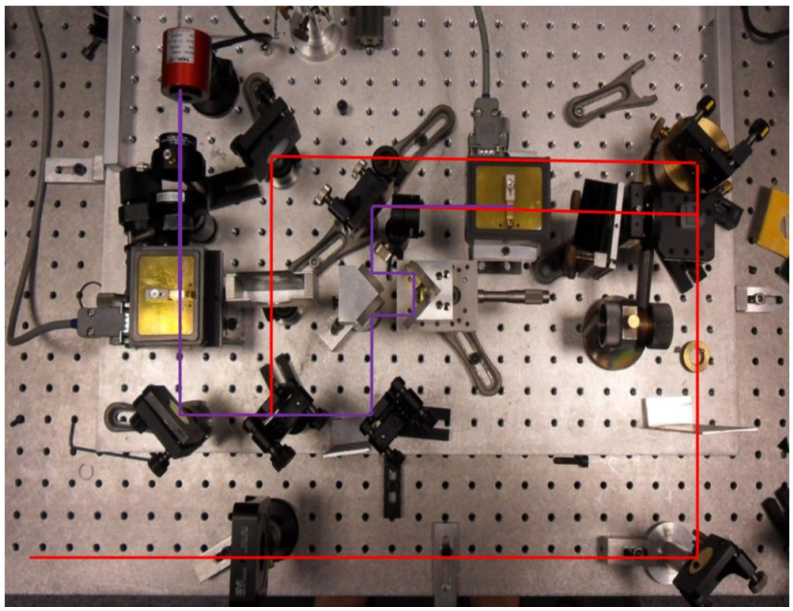


Figure 4-15 Montage expérimental de la configuration à deux cristaux de PPMLN successifs.

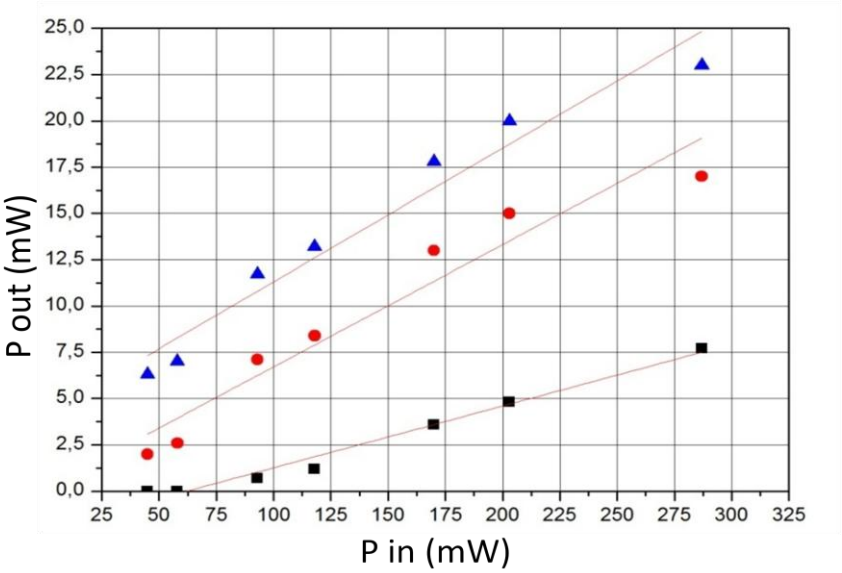


Figure 4-16 Puissance mesurée en sortie du cristal amplificateur : en configuration OPG (carrés noirs), en pompant avec un signal filtré à 1650 nm +/- 25 nm (points rouges) et sans filtrage du bras initiateur des photons (triangles bleus).

Le signal en sortie du second cristal est multiplié par un facteur compris entre 2 et 3 lorsque qu'il est pompé par le signal produit par un premier étage. Ainsi, l'efficacité est meilleure en injectant un signal centré autour de la longueur d'onde souhaitée qu'avec l'injection d'un continuum dans lequel l'intensité est répartie sur un spectre plus large. L'injection du spectre issu d'un premier cristal privilégie l'amplification des longueurs d'onde dans la bande spectrale d'intérêt.

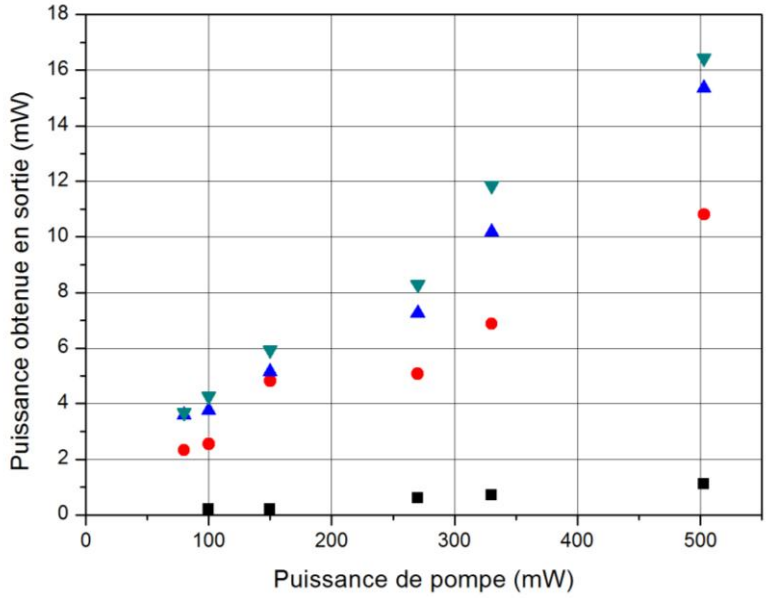


Figure 4-17 Puissance obtenue en sortie du cristal en configuration OPG (carré noir), en configuration OPA avec injection de la totalité du signal généré au 1er étage (cercle rouge), en configuration OPA avec injection du signal généré au 1er étage filtré à 1600 nm +/- 25 nm (triangle bleu pointant vers le haut) et en configuration OPA avec injection du signal généré au 1er étage filtré à 1600 nm +/- 5 nm (triangle vert vers le bas).

L'injection d'un signal filtré à +/- 5 nm (Figure 4-17) permet d'obtenir une amplification plus importante à la longueur d'onde souhaitée. En effet, seuls les photons à la bonne longueur d'onde, ici 1600 nm sont injectés sur le second cristal permettant de « concentrer » l'amplification et le transfert d'énergie sur la bonne plage spectrale.

4 Autres lasers utilisés

4.1 Laser fibré

Ce premier laser a été développé au sein de l'Institut d'Optique par l'équipe ELSA, dans le cadre du projet ANR Greco et de la thèse de Franck Morin [149]. Il est basé sur la technologie des lasers à fibres dopées erbium.

Le gain de cette technologie est principalement situé entre 1550 et 1580 nm, mais il existe aussi un signal plus faible à 1600 nm. Pour compenser ce faible gain, il a fallu utiliser des fibres plus longues et donc assurer un contrôle de la distorsion de la phase spectrale. Ainsi, il a été possible de générer un signal en sortie du système à la longueur d'onde 1600 nm avec une largeur spectrale à mi-hauteur de 15 nm, une durée d'impulsion d'environ 700 fs ; l'énergie disponible étant de 2 µJ, suffisante pour réaliser les incisions dans la cornée. Le schéma du montage est présenté et le montage expérimental sont présentés en Figure 4-18.

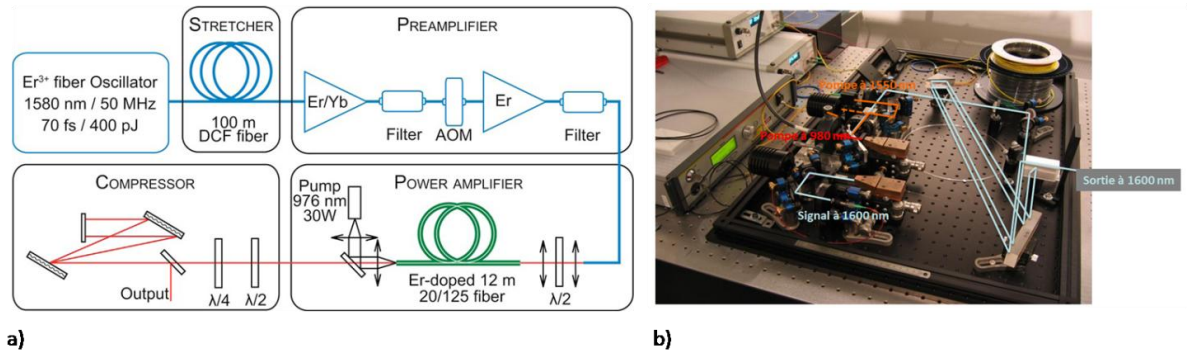


Figure 4-18 Schéma du laser fibré a) et montage expérimental du laser fibré au Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique *GraduateSchool* [149].

4.2 OPA commercial

Un amplificateur paramétrique optique commercial[41] a été utilisé dans le cadre de nos expériences chirurgicales. Il s'agit d'un OPA pompé par un laser Ti :Sa. Les caractéristiques du laser de pompe sont les suivantes :

- Longueur d'onde 820 nm
- Durée d'impulsion : 50 fs
- Cadence des impulsions : 1 kHz
- Energie disponible en entrée de l'OPA : environ 90 mJ.

La longueur d'onde d'intérêt pour notre groupe est autour de 1650 nm, très proche de la dégénérescence de l'OPA (1640 nm, double de la longueur d'onde de pompe). Ainsi, pour les longueurs d'onde autour de cette valeur, le spectre est très large car il associe le spectre du signal et le spectre du complémentaire, comme indiqué par le spectre turquoise de la Figure 4-19. Les signaux filtrés permettent d'obtenir de bonnes conditions de découpes.

[41] Palitra, Quantronix

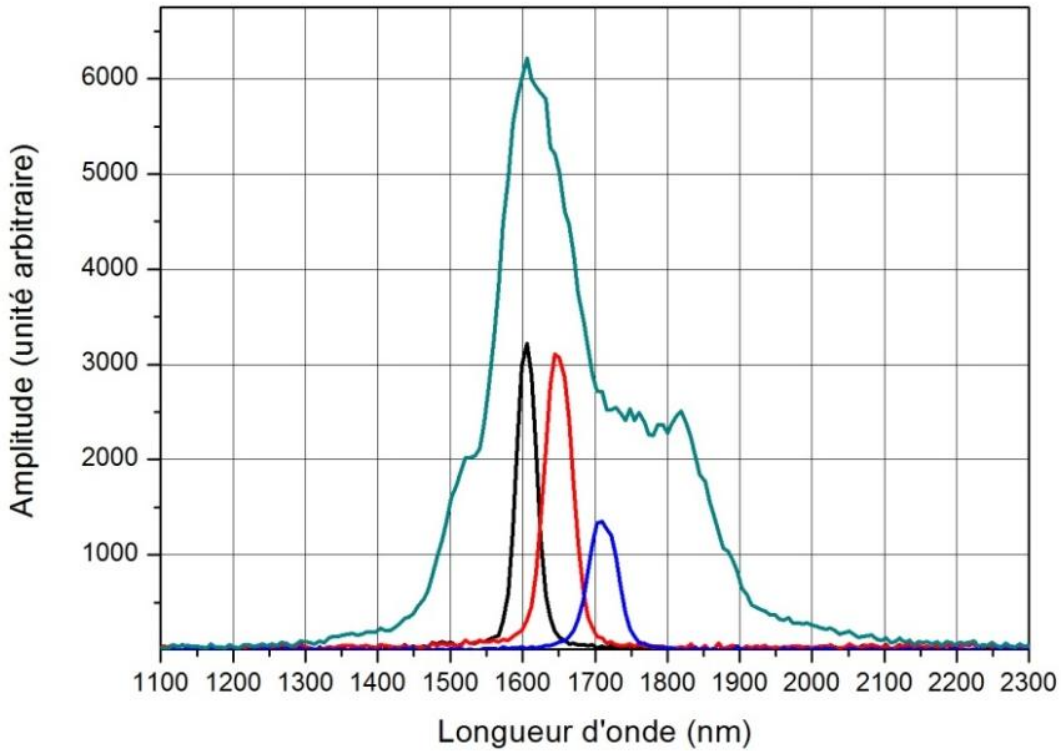


Figure 4-19 Spectres de l'OPA commercial utilisé pour les découpes sur tissu : en vert le signal non filtré centré à 1620 nm, en noir le signal filtré à 1600 nm, en rouge le signal filtré à 1650 nm et enfin en bleu le signal filtré à 1700 nm.

Les caractéristiques sont présentées dans le tableau suivant :

Longueur d'onde (nm)	Filtrage	Largeur à mi-hauteur (nm)	Energie disponible (µJ)
1620	Non	200	51
1600	Oui	34	7
1650	Oui	45	8,5
1700	Oui	45	4

Tableau 4-3 Tableau présentant les possibilités de cette source laser dont les spectres sont présentés en Figure 4-19.

Plusieurs sources ont été développées dans le cadre des découpes chirurgicales sur tissu, certaines présentant des limites ou des inconvénients, menant au développement de sources plus adaptées. Finalement, les caractéristiques des différentes sources mentionnées dans ce chapitre sont présentées sur le Tableau 4-4.

	Laser fibré	OPA	OPG	OPA PPMLN	OPA commercial
Accordabilité (longueur d'onde)	1,6 µm	Accordable entre 1,2 et 2,2 µm	Accordable entre 1,45 et 1,7 µm (selon période)	Accordable entre 1,45 et 1,7 µm (selon période)	accordable 1 µm et 2 µm
Largeur spectrale à 1600 ou 1650 nm	15 nm	50 nm	140 nm	140 nm 45 nm par filtrage	180 nm 45 nm par filtrage
Durée d'impulsion	700 fs	100 fs	600 fs	600 fs	50 fs
Cadence	200 kHz	1 kHz	10 kHz	10 kHz	1 kHz
Énergie @ 1,6 µm	2 µJ	200 µJ	10 µJ	30 µJ	10 µJ
Compacité	oui	Non	Oui	Oui	Non
Stabilité	oui	Non	Oui	moyenne	Oui

Tableau 4-4 Récapitulatif des caractéristiques des différents lasers développés pour la chirurgie du segment antérieur de l'œil.

Les lasers cliniques actuellement disponibles émettent à des longueurs d'onde autour de 1000 nm et sont parfois confrontés à des limitations dans les tissus. Il n'existe aucun système laser sur le marché émettant des impulsions ultracourtes aux longueurs d'onde de la fenêtre de transparence de la cornée ou de la sclère. Dans ce chapitre, je viens de décrire les cinq lasers disponibles au laboratoire, dont quatre ont été développés spécifiquement pour la chirurgie des tissus oculaires.

Certains de ces systèmes présentent l'avantage d'être compacts et ouvrent potentiellement la voie à un développement industriel pour les applications cliniques. Les lasers décrits précédemment ont été expérimentés pour la découpe de tissus et les résultats sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 5 Expériences chirurgicales sur tissu

Le degré de transparence plus élevé des tissus cornéen et scléral dans la fenêtre optique centrée à 1650 nm a été démontré au chapitre 3. Des lasers émettant autour de ces longueurs d'onde ont été développés au sein de notre groupe de travail (chapitre 4), et ainsi permis de réaliser des découpes chirurgicales dans les tissus concernés.

Les incisions transfixiantes, autrement dit perpendiculaires à la surface du tissu, permettent d'évaluer la profondeur de pénétration atteinte par le laser. Elles constituent donc un bon indicateur du rapport de Strehl, du degré de transparence ou bien encore du degré d'œdème dans le tissu cornéen.

Les découpes lamellaires, réalisées dans un plan parallèle à la surface du tissu, permettent d'étudier la qualité de l'interface de l'interaction laser-tissu dans les différentes conditions. Cette qualité d'interface est un paramètre important dans le cadre de la greffe de cornée. Une diffusion trop importante de cette interface pourrait, par exemple, limiter l'acuité visuelle post-chirurgicale.

Après la description succincte du dispositif expérimental permettant de réaliser des découpes par laser femtoseconde, je montrerai les résultats obtenus sur les tissus cornéens et scléraux d'origine humaine, et mis en évidence par différentes techniques d'observation : microscopie optique, microscopie électronique en transmission (MET) et à balayage (MEB).

1 Dispositif expérimental

1.1 Sources laser

Les lasers utilisés pour nos expériences chirurgicales au laboratoire sont décrits en détail dans la section 4 du chapitre 4. Les différentes sources lasers ainsi disponibles sont :

- Un laser fibré émettant à 1600 nm à la cadence de 200 kHz, développé par nos collègues de l'Institut d'Optique [149] dans le cadre du projet Greco[42]. L'énergie de ce laser de 2 µJ est limitée par la technologie des fibres.
- Un amplificateur paramétrique optique (OPA), développé dans le cadre de la thèse de Florent Deloison [2].Constitué de deux cristaux successifs, l'un de BBO et l'autre de BiBO, l'OPA permet d'avoir accès à une large plage spectrale, entre 1200 et 2200 nm, et produit une énergie suffisante, plus de 20 µJ.
- Un générateur paramétrique optique (OPG), dont le développement a commencé au cours de la thèse de Florent Deloison [2]. Constitué d'un cristal de lithium niobate ($LiNbO_3$) dopé au magnésium polarisé périodiquement (PPMLN[43]) pompé par un laser commercial[44] en configuration simple passage, il permet d'accéder à une plage spectrale assez large, entre 1450 et 1700 nm, mais sa faible énergie en sortie ne permet pas de filtrer le spectre.

[42] ANR-TecSan-2006-025 « Greffe de cornée automatisée assistée par laser femtoseconde avec optimisation de la longueur d'onde et correction du front d'onde ».
[43] PPMLN, HCPhotonics
[44] Laser s pulse HP, Amplitude Système

- Un OPA commercial[45] disponible au sein du LOA, permettant d'avoir accès à une large gamme spectrale 1000 – 2000 nm avec une énergie suffisante.
- Un OPA utilisant deux cristaux de PPMLN successifs, ou un cristal de PPMLN pompé à la fois par un continuum généré dans une lame en silice et le laser commercial cité précédemment, permettant l'accès à une assez large plage spectrale entre 1450 et 1700 nm et à une énergie suffisante pour les découpes sur tissu. Cette source a été développée récemment et les expériences sur tissu sont prévues au cours des prochains mois.

Les quatre dernières sources citées sont disponibles au LOA. Les caractéristiques de ces différentes sources laser sont présentées dans le Tableau 4-4 du chapitre précédent.

1.2 Préparation des échantillons humains

1.2.1 Pour la chirurgie

Les cornées humaines utilisées sont fournies par la Banque Française des Yeux de Paris (Figure 5-1). Comme décrit dans le Chapitre 3, section 1.2, ces tissus sont dits « à usage scientifique » car ils sont déclarés non aptes à la greffe suite à une période d'analyse d'au moins deux semaines. Afin de réaliser les incisions dans des conditions proches de la chirurgie clinique, le greffon cornéen est placé sur une chambre antérieure artificielle (Figure 5-2). Reproduisant la configuration de la chambre antérieure et remplie de sérum physiologique, elle permet d'obtenir une pression sous la cornée mimant l'effet de la pression intraoculaire. Les mesures pachymétriques des cornées sont également réalisées sur ce dispositif. Pour la chirurgie, afin de se rapprocher de la procédure clinique, du LASIK par exemple, une lamelle de verre, d'épaisseur comprise entre 100 et 160 µm, est placée sur la cornée afin d'en aplanir la surface.

Figure 5-1 Cornée humaine à but scientifique obtenue auprès de la banque française des Yeux.

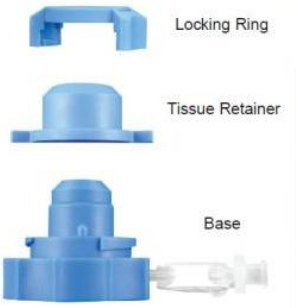


Figure 5-2 Détail des trois éléments de la chambre antérieure artificielle de Baron, stérile et jetable. Après montage du greffon, la chambre est remplie de sérum physiologique *via* des seringues insérées dans les embouts prévus à cet effet à la base du support.

[45]Palitra, Quantronix

Pour les découpes dans la sclère, le greffon n'est pas placé sur la chambre artificielle dont l'« ouverture » utile est limitée à 8 mm de diamètre – seule la cornée et parfois une partie de la jonction cornéo-sclérale sont accessibles. Pour ces expérimentations, après découpe de 3 incisions au scalpel, espacées de 120° les unes des autres, la cornée est montée à plat dans du sérum physiologique, entre lame et lamelle, puis placée sur le porte-échantillon adapté au microscope (voir section 1.4).

1.2.2 Pour les observations microscopiques

- **Histologie et microscopie à transmission électronique (MET).**

Une fois la procédure laser réalisée, les tissus traités sont fixés dans une solution de glutaraldéhyde à 2,5 % dans un tampon de cacodylate (0,1 M, pH 7,4), entre 4 et 12 heures, puis pris en charge par Michèle Savoldelli, de l'hôpital Hôtel Dieu de Paris, responsable des analyses histologiques et par MET.

Les tissus sont ensuite incubés dans une solution d'osmium tetroxyde à 1% dans un tampon de cacodylate (0,2 M, pH 7,4).Puis, ils sont progressivement déshydratés dans des solutions alcooliques à concentration croissante en éthanol (50%, 70%, 95% et 100%) et dans un oxyde de propylène. Chaque zone d'intérêt est séparément incluse dans une résine époxy et orientée afin de pouvoir être identifiée.

Les coupes semi fines (1 µm d'épaisseur) sont obtenues avec un ultra-microtome[46], colorées au bleu de toluidine et observées au microscope optique. Le bleu de toluidine est un colorant basique générant des colorations métachromatiques, c'est-à-dire colorant les composants acides en différentes teintes en fonction de leur basophilie.

Les coupes ultra fines (~ 80 nm d'épaisseur), réalisées sur le même microtome, sont contrastées par de l'acétate d'uranyl et du citrate de plomb (essentiel à la coloration du collagène) puis observées à l'aide d'un microscope à transmission électronique[47] associé à une caméra[48].

- **Microscopie Électronique à Balayage (MEB).**

Afin de compléter nos observations, nous avons également utilisé la plateforme de MEB, située à Jussieu, sur le campus de l'Université Pierre et Marie Curie[49], dans l'unité de biologie intégrative (IFR 83).

Pour pouvoir être observé au MEB, l'échantillon doit subir une préparation particulière. Tout d'abord, le tissu doit être absolument sec, ce qui pose problème pour l'observation de tissus biologiques. Comme pour la TEM, il doit donc être fixé et complètement déshydraté par immersion dans des bains d'alcool successifs de plus en plus concentrés[50]afin de préserver et stabiliser sa structure. Ensuite, s'il n'est pas conducteur, l'échantillon doit être métallisé. Une fine couche d'or de quelques nanomètres d'épaisseur est alors déposée, dans le but d'obtenir une bonne résolution et un bon contraste lors de l'observation du tissu sous le microscope à balayage électronique[51].

---

[46]Ultra-microtome OmU2, Reichert, Autriche

[47]Microscope électronique à transmission CM10, Philips, Pays-Bas

[48]Erlangshen ES1000W.

[49]Virginie Garnier-Thibaud ; Service de Microscopie Electronique, Institut de Biologie Intégrative IFR 83, Université Pierre et Marie Curie.

[50]Dans le cas de tissu cornéen, il est clair que la structure est modifiée et altérée, malgré le soin apportée à la préparation. Le tissu se replie sur lui-même, on voit que l'endothélium est complètement plissé, l'observation est donc minutieuse.

[51]StereoScan 260, Cambridge Instruments – Leica.

1.3 Découpes chirurgicales sur les tissus

Il est possible de réaliser deux types de découpes dans la cornée : les incisions « transfixiantes », perpendiculaires à la surface de la cornée, et les incisions « lamellaires », parallèles à la surface de la cornée, comme illustré dans la section 1.4 du chapitre 2.

Le premier type d'incision vise la greffe de cornée transfixiante, qui a pour objectif de remplacer toute l'épaisseur de la cornée pathologique. La plupart des découpes « transfixiantes » n'atteignent pas réellement la partie postérieure du tissu et ne le sont donc pas à proprement parlé. Dans la suite du chapitre, on parlera de ce type de découpes par « abus de langage », afin de les distinguer des découpes lamellaires.

La greffe lamellaire consiste à remplacer uniquement une partie de l'épaisseur cornéenne, en laissant en place un fragment de la cornée du patient.

Comme dit précédemment, l'étude des découpes transfixiantes permet d'évaluer la profondeur de pénétration atteinte par le laser dans le tissu et présente donc un bon indicateur du rapport de Strehl, du degré de transparence ou bien encore du degré d'œdème du tissu.

Selon la littérature, il existe plusieurs façons de définir le seuil de claquage optique, en outre :

- l'énergie de l'impulsion divisée par la surface délimitée par le rayon à $1/e^2$du faisceau gaussien [150],
- l'énergie de l'impulsion divisée par la surface correspondant au premier rayon de la tâche d'Airy dont la valeur est $r_{Airy} = \frac{1{,}22\,\lambda}{2\,ON}$ (avec λ la longueur d'onde et ON l'ouverture numérique du système),
- l'irradiance moyenne contenue dans le disque d'Airy.

C'est la deuxième définition que nous utilisons pour calculer la valeur théorique du seuil de claquage optique du tissu.

Les incisions sont réalisées par les lasers décrits dans la section 1.1, en utilisant différents objectifs (ouverture numérique comprise entre 0,4 et 0,6), avec des énergies de l'ordre de quelques centaines de nJ jusqu'à environ 10 µJ. On considérera que le seuil de claquage optique en volume dans le tissu est obtenu pour une fluence de 2 J/cm^2 [102,127,134,139].

Pour une ouverture numérique de 0,4, à la longueur d'onde 1030 nm, l'aire de la tâche d'Airy vaut $7{,}8\cdot10^{-8}$ cm^2. Le seuil théorique est donc obtenu à une énergie de 155 nJ. A la longueur d'onde 1650 nm pour une même ouverture numérique, l'aire de la tâche d'Airy vaut $2{,}0\cdot10^{-7}$ cm^2 et le seuil théorique est obtenu pour une énergie de 398 nJ.

Le seuil de claquage optique a été mesuré et comparé à la valeur théorique dans les cornées transparentes et œdémateuses. Ainsi, pour une ouverture numérique de 0,5 à la longueur d'onde 820 nm, le seuil expérimental avait été déterminé ensurface pour une énergie de 130 nJ, soit deux fois le seuil théorique (63 nJ) [139]. En volume, le seuil de claquage optique est estimé à une valeur comprise entre 2 et 4 fois le seuil de claquage en surface.

Pour la suite de l'étude, des énergies typiques de quelques centaines de nJ à quelques µJ ont été utilisées pour obtenir le claquage optique en volume dans le tissu.

1.4 Montage expérimental

Le dispositif expérimental utilisé pour réaliser les découpes sur tissu est représenté en Figure 5-3. Il est principalement composé d'un microscope inversé[52] muni de l'objectif choisi. Une fois l'échantillon placé sur une chambre artificielle, elle-même placée sur un système de déplacement par des moteurs pas à pas[53] dans les trois dimensions de l'espace et tous les paramètres de découpes remplis selon les bonnes caractéristiques, la procédure laser peut être lancée.

Ce système est muni d'un spectromètre[54]afin de vérifier le spectre du laser, d'une densité variable afin d'ajuster l'énergie appliquée au tissu, d'un auto-corrélateur si besoin et également de deux puissance-mètres[55].

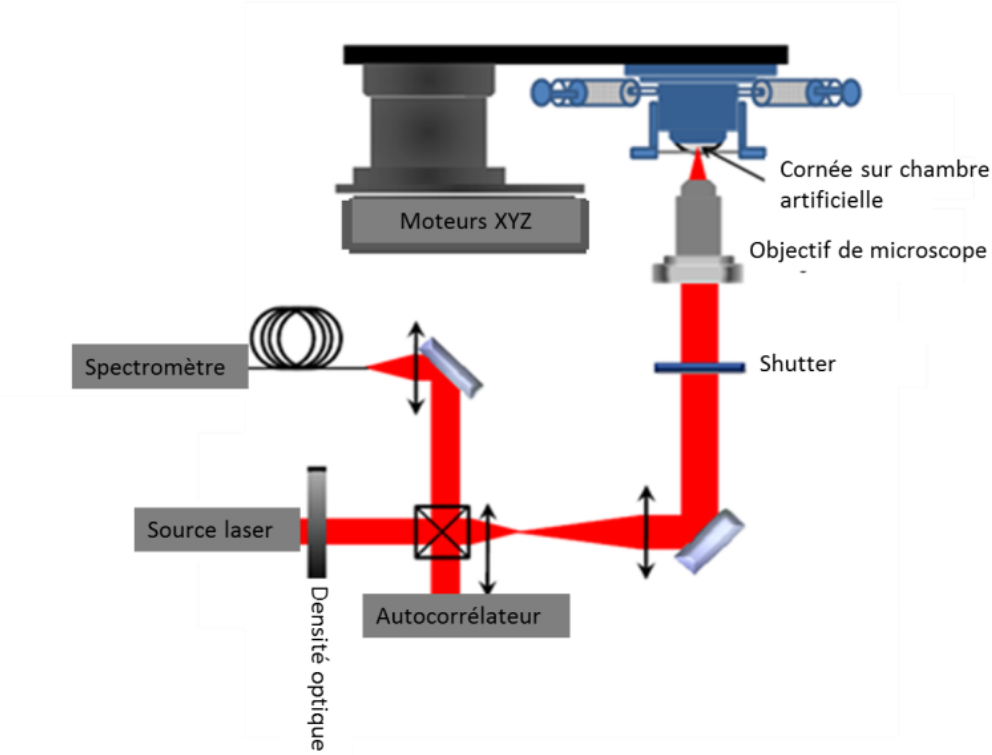


Figure 5-3 Dispositif expérimental utilisé pour réaliser les découpes sur tissu.

En ce qui concerne la focalisation du faisceau laser, plusieurs objectifs de microscope sont disponibles. Leurs caractéristiques sont présentées dans le tableau suivant.

[52]Olympus IX70.
[53]Moteur pas à pas XPS, Newport.
[54]Spectromètre NirQuest 256, OceanOptics.
[55]Une tête Gentec thermique permettant la mesure des plus fortes puissances, en particulier pour le laser de pompe à 1030 nm et un détecteur Thorlabs S302C thermique permettant la mesure de puissance précise autour de la longueur d'onde d'interet 1650 nm.

	Plage de longueur d'onde optimale d'utilisation	Pourcentage de transmission à 1650 nm (avec les optiques du microscope et avant le dernier miroir)	Grandissement	Ouverture numérique	Distance de travail	Obscuration
Objectif Zeiss	400 - 1100 nm	29 %	20 x	0,4	8 mm	-
Objectif Nachet	800 - 1800 nm	20 %[56]	40 x	0,56	10 mm	-
Objectif Cassegrain	700 nm - 11 µm	27 %	15 x	0,28	24 mm	27%[57]

Tableau 5-1 Tableau présentant les 3 objectifs disponibles pour réaliser les découpes laser.

Actuellement, l'atténuation du faisceau laser est effectuée grâce à l'insertion de densité(s) optique(s), mais il est important de noter qu'ainsi, le volume focal peut être modifié. Il serait plus propre d'utiliser une lame à retard λ/2 (achromatique dans la mesure du possible) suivie d'un prisme de Glan, afin d'atténuer le faisceau.

2 Analyses histologiques des découpes cornéennes effectuées par laser femtoseconde

Une fois la procédure laser réalisée sur la cornée, celle-ci est préparée comme énoncé dans la section 1.2.2 afin de l'observer par les différentes méthodes microscopiques choisies.

2.1 Découpes transfixiantes

2.1.1 Histologie

- **Source laser fibrée**

Plusieurs séries de découpes ont été réalisées en utilisant le laser fibré disponible à l'Institut d'Optique. Ce laser émet à une longueur d'onde de 1594 nm, avec une largeur spectrale de 15 nm et à une cadence de l'ordre de 200 kHz. L'énergie maximale disponible est de l'ordre de 2 µJ, la limite étant imposée par le diamètre des fibres non linéaires utilisées dans le système laser.

Une coupe histologique d'une partie de ces résultats est présentée en Figure 5-4.

[56] À noter : la pupille de cet objectif est bien plus petite (2 mm) que celles des deux autres objectifs (6-8 mm).
[57] L'obscuration est due au principe de l'objectif de type Cassegrain (comme certains télescopes). En effet, celui-ci est constitué de deux miroirs sphériques, le premier, plus petit, collectant la lumière et le second permettant la focalisation ; le premier gênant une partie du faisceau lors de ce trajet en sortie.

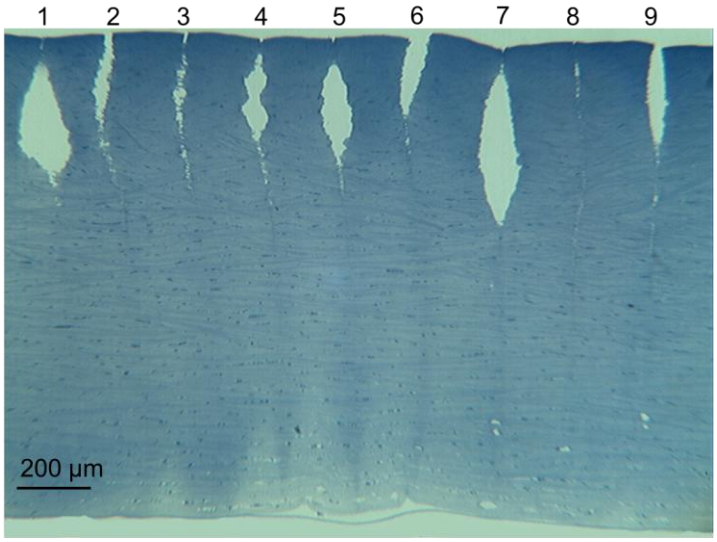


Figure 5-4 Incisions transfixiantes réalisées par le laser fibré émettant à 1594 nm avec une cadence de 200 kHz, en utilisant l'objectif d'ouverture numérique 0,56 et en variant les énergies selon le Tableau 5-2.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Energie (µJ)	1,6	1,37	1,37	1,14	1,14	1	1	0,76	0,76
Profondeur de pénétration (µm)	-	1000	-	990	990	960	920	960	890

Tableau 5-2 Tableau indiquant les énergies utilisées pour réaliser les incisions présentées sur la Figure 5-4, ainsi que les profondeurs de pénétration atteinte.

L'analyse de ces découpes fait apparaître une grande variabilité des résultats. Comme le montre la Figure 5-4, les effets du laser sont visibles jusqu'à une grande profondeur (de l'ordre de 1000 µm pour des énergies de l'ordre de 1 µJ), mais la découpe effective n'est pas aussi profonde. De plus, la coloration du collagène stromal au bleu de toluidine n'apparait pas homogène, ce qui signe une dénaturation du collagène, probablement induit par un effet photochimique. Ces effets indésirables sur le collagène peuvent être expliqués par la cadence relativement élevée de cette source laser (200 kHz), comparée aux autres sources laser utilisées pour les découpes (typiquement 1kHz ou 10 kHz). Des séries de découpes réalisées avec cette source et à cadence plus faible permettraient de confirmer cette hypothèse. Il est également possible qu'une pré-impulsion de durée plus longue (de l'ordre de quelques picosecondes) soit en cause dans ces effets, les outils disponibles pour caractériser la source ne permettant pas de l'observer.

- **Sources laser accordables en longueur d'onde**
    - Sources OPA et OPG développées au laboratoire

La série de découpes présentées sur la coupe histologique Figure 5-5a été réalisées avec les sources laser accordables développées dans le cadre du projet de thèse de Florent Deloison [2], c'est-à-dire le générateur paramétrique optique (OPG) et l'amplificateur paramétrique optique (OPA).

La Figure 5-5 montre que les longueurs d'onde proches de la bande d'absorption de l'eau, entre 1550 et 1450 nm, ne permettent pas d'atteindre des profondeurs suffisantes ; à

1600 et 1700 nm, la profondeur de pénétration est plus élevée mais elle est optimale à la longueur d'onde 1650 nm.

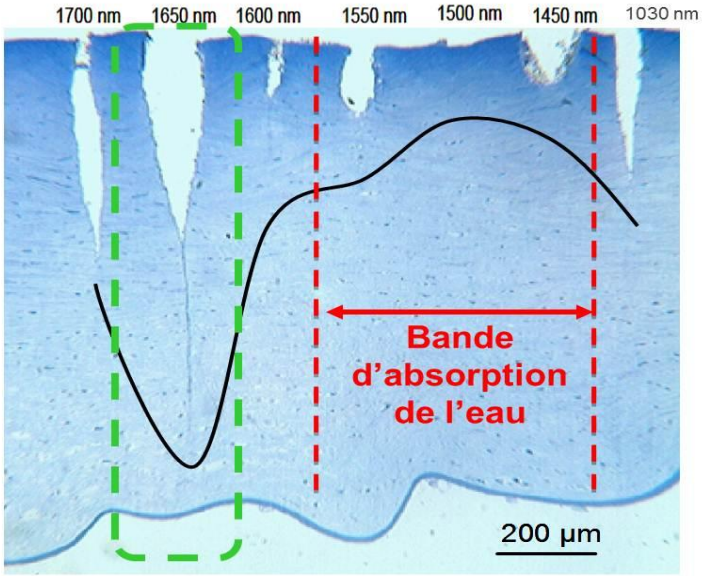


Figure 5-5 Incisions réalisées à différentes longueurs d'onde dans une cornée œdémateuse avec la source OPG, une énergie de 2 µJ et ouverture numérique de 0,56 [2].

Sur la plage de longueur d'onde étudiée (1030 nm et 1400 – 1700 nm), c'est donc à 1650 nm que la découpe la plus profonde est obtenue dans le tissu œdémateux. En effet, alors que l'épaisseur d'une cornée saine est d'environ 500 µm, celle de la cornée étudiée est de 1000 µm.

La comparaison des découpes réalisées avec la longueur d'onde utilisée dans les systèmes commerciaux (~1030 nm) et la longueur d'onde visée, autour de 1650 nm, montre un gain d'un facteur 3 en termes de profondeur de pénétration dans la cornée avec l'OPA (Figure 5-6 a)et un gain d'un facteur au moins 2avec l'OPG (Figure 5-6 b) en utilisant la longueur d'onde optimisée.

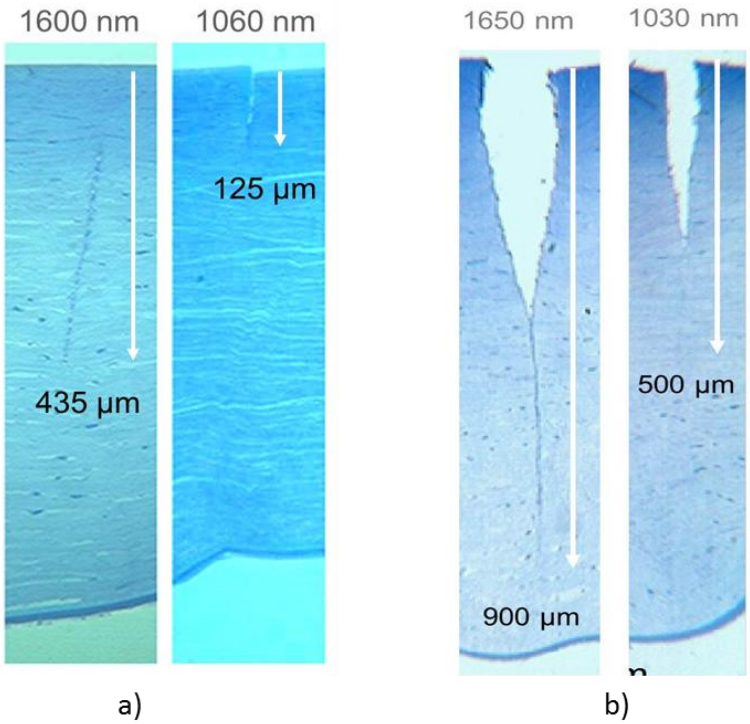


Figure 5-6 Comparaison directe des découpes à 1600 nm et 1000 nm, en utilisant la source OPA avec une énergie de 1 µJ et une ouverture numérique de 0,4 a) et comparaison directe des découpes à 1650 nm et 1030 nm en utilisant la source OPG avec une énergie de 2 µJ et une ouverture numérique de 0,56 b).

La différence observée avec les deux sources accordables, paramétrées pour émettre à la longueur d'onde optimisée, peut s'expliquer par l'allure de leurs spectres. L'OPA dispose d'un spectre fin d'environ 30 nm à 1600 nm tandis que l'OPG présente un spectre d'une largeur environnant les 100 nm à la longueur d'onde 1650 nm. Autrement dit, dans ce deuxième cas, certaines des longueurs d'onde intervenant dans l'interaction avec le tissu sont proches de la bande d'absorption de l'eau et l'aberration chromatique est plus marquée ; ce qui explique le gain plus faible obtenu avec l'OPG qu'avec l'OPA.

- Source OPA commerciale

De nouvelles séries de découpes ont été réalisées sur les cornées en utilisant l'OPA commercial permettant de travailler sur une large gamme spectrale 1100 – 1800 nm. Nous avons privilégié l'utilisation des longueurs d'onde 1600, 1650 et 1700 nm ainsi que 1280 nm. Pour comparaison, plusieurs découpes ont également été réalisées à la longueur d'onde 1030 nm[58].

Une série de découpes réalisées à une longueur d'onde fixée à 1600 nm, a permis de comparer les effets d'énergies comprises entre 500 nJ et 1,5 µJ. Les caractéristiques des incisions obtenues sont présentées dans le Tableau 5-3 et la coupe histologique illustrant les résultats obtenus et présentée en Figure 5-7.

[58] Laser s-pulse HP, Amplitude Systèmes

CHN89 11E56							
Numéro de la découpe	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Energie (µJ)	1,5	0,5	0,5	1	1	1,5	1,5
Profondeur incision (µm)	770	525	375	625	525	675	800
Epaisseur totale de la cornée (µm)	770	775	750	775	800	775	800

Tableau 5-3 Caractéristiques des incisions transfixiantes réalisées dans une cornée œdémateuse, à 1600 nm, en utilisant l'objectif d'ouverture numérique 0,56 et en faisant varier l'énergie des impulsions.

A cette ouverture numérique 0,56 et à la longueur 1600 nm, les découpes transfixiantes sont obtenues en utilisant une énergie de 1,5 µJ (Figure 5-7).

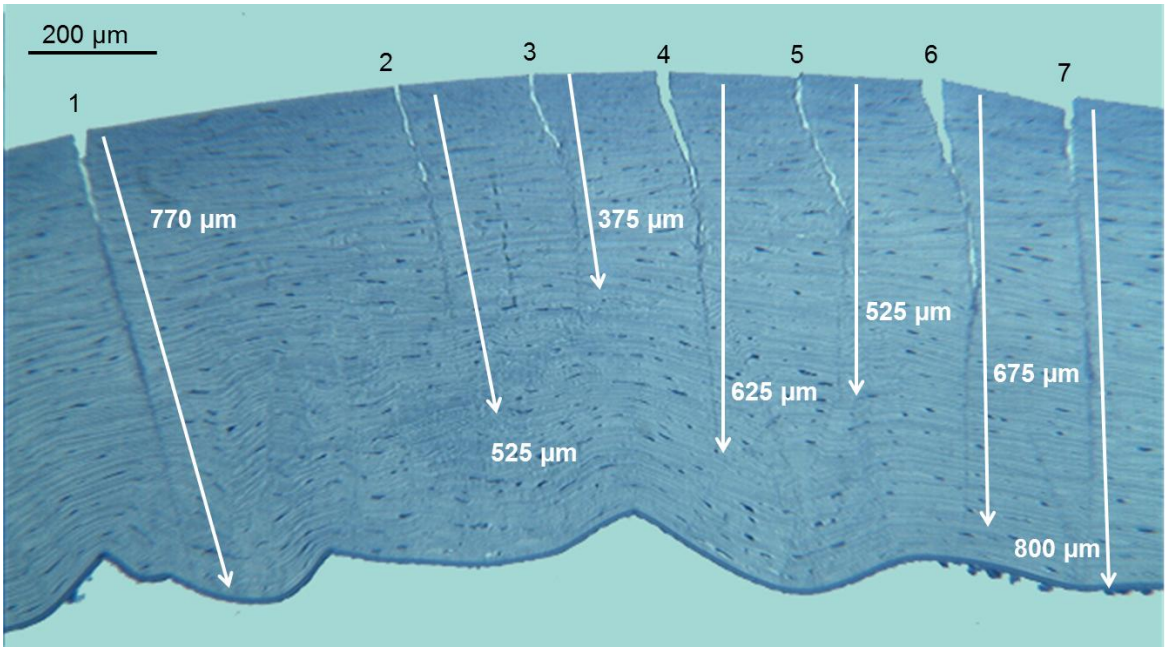


Figure 5-7 Découpes transfixiantes à la longueur d'onde 1600 nm en utilisant l'objectif d'ouverture numérique 0,56 et à différentes énergies (comme indiqué dans le Tableau 5-3) avec un pas de moteur de 3 µm.

Pour chaque série de découpes, autrement dit pour chaque longueur d'onde à une ouverture numérique donnée, nous avons mesuré la profondeur de pénétration atteinte en fonction de l'énergie du laser $E_{incidente}$ focalisée sur l'échantillon, ainsi que l'épaisseur totale de la cornée.

Les différents résultats obtenus sur les incisions transfixiantes dans les cornées nous ont permis de déterminer une profondeur de pénétration L_{prof} à *1/e* (ainsi qu'une énergie E_{seuil} sous laquelle le laser n'induit pas de découpe) par longueur d'onde grâce aux équations suivantes :

$$E_{seuil}(z) = E_{incident} \cdot e^{-\frac{z}{L_{prof}}} \quad \textbf{(5-1)}$$

$$z_{découpe} = L_{prof} (\ln E_{incident} - \ln E_{seuil}) \quad \textbf{(5-2)}$$

Par exemple, pour la série de découpes présentée en Figure 5-7, nous obtenons le graphique suivant :

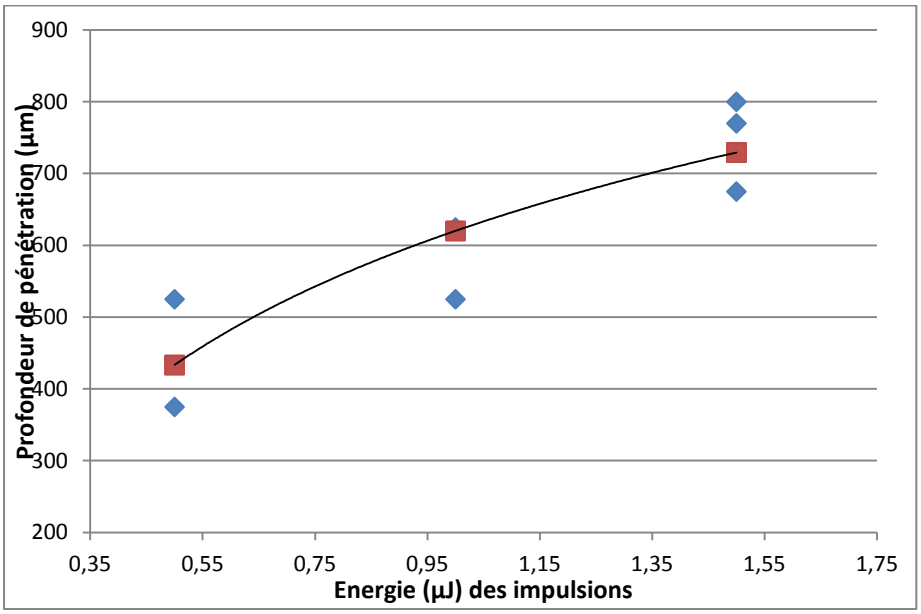


Figure 5-8 Profondeur de pénétration (en µm) obtenue en fonction de l'énergie des impulsions (µJ) pour un objectif d'ouverture numérique 0,56 et une longueur d'onde de 1600 nm (losanges bleus) et ajustement par une fonction logarithme (carrés rouges).

Dans ce cas, l'équation de l'ajustement de la profondeur de pénétration y (en µm) en fonction de l'énergie *E*(en µJ) obtenue est :

$$y\,(E) = 269 \cdot \ln(E) + 620.$$

Les résultats sur les calculs de L_{prof} (et sur son incertitude) pour toutes les séries de découpes réalisées récemment en fonction de la longueur d'onde sont présentés sur le graphique de la Figure 5-9, avec l'utilisation de deux ouvertures numériques différentes (0,4 et 0,56). L'ensemble de ces données correspond à environ 20 cornées traitées, chacune ayant subi environ 5 incisions laser (soit une centaine d'incisions au total).

Expérimentalement, la profondeur de pénétration à 1/*e* en utilisant les longueurs d'onde dans la fenêtre de relative transparence de la cornée est augmentée d'un facteur d'au moins 2 par rapport à celle obtenue en utilisant la longueur d'onde 1030 nm. De plus, aucune différence n'apparait *a priori* sur l'utilisation de l'une ou l'autre des ouvertures numériques (ici 0,4 et 0,56 ont été utilisées). C'est en dessous de 0,4 et au-dessus de 0,75 que des effets peuvent être observés [139].

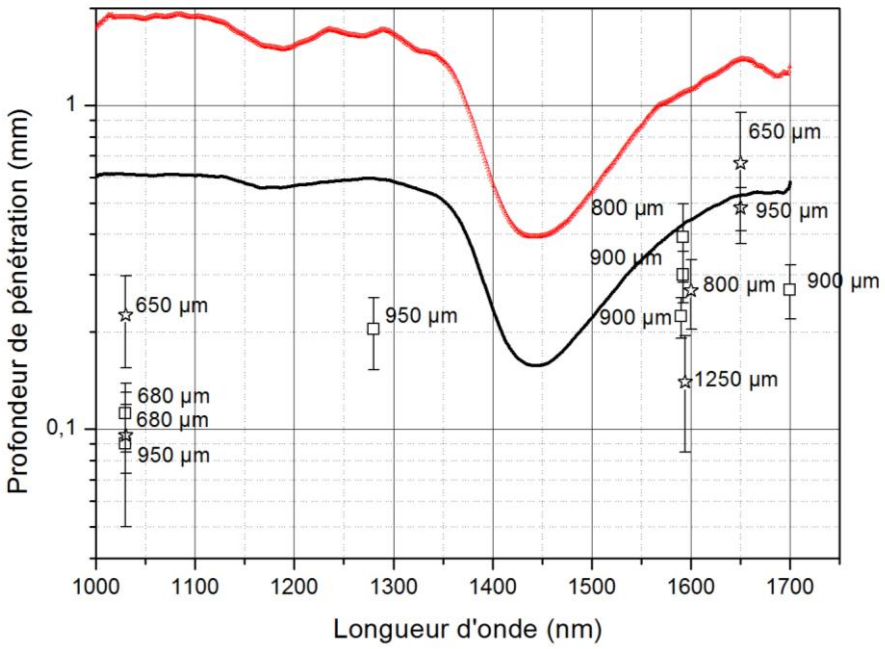


Figure 5-9 Profondeur de pénétration à *1/e* aux différentes longueurs d'onde (et incertitude sur cette profondeur) déterminée par les séries à une ouverture numérique de 0,4 (carrés) et une ouverture numérique de 0,56 (étoiles) et profondeur de pénétration effective typique [89] pour une cornée claire (courbe rouge) et pour une cornée œdémateuse (courbe noire) déterminée au chapitre 3.

La représentation de la profondeur de pénétration en fonction de l'épaisseur cornéenne pour chacune des longueurs d'onde présentées - 1030, 1600 et 1650 nm – (Figure 5-10), permet de constater que la profondeur de pénétration effective à 1/*e* décroit lorsque l'épaisseur du tissu augmente. Ces résultats concordent avec la prévision issue des données présentées au chapitre 3 : plus la cornée est œdémateuse, moins la découpe est profonde.

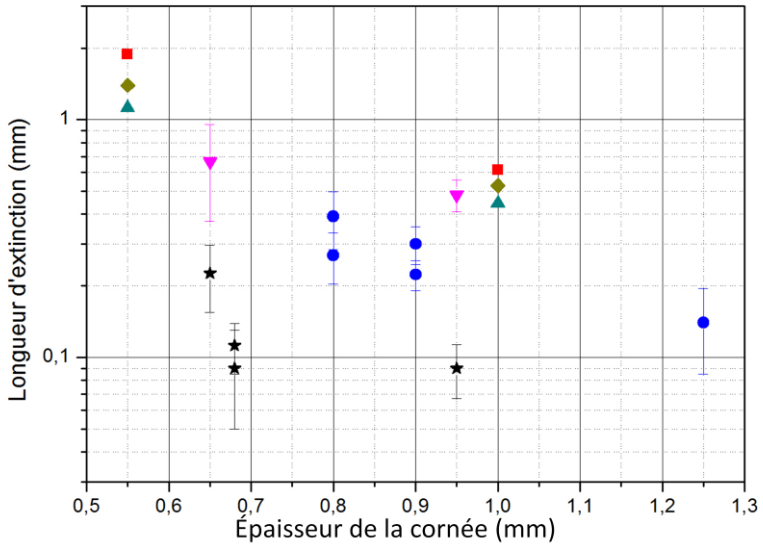


Figure 5-10 Profondeur de pénétration à 1/*e* et incertitude en fonction de l'épaisseur de la cornée, obtenue à 1030 nm (étoiles noires), à 1600 nm (ronds bleus) et à 1650 nm (triangles roses pointés vers le bas) et comparaison avec les profondeurs de pénétration détéreminées au chapitre 3 à 1030 nm, (triangles verts vers le haut), à 1600 nm (losanges kakis) et à 1650 nm (carrés rouges).

2.1.2 Microscopie électronique à transmission (MET)

Les incisions transfixiantes ont été observées au MET afin de pouvoir en évaluer la qualité. La Figure 5-11illustre la comparaison d'une incision réalisée à 1030 nm (à gauche) à celle réalisée à 1650 nm (à droite). Chacune d'entre elles a été observée tout le long de la découpe, comme illustrée Figure 5-12 pour l'incision réalisée à 1650 nm.

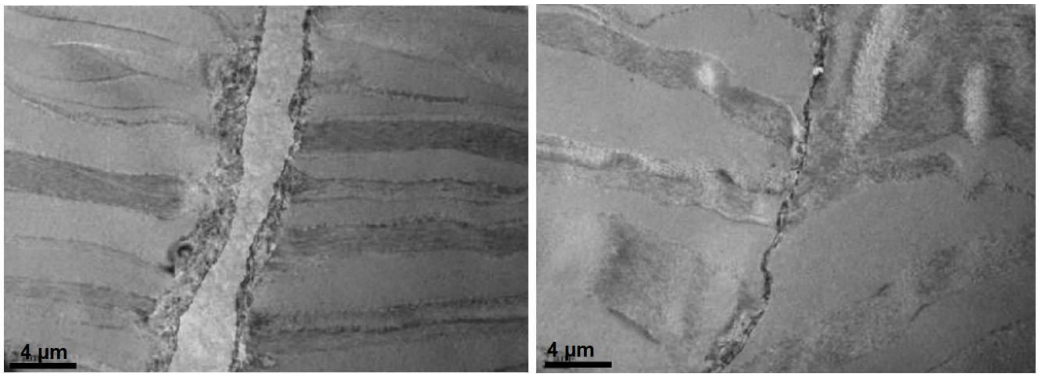


Figure 5-11 Coupes ultrafines présentant une incision laser à 1030 nm en utilisant le laser de pompe(a) et à 1650 nm en utilisant la source OPG (b), sur une même cornée à l'aide d'un objectif d'ouverture numérique de 0,56 et une énergie de l'ordre de 2 µJ.

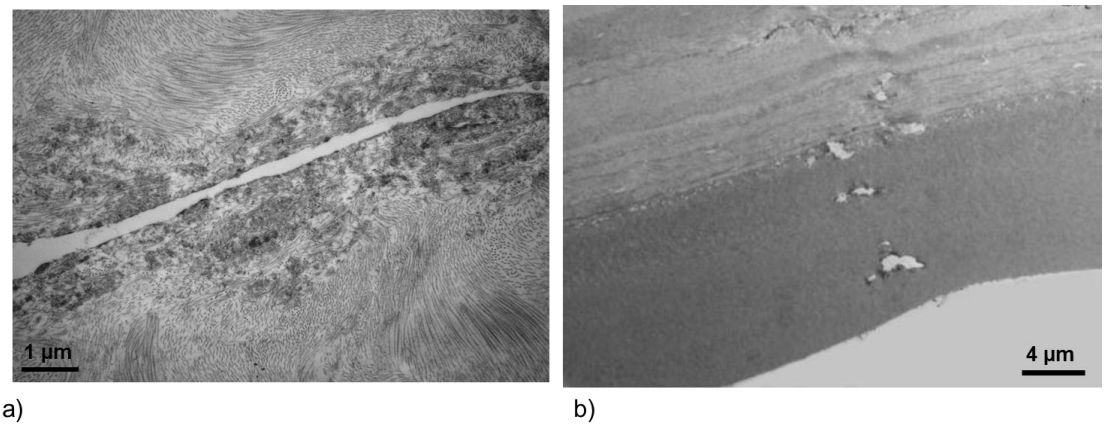


Figure 5-12 Coupes ultrafines présentant une incision réalisée à la longueur d'onde 1600 nm en utilisant la source OPG avec une énergie de 2 µJ et un objectif d'ouverture numérique 0,56 dans le stroma postérieur (a) et dans la membrane de Descemet (b) d'une cornée épaisse de 850 µm.

Ces coupes ultrafines permettent de conclure qu'aucun effet sur le collagène n'est visible le long des incisions, quelle que soit la longueur d'onde utilisée (1030 nm ou autour de 1650 nm). L'utilisation d'une longueur d'onde plus élevée n'endommage donc pas le tissu cornéen.

2.1.3 Microscopie électronique à balayage (MEB)

La Figure 5-13 présente une section de cornée observée au MEB. Mise en évidence par les plis de l'endothélium et la forme de la cornée, l'altération du tissu par les différents traitements imposés lors de sa préparation est clairement visible.

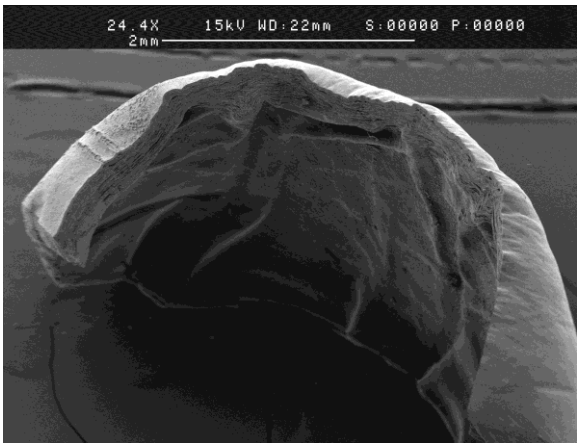


Figure 5-13 Image de MEB montrant une section de cornée

Deux incisions transfixiantes réalisées à 1580 nm, avec des énergies différentes, ont été observées au microscope à balayage (Figure 5-14).

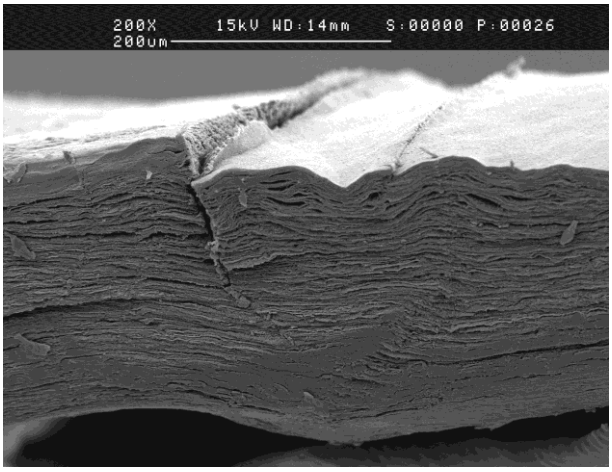


Figure 5-14 Deux incisions transfixiantes réalisées à la longueur d'onde 1580 nm à l'aide d'un objectif d'ouverture numérique 0,4 avec une énergie de 3,5 µJ (à gauche) et une énergie de 2,6 µJ (à droite) dans une cornée œdémateuse, observées au MEB (grossissement : 200 x)

L'incision réalisée à forte énergie, *i.e.* 3,5 µJ (Figure 5-14 gauche), est facilement observable puisque le tissu a bougé. Par contre, il n'est pas facile de distinguer la deuxième découpe, réalisée à 2,6 µJ (Figure 5-14 droite), d'autant plus que le tissu a été altéré.

Les observations au MEB n'apportent donc pas plus d'informations que les analyses histologiques et par MET en termes de profondeur de pénétration. Cependant, l'observation directe des parois de l'incision – impliquant la découpe complète d'un morceau de cornée – devrait fournir une information supplémentaire en termes de qualité de surface.

Ces expérimentations complémentaires permettraient d'évaluer l'apport qualitatif de l'application d'une longueur d'onde plus élevée. Elles n'ont pas été faites pour les incisions transfixiantes, mais une étude exploratoire a été réalisée sur les découpes lamellaires dans le tissu cornéen (voir section 2.2.2).

Finalement, les profondeurs de pénétration des découpes transfixiantes mesurées dans les cornées œdémateuses confirment l'intérêt du choix d'utiliser un laser émettant à la longueur d'onde 1650 nm.

2.2 Découpes lamellaires

Pour les incisions lamellaires, le greffon cornéen est préparé comme décrit section 1.2.1, sur une chambre artificielle et aplani par un dispositif contenant une lamelle de verre. Afin de créer un volet, la procédure consiste à réaliser une découpe lamellaire à une certaine profondeur puis à réaliser 3 incisions perpendiculaires à la surface de la cornée jusqu'à la bonne profondeur (autrement dit, la profondeur de la découpe lamellaire), en laissant une charnière sur l'un des côtés.

Une première série de découpes a été réalisée sous l'objectif Zeiss x20 d'ouverture numérique 0,4 en utilisant le laser[59] commercial disponible dans notre salle d'expérience, réglé à 1030 nm (4 nm FWHM), avec une cadence de 10 kHz et des énergies de 2, 4 et 9 µJ. Pour la découpe, le pas de moteur a été paramétré à1 ou 2 µm.

Une deuxième série de découpe a été faite, sous le même objectif de microscope, à l'aide du faisceau de sortie de l'OPA commercial à une cadence de 1 kHz, et réglé à la longueur d'onde modifiée : soit à 1600 nm avec 1 µJ, soit à 1650 nm avec 2 µJ. Pour cette série, le pas de moteur a été fixé à 2 µm.

Les conditions expérimentales de ces deux séries de découpes sont récapitulées dans le Tableau 5-4.

	longueur d'onde	FWHM	Cadence	Durée d'impulsion	Énergie	Pas	Objectif	Décollement du volet	Ponts?
Laser s-pulse HP	1030 nm	4 nm	10 kHz	600 fs	2 µJ	2 µm	Zeiss x20	oui, grâce à la bulle	oui, quelques-uns
					4 µJ	2 µm		oui	oui, quelques-uns
					4 µJ	1 µm		oui	Oui
					4 µJ	2 µm		non	oui, quelques-uns
					8 µJ	1 µm		oui	Non
					8 µJ	2 µm		oui, en aidant énormément	oui, beaucoup
Laser Ti:Sa + OPA commercial	1650 nm	45 nm	1 kHz	50 fs	2 µJ	2 µm		oui	oui, quelques-uns
								oui	oui, quelques-uns
								oui	Non
								oui	Non
	1600 nm	34 nm			1 µJ			oui	Non

Tableau 5-4 Tableau récapitulatif des conditions de découpes des incisions lamellaires par laser femtoseconde.

[59]Laser s-pulse HP, Amplitude Systèmes.

A l'issue de ces deux séries, les volets à 1600 et 1650 nm se sont décollés plus aisément que les volets à 1030 nm, pourtant réalisés avec un même pas de 2 µm et une énergie au moins égale. Nous avons ainsi techniquement constaté la présence de ponts tissulaires résiduels à 1030 nm (que ce soit pour la découpe lamellaire ou pour les découpes transfixiantes), imposant alors l'utilisation d'un couteau pour soulever le volet ou bien la réduction du pas de déplacement moteur pour les découpes suivantes.

2.2.1 Histologie et MET

Une partie des volets réalisés au laser femtoseconde a été inclue afin d'être étudiée en histologie et en microscopie électronique à transmission.

La Figure 5-15 montre deux coupes histologiques d'une même cornée présentant une découpe lamellaire dans le stroma antérieur, réalisées à la longueur d'onde 1650 nm.

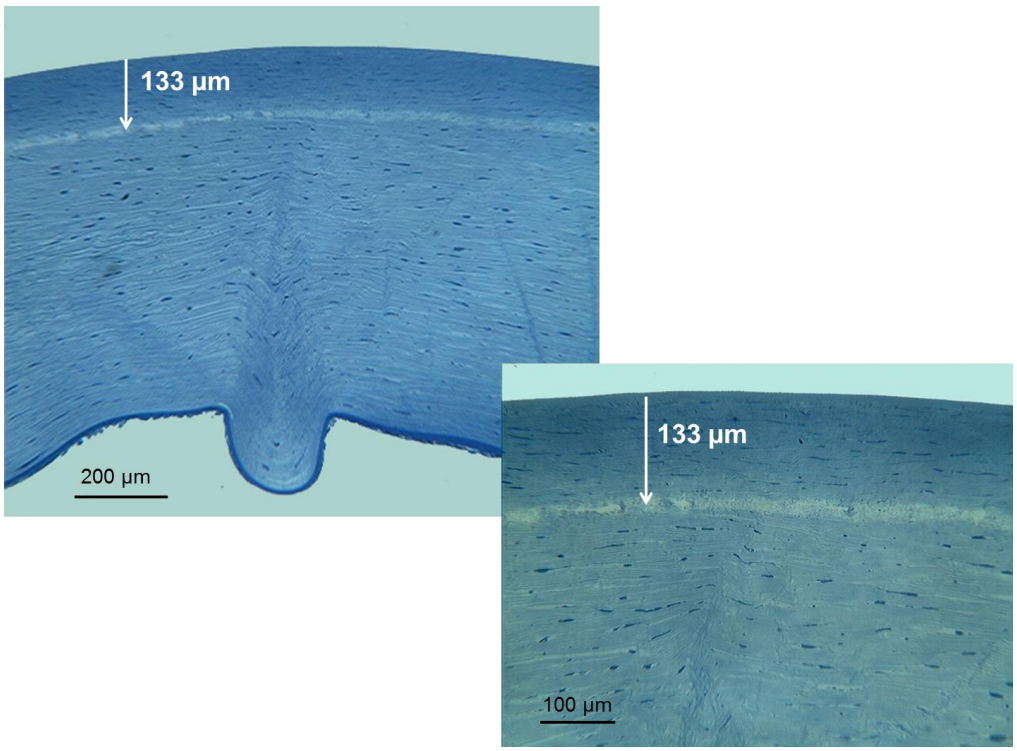


Figure 5-15 Incision lamellaire à environ 133 µm de profondeur (+/- 15 µm) pour une épaisseur totale de la cornée de 891 µm (+/- 40 µm), à la longueur d'onde 1600 nm avec une énergie de 1,3 µJ à l'aide de l'objectif d'ouverture numérique 0,56.

La même incision lamellaire a été observée au MET (Figure 5-16). Sur cette image, la découpe apparaît régulière et aucun effet sur le collagène n'est observé.

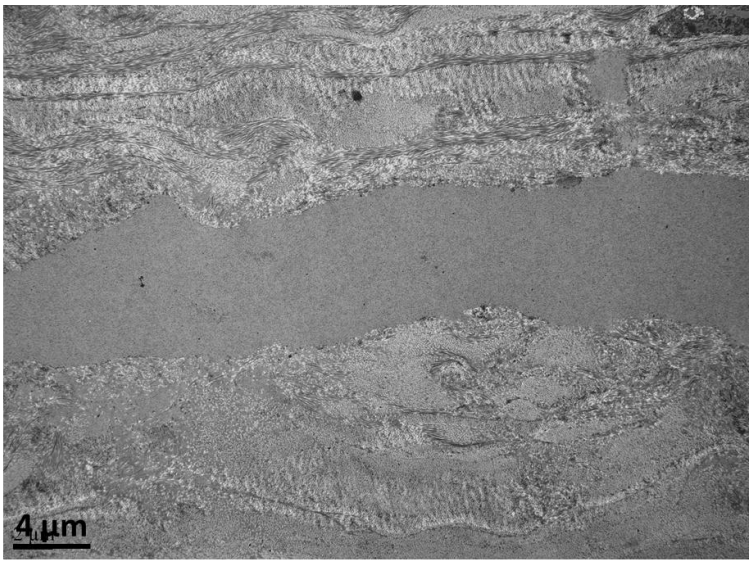


Figure 5-16 Image de TEM obtenue pour la découpe lamellaire dans le stroma cornéen présentée sur la Figure 5-15.

Ces observations histologiques et de MET mettent en évidence la régularité de l'épaisseur de la découpe lamellaire ainsi que l'absence de ponts tissulaires lorsque les incisions sont réalisées à 1650 nm, avec un pas de 2 µm.

Cependant, les incisions lamellaires sont surtout utiles à l'analyse de la qualité des surfaces induites par les découpes réalisées aux longueurs d'onde étudiées. C'est pourquoi elles ont principalement été observées au MEB.

2.2.2 Microscope électronique à balayage (MEB)

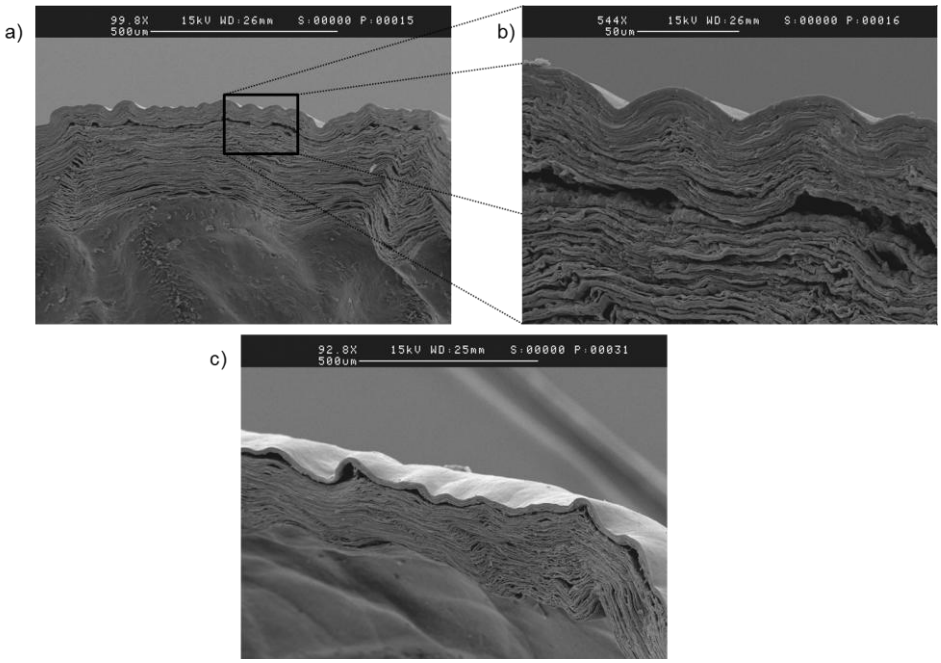


Figure 5-17 Observation des premières découpes lamellaires (volets non ouverts) réalisées à l'aide d'un objectif d'ouverture numérique 0,4,avec une énergie de 2 µJ, à 1650 nm (a) et (b) et à 1600 nm (c).

La cornée ayant été aplatie pour la procédure de découpe par laser, lorsque la qualité de découpe est suffisamment bonne, il est possible de la retrouver en observant la section des cornées (Figure 5-17).Ces images de sections cornéennes transverses générées au MEB rendent possible l'observation de l'organisation des lamelles de collagène stromales, tel un empilement de pages d'un livre.

L'une des découpes lamellaires réalisées à la longueur d'onde optimisée – 1650 nm – se situe à une profondeur d'environ 200 µm (Figure 5-17 a), et l'image générée par MEB met évidence la qualité de l'incision du collagène tout le long de la découpe (Figure 5-17 b). Une autre découpe lamellaire est représentée (Figure 5-17 c). Située à une profondeur d'environ 100 µm, le collagène apparait encore une fois bien incisé.

Sur la série de découpes lamellaires suivante, les volets cornéens ont été ouverts afin d'observer la qualité d'interface de découpe en profondeur dans le tissu ainsi que les bords des volets, à 1650 nm (Figure 5-18 et Figure 5-19) et à 1030 nm (Figure 5-20).

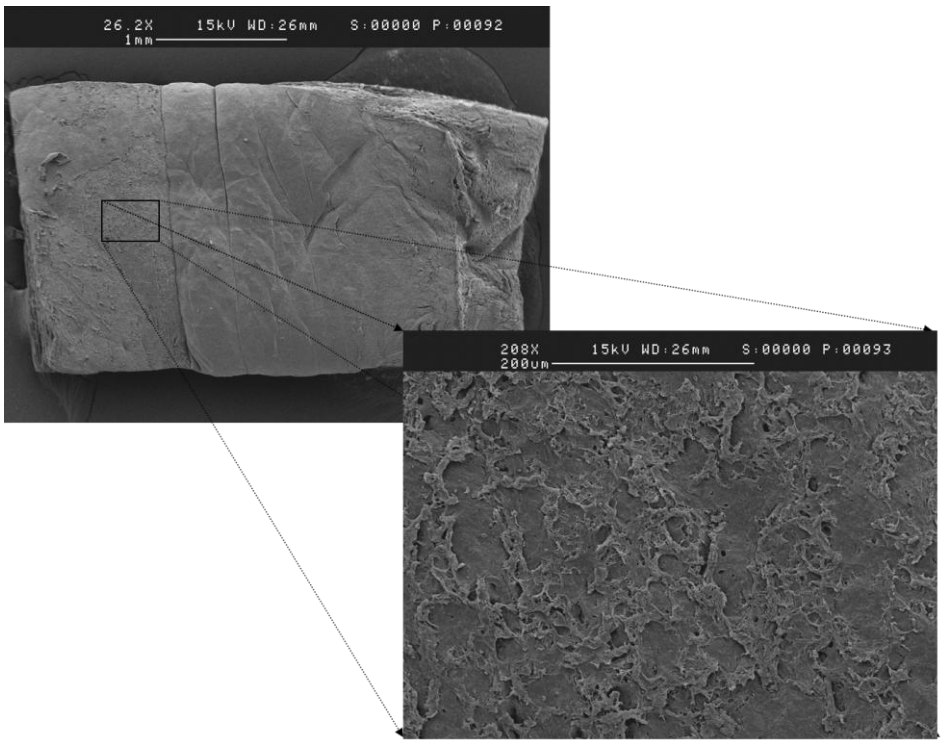


Figure 5-18 Découpe lamellaire réalisée sous l'objectif d'ouverture numérique 0,4, à 1650 nm avec une énergie de 2,1 µJ et un pas de déplacement moteur de 2 µm.

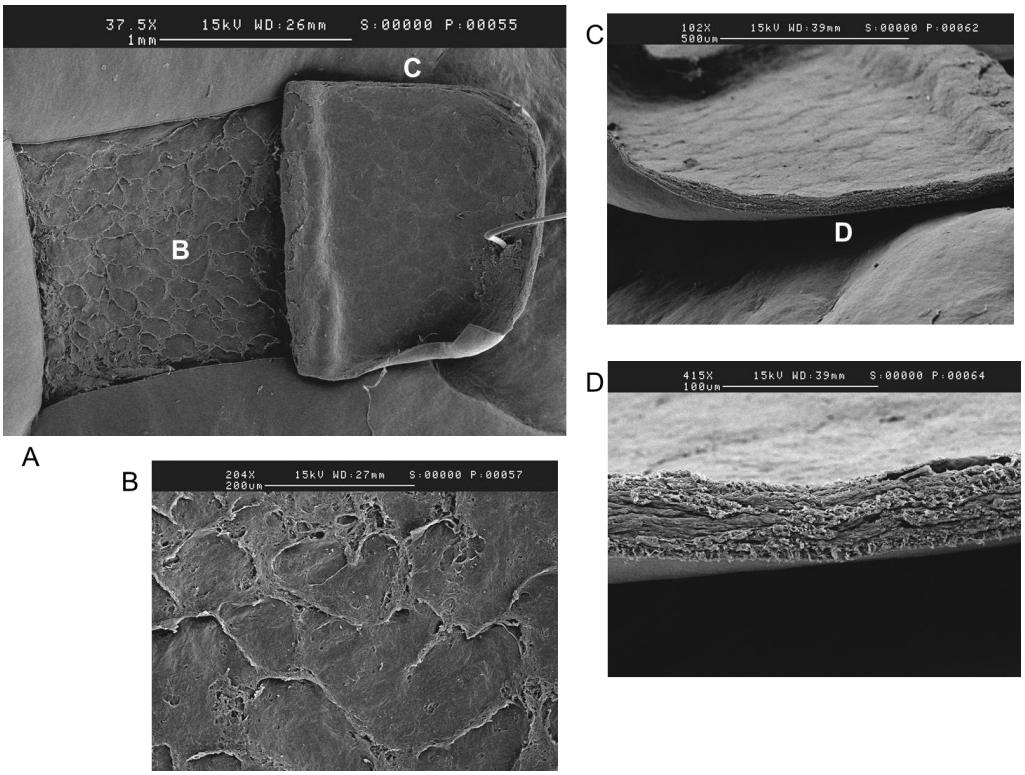


Figure 5-19 Découpes lamellaires réalisée sous l'objectif d'ouverture numérique 0,4, à 1650 nm avec une énergie de 2,2 µJ et un pas de déplacement moteur de 2 µm, A : vue d'ensemble de la découpe lamellaire et son volet, B : zoom sur le centre de l'interface dans le tissu, C : bord du volet et D : zoom sur le bord du volet.

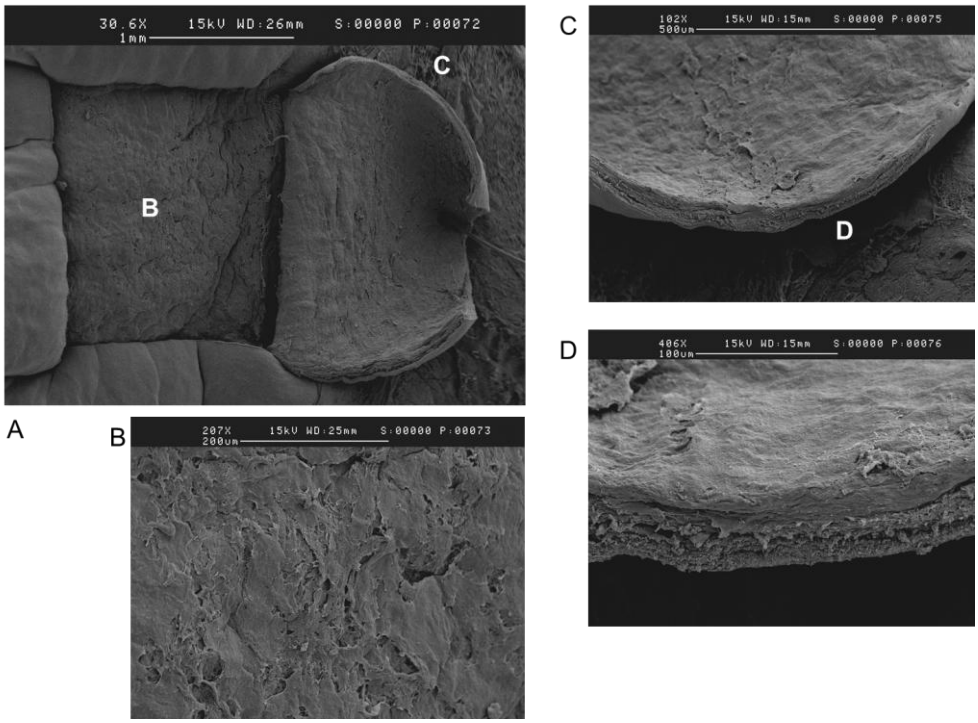


Figure 5-20 Volet cornéen réalisé sous l'objectif d'ouverture numérique 0,4, à la longueur d'onde 1030 nm, avec une énergie de 4 µJ et un pas de découpe de 1 µm. A : vue d'ensemble de la découpe lamellaire et son volet, B : zoom sur le centre de l'interface dans le tissu, C : bord du volet et D : zoom sur le bord du volet.

Les incisions lamellaires réalisées à la longueur d'onde 1650 nm (Figure 5-18 et Figure 5-19) révèlent l'interface entre les lamelles de collagène, soit que la découpe laser n'a pas été parfaitement faite le long de l'interface de deux lamelles de collagène (Figure 5-19 B), ainsi que des bords lisses et réguliers (Figure 5-19 C et D). Ce volet avait été soulevé sans difficulté.

Les images de la découpe réalisée à 1030 nm (Figure 5-20) montrent peu de différence morphologique au niveau de la surface (Figure 5-20 B). Cependant, les bords de la découpe (Figure 5-20 C et D) apparaissent moins propres et moins lisses qu'à1650 nm. Comme le pas de déplacement a été réduit dans ce cas, le volet a également été facilement soulevé.

Finalement, les qualités d'interface de la découpe en profondeur dans le tissu entre la longueur d'onde usuelle de 1030 nm et la longueur d'onde 1650 nm ne présentent pas de différence importante. Ceci peut s'expliquer par le faite que la profondeur des découpes n'est pas suffisante pour que l'effet à 1650 nm sur la qualité de la découpe soit prononcé. En effet, pour cette étude exploratoire, nous avons créé des volets cornéens d'épaisseur de l'ordre de 300 µm (ou moins) afin d'assurer la possibilité de les soulever. Des études complémentaires restent nécessaires afin de pouvoir comparer les qualités de découpe à plus grande profondeur.

Bien que les volets cornéens ont pu être soulevés dans la plupart des cas, la Figure 5-19 montre les détails d'une découpe lamellaire réalisée à 1650 nm avec une énergie de 2,2 µJ et un pas de découpe de 2 µm alors que la Figure 5-20 montre les détails d'une découpe lamellaire réalisée à 1030 nm avec deux fois plus d'énergie (4 µJ) et un pas de découpe de seulement 1 µm. Il a donc été nécessaire de d'augmenter l'énergie et de réduire le pas de découpe à 1030 nm pour pouvoir soulever le volet sans qu'il soit nécessaire d'utiliser un couteau (signe de la présence de ponts tissulaires).

Or, l'énergie nécessaire pour atteindre le seuil de claquage optique à 1030 nm est plus basse qu'à 1650 nm, ce qui signifie que la découpe à 1030 nm aurait, théoriquement, dû nécessiter moins d'énergie qu'à 1650 nm, contrairement à ce qui a été observé expérimentalement. Par ailleurs, le pas de découpe est relié à la taille de la tâche focale. L'aire de la tache focale vaut environ 8 μm^2 à 1030 nm alors qu'elle est d'environ 20 μm^2 à 1650 nm. Comme vérifié expérimentalement, cela signifie qu'à 1030 nm, le pas de découpe doit être choisi plus petit par rapport à 1650 nm, soit que la durée de la procédure est prolongée dans ce cas.

3 Analyses histologiques des découpes de sclère réalisées par laser femtoseconde

Il est important de rappeler que dans le cas de l'opération chirurgicale du glaucome, la zone d'intérêt est située autour du canal de Schlemm, autrement dit la profondeur à atteindre est de l'ordre de 700 µm. Celle-ci doit être accessible par le faisceau laser en vue du remplacement de la chirurgie manuelle et donc, par exemple, de l'ouverture de la paroi de l'œil ou de la pose d'un implant. C'est pourquoi, une attention particulière a été prêtée à la profondeur de pénétration atteinte par la découpe dans le tissu, à la qualité des découpes réalisées et aux différents paramètres pouvant intervenir dans le résultat.

Dans le tissu scléral, nous avons uniquement réalisé des découpes « transfixiantes», autrement dit perpendiculaires à la surface du tissu.

3.1 Découpes aux longueurs d'onde 820 nm et 1030 nm

Après préparation du greffon comme décrit dans la section 1.1, entre lame et lamelle, les premières découpes dans la sclère ont été réalisées à la longueur d'onde 820 nm (laser Ti:Sa de laboratoire).

Les analyses histologiques (Figure 5-21 c) et d)) ont clairement montré que, même à forte énergie (8 à 9 µJ), la découpe ne peut pas aller à plus de 300 µm de profondeur dans la sclère. C'est principalement la conjonctive, adhérente à la partie supérieure de la sclère, qui est altérée, allant jusqu'à provoquer la formation d'un « cratère » sous l'effet du laser (Figure 5-21 d)).

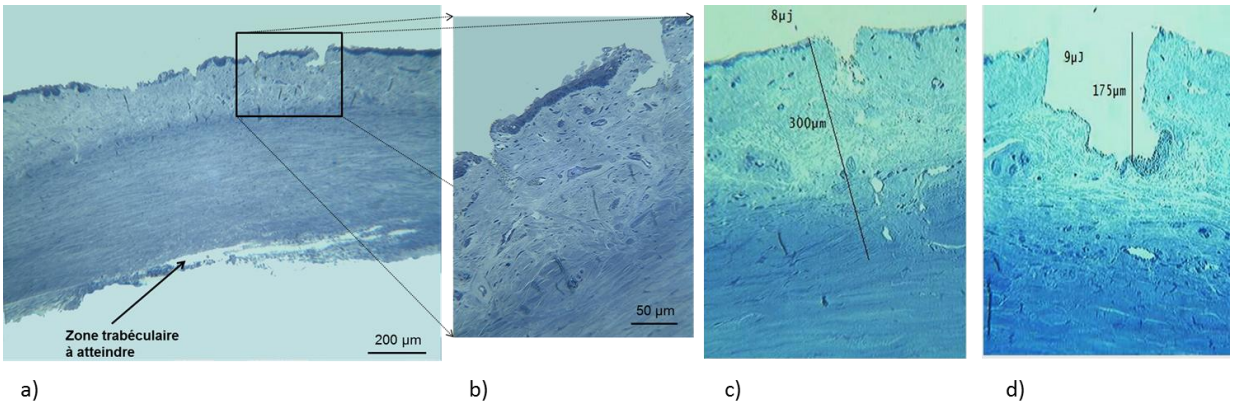


Figure 5-21 a) et b) : Coupe histologique présentant des incisions par laser à la longueur d'onde 820 nm en surface, réalisée avec un objectif d'ouverture numérique 0,4 et une énergie de l'ordre de 4 µJ et le réseau trabéculaire dans le tissu postérieur.
c) et d) Incisions transfixiantes réalisées dans la sclère, à la longueur d'onde 820 nm, pour une énergie de 8 à 9 µJ et un objectif d'ouverture numérique 0,4.

Au vu de ces premiers résultats, la conjonctive est rapidement apparue comme une gêne pour la pénétration du faisceau dans le tissu. Ce tissu est effectivement lâche et de structure très variable d'un endroit à un autre, limitant la propagation du faisceau laser dans la sclère.

Les mêmes découpes, dans les mêmes conditions, ont été renouvelées sur un tissu dépourvu de conjonctive (Figure 5-22). Cependant, la profondeur de pénétration mesurée dans le stroma scléral s'est encore une fois avérée très faible.

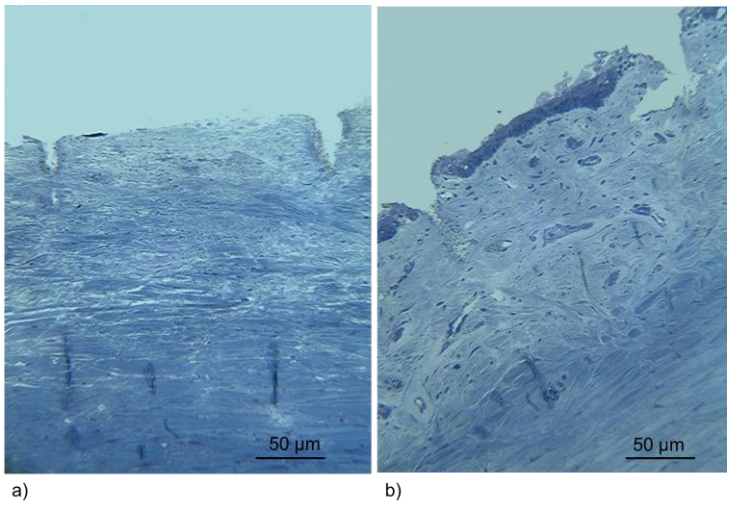


Figure 5-22 Incisions réalisées dans la sclère à l'aide de l'objectif d'ouverture numérique 0,4 sans conjonctive (seulement un résidu) a) et avec conjonctive b) et une énergie de 8 et 9 µJ de gauche à droite.

Les résultats de découpes dans la sclère, que la conjonctive ait été retirée ou non, montre que ce tissu de protection n'est pas le seul facteur limitant lorsque les longueurs d'onde usuelles sont appliquées.

3.2 Découpes aux longueurs d'onde autour de 1650 nm

Les séries de découpes suivantes ont été réalisées à des longueurs d'onde plus élevées, centrées autour de 1650 nm en utilisant la source laser OPA commercial. Les séries de découpes ont été observées au niveau du limbe, c'est-à-dire à la zone de jonction entre la cornée et la sclère (Figure 5-23), et dans la sclère (Figure 5-24). Les caractéristiques des incisions sont respectivement indiqués dans les Tableau 5-5 et Tableau 5-6.

Comparées aux incisions réalisées à 820 nm et à énergie comparable (Figure 5-23), la profondeur de pénétration est plus importante et l'aspect de « cratère » n'est pas aussi apparent lorsque la longueur d'onde de 1620 nm est utilisée.

Dans la sclère, bien que les énergies ne soient pas exactement comparables du fait de l'utilisation de filtres sélectifs de longueurs d'onde, on peut constater que la profondeur de pénétration est plus importante à 1650 nm qu'à 1600 ou 1700 nm (Figure 5-24).

Comparée aux incisions cornéennes réalisées à 1600 nm avec des impulsions de 1,5 µJ (Figure 5-24), les incisons sclérales sont plus petites: ~ 300 µm dans la sclère, contre ~750 µm dans la cornée. Ce résultat peut s'expliquer par la différence structurale du stroma de ces deux tissus, mais aussi par la présence de conjonctive.

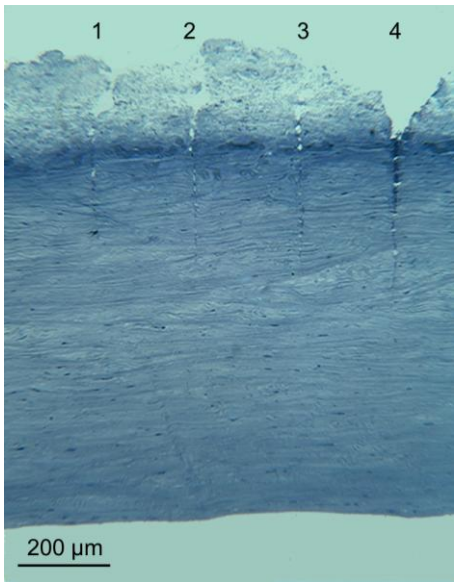


Figure 5-23 Incisions transfixiantes réalisées au niveau du limbe, sous l'objectif d'ouverture numérique 0,4 à des longueurs d'onde autour de 1650 nm. Leurs caractéristiques sont présentées dans le Tableau 5-5.

	1	**2**	**3**	**4**
Longueur d'onde (nm)	1700	1600	1650	1620
Largeur spectrale (nm)	45	34	45	180
Profondeur de pénétration (µm)	360	400	400	425
Énergie (µJ)	1	1,7	2,5	9,4

Tableau 5-5 Tableau des caractéristiques des 4 découpes présentées sur la coupe histologique de la 5-22.

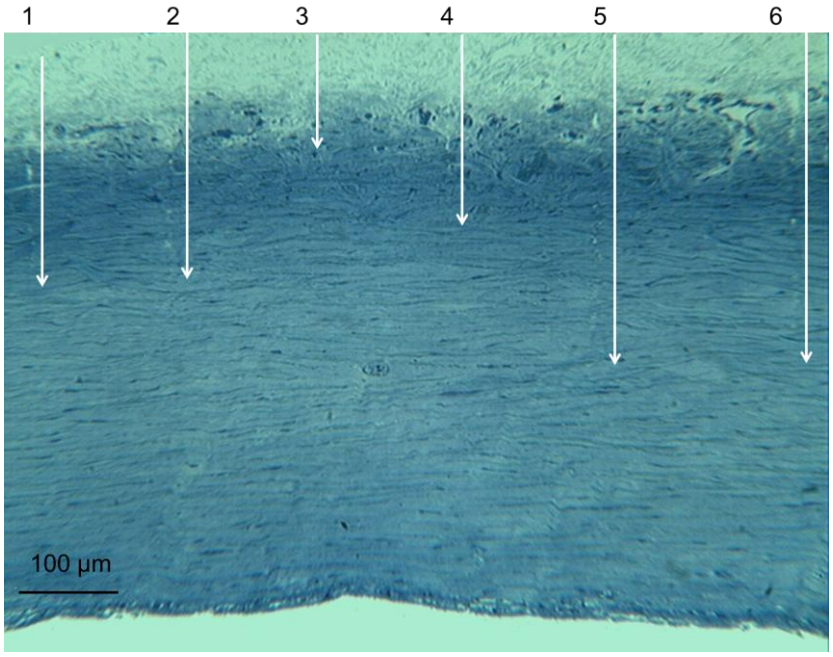


Figure 5-24 Incisions réalisées dans la sclère, sous l'objectif d'ouverture numérique 0,4, à des longueurs d'onde autour de 1650 nm. Leurs caractéristiques sont indiquées dans le Tableau 5-6.

	1	2	3	4	5	6
Longueur d'onde (nm)	1600	1650	1700	1600	1650	1650
Largeur spectrale (nm)	34	34	45	45	45	45
Profondeur de pénétration (µm)	280	300	120	210	400	400
Énergie (µJ)	1,5	2,5	1	1,5	2,5	2,5

Tableau 5-6 Tableau récapitulant les paramètres des incisions réalisées sur la Figure 5-23.

Les différentes coupes histologiques de sclère montrent que la conjonctive est parfois dense, parfois lâche, ce qui suppose que selon sa structure, son influence sur la propagation du faisceau diffère fortement.

Cependant, des incisions ont été faites à environ 1600 nm, au niveau du limbe, c'est à dire dans un tissu plutôt encore organisé – proche de la cornée, dans des zones plus ou moins dense en conjonctive (Figure 5-25). Leur observation montre que l'incision à l'énergie la plus forte (2,2 µJ) est transfixiante quelle que soit la quantité de conjonctive. Le tissu de protection n'apparait donc pas gênant lorsque l'énergie appliquée est suffisante.

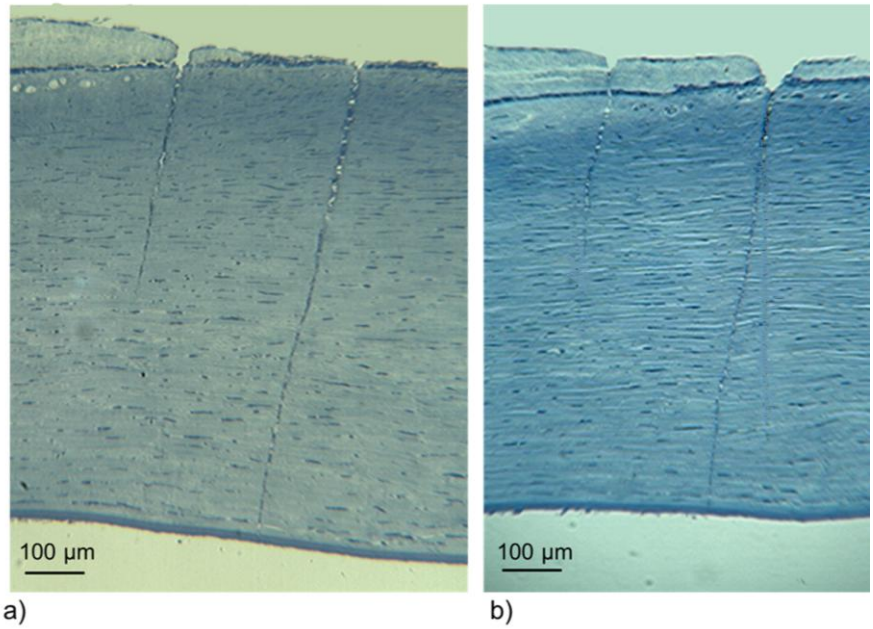


Figure 5-25 Incisions réalisées au limbe avec peu de conjonctive (a) ou de la conjonctive assez dense (b), sous l'objectif d'ouverture numérique de 0,4, à une longueur d'onde de 1592 nm avec une énergie de 2,2 µJ (incision de droite) et 1,1 µJ (incision de gauche).

Pour découper dans la sclère, il a fallu utiliser une énergie plus forte qu'au limbe : comme nous l'avons dit, ce tissu est beaucoup moins bien organisé que la cornée ou que le tissu présent au niveau du limbe (Figure 5-25). Nous avons utilisé la source laser OPA développée au sein de notre équipe pour réaliser une découpe transfixiante à 1600 nm avec une énergie de 7 µJ (Figure 5-26). L'incision a traversé toute l'épaisseur du stroma et a atteint le trabéculum

sur la partie postérieure. Sur cette dernière coupe histologique, la conjonctive apparait particulièrement lâche (la coloration du tissu est peu prononcée) et la découpe est pourtant transfixiante.

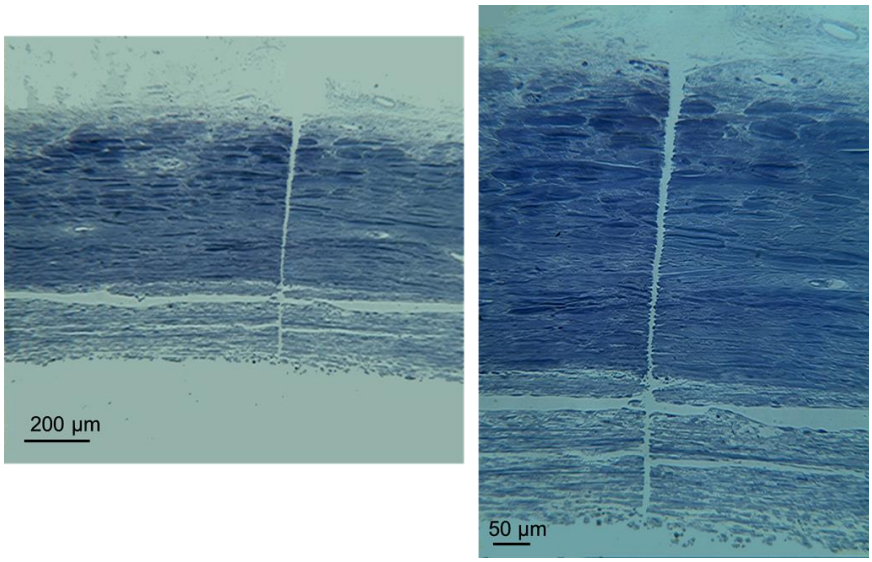


Figure 5-26 Découpe transfixiante réalisée dans le tissu scléral sous l'objectif Cassegrain[60], d'ouverture numérique 0,28 à la longueur d'onde 1600 nm en utilisant la source OPA, avec une énergie de 7 µJ.

Les expérimentations de découpes dans la sclère nous ont finalement permis de réaliser plusieurs incisions transfixiantes et d'atteindre le trabéculum, ce qui n'avait encore jamais été fait dans ces tissus. Ces résultats sont très encourageants pour la poursuite de cette étude. Il est pour le moment délicat d'apporter une conclusion générale, étant donnés les nombreux paramètres pouvant varier : énergie, présence de conjonctive, organisation du tissu, ouverture numérique, largeur spectrale… et nécessitant une étude plus systématique. Il reste cependant indéniable que la profondeur de pénétration obtenue en utilisant la longueur d'onde 1650 nm est bien meilleure qu'en utilisant une longueur d'onde autour de 1000 nm.

Dans la cornée, l'utilisation de la longueur d'onde 1650 nm permet d'atteindre des profondeurs au moins deux à trois fois plus importantes qu'à la longueur d'onde des systèmes cliniques actuels (autour de 1050 nm). Les résultats expérimentaux obtenus sur tissu sont meilleurs que nos prévisions établies suite aux expériences présentées dans le chapitre 3.

En microscopie électronique, l'étude des découpes transfixiantes réalisées à cette longueur d'onde plus élevée dans le tissu cornéen ne montre pas d'effet collatéral sur le collagène le long des bords de la découpe.

Dans le cas des découpes lamellaires, il semble plus aisé d'ouvrir le volet cornéen lorsque la longueur d'onde utilisée pour la découpe est de 1650 nm, et pour une énergie plus faible que celle nécessaire à 1030 nm.

[60] Composé uniquement de deux miroirs sphériques

Les prochaines découpes lamellaires dans le tissu cornéen seront corrélées à des mesures de diffusion dans le tissu (par mesures de transmission directe et totale) afin de pouvoir évaluer la qualité d'interface de découpe à 1030 nm et à 1650 nm, d'éventuellement qualifier ou quantifier la diffusion induite par une interface plus ou moins régulière et de les comparer à nos premières observations.

Dans le cas des découpes dans le tissu scléral, la conjonctive peut représenter une gêne au cours de la propagation du faisceau en profondeur. Néanmoins, l'utilisation de la longueur d'onde 1650 nm permet d'atteindre des profondeurs plus grandes (il a été possible de traverser la sclère dans toute son épaisseur) en causant moins d'effets qu'à la longueur d'onde 820 nm.

De nouvelles découpes seront réalisées dans le tissu, en variant les paramètres de découpes. Il est déjà possible d'envisager une correction du front d'onde par l'optique adaptative afin de compenser les déformations engendrées par la propagation à travers le tissu conjonctival, situé à la en surface de la sclère.

Chapitre 6 La tomographie par cohérence optique : outil de visualisation assistant le laser femtoseconde dans la chirurgie du segment antérieur de l'œil

Il existe de nombreuses techniques d'imagerie du corps humain en volume pour le diagnostic médical. La radiographie a été la première technique largement employée dans le domaine médical puisque son utilisation remonte à plus d'un siècle [153]. On peut également citer l'échographie et l'imagerie par résonance magnétique.

Parmi ces techniques d'imagerie, une voie optique est apparue récemment. Cette technique permet de déterminer les propriétés des tissus avec une résolution de l'ordre du micromètre et jusqu'à une profondeur de l'ordre du millimètre [153]. Dans le cadre du projet ANR NOUGAT[61]*, en collaboration avec nos partenaires du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique* Graduate School*, nous avons développé un nouvel outil d'imagerie de tomographie par cohérence optique pour le contrôle* in situ *en temps réel pendant l'opération du glaucome par laser à impulsions ultra-brèves.*

Dans ce dernier chapitre, je décrirai le principe de la tomographie par cohérence optique (OCT), type d'imagerie très utilisé dans le domaine de l'ophtalmologie, et je parlerai des configurations optiques possibles. Je présenterai ensuite le dispositif expérimental et les autres dispositifs disponibles au laboratoire, ainsi que les images obtenues avec ces différents outils.

Je terminerai par montrer la potentielle combinaison de l'OCT avec le laser, permettant de donner au chirurgien un outil puissant.

1 La tomographie par cohérence optique

Comme nous l'avons dit dans le chapitre 2, la maladie du glaucome à angle ouvert est une maladie chronique. Le glaucome étant une neuropathie optique associée à un déficit du champ visuel, on peut à la fois suivre les changements fonctionnels (la vision) et les changements structurels (les fibres nerveuses optiques). Cette évolution peut être détectée, contrôlée et suivie par plusieurs techniques d'imagerie telles que la microscopie confocale *in vivo* comme l'HRT (pour Heidelberg Retina Tomograph[62]), la polarimétrie à balayage laser comme le GDx-VCC[63], ou encore l'OCT[64].

---

[61] Projet ANR TecSan : 08-TECS-012, dont le titre est « Nouvel Outil pour la chirurgie du Glaucome Assistée par laser femtoseconde et Tomographie par cohérence optique », dont le groupe OPS du Laboratoire d'Optique Appliquée est le coordinateur ; les partenaires sont : le service d'ophtalmologie de l'Hôtel Dieu de Paris, le Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique *Graduate School* et la société Amplitude Systèmes.

[62] Heidelberg Engineering GmbH, Heidelberg, Allemagne

[63] Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA

[64] Par exemple: Carl Zeiss Meditec, Dublin, CA, USA

L'OCT possède de nombreux avantages, puisque cette observation est réalisée sans contact donc non invasive, et que la résolution spatiale générée (pouvant aller jusqu'au micromètre) est suffisante pour permettre la visualisation de structures biologiques sous la surface (Figure 6-1).

La tomographie par cohérence optique est basée sur l'utilisation d'ondes lumineuses, permettant de faire des mesures interférométriques. Selon le tissu à observer, l'illumination pourra être directe ou réalisée par une fibre optique. Aujourd'hui, cette technique est appliquéedans de nombreux domaines tels que l'urologie, la gynécologie, ou encore la cancérologie [154].

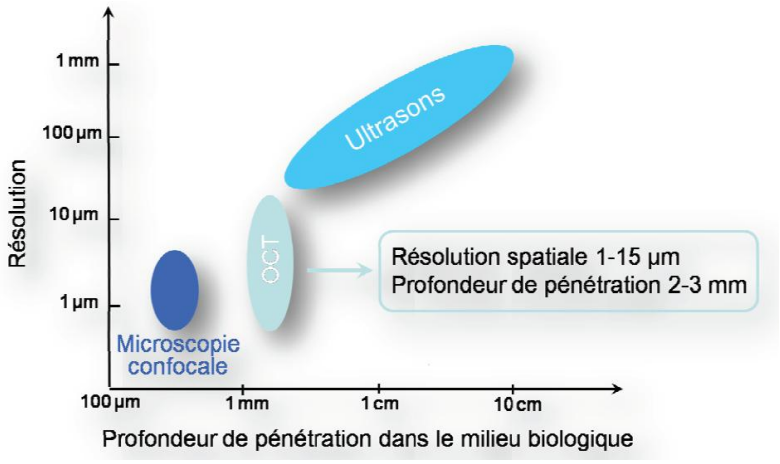


Figure 6-1 Résolution et profondeur de pénétration comparatives pour les ultrasons, la microscopie confocale et la tomographie de cohérence optique [94].

Grâce à ses avantages, l'OCT a rapidement connu un franc succès en l'ophtalmologie [155,156] pour le suivi des pathologies du segment postérieur comme du segment antérieur de l'œil, comme le glaucome [157,158].

Il existe trois types de systèmes OCT différents, indiqués dans le Tableau 6-1.

	Description technique	Acronyme
OCT conventionnelle	L'image tomographique (XZ) est acquise dans l'espace temporel par balayage du miroir de référence (Z) et balayage transverse du faisceau (X).	TD – OCT
OCT fréquentielle	L'image tomographique (XZ) est acquise dans l'espace fréquentiel par balayage de la longueur d'onde ou acquisition par un spectromètre (Z) et balayage transverse du faisceau (X).	FD-OCT
OCT plein champ	L'image tomographique (XY) est acquise sans balayage de faisceau.	FF-OCT

Tableau 6-1 Tableau récapitulant les trois configurations possibles de l'OCT [94].

Les différents paramètres qui permettent de comparer les systèmes entre eux sont :

- La sensibilité de détection, correspondant au plus faible signal pouvant être détecté. Cette sensibilité est assez élevée en OCT puisqu'il s'agit de montage interférométrique.
- La résolution spatiale, sachant que la résolution transverse dépend de la qualité des optiques et de l'ouverture numérique de l'objectif alors que la résolution axiale dépend principalement de la largeur spectrale de la source utilisée pour l'illumination et du détecteur.
- La profondeur de pénétration qui dépend de la diffusion et de l'absorption des tissus, mais également de la longueur d'onde [159].
- La vitesse d'acquisition des images.

1.1 Principe de l'OCT

C'est au début des années 1990 que les premiers principes de l'OCT ont été proposés par différentes équipes (Huang, Fercher…) [160].
Le principe de ce système d'imagerie repose sur l'établissement d'une corrélation entre l'onde réfléchie (ou rétrodiffusée) par l'échantillon à étudier et une onde de référence. La vitesse des ondes lumineuses ne permettant pas de réaliser des mesures directes au vu des temps de réponse typiques des détecteurs optiques, la solution est d'utiliser le principe de l'interférométrie. Le principe de l'OCT est ainsi basé sur le fonctionnement d'un interféromètre de Michelson (Figure 6-2). Cependant, les interférences ne se produisent qu'à condition que la différence de longueur des deux bras soit inférieure à la longueur de cohérence de la lumière. Il est ensuite possible de remonter à la structure en trois dimensions de l'échantillon à l'endroit imagé selon différents mode de balayage et selon le type d'OCT utilisé.

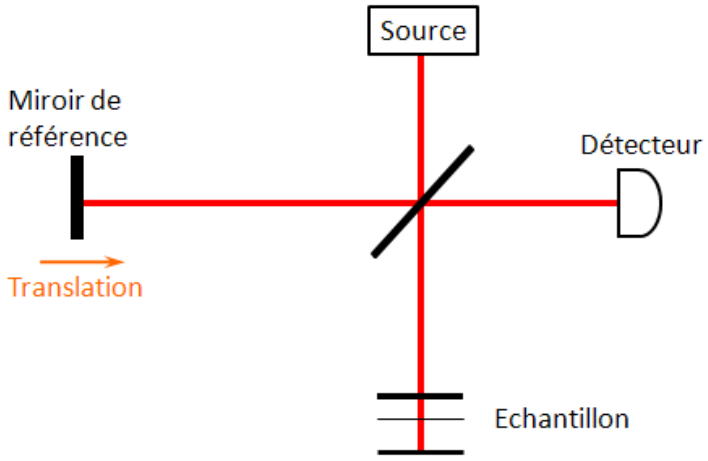


Figure 6-2 Schéma d'un interféromètre de Michelson, principe de base de tout dispositif OCT [94].

La source lumineuse est définie par sa largeur spectrale $\Delta\lambda$, centrée à la longueur d'onde λ_0, n étant l'indice du milieu imagé, f la distance focale de l'objectif utilisé et d le diamètre utile de l'objectif (diamètre du faisceau incident). La résolution axiale Δz du système est alors donnée par la longueur de cohérence l_c de la source :

$$\Delta z = l_c = \frac{2\ln 2}{\pi} \cdot \frac{{\lambda_0}^2}{\Delta\lambda . n} \qquad \textbf{(6-1)}$$

Le spectre de la source doit être le plus proche d'un spectre gaussien pour éviter d'engendrer des rebonds dans le signal [161].

La résolution latérale (ou transverse) Δx du système est déterminée par les optiques utilisées, correspondant au critère de Rayleigh et vaut :

$$\Delta x = \frac{4.\lambda_0}{\pi}.\frac{f}{d} \quad \textbf{(6-2)}$$

On peut noter que cette résolution dépend linéairement de la longueur d'onde de la source lumineuse. Pour augmenter la résolution transverse, on pourra augmenter l'ouverture numérique de l'objectif (au risque d'induire des aberrations supplémentaires).

Deux paramètres sont essentiels dans le choix de la source lumineuse de l'OCT :

- La longueur d'onde d'émission de la source, qui doit idéalement se situer dans la fenêtre 600 – 1300 nm. Au-dessus de cette fenêtre, l'absorption de l'eau devient prépondérante (et tout tissu biologique est riche en eau) et le signal sera rapidement perdu. En dessous de cette fenêtre, c'est la mélanine et l'hémoglobine qui sont les éléments les plus absorbants (Figure 6-3).

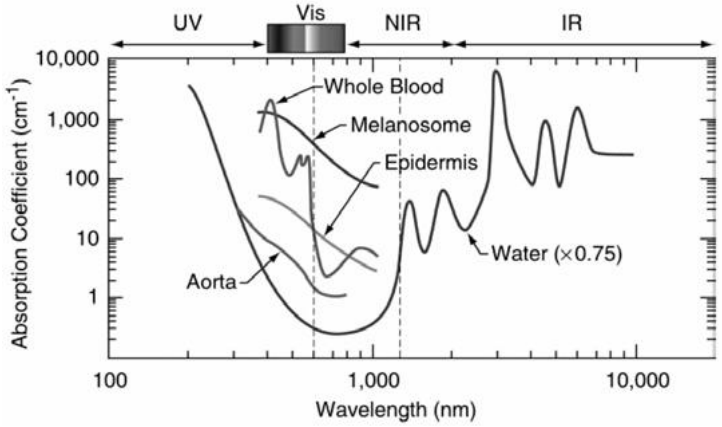


Figure 6-3 Spectres d'absorption des principaux constituants des milieux biologiques. La fenêtre de transparence se situe entre 700 nm et 1000 nm typiquement [162**].**

- La longueur de cohérence de la source L_c dont les caractéristiques influencent la résolution axiale.

Les premiers systèmes OCT utilisaient des diodes laser émettant à 830 nm, la profondeur de pénétration était alors limitée à 700 µm environ dans le tissu (sauf dans le cas des images sur les globes oculaires). L'utilisation d'une source à 1300 nm permet d'imager le tissu jusqu'à une profondeur supérieure au millimètre, la diffusion optique étant fortement diminuée. Actuellement, tous les systèmes commerciaux utilisent des diodes superluminescentes (SLD) à cette longueur d'onde car il s'agit de sources compactes, peu chères et d'une puissance suffisante (quelques milliwatts). La largeur spectrale de ces sources est de l'ordre de 50 à 70 nm. Le Tableau 6-2 récapitule quelques-unes des sources utilisées pour l'OCT et leurs caractéristiques principales.

	Longueur d'onde centrale (nm)	Largeur spectrale (nm)	Résolution axiale (µm)
Lampe halogène	800	320	0,9
Diode électroluminescente	800	50	5,7
Diode électroluminescente	1240	40	17
Laser Ti:Sa	810	260	1,5
Fibre à cristal photonique	1300	370	2,7

Tableau 6-2 Tableau présentant différentes sources lumineuses qui ont été utilisées pour l'OCT, à partir de [94].

1.2 Domaine temporel

Dans ce type de montage, l'échantillon est balayé plan par plan grâce à la translation du miroir de référence (Figure 6-2). Le détecteur, généralement une photodiode, enregistre le signal interférométrique dans l'espace temporel pour chaque plan.

1.3 Domaine fréquentiel

Dès 1995, Fercher *et al.*[163,164] proposent un nouveau concept d'OCT en optique fréquentielle (ou dans le domaine de Fourier). L'information est alors codée dans les fréquences de modulation du spectre d'interférences. Le miroir de référence n'a plus besoin d'être translaté en *z*, chaque enregistrement correspond à un profil transverse de l'échantillon, ce dernier est alors balayé selon *x* ou *y* grâce à un miroir galvanométrique (Figure 6-4). Il existe deux possibilités concernant l'enregistrement en FD-OCT (*Fourier Domain OCT*).

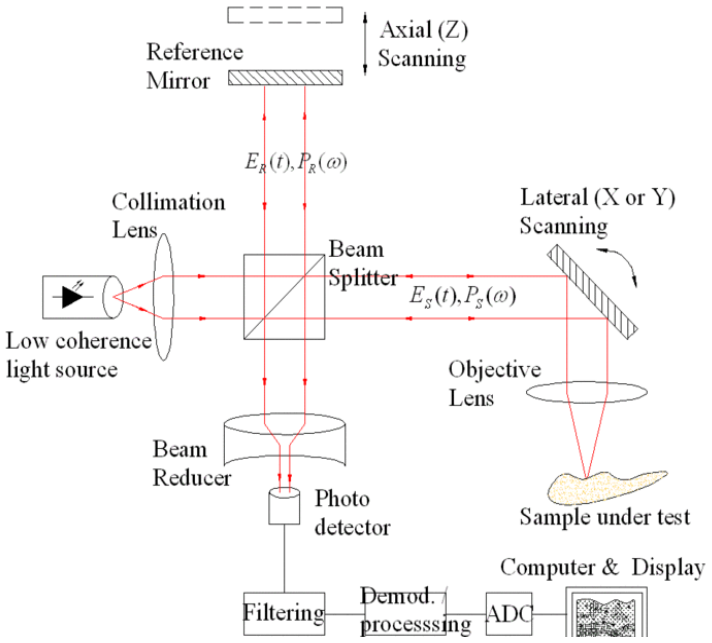


Figure 6-4 Schéma général de l'OCT [165].

- OCT dans le domaine spectral : la source lumineuse de large bande spectrale illumine l'échantillon et l'acquisition du signal est assurée par un interféromètre, suivi d'un

spectromètre (réseau de diffraction et caméra en ligne) [166,167]. Ainsi, le détecteur reçoit toutes les longueurs d'onde simultanément.

- OCT fréquentiel avec source à balayage spectral (*Swept-source OCT*, SD-OCT) : il s'agit d'utiliser une source de faible largeur spectrale accordable en longueur d'onde sur une plage assez grande. Cette fois-ci, l'acquisition des différentes longueurs d'onde se fait en fonction du temps par un monodétecteur.

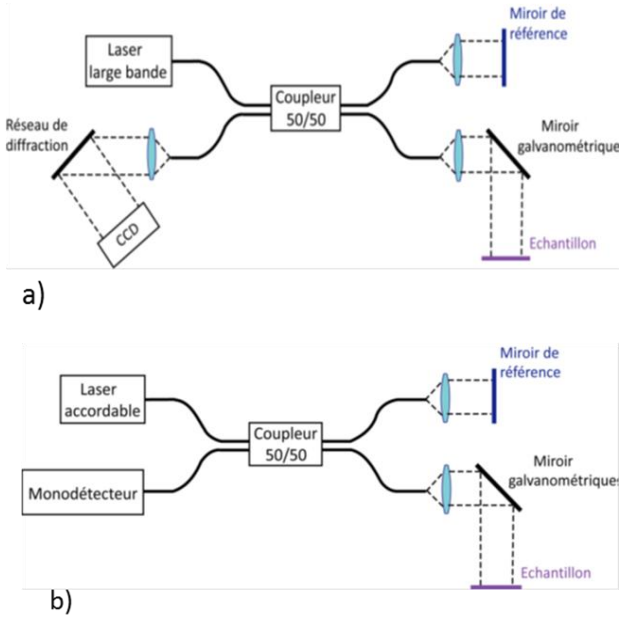


Figure 6-5 Schéma de principe du SD-OCT a) et de l'OCT fréquentiel avec source accordable b) [94].

L'intérêt d'effectuer la détection dans l'espace des fréquences optiques permet de ne plus avoir recours à la translation mécanique du miroir de référence pour balayer les plans en profondeur de l'échantillon. On réalise ainsi un gain de temps considérable par rapport aux techniques d'OCT temporelle. De plus, pour un même temps d'acquisition, l'OCT fréquentielle permet d'atteindre des sensibilités de détection bien supérieures.

La technique FD-OCT est devenue la technique de choix pour les applications cliniques, et donc le système le plus commercialisé.

1.4 OCT plein champ

Contrairement à celles décrites précédemment, cette configuration[65] produit des images par plan orienté *en-face*, autrement dit, c'est comme si l'échantillon était vu du dessus, sans balayage du faisceau ou de l'échantillon [168], à une certaine profondeur. Dans cette configuration, seule la lumière réfléchie par les structures de l'objet situées dans une tranche d'épaisseur $L_c/2$ crée des interférences.

Ici, tout le champ est illuminé par une source faiblement cohérente spatialement et l'acquisition est réalisée grâce à un détecteur (type caméra CCD) [169]. Dans ce type d'OCT, on peut utiliser des objectifs à grande ouverture numérique et donc, par exemple, des objectifs à immersion dans l'eau qui permettent d'obtenir des résolutions transverses de l'ordre du micromètre. Généralement, ce type d'objectif ne peut pas être utilisé pour les OCT fréquentiel

[65]Inventée au Laboratoire d'Optique de l'ESPCI.

et temporel car, pour ces derniers, la profondeur de champ doit être du même ordre de grandeur que la profondeur de pénétration souhaitée. L'OCT plein champ dispose ainsi d'une résolution transverse 10 à 20 fois meilleure que les autres dispositifs OCT.

Finalement, le temps d'acquisition de chaque image en OCT plein champ dépend de nombreux paramètres et reste relativement long : de l'ordre de la seconde, ce qui est bien supérieur aux temps d'acquisition des autres configurations d'OCT et n'est pas compatible avec une application *in vivo.*

2 Applications de l'OCT en ophtalmologie clinique

L'OCT est un outil de diagnostic très utilisé en ophtalmologie car :

- l'œil est un organe qui permet d'obtenir de bonne profondeur de pénétration (de l'ordre du millimètre), certains de ses tissus étant transparents.
- Les caractéristiques des systèmes disponibles suffisent pour imager la plupart des structures oculaires.

2.1 Segment antérieur

Dans le segment antérieur de l'œil, l'OCT permet d'observer la cornée, l'angle irido-cornéen, et en particulier la configuration de l'iris, pour le diagnostic des pathologies cornéennes ou du glaucome.

Parmi les OCT commercialisés, les systèmes Visante[66](Figure 6-6, Figure 6-7) et Visante *omni* sont entre autres les plus répandues. La source lumineuse utilisée est une diode superluminescente à une longueur d'onde de 1310 nm. La profondeur maximale est de l'ordre de 6 mm. La résolution axiale est de 18 µm et la résolution transverse de 60 µm.

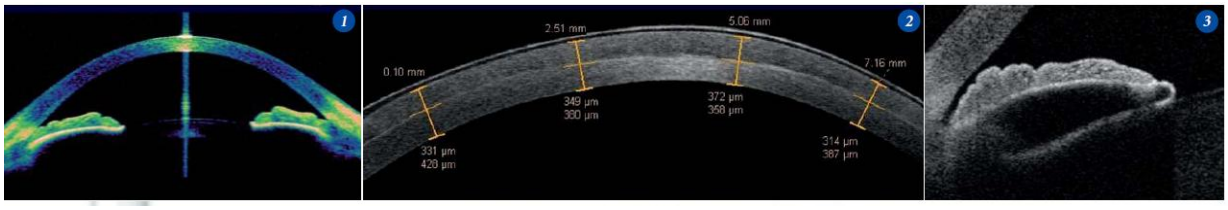


Figure 6-6 Images obtenues par l'OCT *Visante* pour visualiser toute la chambre antérieure (en fausses couleurs) 1), mesurer l'épaisseur d'une lamelle dans le cadre d'une greffe 2) et imager l'angle irido-cornéen en haute résolution 3).

[66] Carl Zeiss Meditec

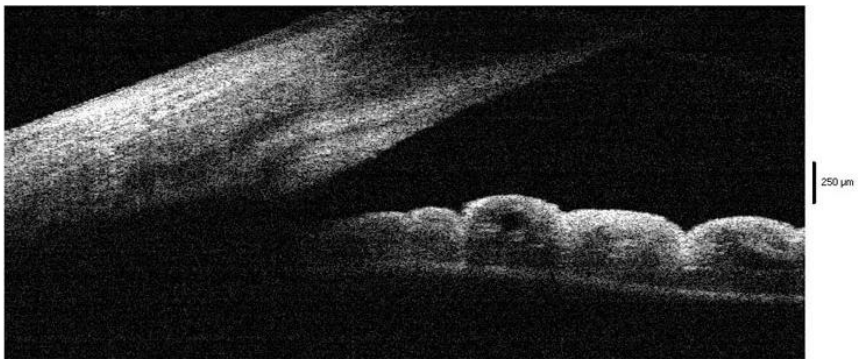


Figure 6-7 Observation de l'angle irirdo-cornéen avec l'OCT *Visante* dans le segment antérieur.

On peut également citer le *Fourier Domain* OCT SS-1000 de Tomey. La longueur d'onde est également 1310 nm, en configuration *swept-source,* et la profondeur de pénétration est de 6 mm. La résolution axiale est d'environ 10 µm et la résolution transverse est de l'ordre de 30 µm. Trente mille profils peuvent être réalisés par seconde.

2.2 Segment postérieur

L'OCT pour le segment postérieur est très utilisé pour le suivi des patients atteints de diverses pathologies rétiniennes telles que le glaucome ou les neuropathies affectant la tête du nerf optique, mais aussi les maladies dégénératives, inflammatoires et néo-vasculaires.

L'image obtenue par OCT est combinée à différents traitements numériques afin de donner les informations pertinentes au spécialiste et d'assurer un suivi.

La rapidité d'acquisition de ces systèmes et la qualité d'image obtenue permettent d'observer rapidement et de façon fiable les tissus du segment antérieur comme du segment postérieur de l'œil, ce qui fait de l'OCT un outil puissant pour les ophtalmologistes qui s'est imposé par rapport à d'autres techniques d'imagerie.

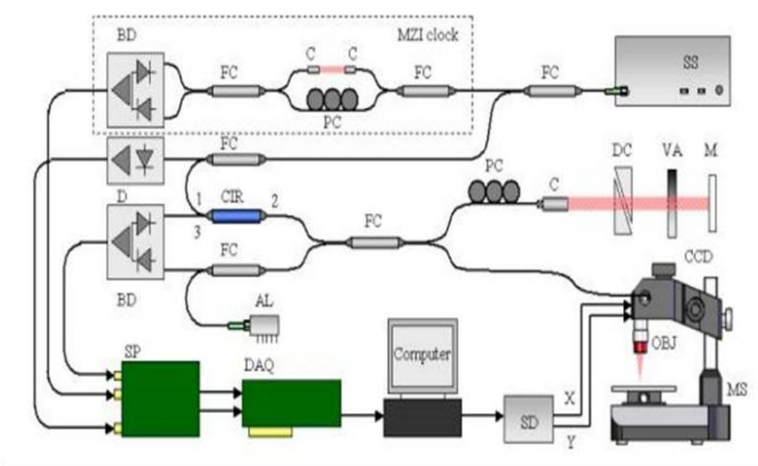
3 Systèmes utilisés pour le présent travail : dispositifs commercial et expérimental

3.1 OCT commercial (SS-OCT)

L'OCT commercial acquis au début du projet ANR NOUGAT est un OCT *swept-source*[67](Figure 6-8). Il émet à la longueur d'onde centrale 1325 nm. Sa résolution transverse est de 25 µm et sa résolution axiale est d'environ 10 µm.

[67]Système OCT *swept-source* OCS1300SS, Thorlabs.

a)



b)

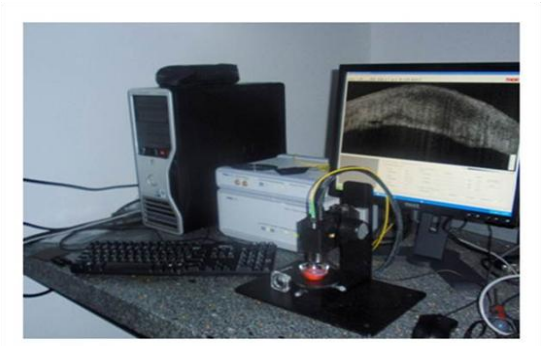


Figure 6-8 Schéma de fonctionnement de l'OCT *swept source* Thorlabs a) et dispositif commercial installé au laboratoire imageant une cornée de banque b) sur le moniteur.

Ce dispositif présente les avantages d'afficher l'image de l'échantillon en quasi-temps réel et d'acquérir rapidement une image tridimensionnelle.

3.2 OCT plein champ développé à l'Institut d'Optique

Un dispositif d'OCT plein champ (Figure 6-9) a été développé à l'Institut d'Optique par Arnaud Dubois et sa doctorante Delphine Sacchet. La source lumineuse consiste en une lampe halogène qui présente un spectre large bande assurant une résolution axiale optimale. Le système est muni de deux caméra CCD: l'une à base de Silicium (Si), sensible aux longueurs d'onde autour de 800 nm; et l'autre, à base d'Arséniure d'Indium Gallium (InGaAs), sensible sur une gamme spectrale plus large entre 900 nm et 1700 nm, centrée à 1200 nm.

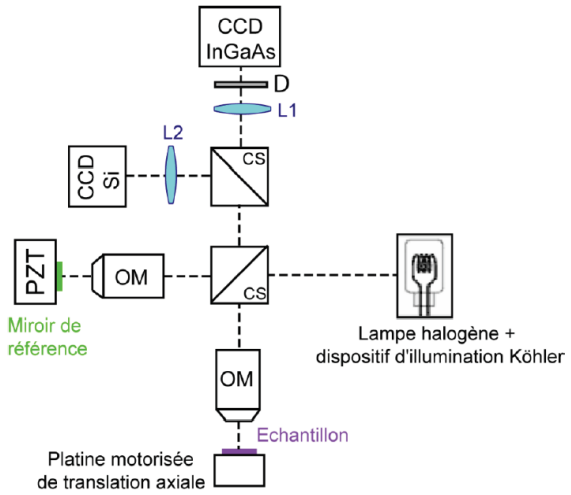


Figure 6-9 Montage expérimental de l'OCT plein-champ associant deux longueurs d'onde (bandes spectrales centrée à 800 et 1200 nm) [94].

3.3 SD- OCT développé dans le cadre du projet NOUGAT

Ce dispositif est développé dans le cadre du projet de thèse de Mas Bayeleyegn à l'Institut d'Optique *Graduate School*, projet étroitement lié au projet NOUGAT.

3.3.1 Importance de la source

Plusieurs solutions ont été envisagées au début du projet afin de disposer d'une source lumineuse stable, centrée autour de la longueur d'onde 1300 nm et ayant un spectre le plus large possible.

Une première solution consistait en l'utilisation d'un soliton, généré dans une fibre optique[68]. Un certain nombre de paramètres est à étudier comme la puissance injectée, la polarisation incidente, la distance focale de la lentille d'injection, le diamètre de cœur de la fibre, la longueur de la fibre…Les figures Figure 6-10 et Figure 6-11 présentent le montage avec une des fibres utilisées et deux spectres obtenus.

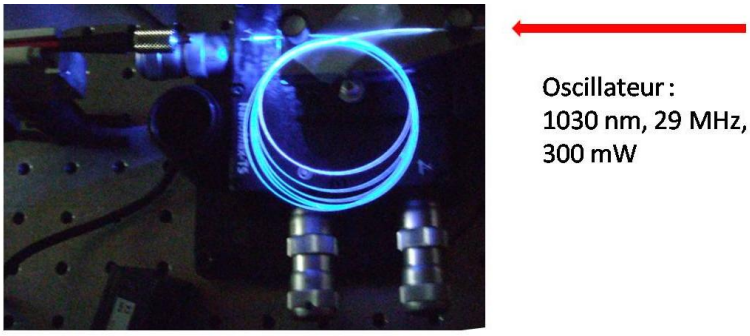


Figure 6-10 Montage de la fibre optique sur une monture réglable dans les 3 dimensions (x,yet z) et injection du faisceau de l'oscillateur grâce à une lentille de focale 6 mm.

[68] Disposant d'une « fuite » de l'oscillateur du laser femtoseconde s pulse HP (Amplitude Systèmes), nous avions souhaité injecter ce faisceau dans une fibre à cristal photonique. Le spectre le plus large obtenu était de 70 nm à la longueur d'onde 1300 nm au cours d'expériences exploratoires.

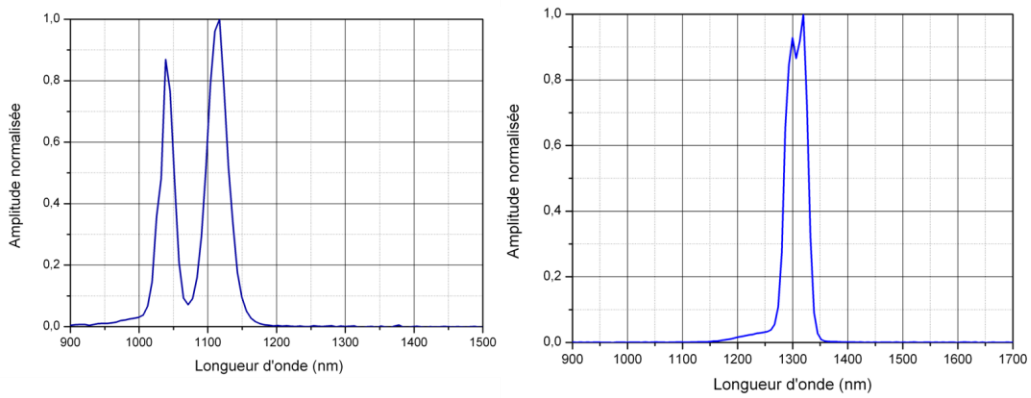


Figure 6-11 Spectres obtenus en sortie en injectant une puissance de 275 mW à 1030 nm à la cadence de 29 MHz dans une fibre de 57 cm de longueur (gauche) et dans une fibre de 1 m de longueur (droite).

Une source continuum commerciale[69] a permis de monter le système et de réaliser les premiers alignements, et c'est finalement la solution d'une source composée de diodes superluminescentes qui a été adoptée pour le montage. Cette source commerciale, compacte[70] et à un prix relativement abordable, est particulièrement adaptée à notre application. Son spectre est représenté sur la Figure 6-12.

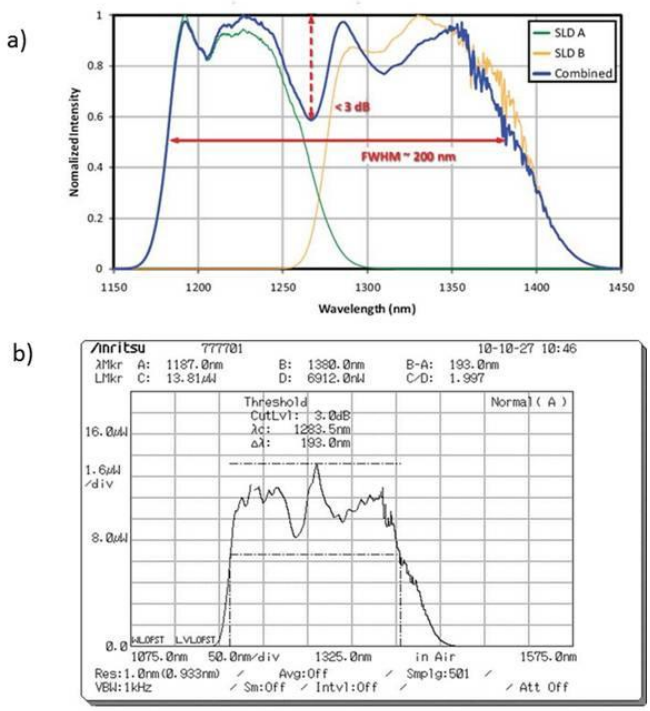


Figure 6-12 Caractéristique spectrale donnée pour la SLD (courbe bleue) par combinaison de 2 SLD (courbes en vert et jaune) légèrement décalées spectralement a) et mesure spectrale effectuée sur le système b).

[69] Nous avions envisagé l'utilisation d'une source continuum commerciale que l'on aurait filtrée optiquement selon la plage spectrale souhaitée. Cette solution n'était pas non plus intéressante car les sources en question manquait de stabilité et manquait de puissance pour saturer la caméra une fois le spectre utile sélectionné.

[70] Source LS200B, Thorlabs, disponible à l'achat depuis le deuxième semestre 2010.

3.3.2 Montage optique

Le schéma du montage optique de l'OCT développé à l'Institut d'Optique est montré sur la Figure 6-13 et photographié Figure 6-14. Le faisceau issu de la source est divisé en deux bras : l'un est destiné à balayé l'échantillon grâce à un miroir galvanométrique, l'autre sert de référence. Le signal réfléchi par le miroir de référence et le signal rétrodiffusé par l'échantillon sont recombinés au niveau du séparateur de faisceau, puis ce signal est envoyé vers une caméra en ligne[71] *via* un réseau de diffraction aux caractéristiques adaptées[72] et une lentille achromatique[73].

Si on note $S(k)$ le spectre de la source lumineuse avec k le vecteur d'onde, R_i le coefficient de réflexion du diffuseur i qui se situe à la profondeurz_i, l'intensité lumineuse $I_D(k)$ reçue par la caméra s'écrit :

$$\boldsymbol{I_D(k) = \frac{\eta}{4} S(k) \cdot \left[R_R + \sum_{n=1}^{N} R_{Sn}\right] + \frac{\eta}{2} S(k) \cdot \sum_{n=1}^{N} \sqrt{R_R \cdot R_{Sn}} \cos(2k \cdot z_n) + \frac{\eta}{4} S(k) \cdot \sum_{n \neq m-1}^{N} \sqrt{R_{Sn} R_{Sm}} \cos\left(2k(z_n - z_m)\right)} \quad \textbf{(6-3)}$$

Le premier terme de l'équation (6-3) correspond à un signal continu à la position *z*=0, le troisième terme correspond à l'auto-corrélation entre les diffuseurs du tissu, et le deuxième terme correspond au signal à récupérer.

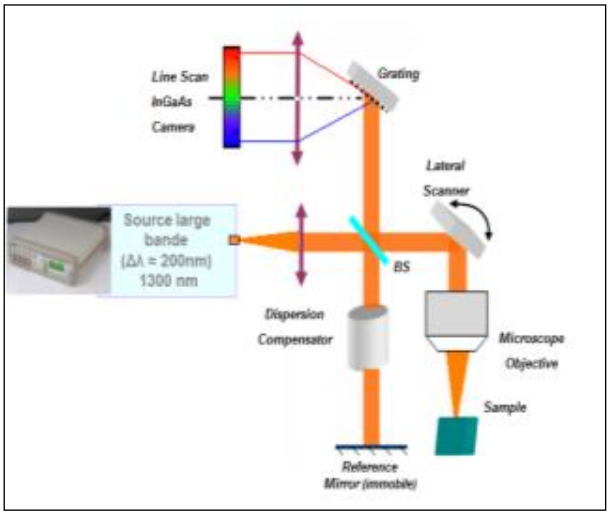


Figure 6-13 Schéma du montage réalisé à l'Institut d'Optique.

[71] Linescan camera, SULDM, Goodrich, Sensors Unlimited Inc.
[72] Ici, 600 traits / mm.
[73] De focale 150 mm

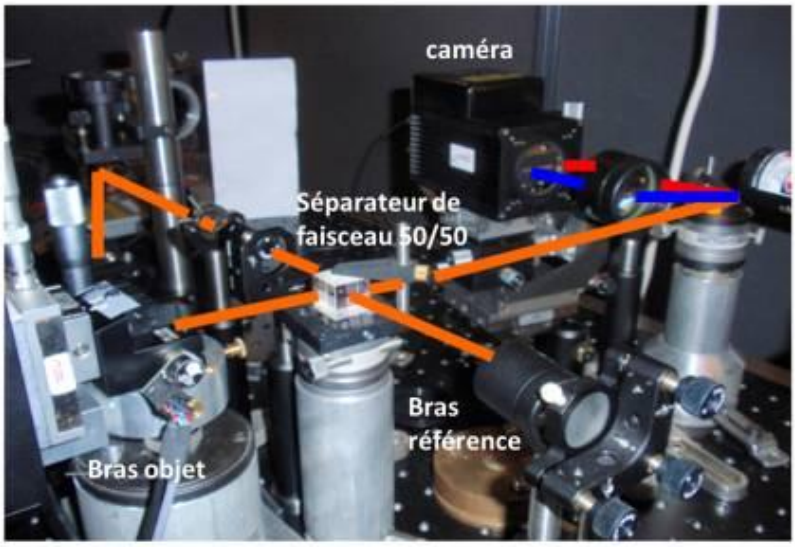


Figure 6-14 Montage expérimental de l'OCT Fourier Domain développé à l'Institut d'Optique dans le cadre du projet de thèse de Mas Bayleyegn, suivant le schéma proposé en Figure 6-13.

Les données enregistrées par la caméra $I_D(k)$ sont ensuite traitées numériquement utilisant le logiciel *Labview*, notamment par transformation de Fourier pour obtenir $i_D(z)$ et afficher l'image de l'échantillon observé. Si on note $\gamma(z)$ la fonction de cohérence de la source et $C[I_n, I_m]$ l'autocorrélation entre les diffuseurs n et m, alors $i_D(z)$ s'écrit :

$$i_D(z) \propto \gamma(z) \otimes \{\delta(0) + \sum_{n=1}^{N} \alpha_n{}^2 \cdot \delta(z+z_n) + \sum_{n=1}^{N} \alpha_n{}^2 \cdot \delta(z-z_n) + C[I_n, I_m]\} \qquad \textbf{(6-4)}$$

Dans l'équation (6-4), l'information utile est contenue dans le 2^e ou 3^e terme de l'accolade, les autres termes devant être supprimés. L'interface obtenue est présentée en Figure 6-15.

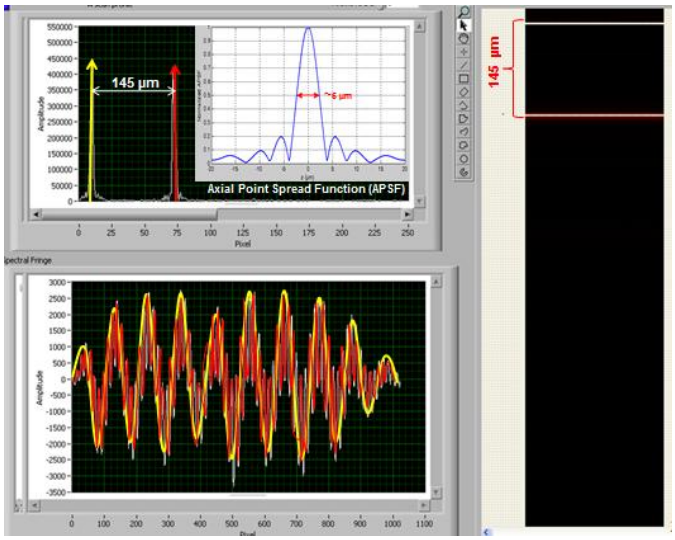


Figure 6-15 Exemple de traitement de l'information pour un échantillon correspondant à deux surfaces séparées par 145 µm. La fréquence la plus basse (courbe jaune) donne la position de la première interface et la fréquence plus élevée (courbe rouge) donne la position de la deuxième interface. Chaque position n'est pas exactement définie par un Dirac et l'épaisseur réelle de cette fonction donne la résolution axiale du système (ici 6 µm)

3.4 Comparaison des systèmes OCT plein-champ, SS-OCT et SD-OCT

Les caractéristiques des trois systèmes ont été récapitulées dans un tableau mettant en évidence les avantages de chacun des systèmes (en rouge dans le Tableau 6-3).

	***Swept source* Thorlabs**	**SD-OCT**	**OCT plein-champ**
Longueur d'onde centrale de la source	1325 nm	1280 nm	800 nm
Largeur spectrale de la source	100 nm	193 nm	>500 nm
Longueur de cohérence	5,6 µm	2,7 µm	< 1 µm
Puissance moyenne sur l'échantillon	10 mW	5 mW	10 mW / cm^2
Rapidité d'acquisition en axial	16 kHz Quasi-temps réel	Temps réel en théorie	30 min pour une pile de 500 µm (pas de 1 µm)
Profondeur maximale d'imagerie	3 mm	2 mm	300 - 500 µm
Résolution transverse expérimentale	25 µm	10 µm	3 à 4 µm
Résolution axiale expérimentale	10 µm	5 µm	1 à 2 µm

Tableau 6-3 Tableau récapitulant et comparant les caractéristiques des trois systèmes OCT disponibles.

Malgré ses excellentes performances en terme de résolution, l'OCT plein-champ ne permet pas de réaliser des imagines *in vivo* car les tissus biologiques ne peuvent pas rester illuminés et immobilisés pendant le temps nécessaire à l'acquisition des images.

Par contre, l'OCT dans le domaine fréquentiel offre un compromis intéressant entre un temps d'acquisition acceptable et une résolution suffisante pour les applications médicales envisagées, comme nous allons le voir dans la suite.

4 Premières images

Les images ont toutes été réalisées sur des cornées humaines à but scientifique. Les yeux de porc, utilisés dans le cadre d'autres expériences, ne peuvent pas être utilisés pour l'imagerie du réseau trabéculaire car le canal de Schlemm est une structure absente de leur segment antérieur [170].

4.1 OCT commercial

L'acquisition du système OCT Thorlabs avait pour objectif d'orienter le choix de la configuration et de certains paramètres de l'OCT à développer dans le projet NOUGAT. Initialement, deux longueurs d'onde, 1300 et 1700 nm, avaient été envisagées pour l'imagerie. L'OCT commercial à 1300 nm nous a permis d'observer la zone d'intérêt pour la chirurgie du glaucome, autrement dit le canal de Schlemm, dans plusieurs cornées humaines à but scientifique (Figure 6-16).

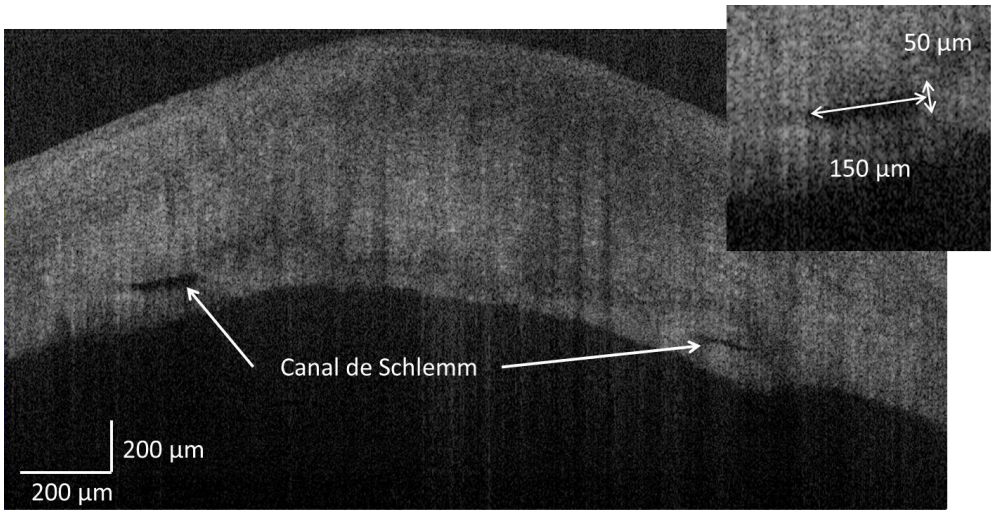


Figure 6-16 Image du canal de Schlemm sur une cornée de banque observée à l'OCT *swept-source*. L'encart présente les dimensions caractéristiques du canal.

Ces résultats ont permis de valider l'utilisation de cette longueur d'onde intermédiaire, tout en évitant le développement d'un système utilisant une source émettant plus loin dans l'infrarouge. Un dispositif à 1700 nm aurait eu l'inconvénient de limiter la résolution spatiale maximale.

Les cornées utilisées, même œdémateuses, ont pu être imagées sur toute leur épaisseur grâce au dispositif commercial, ce qui démontre que la longueur d'onde utilisée pénètre suffisamment dans le tissu. Cependant, la résolution axiale reste faible dans le cadre de nos expériences de découpes, de l'ordre de 15 µm, et le canal de Schlemm n'a pas toujours été observé.

Ce premier OCT disponible, rapide à prendre en main et générant l'image en quasi temps-réel, nous a également permis d'imager les découpes lamellaires par laser juste après leur réalisation : la présence des bulles de cavitation se résorbant en heures si les cornées ne sont immédiatement pas fixées, a notamment facilité l'observation (Figure 6-17).

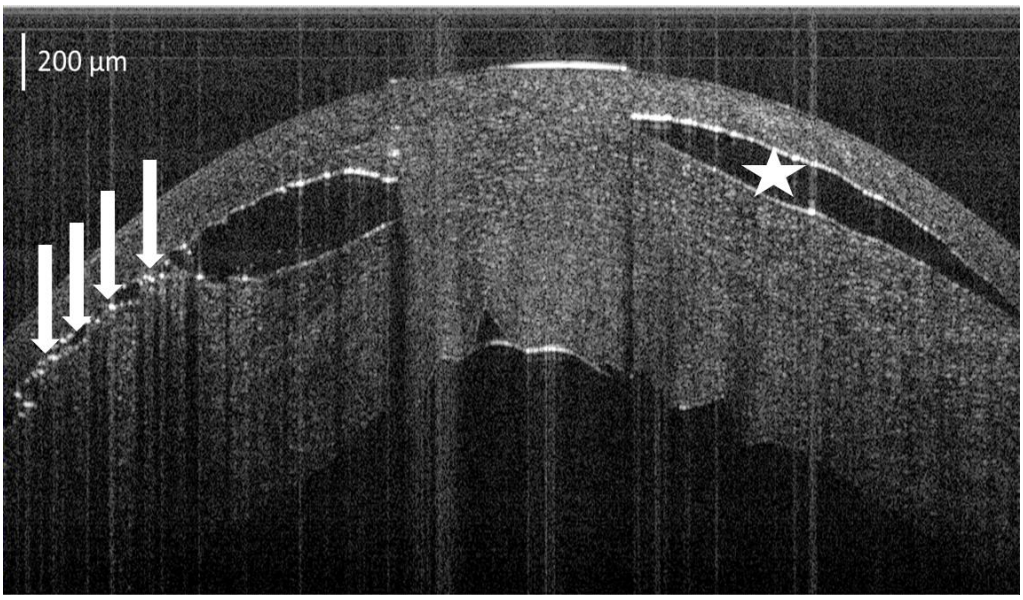


Figure 6-17 Observation OCT de deux découpes lamellaires réalisées à 1030 nm, avant ouverture du volet. Sur la découpe de droite, les incisions transfixiantes ne sont pas bien marquées (étoile) et, sur la découpe de gauche, il semble rester des ponts tissulaires (flèches blanches).

Les volets cornéens, délicatement soulevés à l'aide d'une pince après les découpes lamellaires, ont également été imagés (Figure 6-18). Ces échantillons ont ensuite été utilisés lors des observations par microscopie électronique à balayage, afin de visualiser l'interface de la découpe, ces images étant présentées au chapitre 5, à la section 2.2.1.

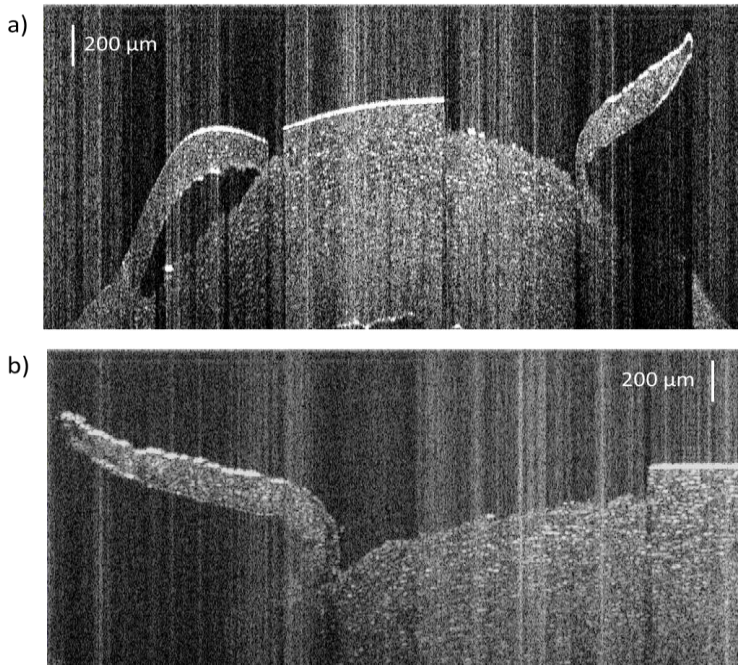


Figure 6-18 Observation à l'OCT de deux découpes lamellaires dans la cornée à l'aide d'un laser femtoseconde[74] émettant à la longueur d'onde 1650 nm avec une énergie de 2,2 µJ en utilisant un objectif d'ouverture numérique 0,4, après ouverture des volets a) et zoom sur le volet de droite b).

[74] OPA commercial muni d'un filtre passe-bande.

La résolution axiale de ce système (de 15 µm) apparaît limitée pour ces observations. C'est pourquoi le développement de l'OCT à l'Institut d'Optique vise à améliorer la résolution axiale d'un facteur au moins deux. Rappelons que le canal à observer, situé à une profondeur de l'ordre de 700 µm possède une dimension axiale de l'ordre de 20 à 50 µm.

4.2 OCT plein champ

Le montage utilisant la détection à deux longueurs d'onde (grâce à une source de lumière halogène) permet de comparer directement les images obtenues sur un même échantillon. Sur les coupes transverses calculées (Figure 6-19), on observe que la résolution est meilleure avec la longueur d'onde 800 nm, mais que la profondeur de pénétration est meilleure à 1200 nm, du fait de la réduction de la diffusion à cette longueur d'onde.

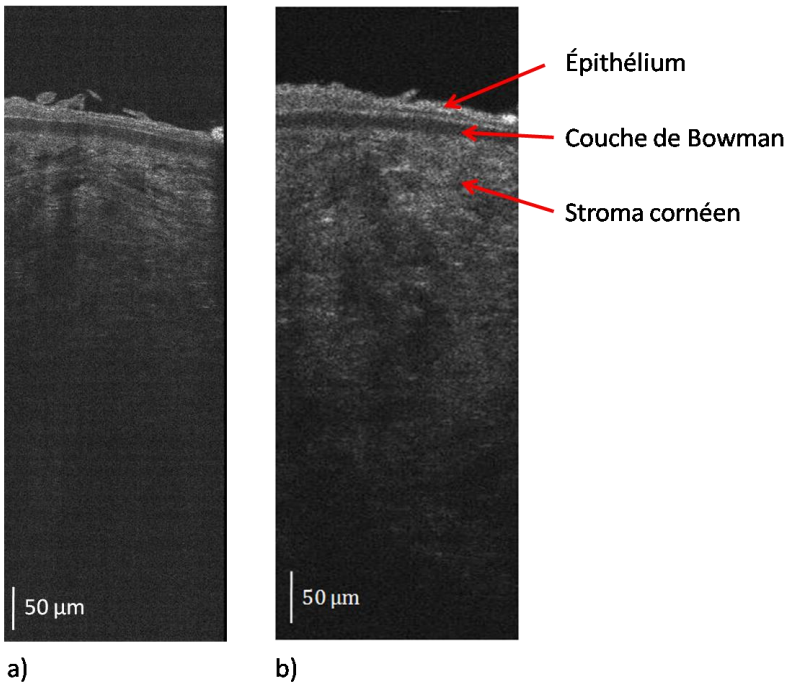


Figure 6-19 Comparaison de deux images transverses d'une même cornée générées en OCT plein champ sur deux gammes de longueurs d'onde différentes : l'une centrée à 800 nm a) et l'autre centrée à 1200 nm b) [94].

Après avoir placé la cornée sur chambre artificielle et sous pression, pour éviter les mouvements gênant l'acquisition (brouillant les interférences), l'OCT plein champ permet de faire l'acquisition de plans *en face* successifs d'un échantillon avec une très bonne résolution (Figure 6-20).

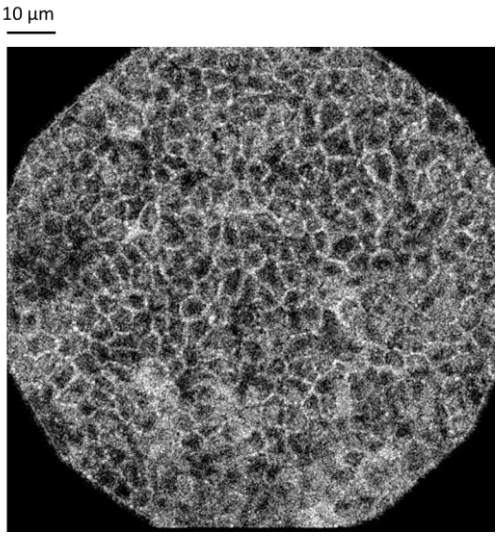


Figure 6-20 Image obtenue par OCT plein champ des cellules épithéliales basales.

Il est ensuite possible de reconstruire la structure du tissu par simple traitement des données (Figure 6-21), en prenant soin de choisir un pas suffisamment fin en fonction de la structure observée. Dans la cornée, les lamelles de collagène ayant une épaisseur caractéristique de 5 µm, et l'épaisseur de la plus fine des couches cornéennes, l'endothélium, étant du même ordre, nous avons choisi un pas de 1 µm pour l'acquisition des images présentées.

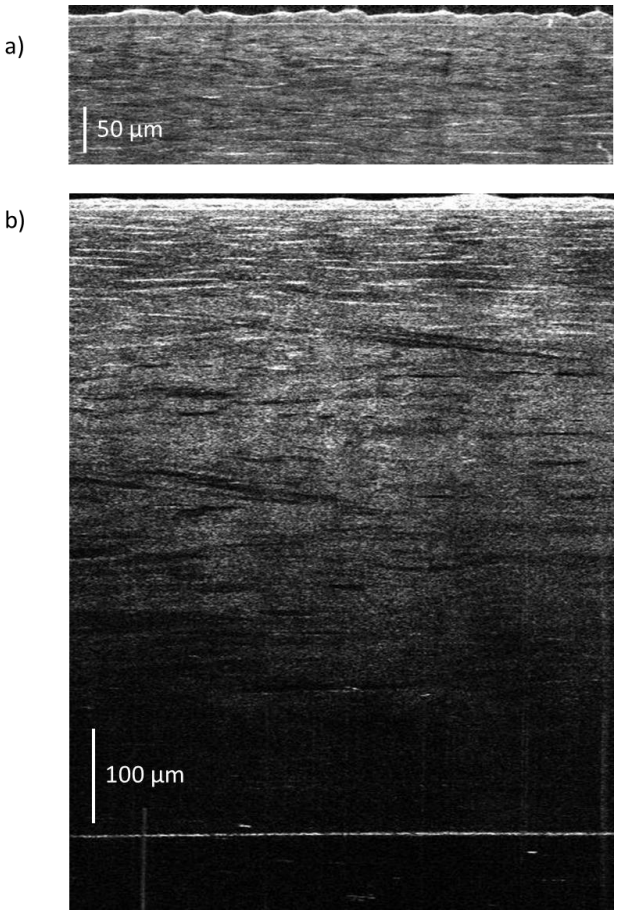


Figure 6-21 Images transverses d'OCT plein champ sur une cornée humaine à but scientifique placée en déturgescence à 2,5% de Dextran pendant 17h, compilation de 300 images a) et compilation de 1500 images b).

A condition de choisir les bons paramètres, toute l'épaisseur du tissu peut être imagée avec l'OCT plein champ. La résolution est très bonne, en particulier à la surface, mais le signal devient très faible à partir d'une profondeur de l'ordre de 500 µm. La limite la plus importante de ce dispositif est le temps d'acquisition qui est de l'ordre de 30 à 45 minutes pour ce type d'image. Il est également indispensable de minimiser les vibrations lors de l'acquisition.

4.3 OCT expérimental développé dans le cadre du projet NOUGAT

Avec le dispositif expérimental, la cornée est simplement placée dans une coupelle avant de lancer l'acquisition. Pour obtenir une image telle que celle présentée en Figure 6-22, le temps nécessaire à l'acquisition est de l'ordre de 30 secondes.

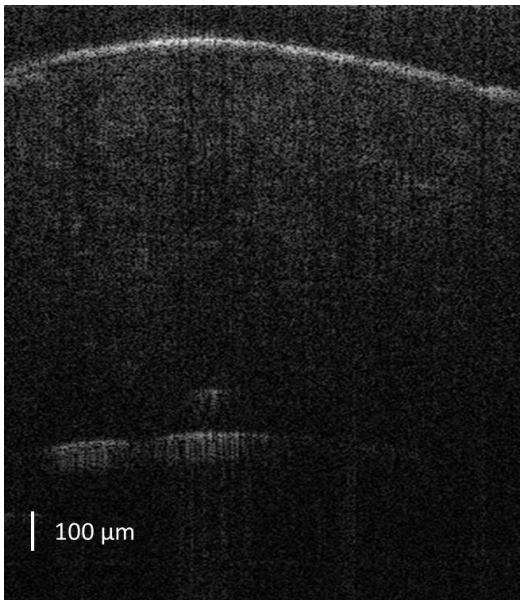


Figure 6-22 Image d'une cornée œdémateuse réalisée à l'aide du SD-OCT.

Il s'agit de l'une des premières images réalisées avec ce dispositif. Le traitement de l'image n'est pas encore optimal et la résolution reste à améliorer. Ces optimisations font actuellement l'objet du travail de thèse de Mas Bayleyegn.

5 Intégration de l'OCT et du laser

L'OCT *spectral domain* a été développé afin d'être associé au laser pour fournir au chirurgien un moyen de chirurgie et de visualisation en quasi-temps réel.

Le dispositif de découpes expérimental présenté au chapitre 5 permet le déplacement du tissu *via* des moteurs[75] pas à pas pour réaliser la géométrie souhaitée des incisions. Dans le cas d'une application clinique, il faut envisager le déplacement du faisceau pour balayer la zone d'intérêt dans le segment antérieur de l'œil du patient.

Dans le cadre du projet GRECO[76], concernant la greffe de cornée par laser femtoseconde, une lentille f-théta avait été réalisée sur mesure pour balayer toute la zone optique de la cornée. Généralement, les lentilles f-théta sont utilisées lorsque le champ sur lequel le faisceau laser doit être focalisé est grand (typiquement 8 x 8 mm² pour la greffe de cornée).

Dans le cadre du projet NOUGAT, le champ utile n'est que de 1 x 0,25 mm², pour une profondeur maximale de 1 mm, la zone d'intérêt étant située autour du canal de Schlemm. Un objectif de microscope est suffisant pour couvrir un champ de cette dimension, sachant que l'ouverture numérique doit être comprise entre 0,4 et 0,6 [139].

[75]Moteurs XPS, Newport.

[76] Projet GRECO, ANR-TecSan-2006-25 « Greffe de cornée automatisée par laser femtoseconde avec optimisation de la longueur d'onde et correction du front d'onde ».

Pour intégrer l'OCT au laser, deux solutions sont envisagées :

- Utiliser la sonde du dispositif OCT commercial au-dessus de l'échantillon (Figure 6-23). Cependant, dans ce cas, les distances de travail des objectifs utilisés, pour l'OCT comme pour le laser, étant de l'ordre de 15 mm, le miroir dichroïque doit être particulièrement petit. La condition de distance minimale entre le patient et le système, imposée par la réglementation des dispositifs médicaux, ne sera alors pas remplie.

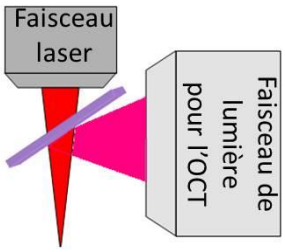


Figure 6-23 Association simple du laser et de l'OCT, par intercalage d'un dichroïque entre les deux optiques de focalisation

- Utiliser le dispositif développé dans le cadre du projet NOUGAT en insérant le bras objet sur le trajet du faisceau laser avant le balayage de l'échantillon. Les deux longueurs d'onde étant différentes, cela impose un traitement sur une large bande spectrale (ou un traitement doré) pour toutes les optiques situées après l'insertion du faisceau OCT sur le faisceau laser. Les deux ouvertures numériques différentes – entre 0,4 et 0,6 pour la découpe laser et environ 0,1 pour l'imagerie par OCT – imposent un diamètre de faisceau différent pour les deux types de balayage, ce qui ne pose pas de problème pour la réalisation pratique.

Les deux projets de chirurgie du segment antérieur du groupe OPS concernent la cornée et la sclère. Pour ces tissus, l'intérêt est d'utiliser une longueur d'onde dans la fenêtre de relative transparence de ces tissus centrée à 1650 nm. Dans ces deux cas, une partie de la surface cornéenne du patient doit être balayée. Une lentille f-thêta sur mesure pourrait être utilisée de façon commune, avec un diamètre de faisceau adapté dans chacun des cas, étant donné que la surface est différente dans la cornée et dans la sclère. De plus, un tel dispositif pourrait bénéficier du développement de l'OCT pour visualiser le déroulement de l'intervention et ainsi la contrôler.

De plus, le système laser choisi est composé d'un premier laser commercial émettant à 1030 nm et d'un module de conversion de longueur d'onde pour accéder à la plage de longueur d'onde 1600 – 1800 nm. Ce dispositif devrait également permettre d'effectuer des découpes sur le tissu cristallinien, par exemple dans le cadre du traitement de la cataracte. Dans ce cas, la longueur d'onde 1030 nm apparaît être optimale pour pouvoir pénétrer au mieux dans le cristallin.

L'une des perspectives de développement pourrait donc être de développer un dispositif multimodal. Il pourrait utiliser une même source initiale sur laquelle des modules dédiés aux différentes indications seraient associés. En effet, on peut se rappeler que toute la puissance disponible par la source initiale ne serait pas utilisée dans de tels modules de conversion de longueur d'onde. Cependant, il faut garder en mémoire que la cataracte est la chirurgie de l'œil la plus répandue ; un dispositif multimodal sera donc probablement utilisé sur 100 % du temps pour cette indication. Il est ainsi possible d'imaginer un dispositif dans lequel un laser de pompe assez puissant fournira un faisceau dédié à cette indication, ainsi qu'un faisceau permettant d'alimenter un (ou plusieurs) module(s) de conversion dédié aux greffes de cornée et à l'opération du glaucome.

Conclusions et perspectives

L'utilisation des lasers à impulsions ultra-brèves pour la chirurgie du segment antérieur de l'œil s'est fortement développée ces dernières années à la vue des excellents résultats obtenues sur les cornées saines et peu œdémateuses lors de leur utilisation pour la chirurgie réfractive. En 2001, seul un système commercial était présent sur le marché de la chirurgie réfractive, contre cinq systèmes en 2010 dont certains proposent des routines pour la greffe de cornée. A ce jour, il existe également trois systèmes laser à impulsions ultra-rapides pour la chirurgie de la cataracte.

Cependant, la technologie des lasers femtoseconde émettant à des longueurs d'onde autour de 1 µm s'est confrontée à une limitation dans les tissus plus fortement diffusants, comme les cornées œdémateuses ou la sclère. Les mesures de transmission et les calculs de diffusion à travers les cornées effectuées entre autre par notre équipe ont montré l'intérêt d'utiliser une longueur d'onde décalée vers l'infrarouge, autour de 1,65 µm, pour diminuer le phénomène de diffusion de la lumière. Dans le cas de cornées saines, la diffusion est principalement due aux fibrilles de collagène dont la dimension caractéristique est bien inférieure à la longueur d'onde. Nous sommes alors dans le régime de la diffusion Rayleigh qui est caractérisée par un comportement fortement dépendant de la longueur d'onde, en λ^{-3}. Dans une cornée saine, la structure ordonnée des fibrilles attenue cet effet car l'interférence de la lumière diffusée par les fibrilles individuelle est constructive vers l'avant ; la cornée est donc transparente. Lorsqu'un œdème ou une autre pathologie engendre une perte de la régularité de cette structure, la cornée perd sa transparence. L'autre contribution à la diffusion de la lumière par le tissu cornéen est celle lié aux objets de taille comparable ou plus grande à la longueur d'onde, la diffusion « Mie ». Elle n'est que peu dépendante de la longueur d'onde. Dans une cornée saine, sa contribution est faible et liée aux kératocytes. Quand la cornée devient très œdémateuse, les lamelles de collagène se détachent localement et créent des « lacs », des régions dépourvues de fibrilles de collagène, qui contribuent à la diffusion. La dépendance totale en fonction de la longueur d'onde étant alors moins forte que dans le cas d'une cornée claire, mais toujours très prononcée.

Objectifs de la thèse

Les objectifs de ma thèse sont les suivants :

- Étendre les études de l'optique du tissu cornéen au tissu scléral en vue de l'opération du glaucome assistée par laser à impulsions ultra-rapides, ainsi que la réalisation d'études exploratoires sur le cristallin en vue de l'opération de la cataracte, puis mise en place d'une nouvelle méthode de caractérisation des tissus transparents ;

- Consolider les sources laser existantes, les caractériser en vue de leur optimisation notamment dans le but de maîtriser leur spectre d'émission et leur stabilité ; concevoir et réaliser de nouvelles architectures de sources laser ;
- Réaliser des expériences chirurgicales sur les tissus cornéen et scléral par laser femtoseconde et les analyser les résultats par histologie et microscopie électronique,
- Participer au développement d'un système d'imagerie *in situ* de tomographie par cohérence optique afin de contrôler le déroulement des expériences chirurgicales.

Résultats

Les résultats obtenus au cours de mon travail de thèse sont les suivants :

Mesures de transparence :

Nos mesures de transmission à travers la cornée montrent une fenêtre de relative transparence autour de 1650 nm permettant d'effectuer des interventions chirurgicales par laser ultra-rapide utilisant cette longueur d'onde même dans des cornées fortement œdémateuses.

L'existence d'une telle fenêtre a pu être confirmée pour la sclère, immergée dans le glycérol pour optimiser sa transmission optique. Cette observation ouvre la voie vers la chirurgie du glaucome assistée par laser ultra-rapide.

Pour le cristallin, les courbes de transmission suggèrent l'utilisation d'une longueur d'onde autour de 1200 – 1300 nm pour réduire la diffusion en pénétrant au mieux en profondeur dans le tissu.

Un dispositif permettant le calcul de la fonction de transfert optique de modulation (MTF) de tissus transparents a été mis en place, ayant donné lieu à un dépôt de brevet au sein du groupe[77] et à l'obtention d'un financement[78]. Un dispositif consolidé basé sur un « macroscope » commercial a été monté, potentiellement utilisable pour des mesures de caractérisation effectuées par des non-spécialistes comme le personnel de banques des yeux ou d'autres laboratoires.

[77]Brevet « Dispositif et procédé de mesure optique, de transmission et de diffusion de milieux oculaires», K. Plamann, F. Aptel, C. Crotti, F. Deloison, D.A. Peyrot., Demande de brevet prioritaire n° FR08/0056011 du 08/09/08Brevet FR n° FR 2 935 803, délivré le 12 mars 2010 Extensions en cours en Europe, aux US et au Japon.

[78]Programme ASTRE du Conseil général de l'Essonne (avec co-financement de la DRIP de l'École Polytechnique)

Développement de sources

J'ai poursuivi la mise en place et la caractérisation de la source basée sur la génération paramétrique à travers un cristal polarisé périodiquement, débutée dans le cadre du précédent projet de thèse de Florent Deloison.

J'ai notamment pu mettre en place une nouvelle configuration permettant l'amplification du signal en sortie en injectant un continuum colinéairement à la pompe dans ce cristal. Cette augmentation d'énergie rend possible l'utilisation de filtres passe-bandes afin de sélectionner une largeur spectrale raisonnable pour les découpes.

J'ai également mis en place une deuxième configuration qui consiste en deux cristaux successifs, permettant une amplification d'un facteur compris entre 2 et 3, et permettant également le contrôle par filtrage du spectre du signal émis.

Expériences chirurgicales

Les analyses systématiques des coupes histologiques ont permis de quantifier la profondeur de pénétration dans chacune des conditions de découpes par laser (longueur d'onde, ouverture numérique, cadence, durée d'impulsion). Le bénéfice obtenu en termes de profondeur de pénétration apparait clairement à la longueur d'onde 1650 nm, avec un gain d'un facteur compris entre 2 et 4 par rapport aux profondeurs obtenues à 1030 nm.

L'étude des découpes lamellaires sur cornée – en particulier par microscopie électronique à balayage – montre que la qualité d'interface est conservée, voire améliorée lors de l'utilisation de cette nouvelle longueur d'onde. L'énergie nécessaire pour la découpe d'un volet cornéen à 1650 nm n'est que de l'ordre de 2 µJ avec un pas de 2 µm pendant qu'à 1030 nm, la création d'un tel volet demande une énergie 4 fois plus forte et un pas deux fois plus faible. Cette amélioration dépasse même les prédictions faites sur la base des mesures de transparence et repose vraisemblablement sur des subtilités de l'interaction laser-tissu qui restent à élucider.

Sur le tissu scléral, l'utilisation de la longueur d'onde plus élevée permet aussi d'obtenir de meilleurs résultats en termes de profondeur de pénétration. Des incisions transfixiantes ont été obtenues en utilisant des impulsions de faible énergie. À l'heure actuelle il est délicat de tirer des conclusions définitives quant à la qualité de découpe - le tissu étant désordonné et lâche localement et donc difficile à analyser – mais il est sûr que les expériences réalisées sont encourageantes pour la poursuite de l'étude en vue de la mise en place d'un système d'opération du glaucome assistée par laser à impulsions ultra-brèves.

Imagerie par OCT

Avec nos partenaires du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique j'ai participé au développement d'un dispositif OCT pour le contrôle *in situ* en temps réel d'interventions chirurgicales par laser femtoseconde dans la sclère. Une étape importante a été le choix de la source, pour laquelle j'ai réalisé des expériences de génération de soliton à 1300 nm dans une fibre à cristal photonique ; j'ai également participé à la mise en place du logiciel de traitement d'images de ce dispositif.

Par ailleurs, des images de cornée ont été générées avec deux autres dispositifs : l'un commercial et disponible au laboratoire, l'autre développé à l'Institut de l'Optique. Les caractéristiques de ces différents systèmes ont ainsi été comparées. La meilleure résolution est obtenue avec l'OCT plein champ dont le temps d'acquisition reste trop long pour envisager une application *in vivo ;* en revanche l'acquisition se fait quasiment en temps réel grâce au dispositif OCT *swept-source* avec une résolution limitée pour l'application au traitement du glaucome. Le dispositif développé dans le cadre du projet NOUGAT devrait associer une meilleure résolution que ce dernier et un temps d'acquisition en accord avec l'imagerie *in vivo*.

Bilan et perspectives

Les mesures de transmission et les calculs de diffusion sur la cornée ont permis de mettre en évidence la fenêtre de relative transparence autour de 1650 nm, fenêtre existant aussi pour le tissu scléral immergé dans le glycérol. Expérimentalement, la profondeur de pénétration dans une cornée obtenue à 1650 nm est d'environ 500 µm alors qu'à 1030 nm, on a déterminé une profondeur de pénétration de l'ordre de 140 µm. Le gain obtenu grâce à ce décalage en longueur d'onde est proche de 4. Dans la sclère, il est également avantageux d'utiliser une telle longueur d'onde pour minimiser les effets secondaires sur le tissu.

Au cours de nos recherches nous et nos partenaires avons pu mettre en place des sources laser fournissant des impulsions à la longueur d'onde optimisée qui présentent les avantages d'être compacts et simples et sont donc utilisables pour une application clinique.

Plusieurs axes seront poursuivis par les futures recherches de notre équipe et de nos partenaires.

Le projet de thèse de Tal Marciano, actuellement en deuxième année, permettra d'approfondir les connaissances dans le domaine de la transparence et la diffusion dans les tissus du segment antérieur de l'œil, notamment grâce à des expériences d'holographie numérique permettant de quantifier l'incidence des propriétés de cornées et cristallins sains et pathologiques sur le maintien – ou la perte – de la cohérence de la lumière les traversant et sur l'acuité visuelle. Ces expériences pourront être étendues à des tissus ayant subi une intervention chirurgicale pour évaluer la diffusion induite par une interface lamellaire de bonne et moins bonne qualité.

Le travail sur les sources laser sera poursuivi au cours du travail de doctorat d'Asad Hussain. Les expériences chirurgicales sur cornée et sclère seront poursuivies et étendues au cristallin dont l'étude des propriétés et mécanismes de transparence constituera une majeure activité de recherche du groupe.

L'ajout d'un système d'imagerie *in situ* pour un dispositif laser multimodal permettrait d'accroître la sécurité – déjà importante – de ces systèmes lasers de découpe et la supervision plus confortable par l'ophtalmologiste. Il est possible d'envisager un outil « crayon » que le spécialiste pourrait tenir en main, loin du patient, pendant que l'acte est réalisé dans les trois dimensions par un système robotisé.

Annexe 1 : Analyse de Fourier et Vecteur de diffusion

L'analyse d'une image permet d'extraire un certain nombre d'informations et notamment de répondre à la question de savoir si le tissu imagé est sain ou pathologique dans notre application. Cette analyse est utilisée dans de nombreux domaines comme le contrôle qualité par exemple.
Dans ce cas, l'analyse est locale, car elle ne concerne que le stroma cornéen ou scléral.
Lorsqu'on regarde une image présentant la structure de ce stroma cornéen ou scléral, c'est bien la « texture » que l'on cherche à mettre en évidence. Cette texture correspond à la répétition d'un même motif dans différentes directions de l'espace.
Il existe plusieurs méthodes d'analyse de la structure et celle qui nous intéresse ici est la méthode par transformation de Fourier, méthode statistique.

La transformée de Fourier (TF) permet de passer de la représentation dans le domaine spatial à une représentation dans le domaine fréquentiel.
Pour un signal 2D discret A(a,b), la TF est exprimée selon :

$$F(u,v) = \sum_{m=-\infty}^{+\infty} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} A(m,n) \cdot e^{-2i\pi(mu+nv)}$$

L'image n'existe que sur un support borné et on peut alors écrire :

$$F(u,v) = \frac{1}{M \cdot N} \sum_{m=0}^{M-1} \sum_{n=0}^{N-1} A(m,n) \cdot e^{-2i\pi(\frac{mu}{M}+\frac{nv}{N})}$$

Le spectre de Fourier correspond au module de ce terme, lorsqu'on ne souhaite pas récupérer les informations contenues dans la phase.

La transformée de l'image le plan de Fourier permet de savoir s'il existe une périodicité ou un motif qui pourrait apparaitre dans l'image (Figure a-1).

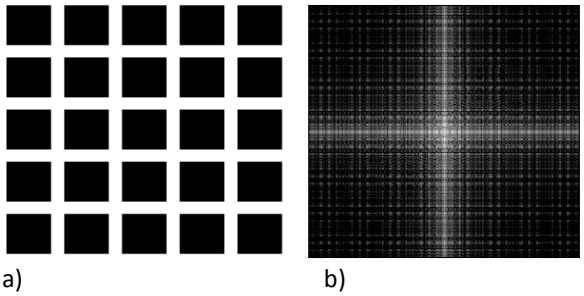


Figure a-1 Image a) et sa transformée de Fourier b) par ImageJ.

De plus, à partir de la transformée de l'image, on peut retrouver les informations de l'image. La partie centrale de la transformée permet d'avoir accès (par transformée inverse) aux basses fréquences de l'image, autrement dit l'image avec un mauvais contraste. En effaçant les pixels centraux, la partie périphérique permet d'avoir accès (par transformée inverse) aux hautes fréquences de l'image (Figure a-2). La somme des deux images correspond bien à l'image initiale.

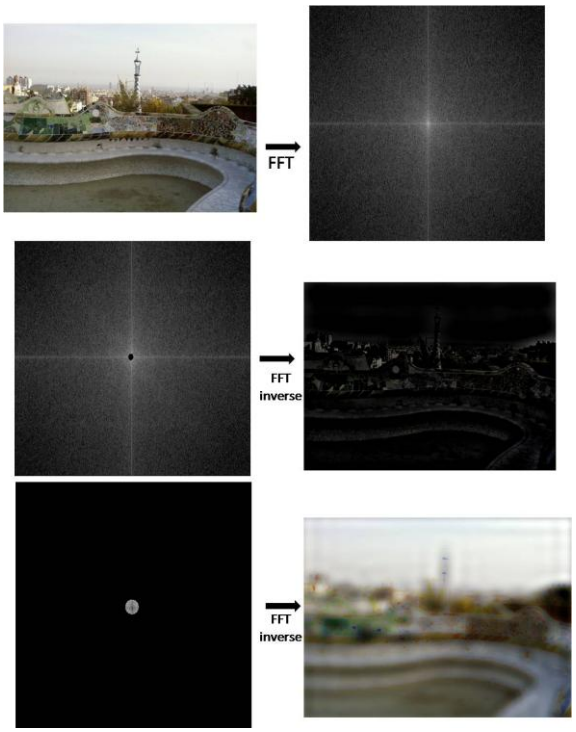


Figure a-2 Image d'origine et transformée de Fourier (haut), image obtenue par transformée inverse de la partie centrale de la FFT (milieu) et image obtenue par transformée inverse de la FFT sans la partie centrale (bas).

Si on définit le vecteur de l'onde incidente par $\boldsymbol{k_0}$, le vecteur de l'onde diffusée par $\boldsymbol{k}$, alors le vecteur de diffusion est noté $\boldsymbol{K = k_0 - k}$. $\boldsymbol{k_0}$et $\boldsymbol{k}$ ont pour norme$2\pi/\lambda$.On peut alors représenter ces vecteurs :

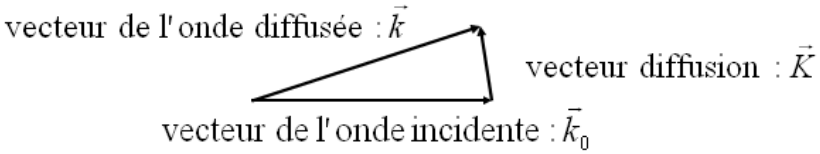


Figure a-3 Schéma des vecteurs d'onde [15].

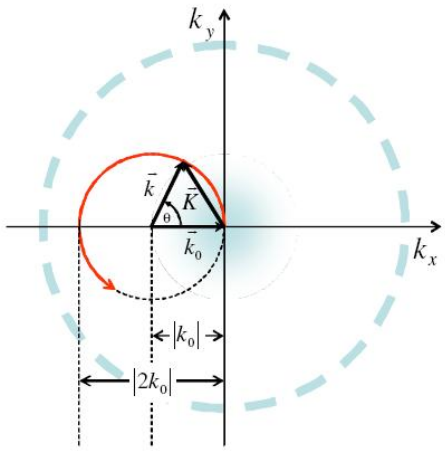


Figure a-4 Schéma du vecteur diffusion dans l'espace de Fourier [15].

Annexe 2 : Les impulsions ultracourtes

Afin de décrire les impulsions ultracourtes, commençons par rappeler l'expression de l'enveloppe gaussienne $A(t)$et le champ une onde électromagnétique $\varepsilon(t)$, d'amplitude E_0oscillant à la fréquence centrale ω_0, où t est le temps et τ la durée de l'impulsion [138,139]:

$$\boldsymbol{A(t) = E_0 . e^{-\left(\frac{t^2}{\tau^2}\right)}} \quad \textbf{(a-1)}$$

$$\boldsymbol{\varepsilon(t) = E_0 . e^{-\left(\frac{t^2}{\tau^2}\right)} . e^{-i\omega_0 t}} \quad \textbf{(a-2)}$$

On peut alors en déduire l'expression de l'intensité lumineuse, avec I_0 est l'intensité crête exprimée par $I_0 = 2.\frac{{E_0}^2}{\eta_0}$ et η_0 l'impédance du vide $\eta_0 = \sqrt{\frac{\mu_0}{\varepsilon_0}}$:

$$\boldsymbol{I(t) = \frac{1}{2\eta_0}|\varepsilon(t)|^2 = I_0 . e^{-2\left(\frac{t^2}{\tau^2}\right)} = I_0 . e^{-2\left(\frac{t}{\tau}\right)^2}} \quad \textbf{(a-3)}$$

Ainsi, τ peut directement être relié à la largeur à mi-hauteur (« *Full Width Half Maximum* » en anglais) temporelle $\Delta t_{\frac{1}{2}}$et au temps mis à l'impulsion pour décroître à une intensité à $1/e^2 \Delta t_{1/e^2}$de l'impulsion par les relations :

$$\boldsymbol{\Delta t_{\frac{1}{2}} = \tau . \sqrt{2 \ln 2}}, \quad \textbf{(a-4)}$$

$$\boldsymbol{\Delta t_{1/e^2} = 2\tau} \quad \textbf{(a-5)}$$

Si l'on souhaite passer dans l'espace de Fourier à partir de l'espace du temps ou inversement, on peut écrire :

$$\boldsymbol{\varepsilon(\omega) = \mathcal{F}[\varepsilon(t)] = \int_{-\infty}^{+\infty} \varepsilon(t) . e^{i\omega t} . dt} \quad \textbf{(a-6)}$$

$$\boldsymbol{\varepsilon(t) = \mathcal{F}^{-1}[\varepsilon(\omega)] = \frac{1}{2\pi} . \int_{-\infty}^{+\infty} \varepsilon(\omega) . e^{i\omega t} . d\omega} \quad \textbf{(a-7)}$$

En remplaçant l'expression de $\varepsilon(t)$dans l'équation donnant $\varepsilon(\omega)$, on obtient :

$$\boldsymbol{\varepsilon(\omega) = \mathcal{F}\left[E_0 . e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^2} . e^{-i\omega_0 t}\right]} \quad \textbf{(a-8)}$$

Soit un produit de convolution de deux transformées de Fourier :

$$\boldsymbol{\varepsilon(\omega) = \frac{E_0}{2\pi} . \mathcal{F}[e^{-\left(\frac{t}{\tau}\right)^2}] \otimes \mathcal{F}[e^{-i\omega_0 t}]} \quad \textbf{(a-9)}$$

Autrement écrit :

$$\boldsymbol{\varepsilon(\omega) = \frac{E_0}{2\pi} . \tau\sqrt{\pi} . e^{-\frac{\tau^2 . \omega^2}{4}} \otimes 2\pi\delta(\omega - \omega_0)} \quad \textbf{(a-10)}$$

Ou encore

$$\boldsymbol{\varepsilon(\omega) = E_0 . \sqrt{\pi} . \tau . e^{-\frac{\tau^2 . (\omega - \omega_0)^2}{4}}} \quad \textbf{(a-11)}$$

En effet, la transformée de Fourier d'une quantité gaussienne dans l'espace temporel demeure une quantité gaussienne dans l'espace des fréquences. On peut ainsi écrire l'intensité spectrale :

$$\boldsymbol{I(\omega) = \frac{2}{\eta_0} . |\varepsilon(\omega)|^2 = \frac{2\pi}{\eta_0} . {E_0}^2 . \tau^2 . e^{-\frac{\tau^2 . (\omega - \omega_0)^2}{2}}} \quad \textbf{(a-12)}$$

$$\boldsymbol{I(\omega) = I_0.\pi.\tau^2.e^{-\frac{\tau^2.(\omega-\omega_0)^2}{2}}} \quad \textbf{(a-13)}$$

On peut alors définir la largeur spectrale à mi-hauteur $\Delta\omega_{\frac{1}{2}}$:

$$\boldsymbol{\Delta\omega_{\frac{1}{2}} = \frac{1}{\tau}.\sqrt{8\ln 2}} \quad \textbf{(a-14)}$$

Pour une impulsion de forme gaussienne, le produit de la largeur à mi-hauteur temporelle avec la largeur à mi-hauteur spectrale doit toujours être supérieur ou égal à une valeur particulière :

$$\boldsymbol{\Delta t_{\frac{1}{2}}.\Delta\omega_{\frac{1}{2}} \geq 4\ln 2} \quad \textbf{(a-15)}$$

L'inégalité de Heisenberg est une généralisation de cette dernière obtenue pour les ondes classiques.

Quand l'égalité est vérifiée, l'impulsion est à la limite de Fourier, il n'est pas possible pour le même spectre d'obtenir une impulsion plus courte temporellement pour le même spectre. Lorsque les impulsions sont d'une durée de l'ordre de la femtoseconde, leur spectre ne peut plus être considéré comme fin. Par exemple, pour une impulsion de 100 fs limitée par transformée de Fourier, la largeur spectrale est de l'ordre de 6 nm.

Pour de telles impulsions traversent un milieu transparent dont l'indice optique dépend de la longueur d'onde, il est nécessaire de prendre en compte la dispersion de la vitesse de groupe $T(\omega)$, qui conduit à la distorsion de phase et finalement à l'augmentation de la durée d'impulsion.

$$\boldsymbol{T(\omega) = \frac{d\phi(\omega)}{d\omega}} \quad \textbf{(a-16)}$$

Afin de prendre en compte les différents effets intervenant lors de la propagation, on peut utiliser un développement de Taylor pour exprimer la phase spectrale de l'impulsion $\phi(\omega)$:

$$\boldsymbol{\phi(\omega) = \phi_0 + \left(\frac{d\phi}{d\omega}\right)_{\omega=\omega_0}(\omega-\omega_0) + \frac{1}{2}\left(\frac{d^2\phi}{d\omega^2}\right)_{\omega=\omega_0}(\omega-\omega_0)^2 + \frac{1}{6}\left(\frac{d^3\phi}{d\omega^3}\right)_{\omega=\omega_0}(\omega-\omega_0)^3 + o(\omega^4)} \quad \textbf{(a-17)}$$

La dispersion de la vitesse de groupe s'écrit :

$$\boldsymbol{T(\omega) = \left(\frac{d\phi}{d\omega}\right)_{\omega=\omega_0} + \left(\frac{d^2\phi}{d\omega^2}\right)_{\omega=\omega_0}(\omega-\omega_0) + \frac{1}{2}\left(\frac{d^3\phi}{d\omega^3}\right)_{\omega=\omega_0}(\omega-\omega_0)^2 + \cdots} \quad \textbf{(a-18)}$$

Le premier terme de l'équation ci-dessus est un terme constant de retard et n'induit pas de modifications de l'impulsion, contrairement aux autres termes de l'équation. En particulier, le terme $\frac{d^2\phi}{d\omega^2}$ est appelé la dispersion de vitesse de groupe et dépend de la longueur d'onde. C'est ce terme qui est responsable de l'allongement de la durée d'impulsion de l'onde.

Liste des publications de l'auteur

C. Crotti, F. Deloison, F. Alahyane, F. Aptel, L. Kowalczuk, J.-M. Legeais, D.A. Peyrot, M. Savoldelli, K. Plamann, "Wavelength optimisation in femtosecond laser cornealsurgery", *Journal of Ophthalmology* 2011 (soumis).

C. Crotti, F. Deloison, D.A. Peyrot, F. Aptel, F. Alahyane, L. Kowalczuk, T. Marciano, K. Plamann, M. Savoldelli, J.-M. Legeais, "New compact femtosecond laser source for penetrating keratoplasty at 1.65 μm", Proc. SPIE ECBO, paper No.8092-1G (2011).

D.A. Peyrot, F. Aptel, C. Crotti, F. Deloison, S. Lemaire, T. Marciano, S. Bancelin, F. Alahyane, L. Kowalczuk, M. Savoldelli, J.-M. Legeais, K. Plamann, "Effect of Incident Light Wavelength and Corneal Edema on Light Scattering and Penetration: Laboratory Study of Human Corneas", *Journal of Refractive Surgery*, 2010, **26**(10):786-795.

K. Plamann, F. Aptel, C. 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 and M.Savoldelli "Ultrashort pulse laser surgery of the cornea and the sclera", *Journal of Optics* **12** (2010), 084002 (30pp).

C. Crotti, F. Deloison, D.A. Peyrot, M. Savoldelli, J.-M. Legeais, F. Roger, K. Plamann, "Wavelength optimisation in femtosecond laser corneal surgery: experimental results", Proc. SPIE ECBO, paper No.7373-24 (2009).

A. Cotel, C. Crotti, P. Audebert, C. Le Bris, and C. Le Blanc, "Tiled-grating compression of multi-Terawatt laser pulses", *Optic Letters*,**32**(12), 1749-51 (2007).

Références

[1] Kowalczuk L « Applications de l'électrotransfert à l'étude des maladies oculaires inflammatoires et angiogéniques », Centre de Recherche des Cordeliers – UMR S 872. Équipe 17 : Physiopathologie des maladies oculaires : innovations thérapeutiques (sous la direction du Pr. Béhar-Cohen). École Doctorale ABIES : Agriculture, Alimentation, Biologie, Envrionnement, Santé (ED 0435), 2010.

[2] Deloison F « Greffe de cornée automatisée assistée par laser femtoseconde optimisé en longueur d'onde », Thèse de doctorat, École doctorale de l'École Polytechnique, 2010.http://pastel.archives-ouvertes.fr/docs/00/57/72/21/PDF/thA_se_Florent_Deloison.pdf

[3] « Chapter 2 : Sclera », Jody A. Rada, Janell M. Jonhson, Cornea.

[4]http://www.snof.org/maladies/imagesmaladie/anatphoto.jpeg.

[5]Leonard DW and Meek KM. "Refractive indices of the collagen fibrils and extrafibrillar material of the corneal stroma". 1997, *Biophysical Journal*, 72:1382-87.

[6] Robert L, Legeais JM, Robert AM, Renard G, « Corneal collagens », 2001, *PatholBiol*; **49** 353-63.

[7] http://fr.wikipedia.org/wiki/Image:Cornea_endothelium_specular.jpg.

[8] Nuzzo V, "Mechanisms of femtosecond laser-cornea interaction in keratoplasty", Thèse de doctorat, École Doctorale de l'École Polytechnique, 2008.

[9] G.M. Hale, M.R. Querry, *Appl. Opt*. **12** (1973) 555.

[10] Potts AM, Friedman BC "Studies on corneal transparency" *AM. J Ophthalmolgy* 1959; **48** 480-487.

[11] Maurice DM "The structure and transparency of the cornea" *J Physiol* 1957; 136 263-286.

[12] Vaezy S, Clark JI " A quantitative analysis of transparency in the human sclera and cornea using Fourier methods", J Microsc 1990; 163:185.

[13] Benedek GB "Theory of transparency of the eye" *App Optics* 1971 **10** 459-473.

[14] R.W. Hart, R.A. Farrell. Light scattering in the cornea.*J. Opt. Soc. Am*. 1969;59:766-74.

[15] Plamann K *et al.* 2010, "Ultrashort pulse laser surgery of the cornea and the sclera" *J Opt***12** 084002.

[16] Plamann K, Aptel F,Crotti C,Deloison F,Peyrot DA, « Dispositif et procédé de mesure optique, de transmission et de diffusion de milieux oculaires, » Demande de brevet prioritaire n° FR08/0056011 du 08/09/08Brevet FR n° FR 2 935 803, délivré le 12 mars 2010 Extensions en cours en Europe, aux US et au Japon.

[17] van de Hulst "Light scattering by small particles" New Dover Publications Inc, New York, 1984.

[18] Kokhanovsky AA "Light schatteringmediaoptics" 3rd Edition, Springer, Berlin, Heidelberg, 2004.

[19] Bohren CF, Huffman D "Absorption of light by small particles" Wiley VCH, Weinheim, Berlin, Darmstadt und Zürich, 2004.

[20] http://ophtazone.no-ip.com/Anatomie/sclera.htm, dernière consultation en aout 2011.

[21] A.N. Bashkatov, V.V. Tuchin, E.A. Genina, Yu.P. Sinichkin, N.A. Lakodina, V.I. Kochubey "The human sclera dynamic spectra: in vitro and in vivo measurements", SPIE Conference on Ophthalmic Technologies IX, Vol. 3591.

[22] Alexey N. Bashkatov, Elina A. Genina, Vyacheslav I. Kochubey, and Valery V. Tuchin "Estimation of wavelength dependence of refractive index of collagen fibers of scleral tissue", SPIE Vol. 4162.

[23] Yammamoto S, Hitomi J, Shigeno M, Sawaguchi S, Abe H, UshikiT,"Atomic force microscope studies of isolated collagen fibrils of the bovine cornea and sclera". 1997 *Arch. Histol.Cytol.***60**, 371–378.
[24] Clark IJ, "Fourier and power law analysis of structural complexity in cornea and lens", *Micron* 32 (2001) 239-249.
[25] http://www.vetopsy.fr/sens/visu/tun3.php, dernière consultation en aout 2011.
[26] http://www.suite101.com/content/eye-lens-structure-functions-and-eye-accommodation-a266542, dernière consultation en aout 2011.
[27] http://www.vetopsy.fr/sens/visu/oeil2_cristallin.php, dernière consultation en aout 2011.
[28] http://www.mda-sy.com/pathology/HISTHTML/NORMAL/NORM012.HTM.
[29] http://www.oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/pages/v1/ch071a/004f.html.
[30] Donaldson P, Kistler J, Mathias RT. "Molecular solutions to mammalian lens transparency". *News Physiol Sci.* 2001 **16**:118-23.
[31] Mathias RT, Rae JL. "The lens: local transport and global transparency".*Exp Eye Res*. 2004 **78**(3):689-98.
[32] Schachar RA. The mechanism of accommodation and presbyopia.*International Ophthalmology Clinics.*46(3): 39-61, 2006.
[33] http://claire.guyot.free.fr/notion%20d%27espace%20.htm, dernière consultation en aout 2011.
[34] Trokel S « The physical basis for transparency of the crystalline lens » IOVS 1962 1 :493-501.
[35] Bettleheim FA, « Physical basis of lens transparency" in The ocular lens: structure, function ans pathology. 1985:265-300.
[36] Philipson B, "Changes in lens related to the reduction of transparency" *Exp Eye Res* 1973, 16:29.
[37] Delaye M, Tardieu A "Short range order of crystalline proteins accounts for eye lens transparency" *J MolBiol* 1989, 205:713.
[38] Boettner EA, Wolter JR « Transmission of the ocular media » ,*IOVS* 1962, 1 :776-783.
[39] Lerman S "Lens transparency and aging".
[40] Boulton ME, Saxby L " Basic science of the lens: biophysics" *Ophthalmology* 2004; 249-252.
[41] Gisselberg M, Clark JI, Vaezy S, Osgood TB "A quantitative evaluation of Fourier components in transparent and opaque tissue*" Am J Anat* 1991; 16:197.
[42] Vaezy S, Clark JI, Clark JM "Fourier Analysis of two structures in opacifying mouse lens" PROC ICEM.
[43]http://medecine.univ-lille2.fr/pedagogie/contenu/mod-transv/module08/item127/2002-12le12greffe-cornee.pdf.
[44] Dana MR, Qian Y, Hamrah P "twenty five years panorama of corneal immunology : emerging concepts in the immunopathogenesis of microbial keratitis, peripheral ulcerative keratitis ans corneal transplant rejection" *Cornea* (2000), 19:625-643.
[45] Ing JJ, Ing HH, Nelson NRet al., "Ten year postoperative results of penetrating keratoplasty" *Ophthalmology (*1998), 105:1855-1865.
[46] InoueK, Amano S, Oshika T et al. « A ten year review of penetrating keratoplasty » *Jpn J Ophthalmol* (1988) 44 :139-145.
[47] http://medgadget.com/2005/12/the_gift_of_sig.html, dernière consultation en aout 2011.
[48] Agence de la biomédecine, http://www.ecosante.fr/index2.php?base=DEPA&langh=FRA&langs=FRA.
[49] Pels E, Beele H, Claerhout I. Eye bank issues: II. Preservation techniques: warm versus cold storage. *IntOphthalmol.* 2008 Jun;28(3):155-63.

[50] Jeng BH. Preserving the cornea: corneal storage media.*CurrOpinOphthalmol.* 2006Aug;17(4):332-7.
[51] Aptel F, « Chirurgie du glaucome assistée par laser femtoseconde », Rapport de stage de master 2, 2008.
[52] Aptel F, Olivier N, Deniset-Besseau A, Legeais JM, Plamann K, Schanne-Klein MC and Beaurepaire E, 2010, "Multimodal nonlinear imaging of the human cornea," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.***51** (5) : 2459-2465.
[53] Llobet A. *et al*., **"**Understanding Trabecular Meshwork Physiology: A Key to the Control of Intraocular Pressure?**"** *Physiology* 2003, 18 :205-209.
[54] http://medecine.univ-lille2.fr/pedagogie/contenu/mal-gd-syndr/item240/2002-12le13glaucome.pdf.
[55]http://www.hassante.fr/portail/upload/docs/application/pdf/depistage_et_diagnostic_precoce_du_glaucome___problematique_et_perspectives_en_france_rapport.pdf
[56] Baudouin C, Labbé A, El MaftouhiA,Hamard P, « Application de l'OCT du segment antérieur dans l'étude des glaucomes »,*J Fr. Ophtalmol.* , 2008, 31, 6, Cahier 2, 2S5-2S9.
[57] Pharmacologie B.P. Par Denis Stora.
[58] Nordmann JP, J Fr. Ophtalmol., 2008, 31(6) Cahier 2, 2S69-2S73 « Place de la trabeculoplastie sélective dans la stratégie thérapeutique ».
[59] Wise JB, Witter SL. *Arch Ophthalmol*1979 ; 97 :319-22
[60] Sellem E, http://www.em-consulte.com/article/111524 « La trabéculoplastie a-t-elle encore des indications ? »
[61] Kramer TR, Noecker RJ, *Ophthalmology* 2001; 108:773- 779.
[62]Hong BK, Winer JC, Martone JF, Wand M, Altman B, Shields B, *J Glaucoma*.2009 ; 18(3):180-3 « Repeat selective laser trabeculoplasty ».
[63] EuropeanGlaucoma Society. Guide pour les glaucomes. 2ème édition 2003.http://www.eugs.org/preview/fra.pdf.
[64] Programme de médicalisation des systèmes d'information. Base nationale 2005.http://stats.atih.sante.fr/cgi-bin/.html, dernière consultation en aout 2011.
[65] Schwartz KS, Lee RK, Gedde SJ "Glaucoma drainage implants : acriticalcomparison of types", *CurrOpinOhthalmol* 2006; 17(2) 181-9.
[66] Mermoud A, « Chirurgie combinée cataracte et glaucome : phaco-émulsification et chirurgie non pénétrante », *Bull. Soc. belgeOphtalmol.*,**rapport**, 59-64, 2000.
[67] Valtot F, Denis P, « Le traitement des échecs de la chirurgie filtrante dans le glaucome par les ultrasons(Sonocare) » Ophtalmologie 1990; 4 | 142-144.
[68] Aptel F, Charrel T, Palazzi X, Chapelon JY, Denis P, LafonC"Histologiceffects of a new device for high-intensity focused ultrasound cyclocoagulation", (2010)**51**(10):5092-8.
[69] Assia EI, Rotenstreich Y, Barequet IS, Apple DJ, Rosner M, Belkin M 'Experimental studies on nonpenetrating filtration surgery using the CO2 laser', *Graef's Arch ClinExpOphtalmol* (2007).
[70] Ton Y, Geffen N, Kidron D, Degani J, Assia EI., *J Glaucoma*.2011 Mar 16. "CO2 Laser-assisted Sclerectomy Surgery Part I: Concept and Experimental Models",
[71] http://www.ioptima.co.il/apage/39700.php, dernière consultation en aout 2011.
[72] Sacks ZS, Kurtz RM, Juhasz T and Mourou GA, 2002 « High precision subsurface photodisruption in human sclera » *J Biomed Opt***7** (3) 7442-50.
[73] Sarayba MA, Juhasz T, Chuck RS, Ignacio TS, Nguyen TB, Sweet P and Kurtz RM, 2005 *Cornea***24** 328-33.
[74] Sacks ZS, Kurtz RM, Juhasz T and Mourou GA "Femtosecond subsurface photodisruption in scattering tissues using long infrared wavelengths" 2001 *Proc SPIE*, Vol 4241 pp 98-111.

[75] Sacks ZS, Kurtz RM, Juhasz T, Spooner G and Mourou GA 2003 *Ophthalmic Surg Lasers Imaging***34** 104-13.
[76] http://www.technolaspv.com/dasat/images/9/100729-technolas-workstation-520f-brochure.pdf.
[77] http://www.gatinel.com/chirurgie-de-la-cataracte/techniques-chirurgicale/,dernière consultation en aout 2011.
[78] http://www.optikon.com/en/assistant.asp**,** dernière consultation en aout 2011.
[79] *La chirurgie de la cataracte en France*, l'Assurance Maladie, septembre 2008
[80] T. H. Maiman *Nature* **187**, 493–494; 1960.
[81] Maria, A.J., *et al.*; *Self mode-locking of lasers with saturable absorbers*, Appl. Phys. Lett.8, 1966, p. 174–176.
[82] Juhasz, T.; Kurtz, R.; Horvath, C.; Suarez, C.; Raksi, F.; Spooner, G.; *The Femtosecond Blade: Applications in Corneal Surgery*, Optics & Photonics News, Jan 2002, p. 24-29
[83] http://www.ophtalis.tm.fr**,** dernière consultation en aout 2011.
[84] Moshirfar M, Gardiner JP, Schliesser JA, Espandar L, Feiz V, Mifflin MD, Chang JC. « Laser in situ keratomileusis flap complications using mechanical microkeratome versus femtosecond laser: retrospective comparison".2010 *J Cataract Refract Surg*.**36**(11):1925-33.
[85] Jones YJ, Goins KM, Sutphin JE, Mullins R, Skeie JM."Comparison of the femtosecond laser (IntraLase) versus manual microkeratome (Moria ALTK) in dissection of the donor in endothelial keratoplasty: initial study in eye bank eyes" 2008 *Cornea*. **27**(1):88-93.
[86]Muñoz G, Albarrán-Diego C, Ferrer-Blasco T, García-Lázaro S, Cerviño-Expósito "A. Long-term comparison of corneal aberration changes after laser in situ keratomileusis: mechanical microkeratome versus femtosecond laser flap creation".2010 *J Cataract Refract Surg*.**36**(11):1934-44.
[87] http://www.lensxlasers.com/pdfs/Clinical_Knorz.pdf.
[88] Nagy Z, Takacs A, Filkorn T and Sarayba M, Initial Clinical Evaluation of an Intraocular Femtosecond Laser in Cataract Surgery, 2009,*J Refract Surg*. **25**:1053-1060.
[89] Peyrot DA*et al.*, "Effect of Incident Light Wavelength and Corneal Edema on Light Scattering and Penetration: Laboratory Study of Human Corneas", *J Refract Surg*. 2010;**26**(10):786-795.
[90] Borderie VM, Baudrimont M, Lopez M, Carvajal S, Laroche L, 1997, Evaluation of the deswelling period in dextran-containing medium after corneal organ culture, *Cornea***16**(2):215-23.
[91] Zhao M, Thuret G, Piselli S, Pipparelli A, Acquart S, Peoc'h M, Dumollard JM, Gain P, 2008 "Use of poloxamers for deswelling of organ-cultured corneas", *Invest Ophthalmol Vis Sci*.**49**(2):550-9.
[92] Thuret G, Manissolle C, Campos-Guyotat L, Guyotat D, Gain P, 2005 "Animal compound-free medium and poloxamer for human corneal organ culture and deswelling"*Invest Ophthalmol Vis Sci.* **46**(3):816-22.
[93] Sanchez I, Martin R, Ussa F and Fernandez-Bueno I, 2011 "The parameters of the porcine eyeball", *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.*
[94] Sacchet D, thèse de doctorat « Tomographie par cohérence optique plein champ linéaire et non linéaire », École Doctorale STITS, 2010.
[95] Tanaka Y, Kubota A, Yamato M, Okano T, Nishida K, 2011 "Irreversible optical clearing of sclera by dehydration and cross-linking".
[96] Kennedy PK 1995 IEEE J. Quantum Electron.**31** 2241-49.
[97] Liu W, Kosareva O, Golubtsov IS, Iwasaki A, Becker A, Kandidov VP and Chin SL, 2003 *Appl Phys B* **76** 215-29.
[98] Kolesik M, Katona G, Moloney JV and Wright EM 2003 *Phys Rev Lett* **91** 043905.

[99] Arnold CI, Heisterkamp A, Ertmer W and Lubatschowski H 2005 *Apply Phys B***80** 247-53.
[100] Couairon A, Sudrie L, Franco M, Prade B and Mysyrowicz A 2005 *Phys Rev B***71** 125435.
[101] Williams F, Varma SP and Hillenius S 1976 *J ChemPhys* **64** 1549-54.
[102] Vogel A, Noack J, Huttman G and Paltauf G 2005 *ApplPhys B***81** 1015-47.
[103] De Michelis C 1969 IEEE *J Quantum Electron***5** 188-202.
[104] Bloembergen N 1974 IEEE *J Quantum Electron* **10** 375-86.
[105] Stuart BC, Feirt MD, Rubenchik AM, Shore B and Perry MD 1995 *Phys Rev Lett***74** 2248-2251.
[106] Quere F, Guizard S and Martin P, 2001, *Europhys Lett.* **56** 138-44.
[107] Keldysh LV 1965 *SovPhysJEPT* **20** 1307-14.
[108] Rethfeld B 2004, Phys Rev Lett 92 147401.
[109] Rethfeld B 2006, Phys Rev B 73 035101.
[110] Arnold CL, Heisterkamp A, Ertmer W and Lubatschowski H, 2007 *Opt Express* **15** 10303-17.
[111] Arnold CL, Heisterkamp A and Lubatschowski H, 2009 *J L M N***4** 39-44.
[112] Couairon A and Mysyrovicz A, "Femtosecond filamentation in transparent media", 2007 *Physics Reports* **441** 47-189.
[113] Maatz G, Heisterkamp A, Lubatschowki H, Barcikowski S, Fallnich C, Welling H and Ertmer W, 2000 *J Opt A***2** 59-64.
[114] Sudrie L, Couairon A, Franco M, Lamouroux B, Prade B, Tzortzakis S and Mysyrovicz A, 2002 *Phys Rev Lett* **89** 1766601.
[115] Marburger JH 1975 *Prog Quant Elecr* **4** 35-110.
[116] Fibich G and Gaeta AL 2000 *Opt Lett* **25** 335-7.
[117] Luther GG, Moloney JV, Newell AC, Wright EM 1994 *Opt Lett* **19** 862-4.
[118] Ilkov FA, Ilkova LS and Chin SL, 1993 *Opt Lett* **18** 681-3.
[119] Nguyen NT, Salimia A, Liu W, Chin SL and Vallée R, 2003 *Opt Lett* **28** 1591-3.
[120] Ashcom JB, Gattass RR, Schaffer CB and Mazure E 2006 *Opt Express* **23** 2317-22.
[121] Heisterkamp A, Ripken T, Mamon T, Drommer W, Welling H, Ertmer W and Lubaschowki H, 2002 *ApplPhys B* **74** 419-25.
[122] Bukarov IM, Bulgakova NM, Stoian R, Mermillod-Blondin A, Audouard E, Rosenfeld A, Husakou A and Hertel IV, 2007 *J ApplPhys* **101** 043506.
[123] Brodeur A and Chin SL, 1998 *Phys Rev Lett* **80** 4406-08.
[124] Dubietis A, Tamosauskas G, Diomin I and Varanavicius A, 2003 *OptLett* **28** 1269-71.
[125] Ranka JK, Schirmer RW and Gaeta AL, 1996 *Phys Rev Lett* **77** 3783-6.
[126] Diddams SA, Eaton HK, Zozulya AA and Clement TS, 1998 *Opt Lett* **23** 379-81.
[127] Stuart BC, Fait MD, Herman S, Rubenchik AM, Shore BZ and Perry MD, 1996 *Phys Rev B* **53** 1749-61.
[128] Du D, Liu X, Korn G, Suier J and Mourou G, 1994 *Appl Phys Lett* **64** 9071-3.
[129] Loesel FH, Niemz JF, Bille MH and Juhasz T, 1996 *IEEE J Quantum Electron* **32** 1717-22.
[130] Lenzner M, Krüger J, Sartania S, Cheng Z, Spielmann C, Mourou G, Kautek W and Krausz F, 1998 *Phys Rev Lett* **80** 4076-9.
[131] Tien AC, Backus S, Kapteyn H, Murnane M and Mourou G, 1999 *Phys Rev Lett* **82** 3883-6.
[132] Kim BMn Fait MD, Rubenchik AM, Joslin E, Celliers PM, Eichler J and Da Silva LB, 2001 *J Biomed Opt* **6** 332-8.
[133] Jia TQ, Xu ZZ, Li XX, Li RX, Suai B and Zhai FL, 2003 *ApplPhysLett***82** 4382-4.

[134] Giguére D, Olivié G, Vidal F, Toetsch S, Girard G, Ozaki T, Kieffer JC, Nada O and Brunette I, 2007 *J Opt Soc Am A* **24** 1562-8.
[135] Sun H, Han M, Niemz MH and Bille JF, 2007 *Lasers in surgery and medicine***39** 654-8.
[136] Vogel A, Linz N, Freidank S and Paltauf G, 2008 *Phys Rev Lett***100** 038102.
[137] Olivié G, Giguére D, Vidal F, Ozaki T, Kieffer JC, Nada O and Brunette I, 2008 *Opt Express***16** 4121-9.
[138] "Femtosecond Laser Pulses, Principles and Experiments", Rulllière C, Springer,1998.
[139]Nuzzo V, Thèse de Doctorat « Mechanisms of femtosecond laser-cornea interaction in keratoplasty », ÉcoleDoctorale de l'ÉcolePolytechnique, 2008.
[140] Strickland D and Mourou G, *Compression of amplified chirped optical pulses*, Opt. Comm. 56, 219 (1985).
[141]Cotel A, « Réseaux de diffraction à multicouches diélectriques pour la compression d'impulsions laser Petawatt par mosaïque de réseaux », Thèse de Doctorat, École Doctorale de l'École Polytechnique (2007).
[142] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/a/ae/Chirped_pulse_amplification.png,dernière consultation en aout 2011.
[143] Roser F, Rothhard J, Ortac B, Liem A, Schmidt O, Schreiber T, Limpert J and Tunnermann A, *Opt. Lett*. 30 2754-6 (2005)
[144] Roser F, Eidam T, Rothhardt J, Schmidt O, Schimpf DN, Limpert J and Tunnermann A, *Opt. Lett*. 32 3495-7 (2007).
[145] Saleh BEA, Teich MC, « Fundamentals of Photonics » Wiley, Hardcover, 2007.
[146] Amstrong J. A., Bloembergen N., Ducuing J. etPershan P.S., "Interactions between light waves in nonlinear dielectric", *Phys. Rev. **21*** (1962) 1918-1939.
[147] Forget N,« Des amplificateurs laser aux amplificateurs paramétriques : études de l'amplification paramétrique à dérive de fréquence et du blocage de modes dans les oscillateurs paramétriques optiques », Thèse de Doctorat, École Doctorale de l'École Polytechnique (2005).
[148] Marangoni M, Osellame R, RamponiR,Cerullo G, Steinmann A,Morgner U, "Near-infrared optical parametric amplifier at 1 MHz directly pumped by a femtosecond oscillator" Opt. Express, **32**(11) 1489-91 (2007).
[149] Morin F, Druon F, Hanna M, Georges P, « Microjoule femtosecond fiber laser at 1.6 µm for corneal surgery applications », *Opt. Lett.***34**(13) 1991-93 (2009).
[150]Saleh BEA, Teich MC *Fundamentals of photonics*, Hardcover 2007.
[151] Heisterkamp A, Ripken T, Mamom T, Drommer W, Welling H, Ertmer W andLubatschowski H, "Nonlinear side effects of fs pulses inside corneal tissue during photodisruption"
[152] Sudrie L., Thèse de Doctorat « Propagation non-linéaire des impulsions laser femtosecondes dans la silice », Laboratoire d'Optique Appliquée, Université de Paris XI Orsay, 2002.
[153] http://paristech.iota.u-psud.fr/site.php?id=209&fileid=486, dernière consultation en aout 2011.
[154] « Optical Coherence Tomography: Technology and Applications », Drexler W and Fujimoto JG, Springer, 2008.
[155] Swanson EA, Izatt JA, Hee MR, Huang D, Lin CP, Schuman JS, Puliafito CA, and Fujimoto JG, "In vivo retinal imaging by optical coherence tomography", Opt. Lett., 18 (21), pp. 1864-1866 (1993).
[156] Izatt JA, Hee MR, Swanson EA, Lin CP, Huang D, Schuman JS, Puliafito CA, and Fujimoto JG, "Micrometer-scale resolution imaging of the anterior eye in-vivo with optical coherence tomography", Archives of Ophthalmology, 112 (12), pp. 1584-1589 (1994).

[157] Schuman JS, Hee MR, Puliafito CA, Wong C, Pedutkloizman T, Lin CP, Hertzmark E, Izatt JA, Swanson EA, and Fujimoto JG, "Quantification of nerve-fiber layer thickness in normal and glaucomatous eyes using optical coherence tomography", Archives of Ophthalmology, 113 (5), pp. 586-596 (1995).
[158] Puliafito CA, Hee MR, Lin CP, Reichel E, Schuman JS, Duker JS, Izatt JA, Swanson EA, and Fujimoto JG, "Imaging of macular diseases with optical coherence tomography", Ophthalmology, 102 (2), pp. 217-229 (1995).
[159]Sacchet D, Moreau J, Georges P and Dubois A,"Simultaneous dual-band ultra-high resolution full-field optical coherence tomography", 2008, *Optics Express*, **16(**24), pp. 19434-19446.
[160] Huang D, Swanson EA, Lin CP, Schuman JS, Stinson WG, Chang W, Hee MR, Flotte T, Gregory K, Puliafito CA, Fujimoto JG, 1991, *Science***254** 1178.
[161] Fercher AF, Drexler W, Hitzenberger CK, and Lasser T, "Optical coherence tomography - principles and applications", Rep. Prog. Phys., 66 (2), pp. 239 - 303 (2003).
[162] « Biomedical Photonics Handbook », edité par Tuan Vo-Dinh.
[163] Leitgeb RA, Drexler W, Unterhuber A, Hermann B, Bajraszewski T, Le T, Stingl A, and Fercher AF, "Ultrahigh resolution Fourier domain optical coherence tomography", Opt. Express, 12 (10), pp. 2156-2165 (2004).
[164] Fercher AF, Hitzenberger CK, Kamp G, and Elzaiat SY, "Measurement of Intraocular Distances by Backscattering Spectral Interferometry", Opt. Comm., 117 (1 2), pp. 43-48 (1995).
[165]http://en.wikipedia.org/wiki/Optical_coherence_tomography, dernière consultation en aout 2011.
[166] Wojtkowski M, Srinivasan VJ, Ko TH, Fujimoto JG, Kowalczyk A, and DukerJS, "Ultrahigh-resolution, high-speed, Fourier domain optical coherence tomography and methods for dispersion compensation", Opt. Express, 12 (11), pp. 2404-2422 (2004).
[167] Nassif N, Cense B, Hyle Park B, Yun SH, Chen TC, Bouma BE, Tearney GJ, and d. Boer JF, "In vivo human retinal imaging by ultrahigh-speed spectral domain optical coherence tomography", Opt. Lett., 29 (5), pp. 480-482 (2004).
[168] Beaurepaire E, Boccara AC, Lebex M, Blanchot L and Saint-Jalmes H, « Full-fild optical coherence microscopy », Opt Lett 23 (4) 244-246.
[169] Laude B, De Martino A, Drevillon A, Benattar L, and Schwartz L, "Full-field optical Coherence tomography with thermal light", Appl. Optics, 41 (31), pp. 6637-6645 (2002).
[170] McMenamin PG, Steptor RJ, "Normal anatomy of the acqueous humour outflow system in the system in the domestic pig eye", *J. Anat.***178**pp 65-77 (1991).