

PARTIE 3

Microscopie tridimensionnelle avec l'OCT plein champ

3.1 Principe de l'acquisition des images tomographiques en OCT plein champ

Maintenant que le microscope OCT est réglé optiquement, une figure d'interférences est observée dès qu'un élément (interface ou particule) réfléchit de la lumière qui peut alors interférer avec celle issue du miroir de référence. Toute réflexion correspond à un saut d'indice de réfraction à la surface ou au sein de l'échantillon (voir figure 3.1). La détection du signal interférométrique donne une image interférométrique d'une interface réfléchissante de l'échantillon à une profondeur z donnée. L'image interférométrique de cette interface est réalisée sur tout un plan, on réalise ainsi une coupe 2D de l'échantillon. En déplaçant l'échantillon en profondeur (axe z), on repère successivement les différentes interfaces réfléchissantes et ainsi les structures internes de l'échantillon.

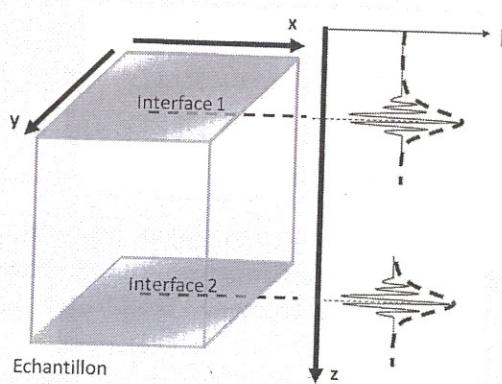


FIGURE 3.1 : Interférogrammes détectés dus à la présence d'interfaces au sein de l'échantillon. Les interférogrammes sont en fonction de la profondeur au sein de l'échantillon

Pour différencier deux structures successives, il faut que les interférogrammes ne se recouvrent pas. Ainsi la forme de l'enveloppe de l'interférogramme est primordiale : sa largeur détermine la résolution axiale du microscope OCT, son intensité renseigne sur la réflectivité de la structure qui a produit les interférences (voir figure 2.2).

Réaliser une **image tomographique** d'un plan situé à une profondeur z , consiste à extraire l'enveloppe de l'interférogramme. Pour cela plusieurs méthodes existent. Dans ce dispositif, on utilise la méthode à décalage de phase : pour une profondeur donnée, une paire d'images déphasées sont acquises puis combinées.

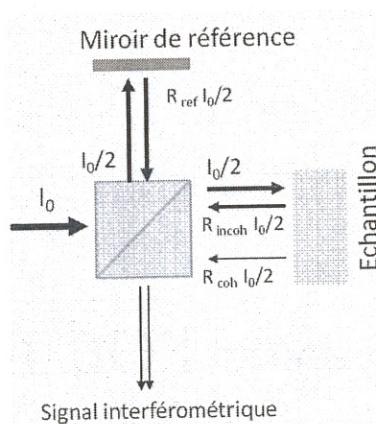


FIGURE 3.2 : Schéma de principe des différentes contributions au signal interférométrique

Le signal interférométrique à la sortie de l'OCT s'écrit :

$$I(x, y) = K I_0 [R_{ref} + R_{incoh}(x, y) + R_{coh}(x, y) + 2\sqrt{R_{ref}R_{coh}} \cos \varphi(x, y)] \quad (3.1)$$

Où I_0 est l'intensité de la lumière incidente, K un coefficient de proportionnalité qui prend en compte les différentes pertes (transmission des optiques et réflexions parasites), R_{ref} est le coefficient de réflexion de la surface de référence, R_{coh} le coefficient de réflexion équivalent à la proportion de lumière cohérente (qui interfère avec le signal du bras de référence) issue de l'échantillon, R_{incoh} le coefficient de réflexion équivalent à la proportion de lumière arrivant sur la caméra mais qui n'interfère pas, $\varphi(x, y)$ la phase du signal interférométrique (voir figure 3.2).

L'information utile pour réaliser l'image tomographique est contenue dans le terme R_{coh} . En plus de ce signal, le détecteur reçoit de la lumière d'intensité constante contenue dans les termes R_{ref} et R_{incoh} qui constitue un fond continu pour les images.

Pour extraire l'information utile et s'affranchir du fond continu, on utilise la méthode de reconstruction de l'enveloppe par décalage de phase. Il s'agit d'enregistrer une première image correspondant à une intensité $I_{z_1}(x, y)$ et une deuxième, d'intensité $I_{z_2}(x, y)$, où l'on aura fait varier $\varphi(x, y)$, la phase du signal interférométrique, de π .

$$I_{z_1}(x, y) = K I_0 [R_{ref} + R_{incoh}(x, y) + R_{coh}(x, y) + 2\sqrt{R_{ref}R_{coh}} \cos(\varphi(x, y))] \quad (3.2)$$

$$I_{z_2}(x, y) = K I_0 [R_{ref} + R_{incoh}(x, y) + R_{coh}(x, y) + 2\sqrt{R_{ref}R_{coh}} \cos(\varphi(x, y) + \pi)] \quad (3.3)$$

$$I_{z_1}(x, y) - I_{z_2}(x, y) = 4 K I_0 \sqrt{R_{ref}R_{coh}} \cos(\varphi(x, y)) \quad (3.4)$$

En faisant la différence des deux images, on trouve un signal proportionnel à l'enveloppe de l'interférogramme. De plus, cette méthode permet de s'affranchir du fond continu.

Pour faire varier la phase de π , on déplace légèrement l'échantillon $\delta z = z_2 - z_1$ pour introduire la différence de chemin optique correspondant.

- ★ De combien doit-on faire varier la différence de marche δ entre les deux bras de l'interféromètre pour faire varier la phase de π ?
- ★ En déduire le déplacement δz que l'on doit appliquer à l'échantillon.
- ★ En utilisant les données spectrales de la lampe halogène obtenue lors du premier jour, en déduire un ordre de grandeur du déplacement nécessaire.

L'échantillon peut être translaté verticalement par deux moteurs :

- un moteur pas à pas de 4 mm de course avec un pas minimum de l'ordre du micromètre,
- un platine piézo-électrique dont la course est d'environ $25\mu\text{m}$ et de pas minimum de l'ordre de la dizaine de nm.

- ★ Déduire des remarques précédentes quel actionneur il faut utiliser pour réaliser une image tomographique.
- ★ Justifier pourquoi il fallait tourner le cube séparateur.

3.2 Pilotage de la platine de translation et de la caméra

A partir de maintenant, vous allez avoir besoin de la platine de déplacement (moteur pas à pas et déplacement piézo-électrique) ainsi que de la caméra.

Les étapes de mise sous tension et d'initialisation sont décrites dans le fascicule à votre disposition sur la paillasse. Vous trouverez également dans ce fascicule une description pour l'utilisation du logiciel permettant l'acquisition d'images tomographiques.

Attention : avant chaque acquisition (images brutes ou images tomographiques), il faut bien vérifier le champ AMPLITUDE PIEZO en bas à droite de l'interface *Labview*. Il doit être mis à jour à chaque lancement du logiciel d'acquisition. Voir document de pilotage pour le paramétrage.

- ★ Prendre en main le logiciel et comprendre les différents éléments de l'interface.

3.3 Caractérisation du microscope OCT

Comme tout dispositif d'imagerie, les performances de l'OCT du point de vue de la résolution et de la taille des pixels doivent être caractérisées. Dans le cas de ce montage, on distingue deux résolutions indépendantes : la résolution axiale (selon l'axe z), c'est à dire en fonction de la profondeur dans l'objet, et la résolution transverse (dans le plan (x, y)), c'est à dire dans le plan d'une tranche donnée. Dans la salle, vous avez deux types de montage utilisant des objectifs de microscopes différents. Leurs caractéristiques sont notées sur l'objectif.

- ★ Identifier et noter le grossissement et l'ouverture numérique des objectifs de votre montage.
- ★ Demander à vos camarades, les caractéristiques de leur objectifs. Ceci vous permettra, ultérieurement, de comparer les caractéristiques de vos montages.

3.3.1 Résolution axiale

La résolution axiale correspond à la capacité du système à séparer deux structures dans la profondeur de l'échantillon (selon l'axe z sur la figure 3.1). Cette résolution axiale peut être déterminée à partir d'un interférogramme car elle correspond à la largeur totale à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme. Elle est ainsi directement reliée à la longueur de cohérence temporelle de la source.

Longueur de cohérence

Soit une source lumineuse avec une répartition spectrale de puissance de forme gaussienne centrée autour de ν_0 et de largeur totale à mi-hauteur $\Delta\nu$. On peut montrer que l'intensité lumineuse I de l'interférogramme s'écrit, en fonction de la différence de marche z comme :

$$I(z) = 2I_0 \left(1 + \cos\left(2\pi\nu_0 \frac{z}{c}\right) \exp\left[-\frac{\pi^2 z^2 \Delta\nu^2}{c^2 4 \ln 2}\right] \right)$$

L'amplitude de l'enveloppe de l'interférogramme diminue très vite avec la différence de marche entre les deux bras de l'interféromètre. On ne peut donc observer des interférences uniquement autour de la différence de marche nulle ou inférieure à une valeur appelée longueur de cohérence de la source L_c définie comme la largeur totale à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme.

Résolution axiale théorique

Dans le cas de l'OCT, la résolution axiale correspond à la capacité à séparer deux interférogrammes successifs selon l'axe z . Elle dépend de la largeur des interférogrammes et elle est proportionnelle à la longueur de cohérence temporelle de la source lumineuse. La résolution axiale d'un système OCT est donc définie comme la largeur à mi-hauteur de l'enveloppe de l'interférogramme. Dans le cas d'une

source de distribution spectrale gaussienne de la puissance lumineuse, la résolution axiale r_z est donnée par :

$$r_z = \frac{L_c}{2} = \frac{2\ln 2}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta\lambda} \quad (3.5)$$

On peut remarquer que la résolution axiale de l'OCT est uniquement liée aux propriétés spectrales de la source et pas aux optiques de focalisation.

- ★ Parmi les différents types de sources que vous avez utilisées (lampe blanche à incandescence, lampe spectrale, laser, lampe halogène...), justifier laquelle était la plus adaptée à la réalisation d'images à haute résolution axiale par microscopie OCT.
- ★ La forme du spectre de la source a-t-elle une importance ?
- ★ Quel élément du montage peut détériorer la résolution axiale ?
- ★ En vous aidant des spectres représentés sur la figure 1.7, donner une estimation de la résolution axiale attendue avec ce montage.

Résolution axiale expérimentale

Pour mesurer expérimentalement la résolution axiale de votre système, il faut enregistrer un interférogramme et mesurer sa largeur à mi-hauteur.

Pour la prise en main des éléments (déplacement motorisé et caméra) et l'acquisition de données, la procédure est détaillée dans l'annexe à votre disposition sur chaque table.

- S'assurer de bien avoir les franges d'interférences sur la caméra, dans une zone du miroir où il n'y a pas trop de poussière résiduelle (éventuellement, demander à l'enseignant de nettoyer les miroirs avec du papier optique). Les franges doivent être suffisamment étalées dans le champ de vue (l'interférogramme doit occuper la quasi-totalité du champ de vue).
- Vérifier que le déplacement indiqué dans PAS PIEZO ENTRE 2 IMAGE (NM) correspond bien au déplacement physique du piézo-électrique. Si ce n'est pas le cas, il faut ajuster le paramètre AMPLITUDE PIEZO (cf. annexe sur le pilotage des éléments).
- Définir l'excursion totale en z_{tot} et l'échantillonnage Δz afin pour caractériser l'interférogramme.
- Procéder à un enregistrement des interférogrammes dans le mode PILE D'IMAGES BRUTES afin de pouvoir observer l'allure des interférogrammes.
- Traiter les données pour en extraire un interférogramme de bonne qualité (voir annexe C pour l'utilisation d'*ImageJ*).
- Déterminer la largeur à mi-hauteur de l'interférogramme.

Ne pas hésiter à solliciter l'enseignant pour la prise en main de l'acquisition et/ou le traitement des données.

- ★ Comparer votre mesure avec la résolution théorique. Qu'est ce qui peut expliquer la différence ?
- ★ Comme vous l'avez fait le premier jour, déterminer la sensibilité spectrale de votre système d'imagerie à partir de votre interférogramme.

3.3.2 Taille d'un pixel et champ de vue

En microscopie, et de manière générale avec tout instrument d'imagerie, tout image présentée doit comporter une barre d'échelle afin de connaître la taille des structures observées. Il est donc indispensable de savoir à quelle surface de l'échantillon correspond un pixel de l'image. On voit ainsi que la taille d'un pixel et le champ de vue de l'image sont liés.

- ★ De quoi dépend la taille du champ de vue ?

En pratique, pour mesurer la taille d'un pixel et en déduire le champ de vue, on réalise l'image d'une mire constituée de gradutations espacées de $50\text{ }\mu\text{m}$ dans l'un des bras de l'interféromètre. Dans cette configuration, on a un simple microscope optique. Pour cela, il faut :

- Utiliser le logiciel *Thorcam*. **Faire attention à avoir bien fermé le programme Labview.**
- Bloquer la lumière provenant du bras échantillon avec un carton opaque.

- Placer la mire de microscope sous l'objectif de microscope du bras de référence et faire la mise au point de l'objectif. Si vous êtes en bout de course au niveau de la platine de translation, vous pouvez introduire des lames de microscopes sous la mire pour la surélever. **Ne pas poser la mire sur le miroir**, vous risqueriez de rayer le miroir de référence.
- Enregistrer l'image pour l'analyser ensuite sur imageJ.
- ★ En déduire l'échelle d'une image, c'est à dire la correspondance entre 1 pixel de la caméra et la taille sur l'échantillon.
- ★ En déduire les dimensions du champ de vue.
- ★ Comparer ces valeurs avec celles de vos camarades ayant des objectifs différents.

3.3.3 Résolution latérale

La résolution latérale est liée au pouvoir séparateur d'un instrument d'imagerie, c'est à dire sa capacité de rendre visible deux points situés côte à côte. Ainsi, la résolution latérale est donnée par la distance minimale qui doit exister entre deux points pour que ceux-ci soient discernables. Elle ne pourra pas être mesurée expérimentalement, mais elle sera évaluée théoriquement.

Ouverture numérique (ON) d'un objectif de microscope

Le but d'un microscope est d'agrandir les détails d'un objet pour les rendre visibles à l'oeil ou sur d'un détecteur. Pour cela on utilise une lentille de courte focale pour grossir l'objet. Cependant la capacité d'une lentille à observer des détails est limitée par diffraction : en effet la lumière provenant d'un point source est diffractée par l'ouverture circulaire des différents éléments optiques (lentilles, miroirs...) et forme une tache ronde entourée d'anneaux appelée tache d'Airy. Le diamètre de la tache est relié à l'ouverture numérique *ON* de l'objectif, c'est à dire à sa capacité à capter les rayons lumineux diffractés par l'objet éclairé. Comme l'illustre la figure 3.3, plus l'ouverture numérique est grande, plus la tache d'Airy est fine et plus il sera possible d'observer des détails sur l'image obtenue.

- ★ Comment en pratique augmente-t-on l'ouverture numérique d'un objectif?
- ★ Quelle est la conséquence sur la distance de travail de l'objectif?

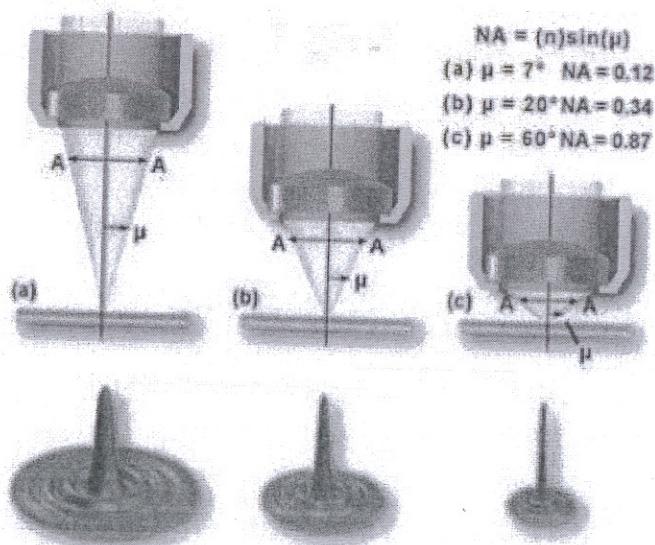


FIGURE 3.3 : Tache de diffraction en fonction de l'ouverture numérique (ON) d'un objectif.

3.3.4 Évaluation théorique de la résolution latérale

Le critère de Rayleigh donne la limite en dessous de laquelle on ne peut pas distinguer deux taches d'Airy côte à côte. Cette quantité est appelée en microscopie, le pouvoir séparateur de l'instrument : il s'agit en fait de sa résolution latérale r_{xy} :

$$r_{xy} = \frac{0.61\lambda}{2ON} \quad (3.6)$$

- ★ A partir de l'ouverture numérique des objectifs à votre disposition, donner un ordre de grandeur de la résolution latérale attendue.
- ★ Comparer les montages.
- ★ Sur quelles caractéristiques de l'instrument OCT, le choix de l'objectif joue-t-il ?

3.4 Imagerie OCT d'échantillons

Vous êtes désormais prêt à analyser des échantillons. Plusieurs sont à votre disposition, mais n'hésitez pas à faire des propositions.

3.4.1 Choix de l'échantillon

- Une des premières conditions à l'obtention d'une image de qualité est le **contraste de la figure d'interférence**. Pour cela il faut être au contact optique et que les deux ondes issues de chacun des bras aient la même intensité. La première condition devrait être bien vérifiée sur votre réglage. La deuxième impose que la réflectivité du miroir de référence soit similaire à celle de l'échantillon. **Pour la suite des expériences, changer le miroir de référence pour un miroir en verre dont la surface est polie.**
- Un second critère est la **profondeur de pénétration**. La lumière qui provient du volume d'un échantillon est faible car il faut les photons incident arrivent à la profondeur souhaitée et en ressortent sans être absorbés. Le milieu ne doit donc pas être trop absorbant ni diffusant. Seuls les photons qui ont traversé l'échantillon en ligne droite (sans rencontrer de centre diffuseur, appelés photons ballistiques) contribuent au signal d'interférences. Ces deux phénomènes d'absorption et de diffusion dépendent de la longueur d'onde de la source.
- ★ Comment varie la diffusion de la lumière en fonction de la longueur d'onde ?
- ★ Conclure sur la longueur d'onde centrale de la source à utiliser en microscopie OCT.
- ★ Conclure quant aux caractéristiques qu'un échantillon doit avoir pour être imaginé par OCT.

3.4.2 Acquisition d'une pile d'image en profondeur d'un échantillon

Avant de réaliser l'acquisition d'une pile d'images tomographiques, votre montage OCT doit être réglé. Vous avez donc pu vérifier dans les étapes précédentes que :

- l'OCT est réglé au contact optique de sorte à voir les franges les plus larges et contrastées possible sur la caméra.
- l'éclairage de Köhler est parfaitement aligné et réglé.

Protocole expérimental permettant de lancer une acquisition d'images tomographiques

- Mettre la lampe halogène à puissance maximale.
- Remplacer le miroir de référence par un miroir de réflectivité moindre. Il s'agit en fait d'un simple morceau de silice poli sur lequel aucun dépôt réfléchissant n'a été effectué.
- ★ Combien vaut le coefficient de réflexion de la face avant d'un morceau de verre ?
- Mettre en place l'échantillon à étudier de préférence sur une surface noire absorbante (par exemple une mire d'alignement) pour éviter les réflexions de lumière parasites. Pour ne pas trop perdre la mise au point, vous pouvez surélever celui-ci à l'aide de lames de microscope.

- Faire la mise au point sur la surface de verre (cacher pour cela le faisceau de lumière dans le bras échantillon).
- Faire la mise au point sur la surface de l'échantillon (cacher pour cela le faisceau de lumière dans le bras de référence). On veillera à fermer pour cela le programme *Labview* et à contrôler le moteur pas à pas via le logiciel *APTUser*. On pourra enregistrer une image de l'échantillon vue par le microscope conventionnel que constitue le bras échantillon à tire de comparaison avec les images tomographiques enregistrées par la suite.
- **S'assurer que le parcours de la lumière est libre dans les deux bras de l'interféromètre.**
- Lancer le programme dans le mode TEMPS RÉEL pour préparer les paramètres de l'acquisition.
- Optimiser les différents paramètres de l'acquisition : le paramètre de l'AMPLITUDE PIEZO, le temps d'exposition de la caméra et le pas piezo Δz entre les deux images déphasées.
- Déterminer l'épaisseur à sonder dans l'échantillon z_{tot} à l'aide du moteur pas à pas.
- Choisir un pas δz entre deux images tomographiques.
- En déduire les paramètres du nombre total de pas selon l'axe z et du pas δz à entrer dans l'interface.
- Indiquer le "nombre d'accumulations" qui correspond au nombre d'images moyennées à chaque position.
- Indiquer un nouveau dossier pour l'enregistrement des images tomographiques (sinon, les images enregistrées précédemment seront écrasées).
- Passer en mode images tomographiques (choisir le mode GRANDS PAS) et lancer l'acquisition.

Il est conseillé de faire une première acquisition avec des pas volontairement très grand (typiquement de l'ordre de 5 à 20 μm et un nombre d'images moyennées faible afin d'obtenir rapidement une idée de la structure de l'échantillon et de l'amplitude en profondeur nécessaire pour l'acquisition. Puis, dans un second temps, de faire une acquisition plus précise, avec des pas en z plus petits, et un nombre d'images moyen plus important afin d'obtenir des images de plus grande qualité.

3.4.3 Traitement des images

Désormais, il vous est demandé de traiter les images à l'aide du logiciel *ImageJ* afin d'aboutir à des images et des films qui soient présentables : contraste optimisé, barre d'échelle. Pour cela, reportez-vous à l'annexe C qui décrit les étapes principales de l'utilisation d'*ImageJ*. Il s'agit en particulier de :

- ★ ouvrir vos images,
- ★ optimiser le contraste,
- ★ traiter les images,
- ★ ajouter une barre d'échelle,
- ★ ajouter un compteur indiquant la profondeur,
- ★ ajouter une légende indiquant le type d'échantillon observé,
- ★ sauvegarder une image,
- ★ sauvegarder un film,
- ★ réaliser des reconstructions tridimensionnelles de votre échantillon (sous forme de vues ou bien de films),
- ★ ...

Il est important d'interpréter vos images et de tenter d'expliquer que ce vous observez ainsi que les limitations de la technique d'imagerie par rapport aux tailles caractéristiques des structures de votre échantillon. N'hésitez pas à chercher des informations concernant la structure de l'objet que vous avez observé. Par ailleurs, il est possible de mesurer des distances en fonction de la profondeur (axe z) à partir des pas de déplacement lors de l'acquisition.

3.4.4 Étude de divers échantillons

Vous pouvez décider :

- ★ de caractériser différentes zones de votre échantillon pour accéder à une meilleure connaissance de sa structure,
- ★ de faire plusieurs acquisitions pour optimiser les paramètres (pas en profondeur, nombre d'acumulation, temps d'exposition ...) et obtenir ainsi les meilleures images possibles,
- ★ de caractériser différents types d'échantillon.