

## LA CORNÉE

---

*Le chapitre 2 décrit les propriétés optiques de la cornée et leur lien avec la présence de pathologies et en particulier d'œdèmes. Cela a pour effet d'augmenter l'épaisseur de la cornée et de modifier sa microstructure. Ces variations désordonnent le tissu, ce qui a une incidence directe sur les propriétés de diffusion de la lumière et donc sur la transparence de la cornée. Ce phénomène est fortement dépendant de la longueur d'onde de la lumière. Les profondeurs de pénétration des lasers peuvent donc être optimisées en décalant leur spectre d'émission vers l'infrarouge. Les cornées humaines dont nous disposons pour nos expériences souffrent systématiquement de la présence d'œdèmes. Un traitement physico-chimique de déturgescence permet de contrôler leur degré d'œdèmes jusqu'à leur redonner leur épaisseur et leur transparence physiologique. Cette méthode est utilisée notamment pour redonner sa transparence à la cornée du donneur au préalable d'une intervention de greffe de cornée. Elle nous permet d'étudier en détail les liens entre les propriétés de transparence du tissu et la perturbation de leur structure<sup>8</sup>.*

## 2.1. Indice de réfraction et biréfringence

### 2.1.1. Indice de réfraction

Les expériences par diffraction de rayons X menées par Leonard *et al.* [70] ont permis de déterminer la fraction volumique des fibrilles de collagène dans le tissu sain et d'en déduire indirectement qu'il existe une différence d'indice de réfraction entre les fibrilles de collagène et la matrice extra-fibrillaire. Ces fibrilles ne pouvant être considérées comme isolées, il est difficile de mesurer les indices respectifs de ces éléments. Cependant, la technique utilisée donne une information sur le volume et permet d'évaluer l'indice de réfraction total par la relation de Gladstone-Dale.

---

<sup>8</sup> Une grande partie du travail expérimental présenté dans ce chapitre a été effectué dans le cadre du projet post-doctoral de Donald Peyrot qui a été mené en parallèle de cette thèse.

L'indice réfractif total  $n_{tot}$  d'un milieu complexe peut être exprimé comme la somme partielle des indices réfractifs des éléments qui le composent,  $n_1, n_2, \dots, n_N$ , pondérés par la fraction volumique de chaque composant,  $f_1, f_2, \dots, f_N$ ,

$$n_{tot} = n_1 f_1 + n_2 f_2 + \dots + n_N f_N; \quad (2-1)$$

Dans une cornée humaine, Leonard *et al.* [70] ont établi que l'indice des fibrilles est de 1,41, contre 1,36 pour la matrice extra-fibrillaire, avec une fraction volumique des fibrilles de 0,22. En appliquant la loi de Gladstone-Dale, l'indice moyen pour le stroma calculé est de 1,37, ce qui est en accord avec le résultat obtenu par Maurice dans une étude antérieure [71].

## 2.1.2. Biréfringence

Le tissu cornéen présente deux propriétés de biréfringence : l'une est intrinsèque et l'autre est une biréfringence de forme [71,72]. La première est issue de la structure longitudinale des molécules qui composent les fibrilles de collagène. La lumière polarisée linéairement suivant l'axe des fibrilles se propage plus lentement que celle polarisée perpendiculairement à ces mêmes fibrilles. La biréfringence de forme est attribuée aux anisotropies du stroma organisé en lamelles de collagène. Chaque lamelle contribue indépendamment à un retard dont l'axe lent est orienté le long de l'axe des fibrilles qui la composent. La biréfringence globale de la cornée correspond à la contribution cumulée des lamelles sur l'intégralité du stroma. Une autre approche consiste à assimiler la cornée à un cristal biaxe incurvé dont l'axe rapide principal est perpendiculaire à la surface.

Un grand nombre de situations cliniques en ophtalmologie (chirurgie ou diagnostic) impliquent une lumière incidente polarisée perpendiculairement à la surface. Cependant, cet axe entraîne peu de modifications de la polarisation car la biréfringence cornéenne est essentiellement influente selon les axes tangentiels à la surface.

Ces propriétés de biréfringence ont été étudiées par des mesures de transmission de la polarisation croisée au travers d'une cornée de lapin, en faisant tourner la polarisation du faisceau incident sur  $360^\circ$ [12]. Les résultats sont présentés en figure 8 et

montrent l'influence de cette biréfringence bien que le minimum de transmission soit strictement positif lorsque polariseur et analyseur sont perpendiculaires.

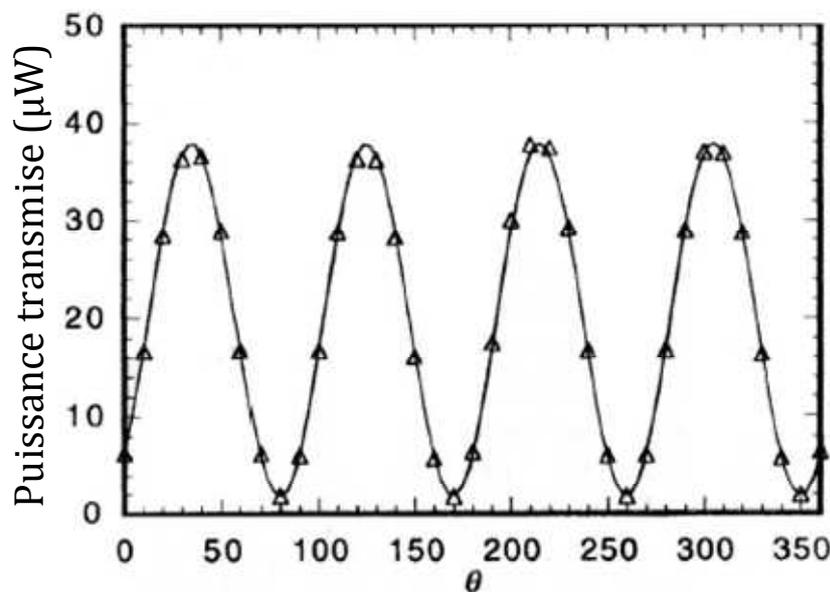


Figure 8 : Puissance transmise en configuration polariseur/analyseur au travers d'une cornée de lapin enregistrée en tournant la polarisation incidente sur 360°. La ligne solide est une interpolation de l'évolution des données [12].

## 2.2. Caractérisation des propriétés de transmission de la cornée

### 2.2.1. Protocole de déturgescence

Afin de caractériser les propriétés optiques de transmission des cornées, nous avons mené une série d'expériences sur des cornées humaines fournies par la Banque française des yeux. Ces échantillons sont exclusivement réservés à un usage scientifique lorsque leur qualité les rend impropres à la greffe (mauvaise qualité endothéliale, défauts épithéliaux, aire transparente insuffisante), conformément aux directives de la déclaration d'Helsinki et à la législation française.

Les cornées sont prélevées sur des personnes récemment décédées et conservées dans un milieu de conservation pour organo-culture, entre 31°C et 35°C [74,75]. Au cours des dix jours qui suivent leur prélèvement, la qualité des cornées est évaluée grâce à des

tests microbiologiques, à l'observation de leur aspect général (anomalies du globe extérieur et signes d'opération antérieure, abrasions et défauts épithéliaux, opacités stromales et formes cornéennes anormales : kératocônes et micro- ou mégalo-cornée notamment, état de la chambre antérieure : forme, présence de sang) et à l'évaluation de leur qualité endothéliale. Généralement réalisée par microscopie en lumière transmise (contraste de phase), cette analyse nécessite de mettre en évidence les cellules endothéliales par induction du gonflement de l'espace intercellulaire à l'aide d'une solution hypotonique (NaCl 0,9%). L'utilisation d'un colorant vital (*i.e.* le bleu trypan) permet de mettre en évidence les cellules mortes ou nécrotiques et les parties dénudées de la membrane de Descemet. Après l'évaluation de la densité de cellules endothéliales, les cornées propres à la greffe, *i.e.* présentant une densité cellulaire supérieure à 2.000 cellules/mm<sup>2</sup>, sont séparées des autres [76,77].

Les cornées rejetées pour la greffe et destinées à un usage scientifique peuvent être conservées dans un milieu de culture 4 à 5 semaines après leur prélèvement avant d'être utilisées au laboratoire. Compte tenu de leur mauvaise qualité endothéliale, elles sont généralement fortement œdémateuses au moment des expérimentations (leur épaisseur pouvant atteindre le double de l'épaisseur physiologique). Elles représentent donc un bon modèle pour nos études de greffes de cornées pathologiques par laser.

Afin de comparer le comportement en transmission d'une cornée œdémateuse avec celui d'une cornée saine en fonction de la longueur d'onde, certains échantillons sont placés dans un milieu leur permettant de retrouver une épaisseur physiologique normale et leur transparence. Ce processus est appelé *déturgescence*. Il est également utilisé pour les cornées destinées à la greffe, dans ce cas les greffons sont incubés dans le milieu de déturgescence 2 à 3 jours avant l'opération. Ce milieu contient des macromolécules qui augmentent la pression osmotique du milieu de base, ce qui permet d'entraîner une déshydratation du stroma [78]. Dans le cadre de nos expérimentations, les cornées sont mises en déturgescence 48 à 72 h dans une solution de Hanks, supplémentée avec un polymère glucidique de 500 kDa<sup>9</sup>, le Dextran 500<sup>10</sup>, typiquement utilisé à une concentration de 5%.

Au cours du projet postdoctoral de Donald Peyrot effectué au sein du groupe et en parallèle de cette thèse, nous avons étudié les influences du temps d'incubation et de

---

<sup>9</sup> Da=Dalton=atomic mass unit

<sup>10</sup> Sigma-Aldrich, Spruce st, St Louis, États-Unis

la concentration en Dextran du milieu de déturgescence sur l'évolution de l'épaisseur cornéenne afin de pouvoir redonner aux cornées leurs propriétés naturelles (épaisseur d'environ 550  $\mu\text{m}$  et transparence). Quarante-quatre cornées ont été placées dans des milieux de déturgescence contenant 2 à 13% massique de Dextran 500 (2%, 2,9%, 3,9%, 4,8%, 6,5%, 9,1% et 13%). Dans chacune des conditions, l'évolution de la déshydratation du stroma a été suivie en mesurant à intervalle régulier l'épaisseur des échantillons par pachymétrie ultrasonore<sup>11</sup>. Ces échantillons ont ensuite été fixés dans une solution de glutaraldéhyde puis conservés dans une solution tampon de cacocylate (pH 7,4) afin d'être inclus dans une résine, coupés (coupe de 100 nm à 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) et analysés en histologie par microscopie optique et en ultrastructure par microscopie électronique en transmission.

La figure 9 représente l'évolution caractéristique de l'épaisseur d'une cornée pour une concentration de Dextran de 4,8 %

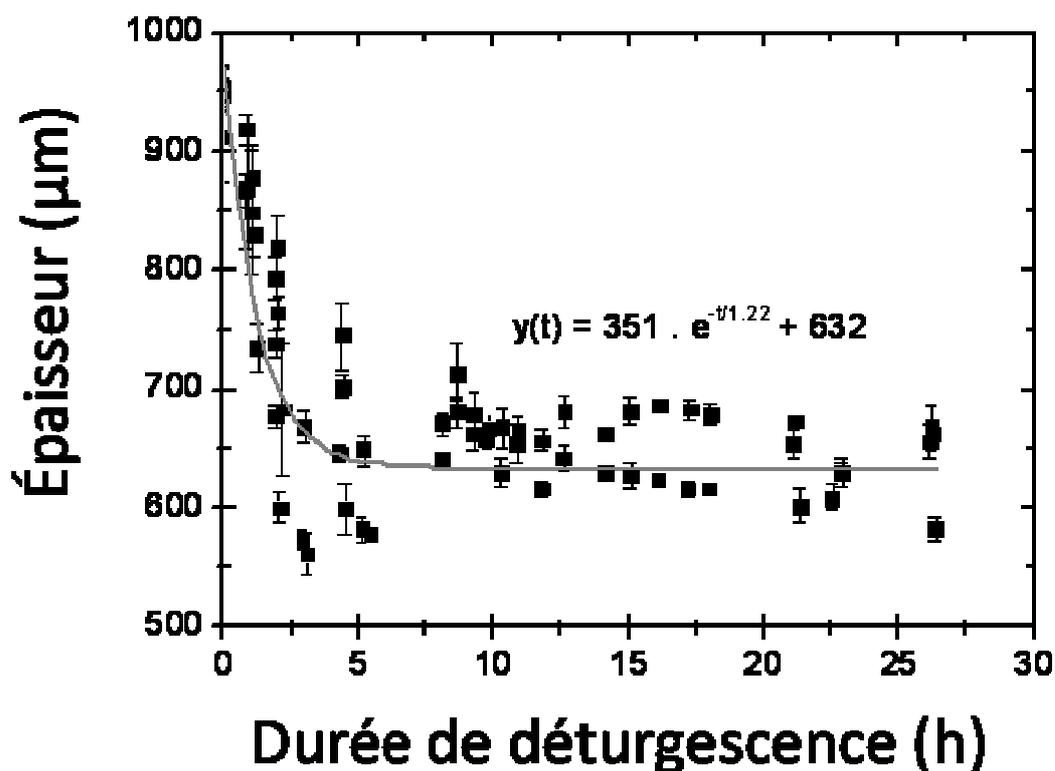


Figure 9 : Évolution caractéristique de l'épaisseur des cornées incubées dans un milieu de déturgescence contenant 4,8% de Dextran 500.

<sup>11</sup> Pocket II, Quantel medical, Clermont-Ferrand, France

L'épaisseur des cornées en fonction du temps d'incubation dans le milieu de déturgescence montre une évolution en exponentielle décroissante :

$$y(t) = A_0 e^{-\frac{t}{T_0}} + Y_0, \quad (2-2)$$

où  $A_0$  correspond au paramètre d'épaisseur de cornée en  $\mu\text{m}$ ,  $Y_0$  à l'épaisseur minimale atteinte,  $T_0$  au temps caractéristique et  $Y(t)$  à l'épaisseur au cours du temps.

Cette étude a permis de déterminer la durée d'immersion nécessaire en fonction de la concentration en Dextran 500 pour atteindre une épaisseur donnée (figure 10). L'épaisseur physiologique d'une cornée étant d'environ 500  $\mu\text{m}$  une fois l'épithélium retiré, les échantillons doivent être mis en déturgescence dans des milieux contenant 6 à 8% de Dextran 500.

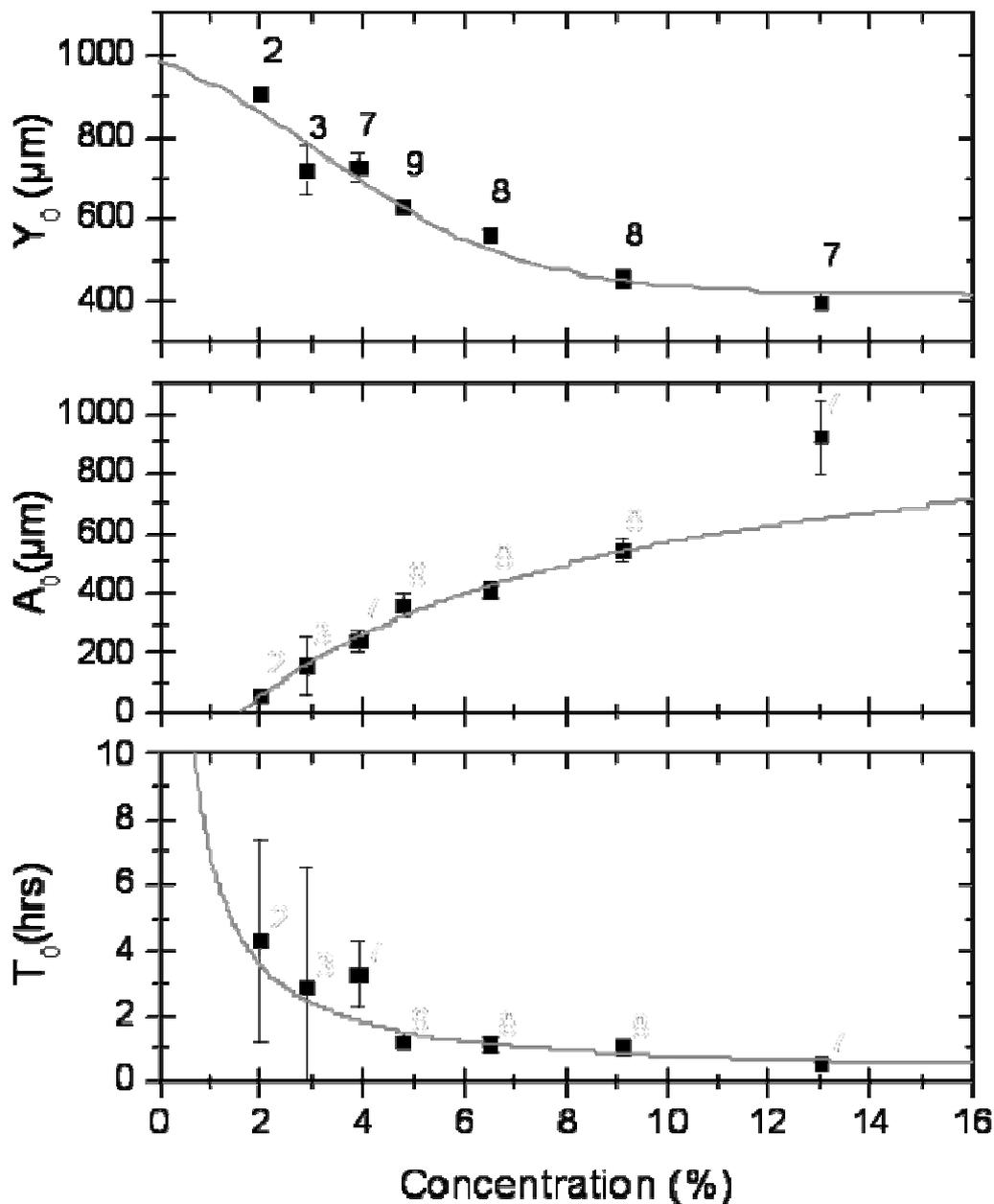
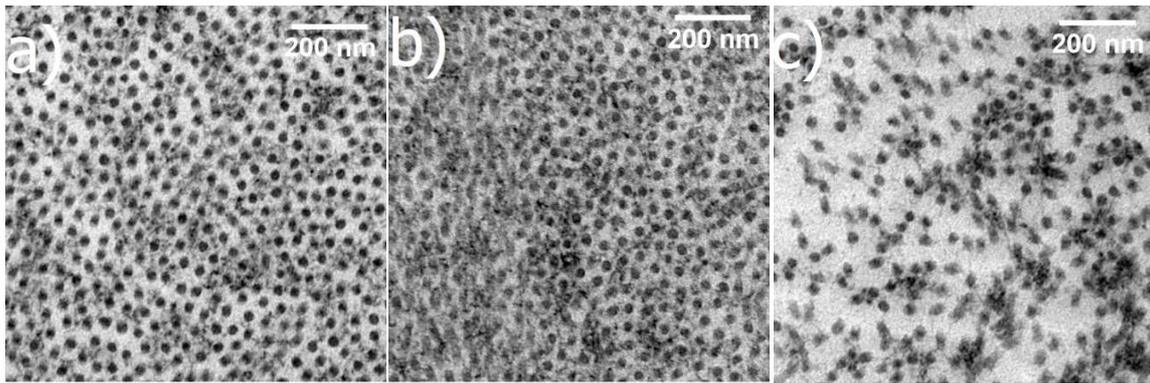


Figure 10 : Épaisseur minimale  $Y_0$  atteignable (en haut), paramètre de déturgescence  $A_0$  (au milieu) et durée de déturgescence caractéristique (en bas) en fonction de la concentration en Dextran 500 calculés à partir de l'équation 2-2

Cependant, bien que cette technique de déturgescence soit efficace, le Dextran est également connu pour être légèrement toxique pour les cellules endothéliales. La figure 11 montre 3 images en ultrastructure du stroma cornéen postérieur, observé en microscopie électronique en transmission, après 12 heures d'incubation dans des milieux de déturgescence contenant 4% (a), 7% (b) et 15% (c) de Dextran 500. Ces traitements ont respectivement conduit à des épaisseurs cornéennes de 850  $\mu\text{m}$  (cornée œdémateuse), 610  $\mu\text{m}$  (cornée saine) et 453  $\mu\text{m}$  (cornée déshydratée).



**Figure 11 : Microscopie électronique en transmission du stroma postérieur de cornées de : a) 850  $\mu\text{m}$ , b) 610  $\mu\text{m}$  et c) 453  $\mu\text{m}$  d'épaisseur.**

Nous verrons ultérieurement en quoi cette structure influence la qualité optique de la cornée. Toutefois, il est d'ores et déjà possible de constater que le collagène stromal de la cornée « saine » (b) présente une structure bien ordonnée, avec un écart inter-fibrillaire régulier, alors que l'écart moyen inter-fibrillaire est plus important et plus distribué dans la cornée œdémateuse (a) bien que sa structure soit encore relativement ordonnée. La dernière, déshydratée (c), montre clairement une structure très désordonnée, démontrant que l'excès de Dextran est fortement délétère pour le tissu cornéen, comme décrit dans la littérature [79,80,81]. Certaines fibrilles sont collées, le potentiel répulsif qui les maintient à distance a donc été dépassé, ce qui provoque des agrégats.

## 2.2.2. Transparence de la cornée

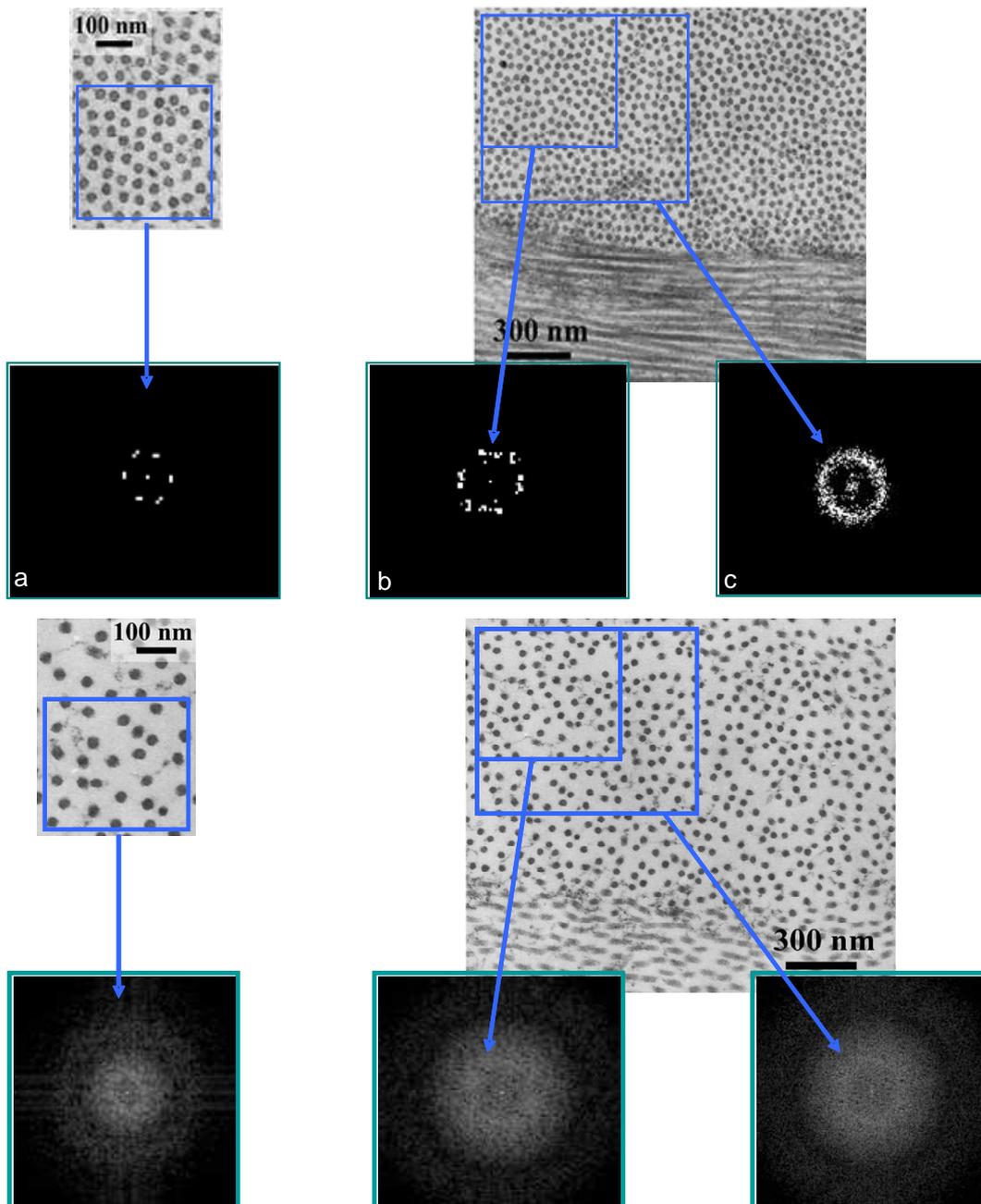
### 2.2.2.1. Considérations théoriques

La composition de la cornée est similaire à celle d'autres tissus, telles que la sclère, pourtant elle est transparente. Un grand nombre de théories ont été proposées pour expliquer cette particularité et certains détails méritent encore d'être clarifiés [71,5-93].

Il est généralement admis que la transparence des cornées est étroitement liée à l'organisation spatiale des fibrilles de collagène dans le stroma (90% de la cornée). Deux processus de diffusion peuvent cependant être identifiés. Les fibrilles de collagène agissent comme des diffuseurs allongés dont le diamètre est très petit et la longueur très grande devant la longueur d'onde. De plus leur indice de réfraction est différent de celui

de la matrice extrafibrillaire. On se retrouve donc dans un régime de diffusion dit Rayleigh. Cette théorie démontre que la section efficace de diffusion d'une fibrille individuelle varie avec la longueur d'onde ( $\lambda$ ) en  $\lambda^{-3}$  [83,94-96]. La diffusion Rayleigh est plus communément liée à une évolution en  $\lambda^{-4}$ , la différence vient du fait que les fibrilles agissent comme des diffuseurs allongés dans une dimension de l'espace contrairement à la théorie qui se base sur des petits diffuseurs sphériques tel que des particules quasi-ponctuelles.

Dans ses études sur le sujet, Maurice met l'accent sur le fait que si les fibrilles agissaient comme des diffuseurs indépendants, même les cornées saines seraient opaques [83]. C'est donc l'arrangement régulier des fibrilles constaté dans les cornées saines qui permet d'obtenir un indice de réfraction effectif globale suffisamment homogène pour assurer la transparence de la cornée. Les perturbations de la structure de la cornée provoquées par un œdème ou d'autres pathologies entraînent une augmentation de la diffusion et donc une baisse de la transparence. D'un point de vue théorique, la figure de diffusion angulaire vers l'avant est proportionnelle à la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation de la distribution des fibrilles [5]. Une étude réalisée sur des images d'ultrastructure a permis de mettre en évidence ces variations dans l'ordre des fibrilles à petite, moyenne et grande échelle pour une cornée saine et une cornée œdémateuse. Cette étude est présentée sur la figure 12. Elle met en évidence la structure hexagonale de la distribution des fibrilles de collagène à petite échelle. À moyenne et grand échelle, les trois axes distincts le long desquels la structure est périodique disparaissent au profit d'un spectre annulaire dont le rayon correspond à l'inverse de l'espacement inter-fibrillaire qui reste cependant constant et peu distribué autour de sa moyenne dans les cornées saines. La perte de l'organisation dans les cornées œdémateuses se manifeste par un spectre large, distribué autour des basses fréquences et ne montrant pas de fréquences spatiale privilégiée. L'influence de l'ordre dans la conservation de la transparence cornéenne est intimement lié aux phénomènes de diffusion décrits dans les paragraphes suivants.



**Figure 12 : Démonstration mathématique par analyse de Fourier de l'ordre à petite, moyenne et grande échelle pour une cornée saine (en haut) et une cornée œdémateuse (en bas), pour des zones de a) 300 nm b)600 nm et c) 400 nm de côté.**

Une seconde origine de la diffusion provient des structures dont les dimensions sont comparables à la longueur d'onde. Le modèle de diffusion qui décrit ce processus est appelé diffusion de Mie. Cette théorie strictement dite a été développée pour des éléments parfaitement sphériques mais cela reste néanmoins une bonne approximation pour des considérations qualitatives. Les composants de la cornée qui correspondent à

cet ordre de grandeur sont en premier lieu les kératocytes. Ces cellules peuvent être responsables de la faible diffusion résiduelle qui demeure dans les cornées saines. Leur contribution augmente avec leur transformation en myofibroblastes couramment rencontrés dans les cornées œdémateuses [97]. Dans les cornées les plus œdémateuses, on peut retrouver des « lacs » de liquide interstitiel dont les dimensions sont également comparables à la longueur d'onde [79]. Ils se forment entre les lamelles de collagène, et engendrent des variations d'indice de réfraction. Contrairement à la diffusion Rayleigh, la diffusion Mie n'est pas *a priori* fortement dépendante en longueur d'onde. Cependant, cumulée avec la diffusion Rayleigh, elles provoquent une diminution de la dépendance en longueur d'onde globale dès que la cornée est fortement œdémateuse. On constate alors une évolution en  $\lambda^{-2}$  [98].

L'ensemble de ces considérations peuvent être modélisées en exprimant la puissance diffusée en fonction du vecteur de diffusion correspondant à la différence entre le vecteur d'onde de l'onde diffusée  $\vec{k}$  et le vecteur d'onde de l'onde incidente  $\vec{k}_0$ :

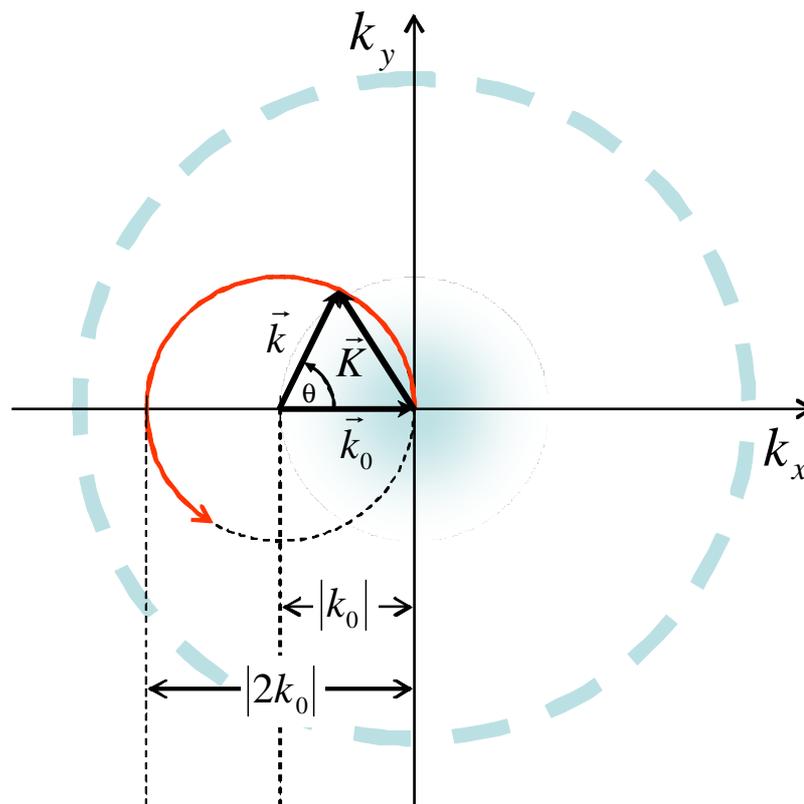


Figure 13 : Orientation des vecteurs d'onde incident et de diffusion et du vecteur de diffusion dans l'espace Fourier

$$\frac{P(\vec{K})}{l} = \frac{|E_0|^2 |\rho(\vec{K})|^2}{2\eta} \times \sigma_{Rayleigh} \quad (2-3)$$

où  $l$  est la longueur des fibrilles,  $E_0$  est l'amplitude du champ électrique de l'onde incidente,  $|\rho(\vec{K})|^2$  est le module carré de la transformée de Fourier de la fonction de distribution des fibrilles qui est égale à la transformée de Fourier de la fonction d'autocorrélation,  $\eta$  est l'impédance caractéristique du milieu et  $\sigma_{Rayleigh}$  est proportionnel à  $\lambda^{-3}$ .

Le fait que la fonction d'autocorrélation apparaisse dans l'équation 2-3 illustre clairement la relation qui lie l'ordre relatif de la disposition des fibrilles et le phénomène de diffusion.

En résumé, on peut retenir deux caractéristiques essentielles pour expliquer la transparence de la cornée :

- La cornée doit être mince ( $\sim 550 \mu\text{m}$ ) et présenter des fibrilles de collagène de diamètre homogène ( $\sim 30\text{nm}$ ), disposées régulièrement, avec une distance inter-fibrillaire moyenne de  $60\text{nm}$ . Le maintien de cette valeur dépend de la qualité de la substance fondamentale et de l'état d'hydratation du stroma lié à l'action de l'endothélium.
- La structure régulière de l'arrangement des fibrilles de collagène dans la cornée réduit considérablement leur section efficace de diffusion de la lumière.

## 2.2.2.2. Résultats expérimentaux

D'un point de vue applicatif, c'est-à-dire dans le cadre du développement d'outil de chirurgie de la cornée par laser, il est important de considérer non seulement la diffusion, mais également l'absorption du tissu cornéen. Afin de pénétrer en profondeur dans la cornée, il est impératif que celle-ci soit suffisamment transparente, sans quoi l'énergie injectée devra être notablement augmentée, ce qui augmente les risques de lésions. Jusqu'à présent, les mesures de spectres de transmission reposaient sur le travail de Boettner et Wolter, dont les résultats, datant de 1960, sont présentés sur la figure 14 [99,100]. Elles pouvaient également être interpolées à partir des coefficients d'absorption des différents composants de la cornée, comme présenté sur la figure 15 [9]. Pour disposer d'une précision suffisante, nous avons affiné les résultats de Boettner et Wolter dont la résolution n'était que de  $50 \text{ nm}$  dans l'infrarouge. Il a également fallu les compléter par une étude de transmission (résolue en transmission directe et totale)

en fonction du degré d'opacité de la cornée. Dans ce contexte, un montage expérimental a été mis en place afin de mesurer les spectres de la cornée entre 400 nm et 1700 nm, avec des résolutions de 1 à 5 nm (figure 16).

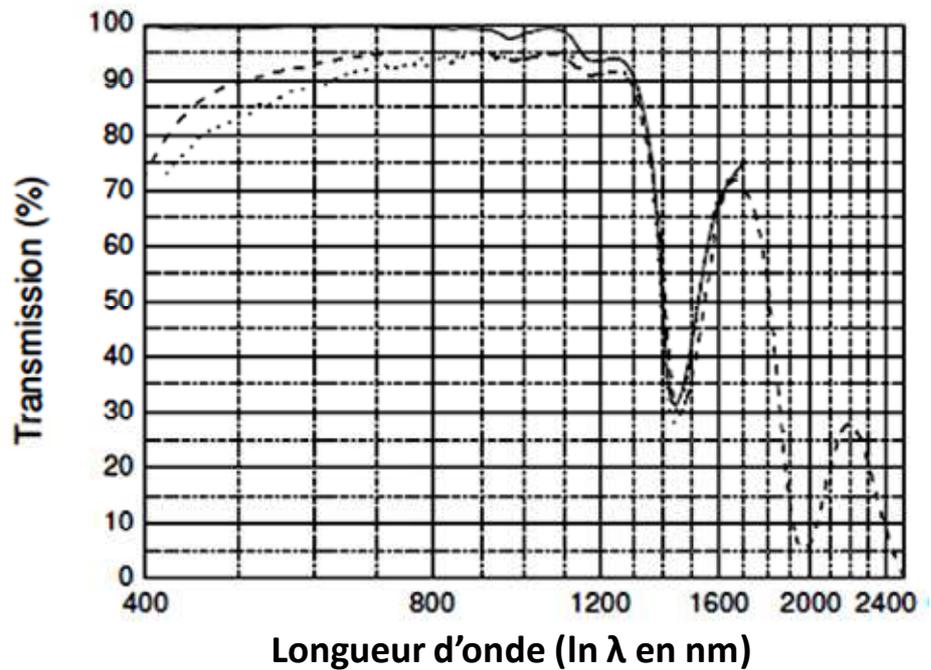


Figure 14 : Spectre de transmission totale d'une cornée saine, tracés à partir des données de Boettner et Wolter (trait d'union), et de nos mesures sur cornée saine (pointillé) et dans le mélange eau/collagène (trait plein) [99,100].

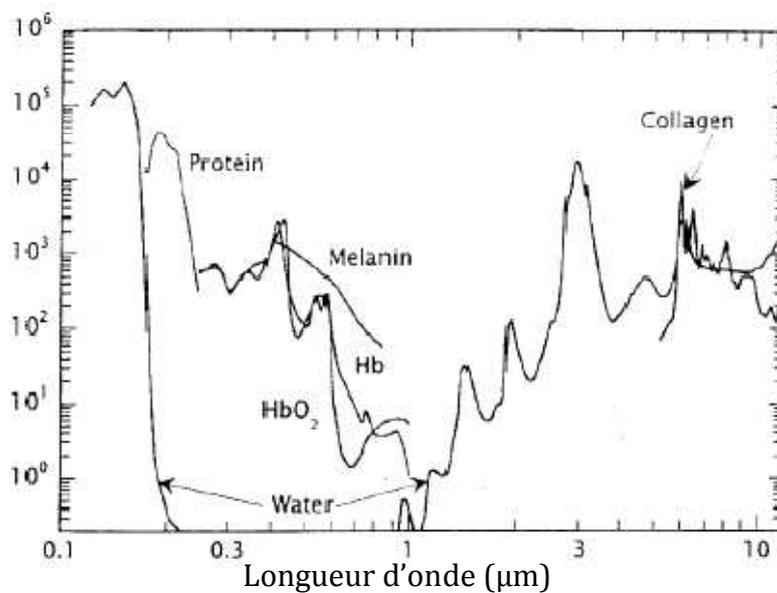


Figure 15 : Coefficient d'absorption des principaux tissus humains[9]

L'association des mesures de transmission (directe et totale) est nécessaire pour quantifier la part de diffusion et d'absorption provoquées par la traversée de la cornée. Les schémas des dispositifs utilisés sont présentés sur la figure 16.

Un premier dispositif (figure 16a) permet de mesurer la transmission « directe » ( $T_D$ ) ou, plus exactement, la part de lumière qui ne subit qu'une faible déviation par rapport à la direction de l'axe optique du fait des petites variations d'indices de réfraction dans la cornée. La lumière est ensuite collectée par une lentille placée à une certaine distance après la cornée pour être couplée<sup>12</sup> dans une fibre d'environ 100 à 200  $\mu\text{m}$  de cœur et reliée à deux spectromètres (visible et infrarouge). La combinaison des deux permet de couvrir une plage de longueurs d'onde allant de 400 nm à 1700 nm, avec une superposition entre 1000 nm et 1100 nm. La configuration du montage est donc proche d'un système confocal puisque l'angle solide de couplage est très étroit ( $\Omega \cong 3\pi \cdot 10^{-8}$  sr). Nous considérons par définition que seuls les photons dont le vecteur d'onde demeure à l'intérieur de cet angle solide ne subissent pas de phénomènes de diffusion. Le dispositif dédié à la mesure de transmission totale  $T_T$ , est constitué d'un faisceau collimaté de lumière blanche qui, après avoir traversé la cornée, est détecté grâce à l'utilisation d'une sphère intégrante placée immédiatement après le tissu et reliée aux spectromètres (figure 16b). Cette mesure donne la quantité totale de lumière traversant la cornée et permet de quantifier la proportion absorbée dans la cornée moins environ 4 % de réflexion et une faible partie rétrodiffusée. Pour effectuer ces deux mesures, la cornée est placée dans un porte-échantillon constitué de deux lentilles placées en contact de la cornée et épousant respectivement la courbure antérieure et postérieure de celle-ci. Afin d'éliminer au mieux la réfraction naturelle de la cornée, les surfaces au contact de l'air sont planes et l'indice de réfraction de ces lentilles est comparable à celui de la cornée.

---

<sup>12</sup> focalisée puis injectée dans une fibre

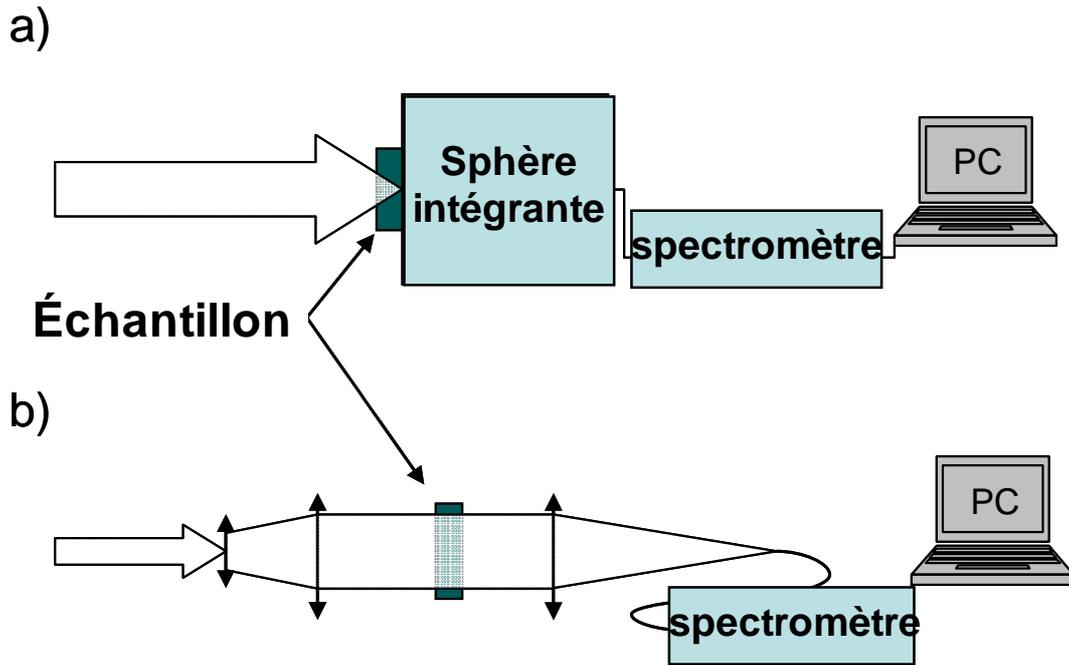


Figure 16 : Dispositifs expérimentaux de mesure des spectres de transmission directe (a) et totale (b).

Les transmissions totale  $T_T$  et directe  $T_D$  peuvent être exprimées comme :

$$T_T = \frac{I_T}{I_0} = e^{-L/\delta_A}, \quad 2-4$$

$$T_D = \frac{I_D}{I_0} = e^{-L/\delta_A} \times e^{-L/\delta_S} = e^{-L/\delta_T}, \quad 2-5$$

Les notations utilisées correspondent à l'intensité incidente sur l'échantillon  $I_0$ , à l'intensité totale transmise  $I_T$  et à l'intensité directe transmise  $I_D$ ,  $n$  étant la densité volumique de diffuseurs,  $\alpha$  le coefficient d'absorption,  $L$  l'épaisseur de l'échantillon et  $\delta$  la profondeur de pénétration effective à  $1/e$  accompagnée d'un indice  $T$ ,  $A$  ou  $S$  faisant référence à la profondeur de pénétration totale, d'absorption et de diffusion respectivement.

En divisant l'équation 2-4 par l'équation 2-3, on obtient la contribution du spectre non diffusé et donc la contribution du spectre diffusé par l'échantillon ( $\Sigma$ ):

$$\Sigma = 1 - \frac{T_D}{T_T} = 1 - e^{-\frac{t}{\delta_s}};$$

2-6

Grâce au protocole de déturgescence mis en place, nous avons pu mesurer les transmissions directe et totale des cornées saines ou présentant différents degrés d'opacité. Les spectres de transmission totale et directe et le spectre de diffusion d'une cornée œdémateuse sont présentés sur la figure 17.

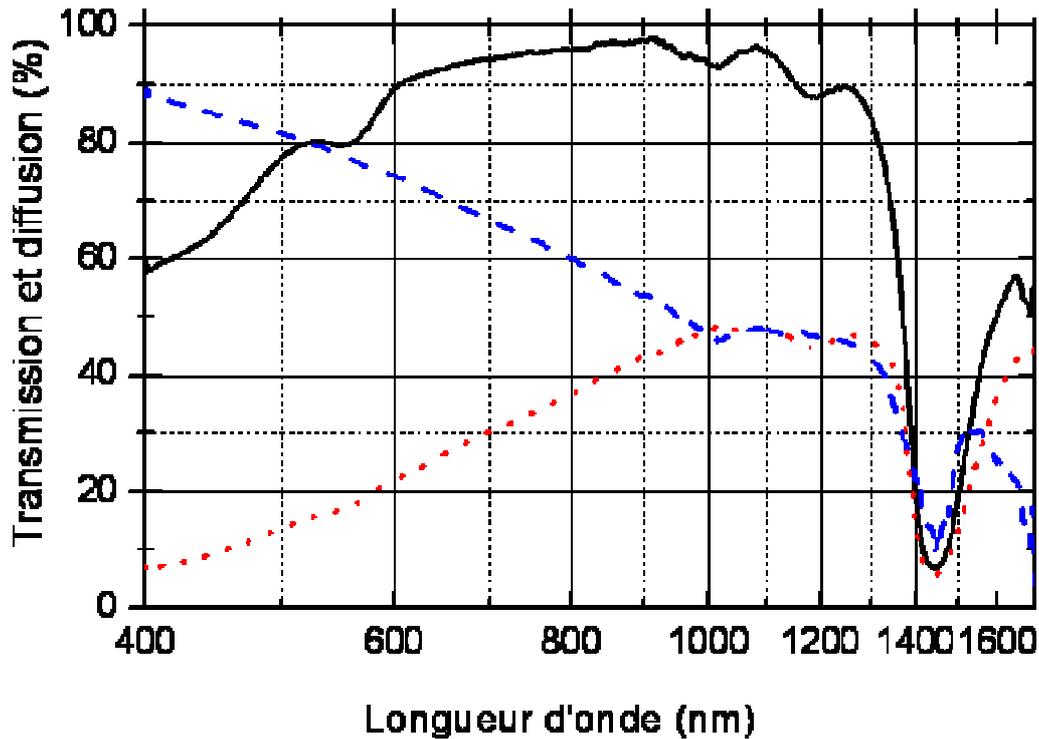


Figure 17 : Spectres de transmission totale  $T_T$  (trait plein noir) et directe  $T_D$  (pointillé rouge) et de diffusion  $\Sigma$  (trait d'union bleu) d'une cornée œdémateuse.

Bien que les valeurs absolues de transmission varient suivant l'état pathologique des cornées, la tendance reste systématiquement identique. Les mesures montrent une zone de forte transmission dans le visible et le proche infrarouge, soit entre 400 nm et 1,3  $\mu\text{m}$ , suivi d'un pic d'absorption centré à 1,45  $\mu\text{m}$  et s'étendant entre 1,35  $\mu\text{m}$  et 1,55  $\mu\text{m}$ , puis, de nouveau, une région de relative transparence entre 1,6 et 1,8  $\mu\text{m}$  avec un peu plus de 50% de lumière transmise.

Afin de vérifier la contribution éventuelle de la diffusion de surface d'une cornée, une étude en transmission a également été réalisée sur un modèle de l'épaisseur d'une cornée, composé d'eau et de collagène de type I en solution acide liquide en proportion identique à celle rencontrée dans les cornées. Les résultats de cette étude montrent que

dans la limite de résolution de notre mesure, le spectre de transmission du modèle est identique à celui de l'eau pure avec une transmission de quasi 100 % dans la zone 400 nm – 1,3 µm. Le tissu cornéen présente lui une baisse progressive de transmission lorsque la longueur d'onde diminue qui est due au fait que les longueurs d'ondes les plus courtes sont plus largement soumises à un processus de diffusion, conformément aux considérations théoriques décrites plus haut. Les longueurs d'onde courtes interagissent d'abord avec l'élargissement du pic de Fourier aux fréquences spatiales de l'ordre de la demi-distance inter-fibrillaire moyenne, ou s'en rapprochant. Au-delà, la transmission à travers la cornée n'atteint pas 100 % car une partie est rétrodiffusée et ne peut être mesurée par la sphère intégrante utilisée.

Sur l'ensemble des spectres présentés sur la figure 17, trois longueurs d'onde présentent un intérêt tout particulier pour la chirurgie de la cornée. En effet, 800 nm et 1050 nm correspondent aux longueurs d'ondes des lasers utilisés expérimentalement et cliniquement, tandis que 1650 nm correspond au maximum local de transmission dans l'infrarouge moyen. Bien que la transmission totale soit supérieure à 800 nm et 1030 nm, la proportion de diffusion est largement moindre à 1650 nm. À cette longueur d'onde, 88 % de l'énergie peut être transmise directement. La synthèse des contributions de transmission totale, directe et de diffusion à chacune de ces longueurs d'onde présentées dans le tableau 5 montre très clairement l'intérêt d'utiliser des lasers émettant à 1650 nm dans le but d'optimiser la chirurgie de greffe de cornée par laser.

	<b>800 nm</b>	<b>1050 nm</b>	<b>1650 nm</b>
<b>Transmission totale</b>	99%	94%	50%
<b>Transmission directe</b>	47%	56%	45%
<b>Diffusion</b>	53%	40%	12%

**Tableau 5 : Comparaison de la transmission totale et directe et de la diffusion à 800 nm, 1050 nm et 1650 nm**

À partir des équations 2-4, 2-5 et 2-6, on peut reformuler ces spectres sous forme de profondeur de pénétration  $\delta$  de la lumière transmise ou sous forme de section efficace de diffusion par fibrille, ce qui est plus pertinent pour déterminer la longueur d'onde optimale en chirurgie de la cornée pathologique.

La figure 18 représente les composantes de profondeur de pénétration totale, de diffusion et d'absorption pour une cornée moyennement œdémateuse d'épaisseur 750

$\mu\text{m}$ . La figure 19 représente la section efficace de diffusion en fonction de la longueur d'onde et de l'épaisseur des cornées.

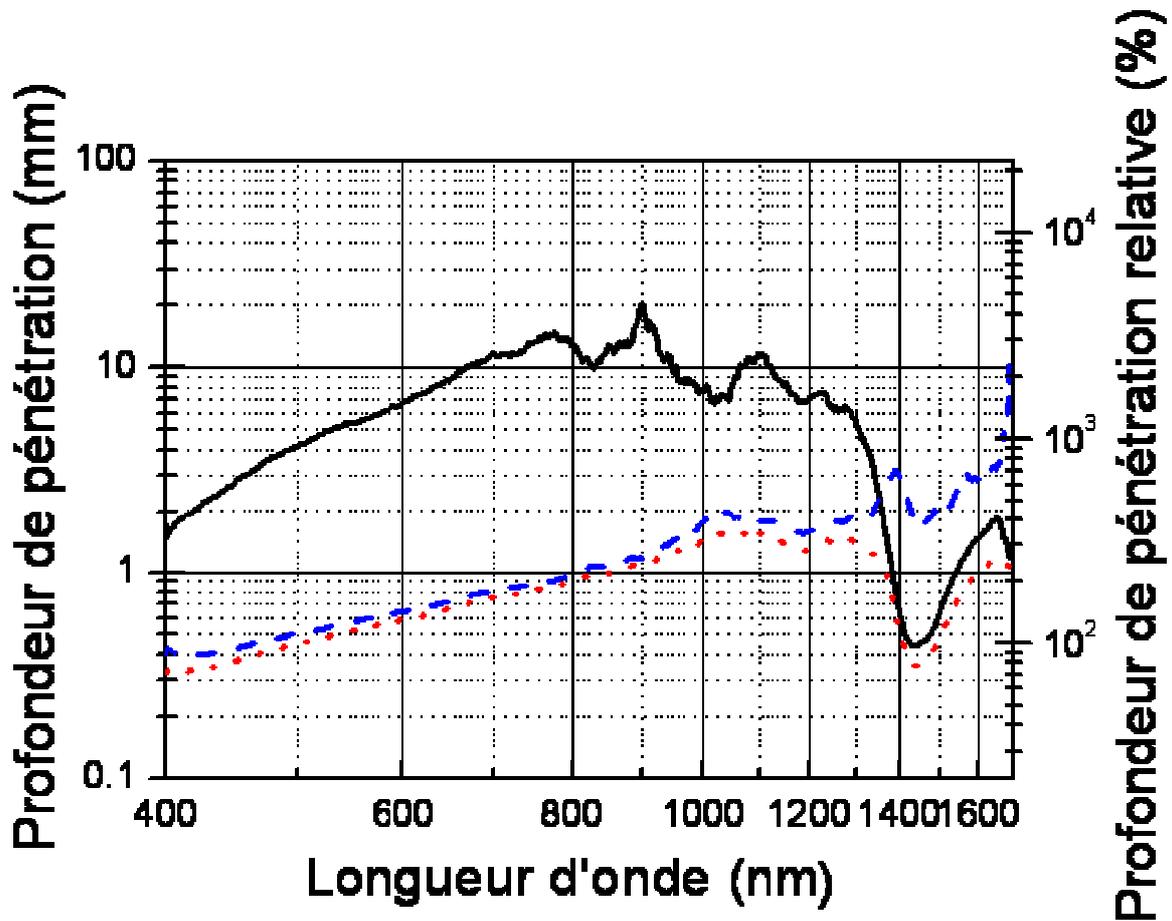


Figure 18 : Profondeur de pénétration dans une cornée (trait d'union bleu) en fonction de ses composantes d'absorption (trait plein noir) et de diffusion (pointillé rouge)

On peut ainsi observer que la profondeur de pénétration augmente de façon quasi-monotone avec la longueur d'onde. Elle est limitée par la diffusion sur tout le spectre de transparence de la cornée et par l'absorption à partir de 1300 nm (considérant l'épaisseur des cornées). Or, puisque l'absorption correspond à une baisse linéaire de l'énergie contrairement à la diffusion qui provoque un élargissement de la fonction d'appareil du laser, elle peut être compensée par une augmentation adaptée et définie de l'énergie. On remarque également que la section efficace de diffusion est environ un facteur 3 plus faible à 1650 nm qu'à 1050 nm. Cela démontre la pertinence d'une chirurgie assistée d'un laser centré à 1650 nm.

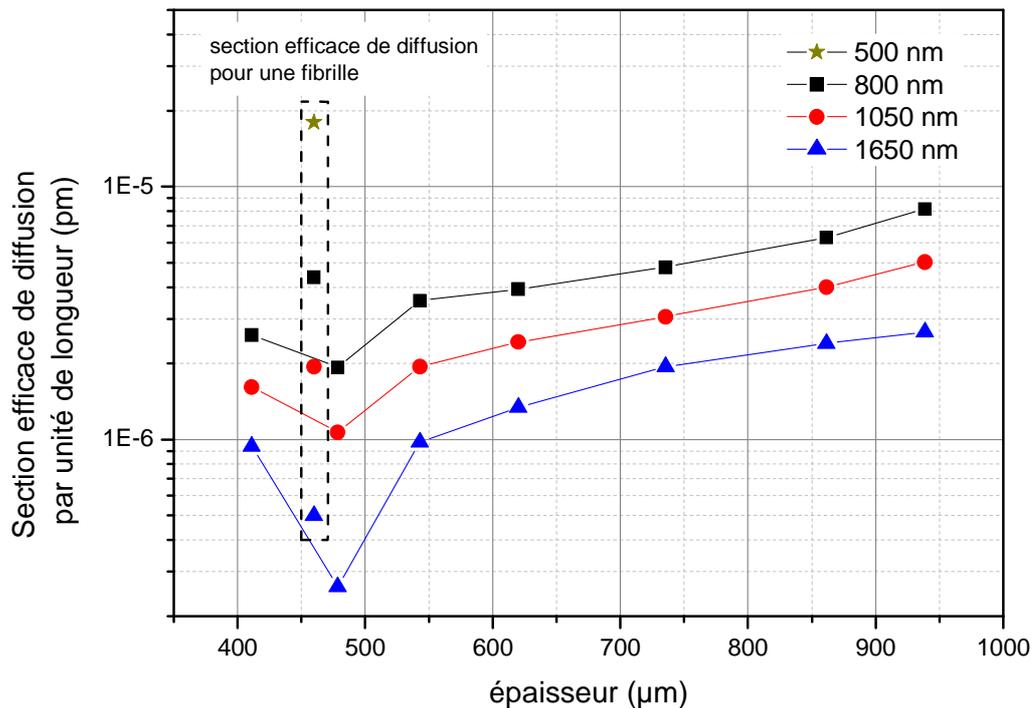


Figure 19 : Section efficace de diffusion en fonction de l'épaisseur des cornées à différentes longueurs d'ondes : 500 nm, 800 nm, 1050 nm et 1650 nm.

La figure 19 montre également que lorsque la cornée devient fortement œdémateuse, la section efficace de diffusion par fibrille devient supérieure à celle d'une fibrille indépendante, ce qui prouve qu'un processus de diffusion supplémentaire s'ajoute à la diffusion Rayleigh collective. On peut attribuer ceci à la diffusion Mie qui devient de plus en plus importante avec l'apparition de « lacs » ou autres défauts de dimensions comparables ou supérieurs à la longueur d'onde. De même, la section efficace de diffusion augmente en deçà de l'épaisseur physiologique, car le collagène subit également une désorganisation.

*En résumé, on peut extraire de ces résultats un certain nombre de conclusions concernant le comportement d'un faisceau laser dans le cadre d'une application sur la greffe de cornée :*

- *la diffusion évolue globalement en  $\lambda^3$  pour une cornée « normalement » œdémateuse, et selon Mc Cally et al. en  $\lambda^2$  lorsque celle-ci est très œdémateuse [101]. Lorsque la cornée est très œdémateuse, la section efficace*

*de diffusion moyenne dans la cornée devient supérieure à celle d'une fibrille indépendante.*

- *la profondeur de pénétration est maximale à 1650 nm et est alors essentiellement limitée par l'absorption. Elle atteint environ 2 mm soit 4 fois plus qu'une cornée saine et au moins 2 fois plus qu'une cornée très œdémateuse.*
- *la section efficace de diffusion est environ 3 fois plus importante à la longueur d'onde des lasers cliniques (autour de 1  $\mu\text{m}$ ) qu'à 1650 nm.*

*Étant donné que la profondeur de pénétration  $1/e$  est limitée par l'absorption et est de l'ordre de 2 mm à 1,65  $\mu\text{m}$  et que la contrainte de diffusion peut être négligée en première approximation, on peut s'attendre à une augmentation d'environ un facteur 3 de la profondeur de pénétration du laser pour une énergie identique lors des expériences de chirurgie sur cornées si l'on passe d'un laser dont la longueur d'onde d'émission est centrée autour de 1  $\mu\text{m}$  à un laser centré à 1,65  $\mu\text{m}$ .*



