

5.1. Dispositif expérimental

5.1.1. Le dispositif d'expériences chirurgicales

Les trois sources laser développées et présentées dans le chapitre précédent ont été testées et utilisées dans le cadre des expériences chirurgicales. Pour rappel, il s'agit d'un amplificateur paramétrique optique (OPA pour *Optical Parametric Amplification*), d'un générateur paramétrique optique (OPG pour *Optical Parametric Generation*) et d'un laser fibré dopé erbium optimisé pour notre application. De plus, la source servant de pompe à l'OPG ayant des propriétés équivalentes à celles des sources cliniques, nous l'utilisons également à titre de comparaison:

- la source OPA pompée par un laser titane:saphir délivre des impulsions de 100 fs à une cadence de 1 kHz, accordables entre 1200 nm et 1750 nm (section 4.2.3). Sur les 300 μJ disponibles nous avons utilisé jusqu'à 2 μJ pour les expériences sur cornées. L'énergie de sortie est modulée par un atténuateur variable contrôlé par ordinateur ;
- la source OPG pompée par un laser solide dopé ytterbium délivre des impulsions de 500 fs à une cadence variable entre 1 et 100 kHz mais est typiquement utilisée pour nos expériences avec un taux de répétition de 10 kHz. Elle est accordable entre 1450 nm et 2000 nm (section 4.3.3) et à ces longueurs d'onde, jusqu'à 20 μJ sont disponibles. Nous utilisons typiquement 0,25 μJ à 2 μJ pour les découpes sur cornée. L'énergie de sortie est directement contrôlée par l'énergie de la pompe injectée ;
- la source fibrée erbium délivre des impulsions de 700 fs à 1 ps, à une cadence de 200 kHz. Elle est centrée à 1594 nm et délivre une énergie allant jusqu'à 1,8 μJ sur tissu. L'énergie peut être modulée par l'utilisation d'un atténuateur variable manuel, par modification de la puissance de pompe ou par rotation de la polarisation par une lame à retard $\lambda/2$ située en entrée de compresseur (section 4.4) [4].

- La source Yb²⁷ délivre des impulsions de 500 fs à 1ps, à une cadence de 1 kHz à 100 kHz, ce qui correspond à des énergies respectives de 1 mJ à 40 µJ et elle est centrée à 1028 nm. L'énergie de sortie est contrôlée soit par l'utilisation d'une lame à retard $\lambda/2$ placé devant une lame de Brewster, soit par contrôle direct du temps d'extraction dans la cavité de l'amplificateur régénératif.

Deux systèmes de contrôle placés à la sortie des sources et accessibles par un miroir basculant ou par réflexion sur une lame de verre permettent de contrôler le spectre et la durée de l'impulsion. Les spectromètres utilisés sont soit un système de la société Avantes²⁸ ayant un détecteur InGaAs dont la plage d'utilisation s'étend de 1 µm à 1,75 µm, soit un système de la société Ocean Optics²⁹ utilisant également un détecteur InGaAs mais refroidi par effet Peltier, sensible de 900 nm à 2,5 µm. La mesure de durée se fait par un autocorrélateur développé au laboratoire ou par un autocorrélateur utilisable également en système FROG³⁰ (*Frequency Resolved Optical Gating*).

Un système de télescope variable en fonction du laser est ensuite installé afin d'obtenir un faisceau dont le diamètre couvre l'ouverture utile des optiques de focalisation utilisées pour les expériences de découpes sur les échantillons.

Un obturateur pilotable par ordinateur permet ensuite de contrôler la délivrance ou non du laser.

Les éléments suivants, sur le parcours optique, sont les optiques de focalisation. Elles sont montées sur un microscope optique inversé qui permet de contrôler précisément leur distance à l'échantillon. Une sortie optique et une autre numérique permettent de visualiser directement ou sur un écran la surface de l'échantillon. Trois objectifs de microscope et une lentille sur mesure peuvent être utilisés pour nos expériences. Leurs différentes caractéristiques sont présentées dans le tableau 9. Elles servent à focaliser le faisceau sur la cornée.

²⁷ Spulse-HP, Amplitude-Systèmes, Pessac, France

²⁸ Avaspec-NIR256-1.7, Avantes, Eerbeek, Pays-Bas

²⁹ NIRQuest512-2.5, Ocean Optics, Dunedin, Floride, États-unis

³⁰ Pulse check autocorelator, APE, Berlin, Allemagne

Optique de focalisation	Correction couvre-objet	Ouverture Numérique	Diamètre théorique de la tâche d'Airy $\lambda = 1,03$	Diamètre théorique de la tâche d'Airy $\lambda = 1,60$	Plage d'utilisation en longueur d'onde
Objectif REFLX Cassegrain Edmund Optics 15×	0	0,28	4,48 μm	6,97 μm	T>95% 800 nm - 10 μm
Objectif de microscope Zeiss LD Plan-Neofluar 20×/corr	0 à 1,5 mm	0,4	3,14 μm	4,88 μm	T>70% 400 nm - 1000 nm
Objectif de microscope Nacet Plan-Apochromatiques 40×	0	0,55	2,28 μm	3,55 μm	Optimisé 600 nm - 1800 nm
Lentille f-thêta sur mesure Wavelength-Technology	0	0,3	4,19 μm	6,51 μm	Optimisée 1600 nm - 1700 nm

Tableau 9 : Caractéristiques des différentes optiques de focalisation utilisées pour les expériences chirurgicales.

Compte tenu des fortes ouvertures numériques, du nombre élevé des lentilles qui composent ces objectifs et de la gamme spectrale inhabituelle, les taux de transmission sont inférieurs aux performances typiques d'objectifs standard optimisés pour le visible. Elles varient de 30 % à 70 % suivant l'objectif et la longueur d'onde utilisée. Seuls les deux derniers objectifs du tableau 9 sont optimisés pour fonctionner dans la plage infrarouge entre 1600 nm et 1700 nm. L'objectif Zeiss à la plus faible transmission dans cette zone, mais permet de corriger les aberrations optiques sur une épaisseur de couvre-objet allant de 0 mm à 1,5 mm. Enfin l'objectif Cassegrain utilise le concept que son nom indique : il n'est pas composé de lentilles mais de deux miroirs sphériques traités or. Le premier à un petit diamètre, qui correspond à l'ouverture utile, il est divergent. Le second beaucoup plus grand est convergent. Cet objectif offre l'avantage de

n'engendrer aucune aberration chromatique sur toute la plage de longueurs d'onde, mais la perte du centre du faisceau est très coûteuse en énergie pour un faisceau gaussien.

Le schéma du dispositif complet est présenté sur la figure 48.

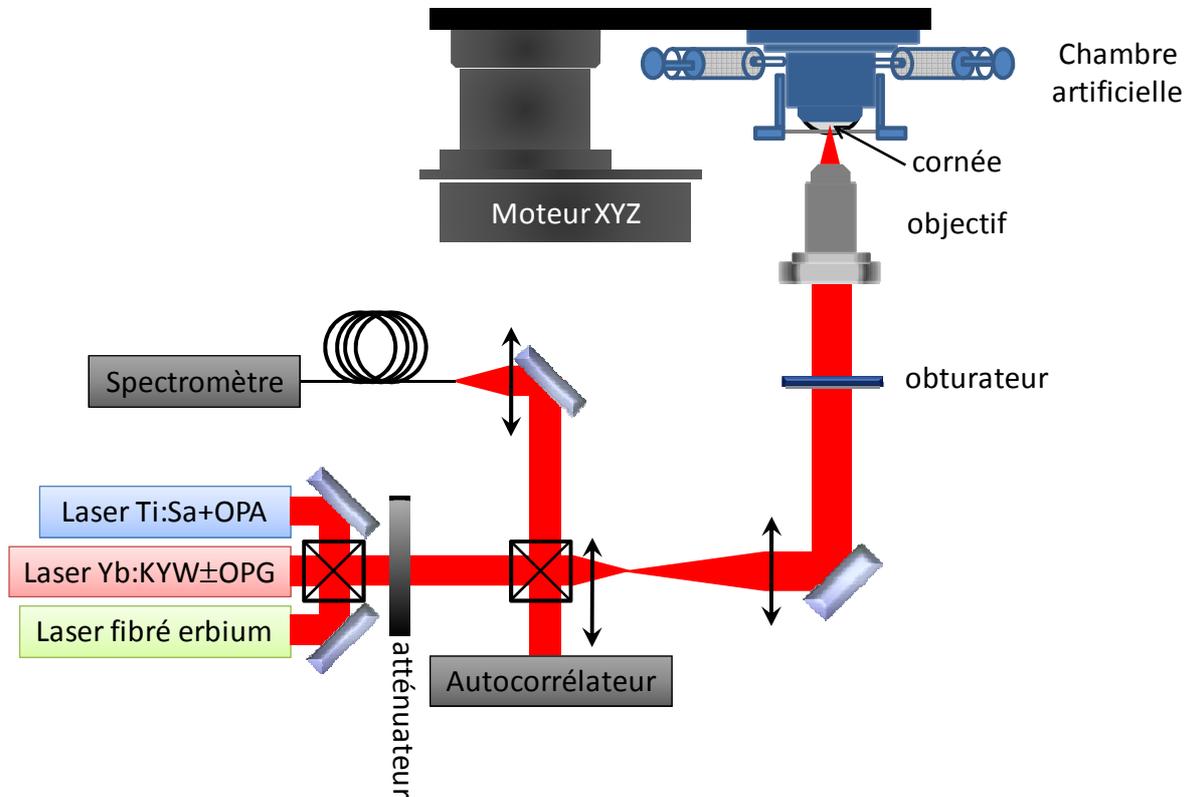


Figure 48 : Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les expériences chirurgicales

Pour les expériences sur cornée, celle-ci est placée sur une chambre artificielle spécialement conçue pour respecter sa courbure naturelle et pour reproduire le plus exactement possible son environnement naturel.

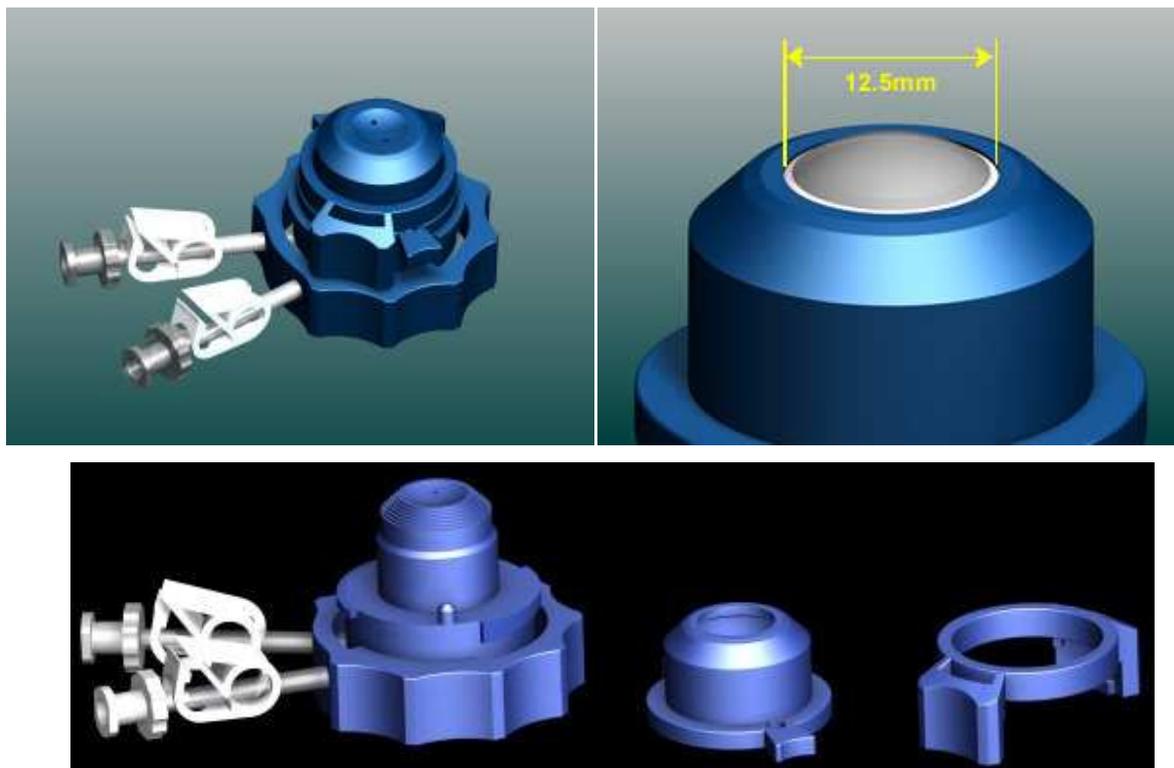


Figure 49 : Chambre artificielle dans laquelle est placée la cornée afin de recréer les conditions de pression et d'environnement naturels [203]

Les deux entrées permettent de remplir la chambre avec une solution saline de bicarbonate (BBS) afin de maintenir un contact avec l'endothélium ainsi qu'une pression constante. De plus, cela permet de s'assurer qu'aucune bulle d'air ne reste au contact de la cornée.

Le porte échantillon est ensuite relié à un déplacement motorisé à trois axes en mode pas à pas ou continu, qui permet de le positionner puis de le déplacer dans les 3 dimensions de l'espace avec une résolution de ± 50 nm. La vitesse de déplacement peut également être contrôlée en fonction de l'ouverture numérique de l'optique de focalisation et de la longueur d'onde.

5.1.2. Préparation des échantillons

Toutes les expériences ont été réalisées sur des cornées humaines obtenues auprès de la banque française des yeux conformément aux règles en vigueur. Les échantillons nous parviennent après environ trois semaines pendant lesquels ils sont

conservés dans un milieu de culture CorneaMax®³¹ à température ambiante. Nous maintenons les cornées dans ces conditions jusqu'à ce qu'elles soient placées dans la chambre antérieure au moment de l'expérience. Ces cornées sont retirées du circuit des greffes par la banque française des yeux lorsqu'elles ne peuvent être transposées, le plus souvent pour cause de mauvaise qualité endothéliale (<2000cellules/mm²). Par conséquent, leur séjour dans le milieu de culture favorise la formation de l'œdème, ce qui les conditionne de façon appropriée à nos études d'optimisation de la chirurgie sur cornée pathologique. Afin de comparer les résultats avec ceux d'une cornée saine, certaines sont d'abord mises en déturgescence 24 h avant l'expérience (section 2.2.1).

Au préalable des expériences par laser, nous retirons l'épithélium des cornées à l'aide d'un coton-tige une fois que celle-ci est placée dans la chambre artificielle. Cette couche de cellules est très fragile lorsque la partie antérieure de l'œil a été retirée de son environnement naturel : si on la laissait en place, les diverses manipulations effectuées sur les cornées pourraient provoquer des irrégularités de surface préjudiciables à la propagation de faisceaux optiques. Une lame de verre de 170 µm faisant office de couvre-objet est ensuite appliquée sur la cornée afin de travailler avec une surface de référence plane sur tout le champ d'expérimentation.

Une fois la procédure laser achevée, les cornées ou la sclère sont replacées quelques heures dans le milieu de culture, le temps que la majorité des bulles de cavitation migrent de la zone de découpe ou se résorbent. Pour l'étude en histologie et en ultrastructure, elles sont ensuite immergées dans une solution de glutaraldéhyde diluée à 2,5% dans du tampon cacodylate de sodium (0,1 molaire ; pH 7,4) pendant environ 3 heures. Après rinçage dans le tampon, elles sont post-fixées dans du tetroxyde d'osmium puis déshydratées dans de l'éthanol à degrés d'alcool croissant. L'étape suivante consiste à les imprégner dans un mélange d'oxyde de propylène et de résine en augmentant progressivement la concentration en résine. Après 12h dans de la résine pure, on procède à l'orientation des échantillons (étape essentielle pour l'étude). On les polymérise enfin dans une étuve à 60° pendant 48 heures. Des coupes semi fines d'environ 1 µm d'épaisseur sont réalisées à l'aide d'un ultramicrotome³², puis colorées au bleu de toluidine. Elles sont alors observées avec un microscope optique³³ (coupes histologiques). De la même façon, des coupes ultra-fines de 100 nm sont préparées et

³¹ Eurobio, courtabœuf, France

³² Reichert OmU2, Autriche

³³ Zeiss Phomi2

contrastées avec une solution d'acétate d'uranyle. Elles sont ensuite analysées avec un microscope électronique en transmission³⁴ (ultrastructure)³⁵.

5.2. Dissection par laser femtoseconde

5.2.1. Introduction

Comme nous l'avons dit en début de cette thèse, la chirurgie par laser femtoseconde a connu un fort essor avec l'introduction de cette technologie dans la première étape de LASIK. Depuis, au moins trois des systèmes cliniques proposent également une option de greffe de cornée. Néanmoins, la plupart des indications de greffe de cornée étant liées à une dégradation des propriétés optiques de ce tissu, l'utilisation de ces routines se heurte aux problèmes de diffusion inhérents aux cornées œdémateuses. Notre solution propose donc d'atténuer cet effet par une augmentation de la longueur d'onde des lasers. Bien que les études de transparence de cornée montrent que le compromis entre l'augmentation de l'absorption et la baisse de la diffusion soit optimal vers 1650 nm pour maximiser la profondeur de pénétration, il restait à démontrer expérimentalement qu'effectivement les avantages de ce décalage justifiaient le développement de sources émettant à ces longueurs d'onde. En effet, deux possibilités ne nécessitant pas de développement de sources existent si l'on souhaite décaler la longueur d'onde d'émission des lasers femtoseconde vers l'infrarouge moyen :

- les lasers chrome:forstérite émettent autour de 1,26 μm , c'est-à-dire juste avant la bande d'absorption de l'eau centrée à 1,45 μm ,
- les lasers de télécommunication dopés erbium ont un gain centré autour d'une longueur d'onde d'émission de 1,55 μm , c'est à dire en fin de cette même bande d'absorption.

Les sources paramétriques couvrant la globalité de ces plages spectrales ont donc permis d'étudier les profondeurs de pénétration autour de ces longueurs d'onde et de comparer les efficacités avec des découpes à 1030 nm.

³⁴ Philips CM10, résolution 0,5 nm

³⁵ Michèle Savoldelli, Hôtel Dieu Paris, France

5.2.2. Méthode

Afin d'évaluer la profondeur de pénétration des faisceaux dans le tissu nous avons effectué des découpes laser dites transfixiantes. La cornée est placée dans sa chambre artificielle, son épaisseur est alors mesurée avec un pachymètre ultrasonore³⁶. Elle est ensuite fixée au support relié aux moteurs de déplacement, puis positionnée au niveau du point focal du laser. Afin de déterminer la position « 0 » qui correspond au point de focalisation du laser au niveau de l'interface air-cornée, la cornée est déplacée le long de l'axe optique du laser (verticalement lorsque nous travaillons sur le microscope inversé). Lorsque le laser est focalisé dans la lame de verre qui sert de couvre-objet, le plasma alors créé émet de la lumière visible. Il suffit alors de déplacer la cornée en direction du laser jusqu'à ce que cet effet disparaisse pour savoir que nous sommes à l'interface verre-tissu. Le laser est ensuite bloqué et la cornée est avancée en sens inverse de l'axe optique d'une distance équivalente à son épaisseur plus environ 200 μm pour prendre en compte les incertitudes de mesures et les variations d'épaisseur entre le centre et la périphérie de la cornée. L'obturateur libère le faisceau laser dès que la procédure de découpe démarre.

Pour nos expériences, la procédure dite transfixiante consiste à réaliser une incision de 1 à 2 mm de longueur en partant de la partie postérieure de l'échantillon (l'endothélium), vers la partie antérieure (épithélium). Les déplacements horizontaux sont calculés à partir du rayon de la tâche d'Airy ρ , défini en fonction de l'ouverture numérique ON de l'optique de focalisation comme :

$$\rho = 1,22 \frac{\lambda}{2ON} ,$$

de façon à ce que chaque tâche focale se juxtapose en se chevauchant légèrement aux extrémités.

Le pas et la vitesse de déplacement sont directement calculés par le programme de pilotage des moteurs en fonction de la longueur d'onde utilisée et de l'ouverture numérique des objectifs. Bien qu'aux ouvertures numériques de nos objectifs, le volume du point focal soit plus important dans l'axe optique, nous conservons les mêmes tailles de pas et la même vitesse de déplacement dans cet axe. Le chevauchement est donc plus important, mais cela permet de diminuer les risques de subsistance de ponts tissulaire

³⁶ Pocket II, Quantel medical, Clermont-Ferrand, France

(parties de tissu non coupées par le laser) et n'engendre théoriquement aucun effet secondaire. En effet, aux cadences laser utilisées aucun effet cumulatif sur plusieurs impulsions n'est à prévoir en deçà de quelques MHz. Un schéma de ce protocole est présenté sur la figure 50. Entre deux découpes, un espacement d'au moins 200 μm est respecté afin de ne pas risquer de modifier les résultats lors des prélèvements de coupes semi fines et ultra fines par ultramicrotome. De plus, l'ensemble des découpes ne peut pas dépasser 2,5 mm car cela correspond à la taille des blocs de résines dans lesquels les échantillons sont fixés. Ce protocole est similaire quelque soit le laser utilisé et quelque soient la nature et l'état du tissu.

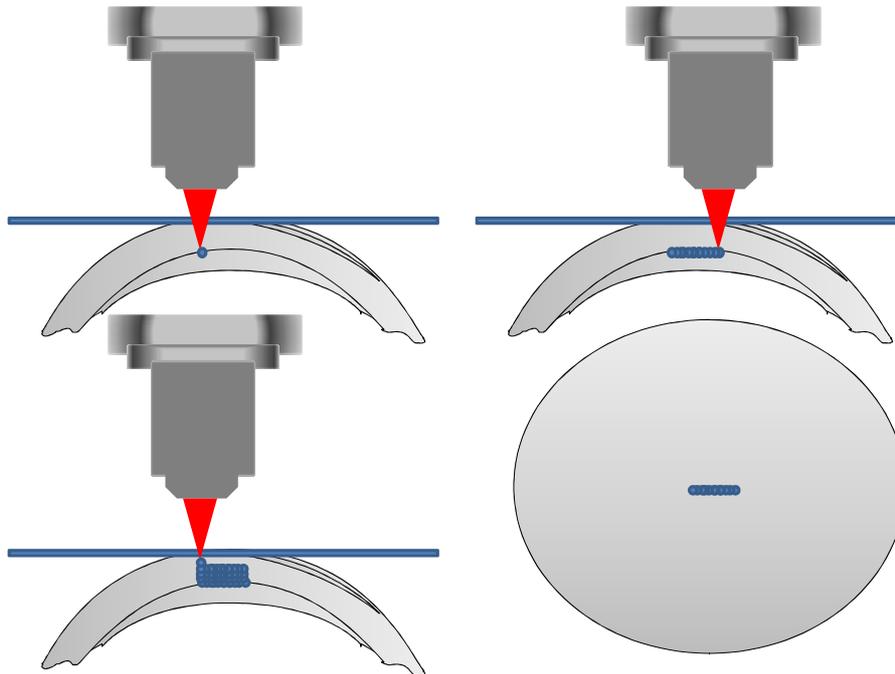


Figure 50 : Schéma décrivant le protocole de découpe transfixiante par laser dans le volume du tissu cornéen

5.2.3. Seuil de claquage optique

Pour des impulsions femtoseconde, on trouve dans la littérature un seuil de claquage optique pour des densités d'énergie légèrement inférieures à $2 \text{ J}/\text{cm}^2$ [156,204, 205]. Ce seuil ne dépend *a priori* que peu de la longueur d'onde. Il est de plus mesuré en surface des échantillons : il ne tient donc pas compte des effets supplémentaires qui peuvent le faire varier, ou qui peuvent modifier la surface du point focal dans le volume si l'on considère notamment l'absorption, la diffusion ou encore les aberrations sphériques. Pour mesurer ce seuil, différentes conventions ont été adoptées :

- énergie de l'impulsion divisée par la surface définie à $1/e^2$ du rayon w de la tâche focale d'un faisceau gaussien :

$$w = 0,32 \frac{\lambda}{n \sin \theta},$$

où n est l'indice de réfraction du tissu et θ est le demi-angle d'ouverture de l'optique de focalisation ;

- énergie totale de l'impulsion divisée par la surface de la tâche d'Airy dont on redonne le rayon ρ .

$$\rho = 0,61 \frac{\lambda}{n \sin \theta},$$

exprimé en fonction de l'ouverture numérique de l'optique de focalisation $n \sin \theta$;

- éclairement moyen de la tâche d'Airy ;
- intensité crête du pic gaussien ;
- intensité crête de la tâche d'Airy.

Pour nos expériences, nous avons travaillé à partir de la seconde définition. Les deux dernières sont rarement utilisées pour parler des résultats expérimentaux. Cependant, il faut calculer la valeur crête du profil du point focal pour pouvoir évaluer les énergies en entrée d'objectifs par rapport au seuil théorique au point focal. Pour un faisceau limité par diffraction comme c'est le cas lorsque l'on couvre la pupille de l'objectif, cela équivaut à une énergie mesurée en sortie d'objectif environ quatre fois supérieure à la moyenne sur la tâche d'Airy.

Nous avons postulé que les seuils devaient être relativement semblables sur l'ensemble de la plage de longueur d'onde étudiée et sommes donc partis de l'étude réalisée par Valeria Nuzzo durant sa thèse, dont les résultats sont présentés dans le tableau 10 [3].

Pour évaluer expérimentalement ce seuil de claquage optique, des incisions laser ont été effectuées proche de la surface du tissu en augmentant progressivement l'énergie du laser. Dès que des bulles nettes et régulières étaient formées sur le trajet effectué par le laser, le seuil de claquage était considéré comme étant juste atteint.

Optique de focalisation	Ouverture numérique	Seuil			
		théorique $\lambda_1=800$ nm /1,03 μm	Seuil expérimental $\lambda_1=800$ nm	Seuil théorique $\lambda_2=1,3$ μm	Seuil théorique $\lambda_3=1,6$ μm
Objectif cassegarin	0,28	$\cong 190$ nJ /315 nJ	$\cong 290$ nJ	$\cong 500$ nJ	$\cong 765$ nJ
Objectif Zeiss $\times 20$	0,4	$\cong 94$ nJ /155 nJ	$\cong 200$ nJ	$\cong 250$ nJ	$\cong 375$ nJ
Objectif Nachtet $\times 40$	0,55	$\cong 50$ nJ /80 nJ	$\cong 100$ nJ	$\cong 130$ nJ	$\cong 200$ nJ

Tableau 10 : Énergie du seuil de claquage optique dans la cornée en fonction de l'optique de focalisation pour un seuil de claquage théorique de $2\text{J}/\text{cm}^2$ [5,68]

L'ensemble de ces données nous renseigne sur l'ordre de grandeur de l'énergie théoriquement nécessaire pour obtenir une incision propre dans un milieu parfaitement transparent et non diffusant. Les énergies permettant d'atteindre le seuil de claquage en volume varient avec la longueur d'onde car les dimensions du point focal varient avec la longueur d'onde. En effet, on peut déduire de ces chiffres qu'il faut théoriquement utiliser au minimum 4 fois plus d'énergie à 1600 nm qu'à 800 nm ($2^2=1600^2/800^2$) et 2,4 fois plus à 1600 nm qu'à 1030 nm ($1600^2/1030^2$), avec une même optique de focalisation pour atteindre le seuil de claquage, car les surfaces de focalisation augmentent avec le carré des longueurs d'ondes. Nous verrons dans les résultats que cette logique n'est plus respectée en volume. Cela s'explique essentiellement par la meilleure conservation de la fonction d'appareil du faisceau avec la baisse de la diffusion lorsque l'on augmente la longueur d'onde d'émission des lasers. On peut donc dire que si à même énergie le résultat est identique à 1030 nm et à 1650 nm, la propagation du faisceau dans le volume du tissu a été nettement moins perturbée à 1650 nm qu'à 1030 nm. En effet, l'élargissement de la fonction d'appareil causé par la diffusion est nettement plus fort que celui due à l'augmentation de la longueur d'onde (convolution d'une fonction étroite (tâche d'Airy) par une fonction plus large (diffusion)).

5.2.4. Résultats

5.2.4.1. Étude de l'influence de la longueur d'onde sur les découpes

5.2.4.1.1. Résultats avec la source OPA

Les premières découpes ont été réalisées avec l'objectif Zeiss d'ouverture numérique 0,4 à des énergies d'environ 1 μJ , en utilisant la source OPA avec une cadence d'impulsions de 1 kHz. Ces découpes ont été effectuées suivant un protocole transfixiant (laser focalisé sur la partie postérieure et remontant progressivement vers la surface), en variant la longueur d'onde tous les 100 nm entre 1200 nm et 1600 nm. Elles ont donc permis d'évaluer la profondeur de pénétration et la qualité des découpes aux longueurs d'onde inférieures au pic d'absorption de l'eau centré à 1450 nm, situées au niveau de ce pic et supérieures à ce pic. La figure 51 montre les résultats obtenus sur une cornée d'environ 800 μm d'épaisseur à 1200 nm, 1300 nm et 1400 nm. La découpe à 1600 nm effectuée sur cette même cornée est présentée en plus grand détails en ultrastructure sur la figure 52. L'énergie n'est que de $3 \times$ le seuil théorique à 1600 nm et monte jusqu'à environ $4 \times$ ce seuil vers 1200-1300 nm. Malgré la faible énergie, l'incision est régulière et de qualité constante sur toute la profondeur de découpe lorsque le tissu reste relativement peu absorbant. Par contre, à 1400 nm, outre le fait que l'absorption diminue fortement la profondeur de pénétration, on observe déjà une légère augmentation du contraste en bordure des incisions. Si l'on compare les profondeurs de pénétration, on remarque que mise à part l'incision effectuée dans la zone d'absorption à 1400 nm et qui atteint 180 μm de profondeur. Les profondeurs augmentent bien avec la longueur d'onde avec un maximum local à 1600 nm. On obtient donc à 1200 nm une profondeur de découpe de 335 μm , à 1300 nm un résultat équivalent mais légèrement supérieur avec 345 μm , et à 1600 nm un optimum avec 445 μm . Ces mesures sont résumés dans le tableau 11. On peut également observer que les découpes n'atteignent pas la surface de la cornée. Ceci est intentionnel, nous avons interrompu le traitement laser à une faible distance avant la surface afin d'éviter d'usiner le verre, ce qui peut ensuite détériorer les découpes car de petits fragments peuvent ainsi se déposer sur le tissu [3]. Ces résultats mettent en valeur l'intérêt d'une source centrée entre 1600 nm et

1700 nm donc au-delà du pic d'absorption plutôt que juste avant ce pic à 1200 nm ou 1300 nm.

Tableau 11 : Paramètres des incisions de la figure 51

Incision	A	B	C
Longueur d'onde (μm)	1,20	1,30	1,40
Profondeur de pénétration (μm)	435	470	210

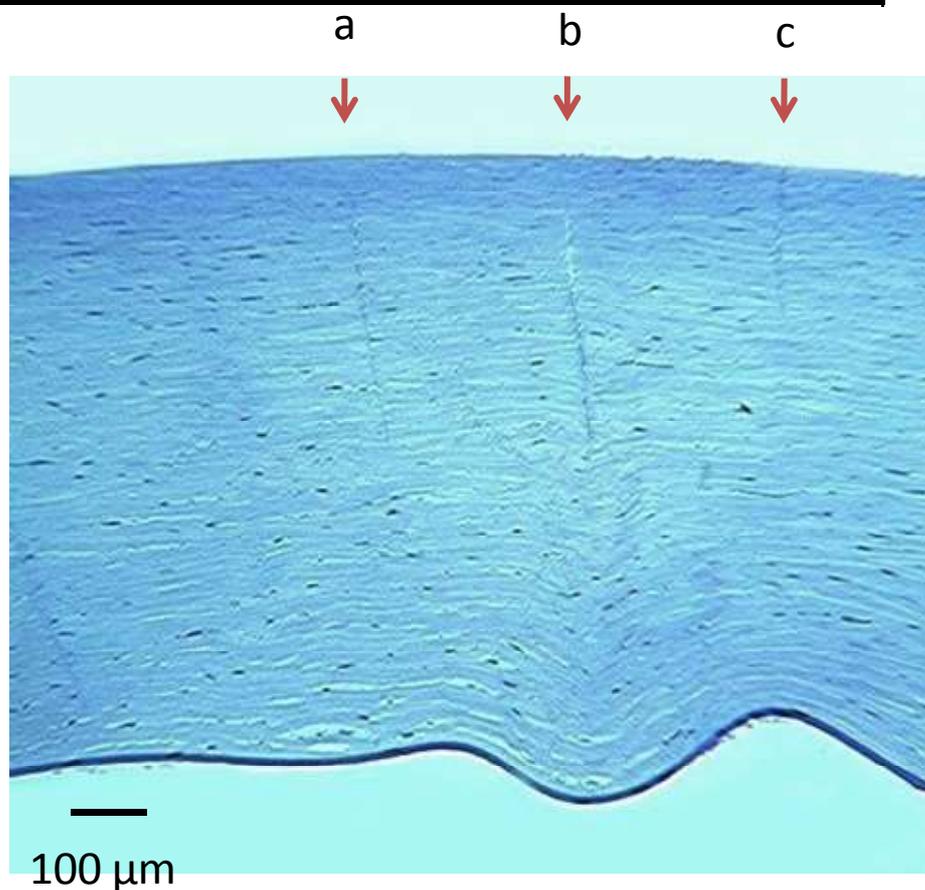


Figure 51 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse de 800 μm avec la source OPA, à 1,2 μm (a), 1,3 μm (b) et 1,4 μm (c). L'ouverture numérique était de 0,4 et l'énergie d'environ 1 μJ .

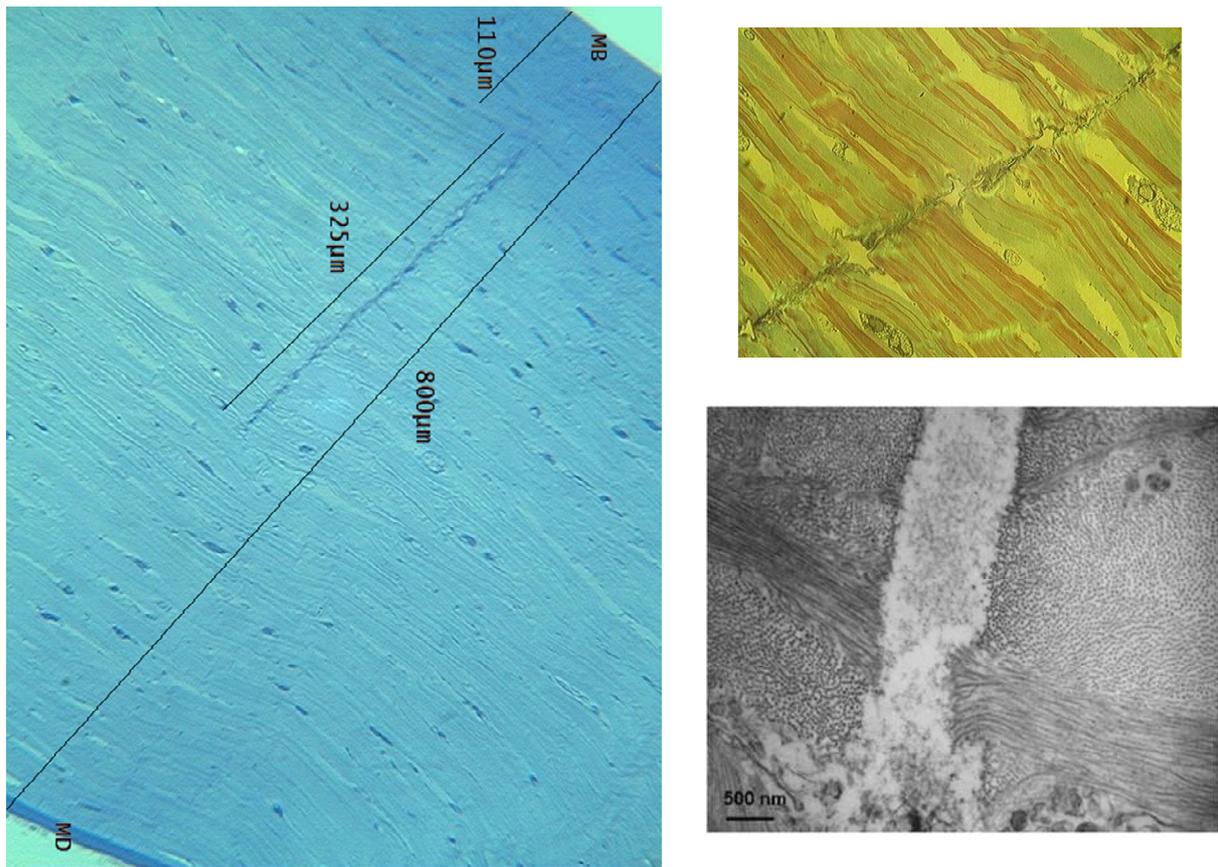


Figure 52 : Coupe histologique de l'incision réalisée sur une cornée humaine œdémateuse de 800 µm avec la source OPA à 1600 nm. L'ouverture numérique était de 0,4 et l'énergie d'environ 1 µJ. Une photo à plus fort grossissement réalisée en polarisation est également présentée (en haut à droite). Une photo d'ultrastructure permet de se rendre compte de la qualité de la découpe (en bas à droite)

5.2.4.1.2. Résultats avec la source OPG

Les découpes réalisées avec la source OPG ont été effectuées avec l'objectif Nacet, d'ouverture numérique 0,55, à des énergies d'environ 2 µJ et un taux de répétition de 10 kHz. Ces découpes ont été effectuées suivant un protocole transfixiant, en variant la longueur d'onde tous les 50 nm entre 1450 nm et 1700 nm. À titre de comparaison, une découpe a également été effectuée sur cette même cornée à 1030 nm. Le but de ces expériences était quadruple :

- confirmation de la longueur d'onde optimale et validation sur cornée œdémateuse ;
- confirmation des effets secondaires à l'absorption ;
- étude de la profondeur de pénétration à la longueur d'onde télécom 1,55 µm ;

- comparaison avec la longueur d'onde clinique 1,03 μm .

La figure 53 montre les résultats de ces incisions en histologie et la figure 54 ceux en ultrastructure. Il s'agissait d'une cornée très œdémateuse d'environ 1 mm d'épaisseur. Sept incisions y ont été réalisées à 1030 nm, 1450 nm, 1500 nm, 1550 nm, 1600 nm, 1650 nm et 1700 nm. Compte tenu de l'état fortement avancé de l'œdème, nous avons utilisé une énergie correspondant à environ 10 fois le seuil théorique de claquage en surface entre 1450 nm et 1700 nm et environ 25 fois ce seuil vers 1030 nm. Ces paramètres et les profondeurs de pénétration associées sont résumés dans le tableau 12.

L'incision effectuée au maximum d'absorption vers 1450 nm présente de forts effets secondaires, avec une partie importante de débris de tissu sur les bords de l'incision, ainsi qu'une membrane apparaissant noircie. Elle se caractérise par une très faible profondeur de pénétration. Bien qu'apparaissant moins nettement sur la figure 53, ce phénomène reste semblable à 1500 nm avec une profondeur de pénétration équivalente.

Les découpes à 1550 nm présentent également de nombreux débris de collagène en bordure de découpe ainsi qu'une membrane beaucoup plus contrastée que le collagène sain. La profondeur de pénétration a environ doublé mais reste faible. Une augmentation de l'énergie entraînerait encore plus d'effets secondaires sans garantir une nette amélioration de la profondeur de pénétration.

De même, à 1600 nm on constate une augmentation de contraste membranaire en bordure de découpe et une profondeur de pénétration environ équivalente. Ce résultat peut sembler contradictoire avec ceux obtenus avec la source OPA. Cependant, il faut prendre en compte les fortes différences de largeurs spectrales : le spectre de la source OPG fait à cette longueur d'onde environ 100 nm de largeur contre deux fois moins pour la source OPA et environ dix fois moins pour la source fibrée. Par conséquent une grande partie du spectre demeure dans la zone d'absorption du tissu lorsque l'on effectue des découpes centrées à 1600 nm avec cette source.

Les découpes à 1030 nm, 1650 nm et 1700 nm sont régulières, avec une qualité constante dans le volume, malgré quelques débris de collagène dans la partie antérieure de la découpe à 1650 nm qui suggère que l'énergie utilisée est alors trop importante.

Aucun pont tissulaire n'est observé en partie antérieure de l'incision. La partie la plus postérieure reste également de bonne qualité malgré quelques rares ponts tissulaires.

L'incision à 1650 nm est indéniablement optimale en considérant la profondeur de pénétration puisque l'on atteint 900 μm , ce qui valide ce choix de longueurs d'onde pour réaliser des greffes dans la quasi-totalité des cornées pathologiques d'un patient. En effet, chez un patient dont la pathologie serait déjà très avancée, les épaisseurs atteignent généralement 800 μm et au maximum 850 μm .

Tableau 12 : Paramètres des découpes de la figure 53

Incision	A	B	C	D	E	F	G
Longueur d'onde (μm)	1,70	1,65	1,60	1,55	1,50	1,45	1,03
Profondeur de pénétration (μm)	500 a	900 b	275 c	350 d	90 e	125 f	550 g

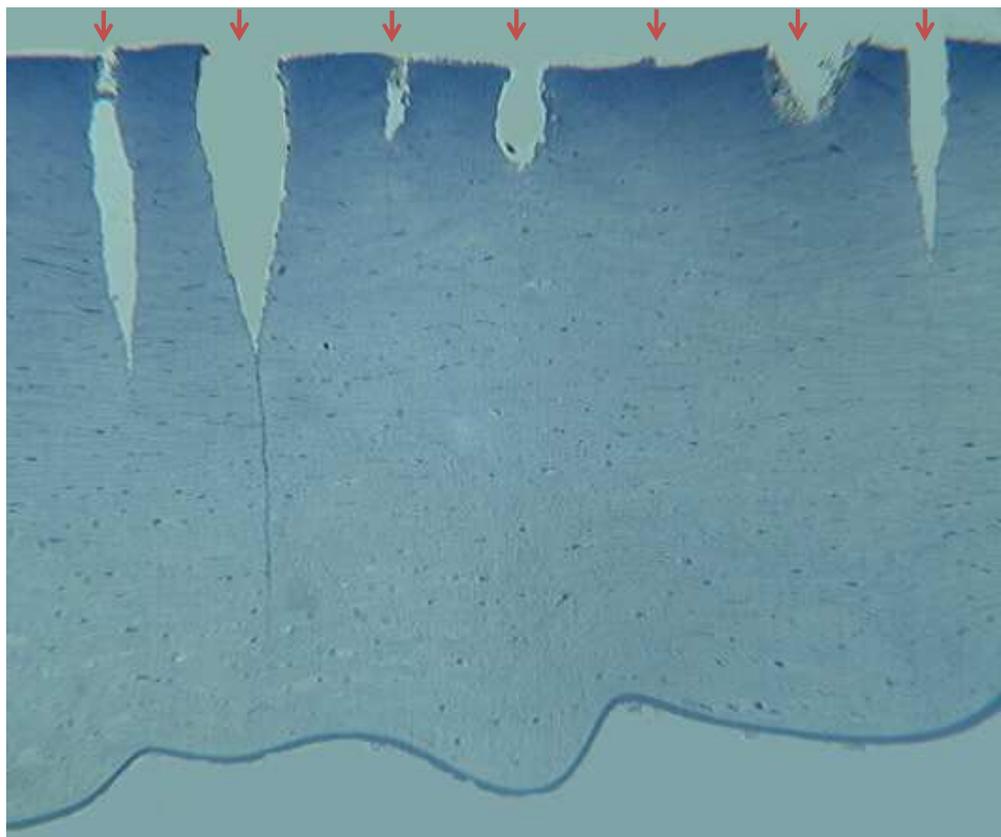


Figure 53 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse de 1 mm avec la source OPG à, 1030 nm, 1450 nm, 1500 nm, 1550 nm, 1600 nm, 1650 nm et 1700 nm. L'ouverture numérique était de 0,55 et l'énergie d'environ 2 μJ .

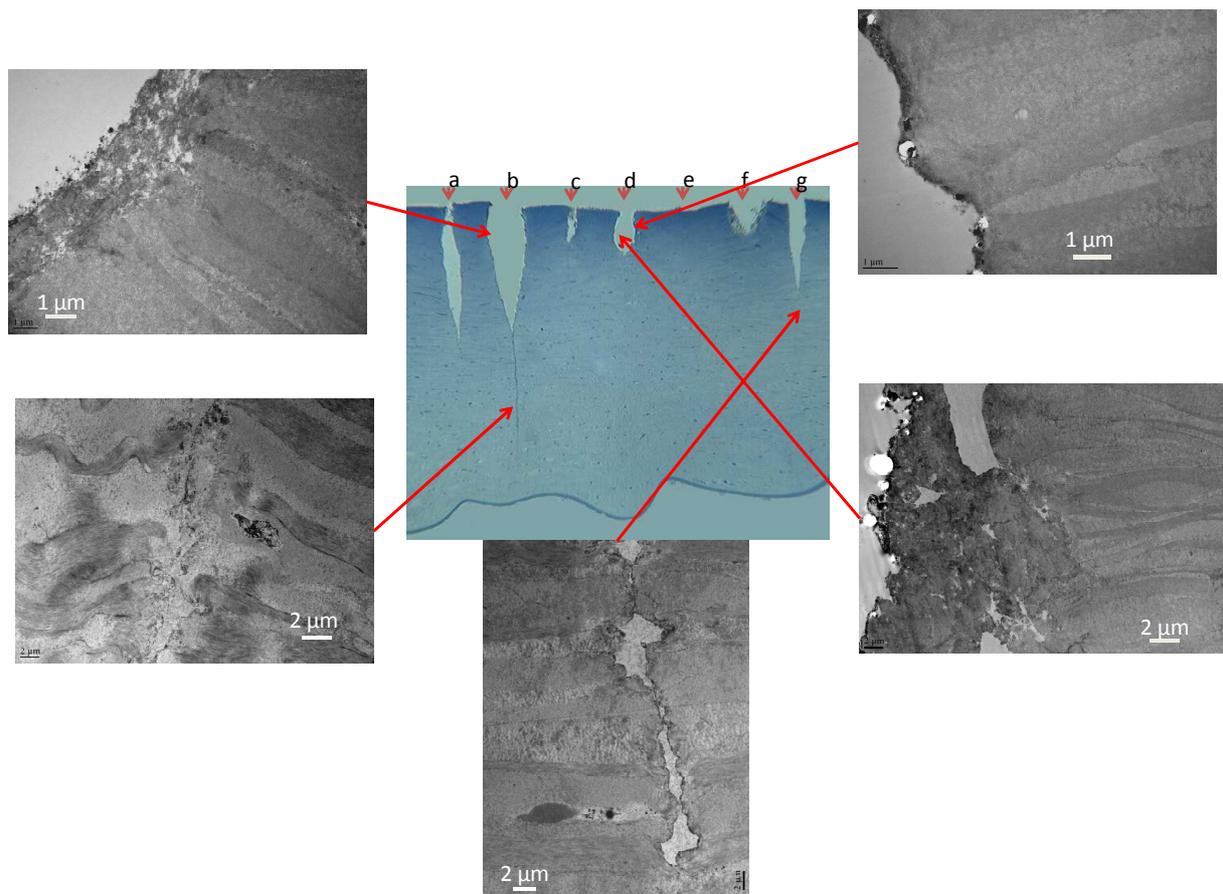


Figure 54 : Ultrastructure des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse de 1 mm avec la source OPG à 1030 nm, 1450 nm, 1500 nm, 1550 nm, 1600 nm, 1650 nm et 1700 nm. L'ouverture numérique était de 0,55 et l'énergie d'environ 2 μ J.

5.2.4.2. Dissection avec le laser fibré dopé erbium

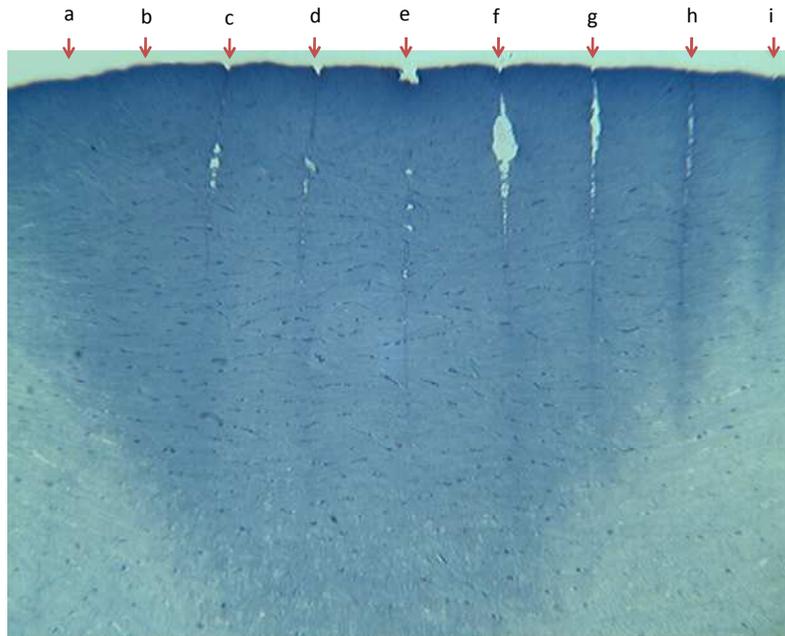
Les expériences de découpe à partir de la source fibré erbium centré à 1594 nm ont également été réalisées avec l'objectif Nacet, d'ouverture numérique 0,55. Plusieurs études de profondeur de pénétration en fonction de l'énergie ont été menées.

Les figures 55, 56 et 57 montrent trois séries d'expériences représentées en histologie. Les résultats de la figure 55 sont également présentés en ultrastructure sur la figure 58. Pour ces découpes, nous avons fait varier l'énergie du laser de pompe suivant les énergies décrites dans le tableau 13:

Incision	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Figure 55 E(μ)	1,6	1,8	1,8	1,6	1,37	1,14	1	0,840	0,760	0,760
Figure 56 E(μ)	1,6	1,6	1,37	1,37	1,14	1,14	1	1	0,760	0,760
Figure 57 E(μ)	1,4	1,4	1,4	1,14	1	760	-	-	-	-

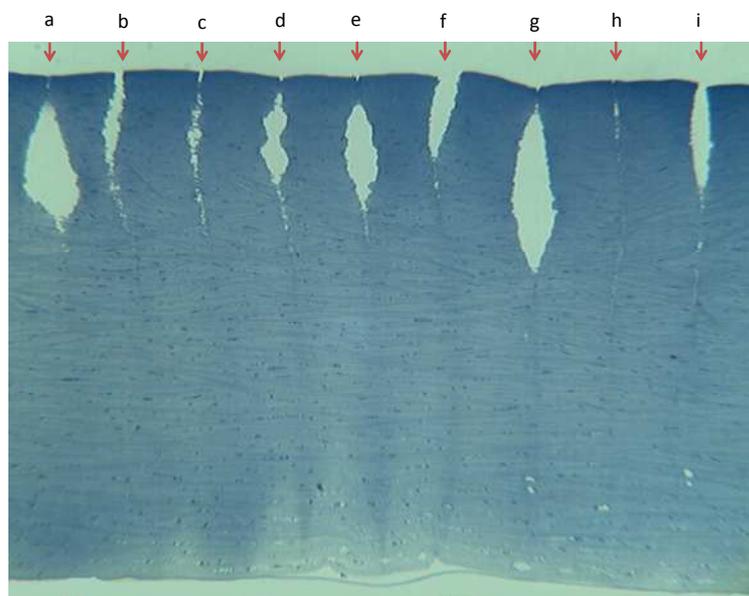
Tableau 13 : Paramètres énergétiques en μ J des incisions des figures 55, 56 et 57

Parmi l'ensemble des expériences réalisées dont les résultats présentés avec ce laser, il est difficile de déduire une tendance, ou de conclure sur les performances du laser, compte tenu de la grande diversité des résultats obtenus. On remarque de façon générale que la découpe est de qualité variable dans le volume du tissu, avec de nombreux effets secondaires. Bien que ces effets atteignent de forte profondeur de pénétration, la découpe effective reste à des profondeurs moyennes. Dans tous les cas, on observe, avec plus ou moins d'ampleur, d'importantes variations de contraste sur les photos d'histologie. Ces variations s'étendent sur de larges zones et ne sont pas confinées aux bordures des coupes. Lorsque l'on étudie ces zones en ultrastructure, on se rend compte que le collagène est fortement déstructuré, ce qui apparaît comme un effet flouté à l'échelle micrométrique (en ultrastructure). Il est encore difficile d'expliquer l'origine de cette modification du collagène. Nous attribuons pour l'instant ce phénomène à des effets photochimiques.



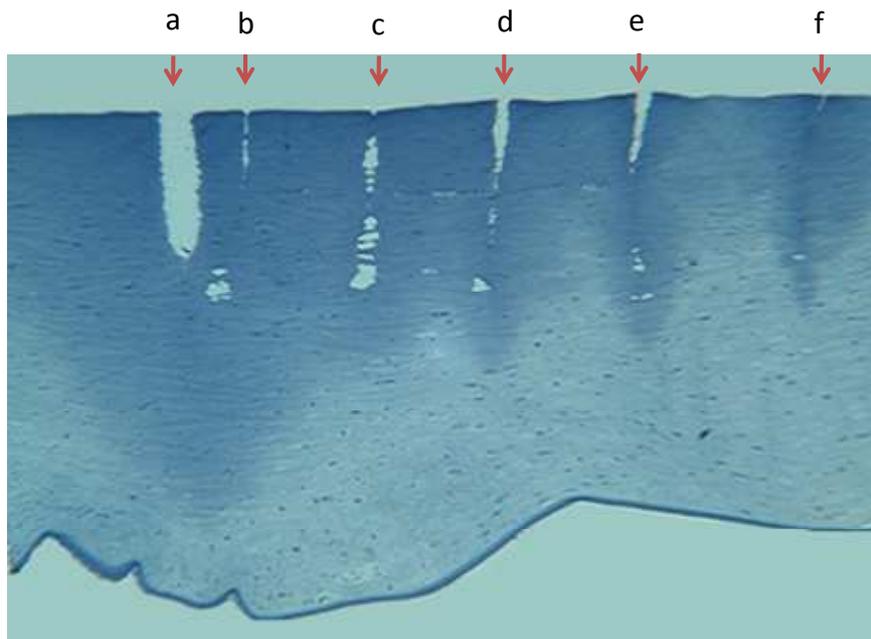
Incision	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Figure 55	1,6	1,8	1,8	1,6	1,37	1,14	1	0,840	0,760

Figure 55 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse d'environ 1 mm avec la source fibrée erbium à 1594 nm. L'ouverture numérique était de 0,55 et l'énergie a été variée entre 760 nJ et 1,8 μ J.



Incision	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Figure 56	1,6	1,6	1,37	1,37	1,14	1,14	1	1	0,760	0,760

Figure 56 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse d'environ 1 mm avec la source fibrée erbium à 1594 nm. L'ouverture numérique était de 0,55 et l'énergie a été variée entre 250 nJ et 1,5 μ J.



Incision	A	B	C	D	E	F
Figure 57	1,4	1,4	1,4	1,14	1	760

Figure 57 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse d'environ 1 mm avec la source fibrée erbium à 1594 nm. L'ouverture numérique était de 0,55 et l'énergie a été variée entre 760 nJ et 1,4 μ J.

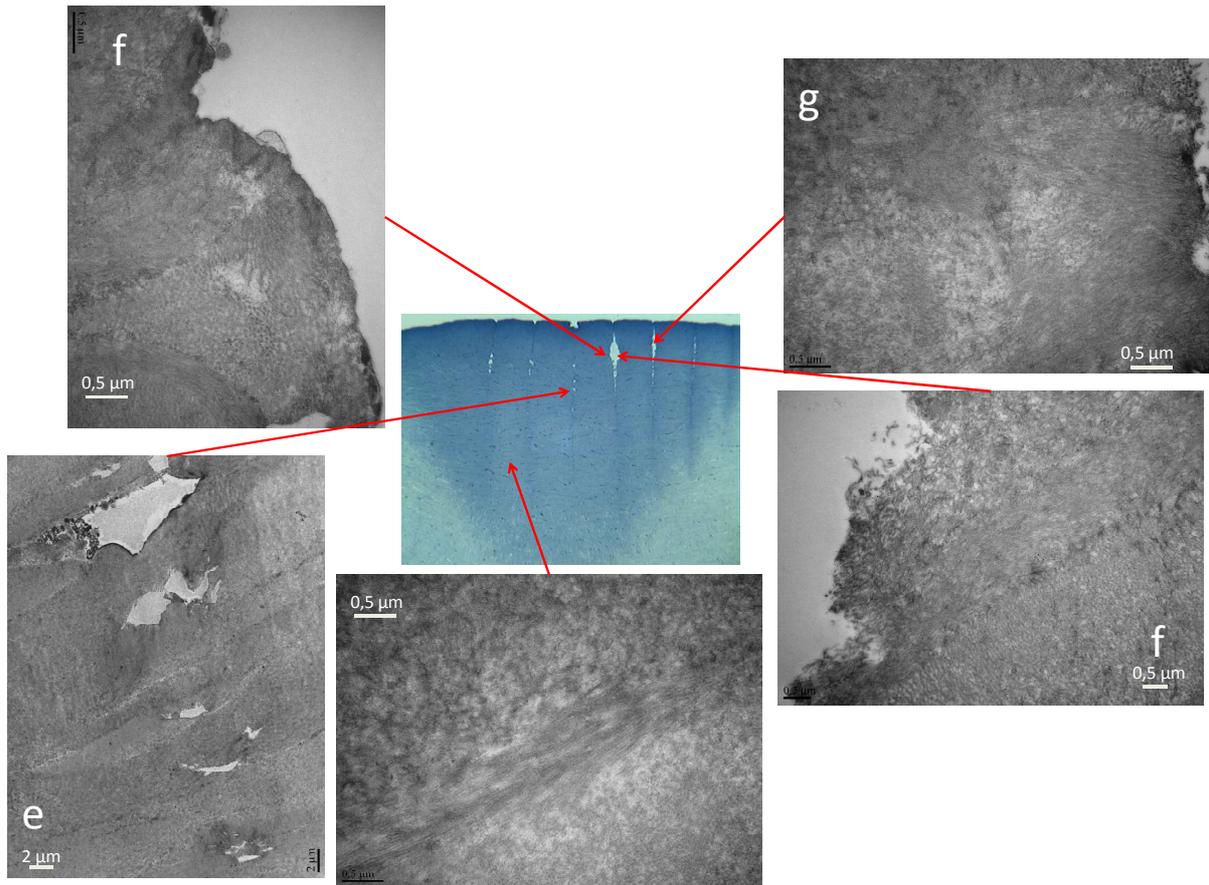


Figure 58 : Ultrastructure des incisions réalisées sur une cornée humaine œdémateuse d'environ 1 mm avec la source fibrée erbium à 1594 nm. L'ouverture numérique était de 0,55 et l'énergie a été variée entre 0,76 μ J et 1,80 μ J.

Deux hypothèses peuvent en partie expliquer ces effets secondaires en dehors du point focal.

- Tout d'abord, un contraste insuffisant du laser et en particulier la présence d'une pré-impulsion suppicoseconde pourrait engendrer ces modifications du collagène. Les appareils de mesure dont nous disposons n'étant pas sensibles à ce phénomène, nous n'avons pour l'instant pas pu vérifier cette hypothèse.
- D'autre part, la cadence étant plus élevée que sur les sources accordables, ces phénomènes pourraient peut-être venir d'un effet cumulatif sur un train d'impulsions. Des expériences en diminuant la cadence devront être réalisées pour le vérifier.

Dès que l'origine de ces résultats sera identifiée, les paramètres du laser pourront être adaptés et la source fibrée deviendra *a priori* la solution la plus avantageuse dans le cadre d'une application clinique de greffe de cornée. En effet, elle propose les meilleures caractéristiques en termes de compacité, de robustesse et surtout de coût.

5.2.4.3. Comparaison des incisions à 1030 nm vs. à 1650 nm

Les expériences effectuées en variant la longueur d'onde ont permis de démontrer que le maximum de profondeur de pénétration du faisceau dans le tissu œdémateux est obtenu à 1650 nm. Afin d'évaluer les différences entre les sources cliniques centrées à 1030 nm et notre source OPG configurée pour être centrée à 1650 nm, deux séries d'expériences supplémentaires ont été réalisées avec l'objectif Nacet d'ouverture numérique 0,55 en variant l'énergie entre 250 nJ et 2 µJ et en alternant ces deux longueurs d'onde sur une cornée saine et sur une cornée œdémateuse.

La figure 59 montre les résultats en histologie et la figure 60 en ultrastructure sur une cornée saine d'environ 600 µm d'épaisseur. Les paramètres de découpe sont résumés dans le tableau 14. On peut remarquer que lorsqu'on utilise une énergie de 250 nJ juste au dessus du seuil théorique à 1650 nm et 3× au dessus du seuil théorique à 1030 nm, on observe une très nette différence de profondeur de pénétration entre les deux longueurs d'onde puisque l'incision à 1650 nm est transfixiante contre seulement 45 µm de profondeur pour celle effectuée à 1030 nm. On observe également qu'à partir de 1 µJ soit 5 fois le seuil à 1650 nm, la découpe est transfixiante ou quasi-transfixiante aux 2 longueurs d'ondes. Toutes les découpes sont régulières et de qualités constantes dans le volume de la cornée et ne présentent pas d'effets secondaires particulier notamment nous n'observons pas de déstructuration du collagène. Une fine membrane plus contrasté en bordure de découpe reste cependant visible quelque soit la longueur d'onde. Par conséquent, la baisse de diffusion avec l'augmentation de longueur d'onde permet une meilleure propagation même sur une cornée saine comparativement aux lasers cliniques. Il est donc possible d'effectuer les mêmes interventions à 1650 nm qu'à 1030 nm avec des impulsions d'énergie très inférieures et obtenir une découpe profonde et de qualité. Cela prouve également qu'il serait possible d'effectuer les interventions de type LASIK avec une source femtoseconde centrée à 1650 nm, d'autant

que le faisceau étant en partie absorbé à 1650 nm, les risques de lésions dans le reste de l'œil et en particulier sur la rétine sont fortement diminués.

Tableau 14 : Paramètres de découpes de la figure 59

Incision	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Longueur d'onde (μm)	1,65	1,03	1,65	1,03	1,65	1,03	1,65	1,03	1,65	1,03
Énergie (μJ)	0,25	0,25	0,5	0,5	0,75	0,75	1	1	2	2
Profondeur de pénétration (μm)	transfixiant	45	420	330	525	270	transfixiant	546	465	tranfixiant

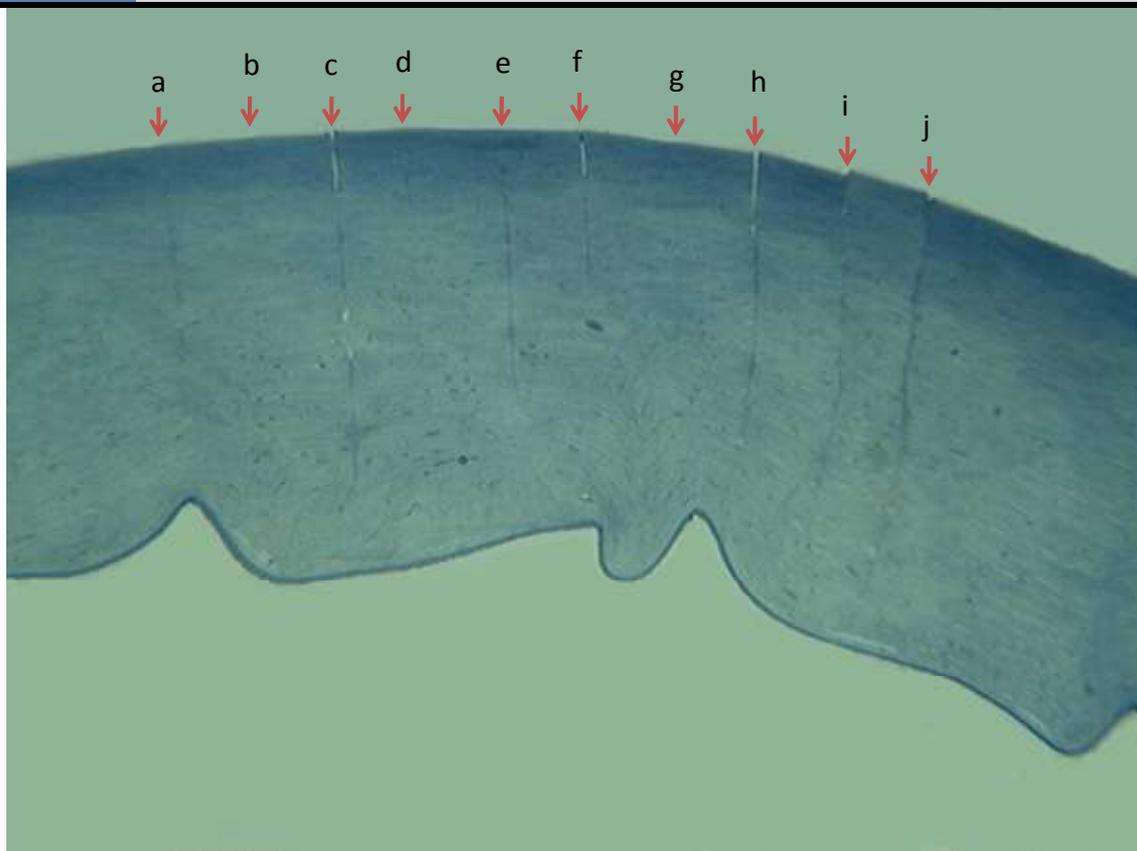


Figure 59 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée humaine saine de 600 μm , en alternant la source à 1,03 μm et la source OPG centrée à 1,65 μm et en variant l'énergie entre 250 nJ et 2 μJ . L'ouverture numérique était de 0,55 et le taux de répétition de 10 kHz.

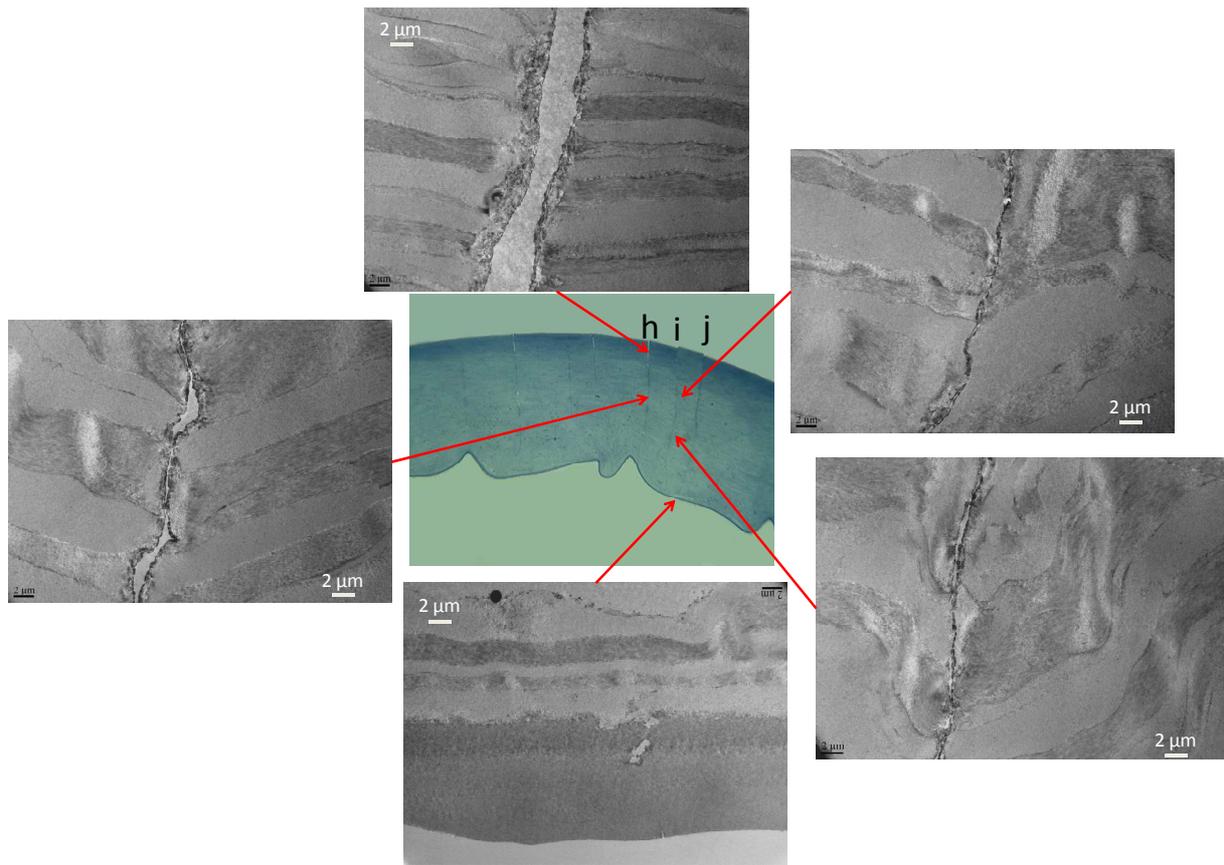


Figure 60 : Ultrastructure des incisions réalisées sur une cornée humaine saine de 600 µm, en alternant la source à 1,03 µm et la source OPG centrée à 1,65 µm et en variant l'énergie entre 250 nJ et 2 µJ. L'ouverture numérique était de 0,55 et le taux de répétition de 10 kHz.

Le même protocole expérimental a été reproduit sur une cornée œdémateuse d'environ 850 µm d'épaisseur. Ces résultats sont présentés sur la figure 61 en histologie et sur la figure 62 en ultrastructure. Les paramètres de découpes sont résumés dans le tableau 15. On observe alors aux deux longueurs d'onde une augmentation progressive de la profondeur de pénétration. Pour des énergies d'environ 250 nJ, l'effet à 1650 nm est peu prononcé et se manifeste uniquement en surface, ce qui prouve que nous sommes alors environ au seuil de claquage dans une cornée œdémateuse. La profondeur de pénétration augmente par contre beaucoup plus rapidement à 1650 nm qu'à 1030 nm puisque des effets jusqu'à la membrane de Descemet sont observables dès 1 µJ à 1650 nm, alors qu'avec 2 µJ, la découpe à 1030 nm atteint 500 µm. Les découpes sont de très bonne qualité et dans l'ensemble très homogènes. Toutefois, à 2 µJ, on observe un dépôt de débris de collagène sur les parois antérieures dans le cas d'une cornée œdémateuse comme dans le cas des cornées saines, alors que sur la partie postérieure, toujours à 2 µJ, la découpe est très propre et ne présente que de rares ponts tissulaire.

Par contre, toujours à 1650 nm avec une énergie de 1 μ J, la découpe est d'excellente qualité sur toute la profondeur.

Tableau 15 : Paramètres des découpes de la figure 61

Incision	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Longueur d'onde (μ m)	1,65	1,03	1,65	1,03	1,65	1,03	1,65	1,03	1,65
Énergie (μ J)	0,25	0,5	0,5	0,75	0,75	1	1	2	2
Profondeur de pénétration (μ m)	-	50	350	400	700	450	835	500	transfixiant

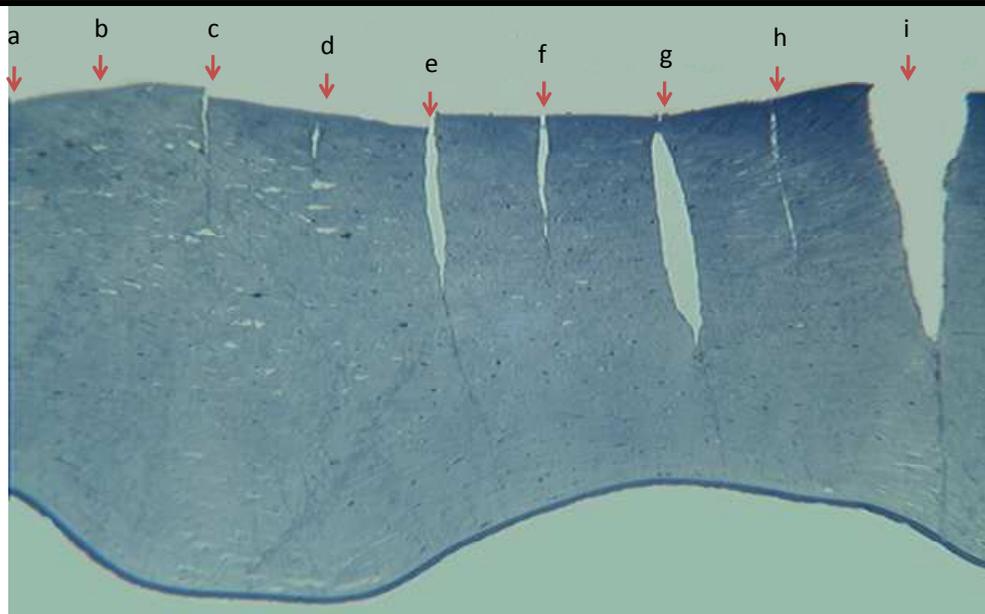


Figure 61 : Coupe histologique des incisions réalisées sur une cornée œdémateuse de 850 μ m, en alternant la source à 1,03 μ m et la source OPG centrée à 1,65 μ m et en variant l'énergie entre 250 nJ et 2 μ J. L'ouverture numérique était de 0,55 et le taux de répétition de 10 kHz.

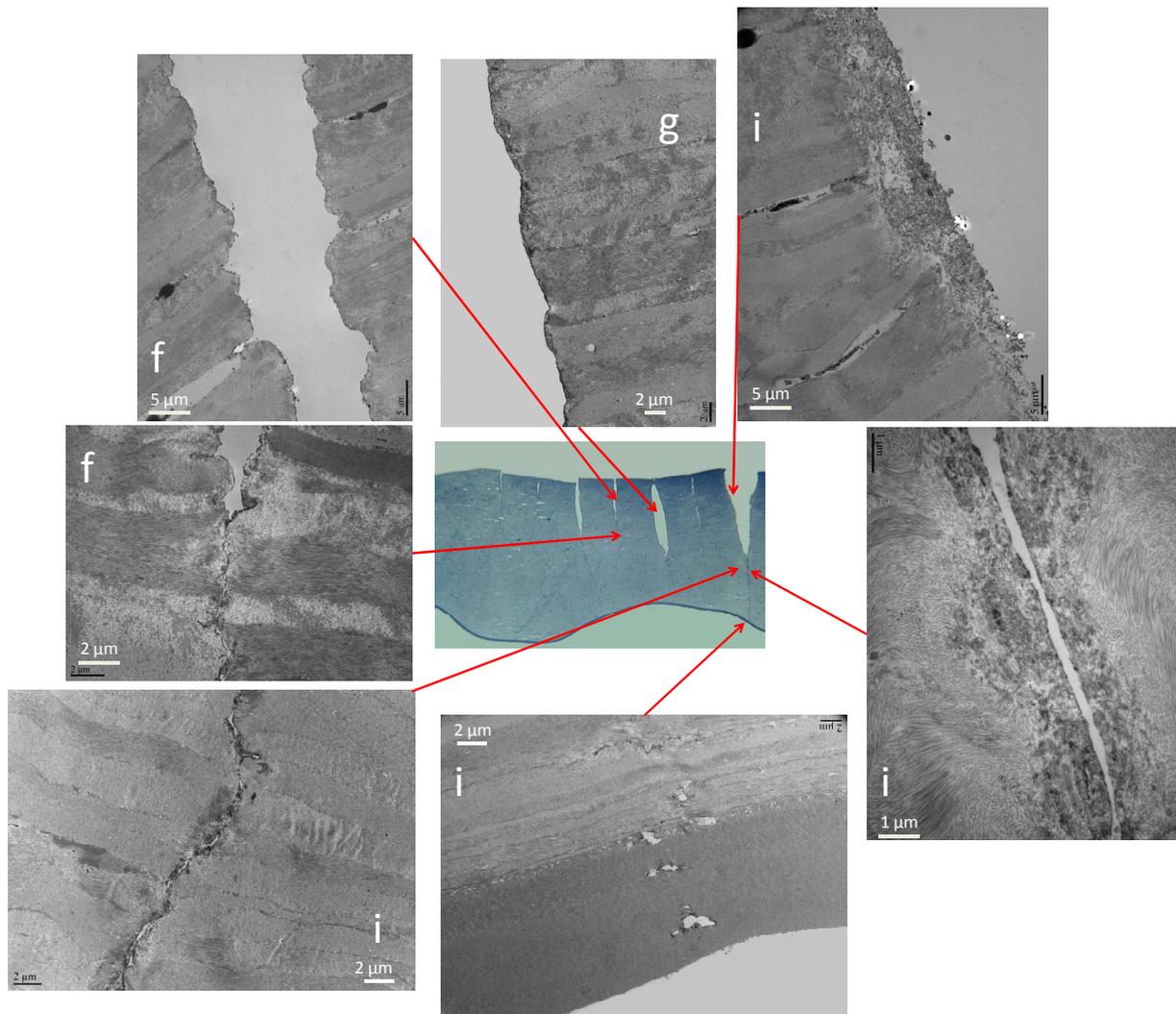


Figure 62 : Ultrastructure des incisions réalisées sur une cornée œdémateuse de 850 µm, en alternant la source à 1,03 µm et la source OPG centrée à 1,65 µm et en variant l'énergie entre 250 nJ et 2 µJ. L'ouverture numérique était de 0,55 et le taux de répétition de 10 kHz.

5.3. Conclusion

Les résultats sur l'étude de l'optimisation de la longueur d'onde en chirurgie de la cornée sont très positifs et confirment les hypothèses de départ.

- La profondeur de pénétration du faisceau laser dans le tissu sain et œdémateux dépend très fortement de la longueur d'onde. En particulier, le phénomène de diffusion de la lumière décroît rapidement avec la longueur d'onde.

- Par contre, la profondeur de pénétration est faible et des effets secondaires sont fréquents et importants entre 1400 nm et 1600 nm. Cette plage de longueur d'onde correspond à la bande d'absorption de l'eau présente dans le tissu.
- La profondeur de pénétration est maximale à 1650 nm. Cette longueur d'onde correspond à un minimum local de l'absorption optique de l'eau et de la cornée. De plus, la diffusion baisse d'un facteur trois à 1650 par rapport à 1030 nm. Par conséquent, l'usage d'une source émettant à 1650 nm correspond de fait au meilleur compromis possible entre diffusion et absorption pour obtenir des découpes propres et constantes sur toute la profondeur des cornées même pathologiques.

Lorsque le tissu est absorbant, des effets secondaires apparaissent rapidement avec l'augmentation de l'énergie. Par conséquent, l'usage d'une source erbium classique émettant autour de 1,55 μm n'est pas envisageable pour la chirurgie de greffe de cornée par laser.

Les avantages d'une source émettant à 1650 nm ont été démontrés puisque conformément aux études de transmission et plus précisément de section efficace de diffusion (section 2.2.2.2), on observe en moyenne une augmentation d'environ un facteur trois de la profondeur de pénétration en comparaison de celle obtenue avec une source émettant à 1,03 μm équivalente à celles utilisées cliniquement. Les découpes à 1650 nm atteignent jusqu'à 900 μm de profondeur en conservant des paramètres énergétiques suffisamment bas pour ne pas engendrer d'effets secondaires trop importants. Si de plus on considère qu'une cornée pathologique atteint dans la plupart des cas un maximum de 850 μm chez un patient, on peut conclure que cet outil rassemble les conditions nécessaires à une chirurgie de greffe de cornée efficace dans la grande majorité des cas cliniques.

On peut ajouter un dernier avantage à ce changement de longueur d'onde : la sécurité de l'intervention est largement améliorée si l'on utilise une source centrée à 1650 nm car les milieux oculaire situés sur le chemin du faisceau, derrière la cornée absorbes autour de cette longueur d'onde. L'énergie du faisceau est donc très fortement atténuée avant que le laser n'atteigne la rétine.