



UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ED 352 - PHYSIQUE ET SCIENCE DE LA MATIERE
INSTITUT FRESNEL - UMR 7249
INMED - UMR 901

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Physique
Spécialité : Instrumentation

Dorian CHAMPELOVIER

Développement d'un microscope bi-photon à front
d'onde optimisé pour l'imagerie calcique profonde dans
le cerveau de souris

Soutenue le 01/12/2016 devant le jury :

Emmanuel BEAUREPAIRE, Laboratoire d'Optique et Biosciences (Paris), Rapporteur
Laurent BOURDIEU, Institut de Biologie de l'ENS (Paris), Rapporteur
Eirini PAPAGIAKOUMOU, Laboratoire de Neurophotonique (Paris), Examinatrice
Serge MONNERET, Institut Fresnel (Marseille), Directeur de thèse
Rosa COSSART, INMED (Marseille), Co-Directrice de thèse

Remerciements

En démarrant cette aventure il y a déjà trois ans, je n'aurais jamais pensé avoir l'occasion de faire autant de rencontres. Celles-ci m'auront tantôt accompagné tout au long de ma thèse ou seulement passé quelques minutes à discuter autour d'un café. Elles m'auront enseigné de nombreuses astuces que l'on ne trouve pas forcément dans les manuels ou seulement fait rire en racontant des histoires portant sur des sujets totalement étrangers au travail. C'est pour ces raisons que je souhaite prendre ces quelques lignes pour remercier toutes ces personnes croisées durant ma thèse.

Pour commencer, j'aimerais remercier mes deux directeurs de thèse : Serge Monneret et Rosa Cossart pour tout le temps qu'ils m'ont accordé et leurs conseils avisés qui m'ont permis d'avancer dans mes travaux. Je voudrais également remercier Arnaud Malvache qui m'a accompagné tout au long de ma thèse et avec qui j'ai travaillé en constante connexion durant ces trois ans. Nous avons pu former un duo très efficace en combinant mes compétences instrumentales et expérimentales avec son savoir-faire en matière d'analyse des données.

Pour continuer, je tiens à remercier tous les membres du projet OMICRON. Tout d'abord, je remercie Hervé Rigneault pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe MOSAIC mais également pour le temps qu'il a toujours trouvé afin de suivre toutes les avancées du projet et pour sa participation aux nombreuses discussions que nous avons eues. Viennent ensuite nos collègues de l'équipe HRA de l'ONERA : Jean-Marc Conan, Serge Meimon, Laurent Mugnier et Joel Teixeira qui ont toujours répondu présent et permis d'obtenir des réponses à toutes nos interrogations liées au développement de la méthode.

Je souhaiterais maintenant remercier de nombreuses personnes de l'Institut Fresnel et plus particulièrement de l'équipe MOSAIC. En premier lieu, je voudrais remercier le directeur Stefan Enoch pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de l'institut. Par la suite, je tiens à remercier Patrick Ferrand qui m'a donné de nombreux conseils mais aussi apporté son soutien dans la prise en main des différents outils logiciels et durant la phase de développement de mon programme d'imagerie. De plus, je souhaiterais remercier tous les post-doctorants avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et qui m'ont tous appris quelque chose durant ma thèse. Ainsi, je remercie chaleureusement Hilton Aguiar avec qui j'ai eu la chance de partager ma première salle de manip et qui m'a transmis un grand nombre de connaissances liées à l'utilisation des lasers. Je voudrais également remercier Siddharth "Sid" Sivankutty avec qui j'ai eu l'opportunité à de très nombreuses reprises de discuter de l'avancée de mes travaux et qui m'a toujours donné d'excellents conseils. Je tiens aussi à remercier Naveen Balla pour toute l'aide apportée sur la modification du montage optique durant les derniers mois de ma thèse. Pour finir, j'aimerais remercier Esben Andersen pour toute son aide et ses conseils lorsque j'ai commencé à utiliser mon miroir déformable.

Pour poursuivre, je remercie mes collègues thésards de troisième année : Alberto Lombardini, Juan Detorres, Carolina Rendon et Hongshan Zhang avec qui j'ai passé de très bons moments et dont l'entraide mutuelle a permis de résoudre nombre de nos problèmes. Pour terminer, je souhaiterais faire un gros "Big Up!" à la team Espace Photonique : Raphael Canonge, Barbara Sarri et Hadrien Robert avec qui j'ai partagé mon bureau voire même pour certains la salle de manip et avec qui les bons moments et les fous rires ne se comptent plus.

Je conclus ce paragraphe en remerciant tous les membres de l'Institut Fresnel et tout particulièrement ceux du pôle administratif et informatique : Nelly, Frédéric, Claire, Emilie et tous les autres pour tous les services qu'ils m'ont rendu tout au long de ces trois ans.

Ces remerciements ne seraient pas complets sans parler de mon deuxième laboratoire, l'INMED et de ses membres. En premier lieu, je voudrais remercier le directeur Alfonso Represa pour m'avoir accueilli au sein de l'institut. Même si je n'ai pas pu passé autant de temps que je l'aurais souhaité au sein de l'équipe, je garde en mémoire de nombreux bons moments passés avec des personnes géniales. Ainsi, j'aimerais commencer par remercier mes collègues : Vincent Villette, Thomas Tressart et Susanne Reichinnek qui en plus de leur gentillesse m'ont fourni tous les échantillons biologiques utilisés durant ma thèse sans lesquels je n'aurais pas pu travailler. Par la suite, je tiens à remercier chaleureusement Agnès Baude qui a su répondre à toutes mes questions et m'a transmis une grande partie des connaissances en neurobiologie que j'ai actuellement. Enfin, je souhaite remercier tous les autres membres de l'équipe et du laboratoire.

Les dernières personnes que je voudrais remercier sont tous mes proches qui m'ont accompagné durant ma thèse. Je remercie tout particulièrement ma compagne Caroline qui a eu la tâche la plus difficile qu'il soit : me supporter durant ces trois longues années avec tous les hauts et les bas qui accompagnent une thèse et qui m'a toujours encouragé dans les moments durs. J'aimerais également remercier mes parents, mes amis et mon entourage, qui tout en me soutenant depuis toujours, ont représenté pour moi un véritable havre de paix, loin de tous les tracas liés à la thèse permettant de se ressourcer pour mieux affronter les étapes suivantes.

Mes derniers remerciements vont à Mr Vidal sans qui je n'en serais pas là.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	5
Préface	9
1 Introduction	13
1.1 Préambule	15
1.1.1 La problématique biologique	15
1.1.2 Les verrous	18
1.1.3 Le cahier des charges	20
1.2 L'imagerie de fluorescence dans les milieux biologiques	21
1.2.1 Introduction au processus de fluorescence	21
1.2.2 L'intérêt de la fluorescence en imagerie	22
1.2.2.1 La protéine à fluorescence verte GFP	24
1.2.2.2 Les marqueurs calciques	26
1.2.3 Modalités d'imagerie de fluorescence	26
1.2.3.1 La fonction d'étalement de point (PSF)	27
1.2.3.2 L'imagerie de plein champ	29
1.2.3.3 La microscopie de balayage	30
1.2.3.4 La microscopie confocale	31
1.2.3.5 L'imagerie multiphotonique	32
1.2.3.6 Les alternatives à l'imagerie de fluorescence - les contrastes sans marquage	35
1.2.4 Les principales sources de problèmes en imagerie des tissus	37
1.2.4.1 La diffusion optique	38
1.2.4.2 Les aberrations optiques	39
1.2.4.3 Le photoblanchiment	40
1.3 Introduction à l'optique adaptative conventionnelle	41
1.3.1 Les aberrations optiques	42
1.3.1.1 L'origine des aberrations optiques	42
1.3.1.2 Les principales aberrations optiques	43
1.3.1.3 Impact des aberrations optiques en imagerie de fluorescence à deux photons	44
1.3.2 Les différents outils de l'optique adaptative	45
1.3.2.1 Les détecteurs de front d'onde	45
1.3.2.2 Les miroirs déformables	46

1.3.2.3	Les modulateurs spatiaux de lumière à cristaux liquides . . .	48
1.3.2.4	Quel système choisir ?	49
1.3.3	Les différentes méthodes d'optique adaptative	49
1.3.3.1	La méthode historique : la méthode par mesure directe . . .	49
1.3.3.2	La méthode par mesure indirecte	51
1.4	L'optique adaptative pour la microscopie	52
1.4.1	Méthode par optimisation modale	52
1.4.2	Méthode par segmentation de pupille	53
1.4.3	Méthode multiplexée	54
Bibliographie		56
2 Le dispositif expérimental		61
2.1	Le système optique	63
2.1.1	Rappels sur les alignements optiques	63
2.1.1.1	Le système afocal	63
2.1.1.2	La conjugaison optique	64
2.1.2	Les cinq piliers du microscope	65
2.1.2.1	Le laser	66
2.1.2.2	Le miroir déformable	67
2.1.2.3	Les miroirs galvanométriques	69
2.1.2.4	L'objectif	69
2.1.2.5	Le détecteur	69
2.1.3	Le microscope complet	70
2.2	Le logiciel d'imagerie	76
2.2.1	L'outil de dialogue avec l'ordinateur : la carte d'acquisition	76
2.2.2	Les briques élémentaires du programme	78
2.2.2.1	Les sous-programmes d'imagerie	78
2.2.2.2	Les sous-programmes de contrôle du miroir déformable	80
2.2.3	Architecture complète du programme	82
2.2.3.1	La face avant de l'instrument	83
2.2.3.2	Les modalités d'acquisition	84
2.2.3.3	Correction et étude des aberrations optiques	86
Bibliographie		88
3 La méthode d'optimisation		89
3.1	Introduction aux polynômes de Zernike	91
3.2	La méthode d'optimisation par reconstruction modale	93
3.2.1	Le concept de base de la méthode	93
3.2.1.1	Optimisation d'une métrique basée sur l'image	93
3.2.1.2	L'utilité d'une base orthogonale	94
3.2.2	Problèmes de convergence : réorthogonalisation ou itération ?	96
3.2.3	Impact de certains modes dans le volume, doit-on les garder ?	100
3.2.4	Notre approche : la méthode locking	104
3.3	Les métriques	105
3.3.1	La moyenne	105

3.3.2	La variance	107
3.3.3	La wavelet	108
3.3.4	La métrique finale	110
3.4	Discussion sur la méthode locking	113
Bibliographie		114
4	Applications	115
4.1	Applications sur billes	117
4.1.1	Calibration du système	117
4.1.2	Essais de réorthogonalisation de la base	121
4.2	Applications <i>in vitro</i> sur des tranches de cerveau	123
4.2.1	Conception des échantillons	124
4.2.2	Application de la méthode locking	125
4.2.2.1	Nos premiers échantillons : des tranches trop "parfaites"	125
4.2.2.2	Mise en place et test des échantillons adaptés à nos problèmes	125
4.2.2.3	Prise en compte du photoblanchiment dans l'analyse des données	131
4.2.3	Etude de l'efficacité de la méthode	132
4.2.3.1	Comparaison avec les mesures <i>in vitro</i>	134
4.2.3.2	Etude de l'efficacité axiale des corrections - définition de la plage d'utilisation de la méthode	138
4.2.3.3	Etude de l'efficacité des corrections dans le plan - mise en évidence de la variation spatiale des aberrations	140
4.3	Applications <i>in vivo</i>	141
4.3.1	Conception des échantillons	142
4.3.2	Application de la méthode locking	143
Bibliographie		148
5	Conclusions et perspectives	149
5.1	Conclusions	151
5.2	Regard critique sur la méthode locking	152
5.3	Perspectives	158
Bibliographie		162

Préface

La thèse présentée s'inscrit dans le cadre d'un projet multidisciplinaire baptisé OMICRON (pour Optique adaptative pour la MICROscopie Neuronale). Financé par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) et France Life Imaging (FLI), il est le fruit de la collaboration entre trois laboratoires français : l'Institut de Neurobiologie de la Méditerranée (INMED), l'Institut Fresnel et le Département Optique Théorique et Appliquée (DOTA) de l'ONERA.

Initié par une première association entre l'INMED et l'Institut Fresnel, un partenariat avec le DOTA a permis de renforcer ce projet apportant un savoir-faire complémentaire aux deux autres acteurs. Ainsi, le but de cette coopération a été de mettre en place un système d'optimisation du front d'onde sur un microscope bi-photon dédié à l'imagerie *in vivo* de l'hippocampe de la souris. Il a pour source l'expérience existante au sein de l'INMED sur l'étude des réseaux neuronaux corticaux *in vivo*.

En effet, la description de l'organisation de ces réseaux repose sur l'imagerie calcique à deux photons utilisant des fluorophores dont la fluorescence dépend de la concentration intracellulaire de calcium. Cette méthode d'imagerie non-invasive permet de visualiser l'activité de centaines de neurones dans le cerveau et plus particulièrement dans l'hippocampe de la souris éveillée. Elle rend ainsi possible l'enregistrement de l'activité des réseaux lorsque la souris effectue des actions types (par exemple courir sur un tapis roulant) mais aussi l'étude de ces mêmes réseaux sur des modèles de souris soumis à des pathologies chroniques (comme l'épilepsie du lobe temporal). Néanmoins, l'utilisation de cette technique est limitée par la profondeur d'imagerie réduisant le nombre de zones accessibles en particulier dans le cadre d'expériences *in vivo*.

Deux phénomènes optiques sont principalement mis en cause dans cette limitation : la diffusion mais aussi l'introduction d'aberrations optiques par le système d'imagerie et par l'échantillon lui-même. Celles-ci, dues à des inhomogénéités optiques présentes dans le milieu de propagation de l'onde, viennent ici dégrader le faisceau laser focalisé utilisé pour exciter les fluorophores. Là où la diffusion aura tendance à disperser le laser dans le milieu suite à très nombreuses interactions aléatoires de la lumière avec des particules présentes dans l'échantillon, les aberrations optiques impacteront quant elles principalement le front d'onde lumineux. En effet, lorsque le front d'onde entrera en interaction avec des inhomogénéités d'indice optique, celui-ci s'en trouvera déformé et causera une détérioration géométrique (dimensions et forme) du volume de focalisation venant alors impacter la qualité des images mais également la capacité d'excitation des fluorophores.

Pour contrer les aberrations optiques rencontrées, une technique héritée de l'astronomie,

l'optique adaptative, semble être une méthode adaptée. Cette technique repose sur la mesure du front d'onde de la lumière provenant d'objets célestes de manière à quantifier directement les perturbations l'impactant et corriger celles-ci via un miroir déformable améliorant ainsi la qualité des images enregistrées. Ainsi, son application à la microscopie à deux photons peut être prometteuse car elle pourrait corriger les effets des aberrations optiques intervenant au sein des tissus biologiques. L'introduction d'un miroir déformable au sein du futur microscope bi-photon et l'élaboration de méthodes de correction des aberrations optiques adaptées à l'imagerie de fluorescence pourrait notamment améliorer la profondeur d'imagerie lors d'expériences *in vivo*.

Afin de concevoir le microscope, l'équipe MOSAIC de l'Institut Fresnel, spécialisée dans le développement d'instruments et de techniques d'imagerie en biophotonique, sera d'une grande importance. Le savoir faire en imagerie non linéaire et multiphotonique permettra d'obtenir rapidement un instrument d'imagerie calcique pour la réalisation d'expériences *in vivo*. Sur cet instrument sera alors implémenté le composant essentiel pour faire de l'optique adaptative, le miroir déformable. Enfin, des travaux portant sur la mise en place d'une méthode d'optimisation rapide et robuste seront menés.

Cependant, l'optique adaptative en microscopie étant une discipline récente et en plein essor, son utilisation au sein de l'équipe MOSAIC est une nouveauté. Le DOTA et plus particulièrement l'équipe HRA apporte ainsi son savoir-faire et ses connaissances théoriques avancées en optique adaptative permettant d'avancer des réponses fiables à nos questions. L'équipe HRA a notamment, dans le cadre d'une thèse également, travaillé au plus proche de nos conditions expérimentales en développant en parallèle de la conception "physique" du microscope une version numérique de celui-ci pour réaliser des simulations d'expériences. Cela nous a ainsi permis de valider théoriquement et numériquement toutes nos hypothèses et nos conclusions obtenues de manière empirique.

Pour conclure, dans ce manuscrit composé de cinq chapitres, sont présentés les travaux ayant été réalisés durant mes trois années de thèse. Ils portent sur l'élaboration et la conception d'un microscope deux photons et de son interface logicielle, la mise en place d'une méthode de correction des aberrations optiques adaptées à l'imagerie *in vivo* profonde et l'application de celle-ci dans différentes conditions expérimentales.

Chapitre 1 : Introduction

Nous débuterons en présentant les différents objectifs fixés pour ce projet et nous décrirons toutes les notions de base liées à l'imagerie de fluorescence ainsi qu'à l'optique adaptative. Une revue des différentes méthodes d'optique adaptative existantes au moment du lancement du projet sera enfin réalisée.

Chapitre 2 : Dispositif expérimental

Nous allons expliquer ici le montage optique du microscope développé durant cette thèse en décrivant chaque élément le composant ainsi que les raisons de leur choix. Puis, nous présenterons dans ce chapitre le logiciel d'imagerie conçu pour contrôler de manière automa-

tique le microscope ainsi que le miroir déformable en appliquant la méthode que nous avons développée.

Chapitre 3 : La méthode d'optimisation

Nous aborderons les travaux qui ont mené à la mise en place de la méthode locking. Dans un premier temps, nous décrirons notre étude basée sur l'approche modale de la correction des aberrations optiques, détaillant les différentes problématiques rencontrées et nos solutions à celles-ci. Par la suite, nous exposerons les travaux portant sur l'élaboration de notre métrique d'optimisation constituant la base de la méthode locking.

Chapitre 4 : Applications

Nous commenterons ici tous les résultats obtenus avec la méthode locking. Ceux-ci sont traités en fonction du type d'échantillon utilisé : microbilles fluorescentes, tranches de cerveau et application *in vivo*. Dans chaque partie, le protocole expérimental employé et les différentes étapes de conception des échantillons sont également décrits. Enfin, nous concluons sur les résultats permettant de prouver l'efficacité et l'applicabilité de la méthode développée durant cette thèse.

Chapitre 5 : Conclusions et perspectives

Pour terminer ce manuscrit, une conclusion globale de ce projet dressera un portrait final sur les travaux effectués durant cette thèse et abordant point par point les différents problèmes restants à corriger et proposant d'éventuelles solutions pour ceux-ci. Une nouvelle revue bibliographique permettra aussi de voir comment le domaine a évolué en parallèle de l'avancement du projet et nous situera au sein de la communauté. Pour finir, nous aborderons le futur de l'optique adaptative au sein de l'Institut Fresnel et de l'INMED.

Chapitre 1

Introduction

1.1 Préambule

1.1.1 La problématique biologique

Le cerveau est l'organe le plus important et le plus complexe du corps humain. Il est composé d'un réseau de milliards de neurones connectés entre eux par des milliers de synapses. Malheureusement, les pathologies qui l'impactent sont, de ce fait, extrêmement difficiles à combattre et causent des dommages très graves.

Parmi les six régions de fonctionnement que compte le cerveau, l'une d'entre elles, le lobe temporal est le centre de nombreuses fonctions cognitives comme la mémoire, l'apprentissage ou encore la navigation spatiale (Figure 1.1.1 (a)). L'une des structures de ce lobe, l'hippocampe, située près du tronc cérébral (Figure 1.1.1 (b)), possède un rôle central dans le fonctionnement de celui-ci et est particulièrement impactée par certaines pathologies comme l'épilepsie du lobe temporal [1]. Le rôle de ce système est primordial car il contrôle de nombreuses fonctions comme la mémoire épisodique [2] et l'encodage des informations spatio-temporelles [3,4,5].

L'hippocampe est composé de quatre sous-structures respectivement appelées CA1, CA2, CA3 formant un ensemble nommé la corne d'Ammon et le gyrus denté (GD) (Figure 1.1.1 (c) - (d)). Ces sous-structures sont composées d'une couche compacte de cellules (cellules pyramidales pour CA1, CA2 et CA3 et cellules granulaires et moussues pour le gyrus denté). Celles-ci sont entourées par des zones de faible densité cellulaire appelées *stratum oriens* et *stratum radiatum* pour les couches autour de la corne d'Ammon, *stratum moleculare* et *hilus* pour le gyrus denté. Les neurones présents dans ces zones de faible densité cellulaire sont principalement des interneurons. Ceux-ci ont pour rôle le contrôle "local" de l'activité des cellules pyramidales, ce sont des neurones inhibiteurs pouvant contrôler plusieurs centaines d'entre elles par le biais de connexions synaptiques. Les cellules pyramidales, quant à elles, représentent l'unité de base pour le traitement et l'envoi d'informations au sein du cortex cérébral.

Les informations provenant d'autres parties du cerveau parcourent l'hippocampe et sont traitées par celui-ci par le biais d'un circuit interne appelé circuit trisynaptique [6] qui correspond à une série de connexions entre le gyrus denté (qui est l'entrée de l'hippocampe), CA3 et CA1. Les informations incidentes entrent donc par le gyrus denté puis sont dirigées vers CA3. Celles-ci vont être traitées et les signaux de réponse ainsi générés seront ensuite renvoyés vers les autres zones du cerveau par les connexions faites avec CA1.

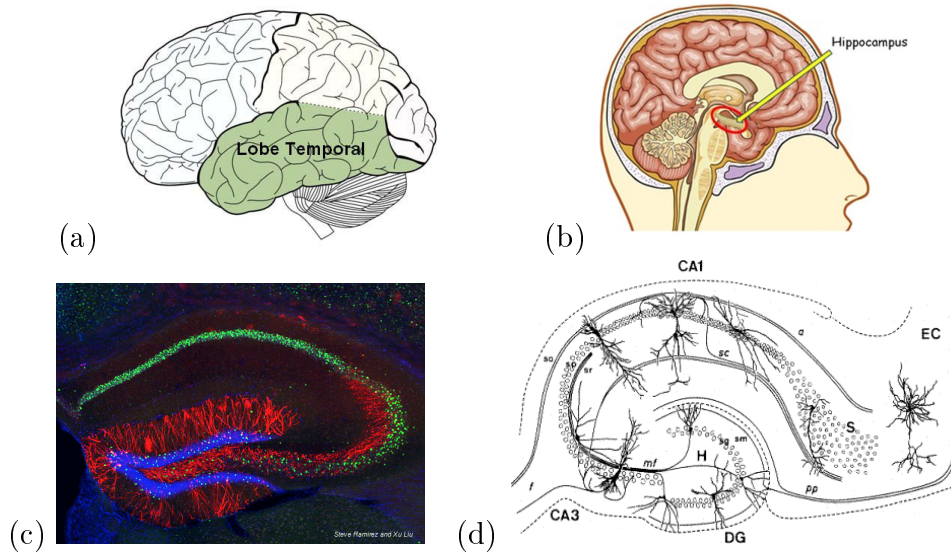


FIGURE 1.1.1 – (a) Position du lobe temporal (en vert), région située dans la partie latérale et inférieure du cerveau humain. Celui-ci intervient dans le processus de nombreuses fonctions cognitives. (b) Localisation dans le cerveau humain de l’hippocampe. Cette structure joue un rôle central dans le contrôle de la mémoire épisodique mais également dans les processus liés à la navigation spatiale. (c,d) Image en fluorescence et représentation schématique de l’hippocampe. Cette zone est composée de quatre sous-structures, trois d’entre elles forment la corne d’Ammon (CA1, CA2 et CA3) et la dernière est le gyrus denté (GD). Ces sous-ensembles sont reliés entre eux par des connexions formant un circuit permettant le traitement des informations par l’hippocampe

Chez la souris, l’étude de l’hippocampe peut se faire de différentes manières mais, si on souhaite mesurer en temps réel l’activité des neurones composant les réseaux présents dans cette région, seulement deux techniques sont possibles. Celles-ci sont l’électrophysiologie [7,8] et l’imagerie de fluorescence à balayage [9] .

La première consiste à enregistrer directement les potentiels d’action via des électrodes insérées dans la zone du cerveau étudiée. L’avantage de cette technique réside dans la résolution temporelle des signaux acquis pouvant atteindre plusieurs kilohertz. Cependant, même s’il est possible d’effectuer des mesures sur plusieurs cellules en même temps, le nombre de cellules étudiées reste faible (quelques pourcents de la population totale) et il est difficile d’obtenir des informations spatiales les reliant.

La seconde approche est l’imagerie de fluorescence à balayage. Cette technique permet, quant à elle, de visualiser une grande partie du réseau (soit plusieurs centaines de cellules en même temps) [10]. Néanmoins, l’acquisition d’images aussi grandes prenant du temps, la vitesse d’acquisition de cette technique est bien plus faible qu’en électrophysiologie et le temps de réponse des marqueurs fluorescents utilisés limite également cette vitesse.

Malgré cela, la possibilité d’observer une grande population de neurones en même temps est indispensable pour mieux comprendre le comportement global des réseaux neuronaux, l’utilisation de techniques d’imagerie de fluorescence sera donc favorisée. Pour visualiser l’activité neuronale, l’emploi de marqueurs fluorescents spécifiques appelés marqueurs calciques est nécessaire. Ces fluorophores ont la propriété d’avoir leur taux de génération de photons de fluorescence lié à la concentration d’ions calcium Ca^{2+} présents dans les cellules marquées.

Effectivement, l'activation d'un neurone est caractérisée par une modification de l'impédance de la membrane de la cellule amenant à une dépolarisation de celle-ci et permettant l'ouverture des canaux laissant passer les ions Ca^{2+} extracellulaires. La concentration extracellulaire de calcium étant plus de cent fois supérieure à celle dans la cellule ($[Ca^{2+}]_{intracellulaire} \approx 0,1$ mmol et $[Ca^{2+}]_{extracellulaire} \approx 25$ mmol) [11], l'ouverture des canaux a pour effet d'augmenter fortement la concentration de ceux-ci dans le corps cellulaire.

L'utilisation de marqueurs fluorescents entraîne intrinsèquement l'emploi de techniques d'imagerie de fluorescence mais pas seulement. En effet, chez la souris qui est l'unique spécimen étudié dans cette thèse, l'hippocampe se trouve à environ un millimètre de profondeur sous le crâne. Il est donc impossible d'arriver à imager celui-ci directement par une simple craniotomie (ablation d'un petit morceau de crâne). La création d'une fenêtre plus profonde par le biais d'une chirurgie d'ablation corticale, c'est-à-dire l'ablation d'un petit volume de cortex pour atteindre les couches supérieures de l'hippocampe, est nécessaire [10] (Figure 1.1.2 (a)).

Pour pouvoir observer ces structures, la technique utilisée est la microscopie bi-photonique. Celle-ci est basée sur un processus d'absorption non linéaire utilisant une source laser pulsée émettant dans le proche infrarouge pour exciter les marqueurs fluorescents. Cette technologie offre la possibilité d'aller imager à des profondeurs assez grandes (la couche pyramidale de CA1 se trouvant à environ $200 \mu\text{m}$ de profondeur sous la fenêtre d'imagerie) et l'utilisation d'un microscope à balayage permettra l'observation *in vivo* de cette zone à une vitesse suffisamment grande pour mesurer l'activité neuronale.

Ainsi, grâce au recours de ces techniques provenant de différents domaines (chirurgie, biochimie et optique), il est possible d'observer des événements épileptiques dans l'hippocampe [12] mais également d'observer les cellules entrant en fonction dans les processus de mémorisation de la distance [5]. Seulement, comme nous l'avons expliqué précédemment, la couche supérieure de l'hippocampe c'est-à-dire CA1 correspond à la sortie de ce système et lorsqu'on mesure un événement épileptique dans cette région, nous ne voyons que la résultante d'un événement situé ailleurs dans l'hippocampe ou le lobe temporal (Figure 1.1.2 (b)).

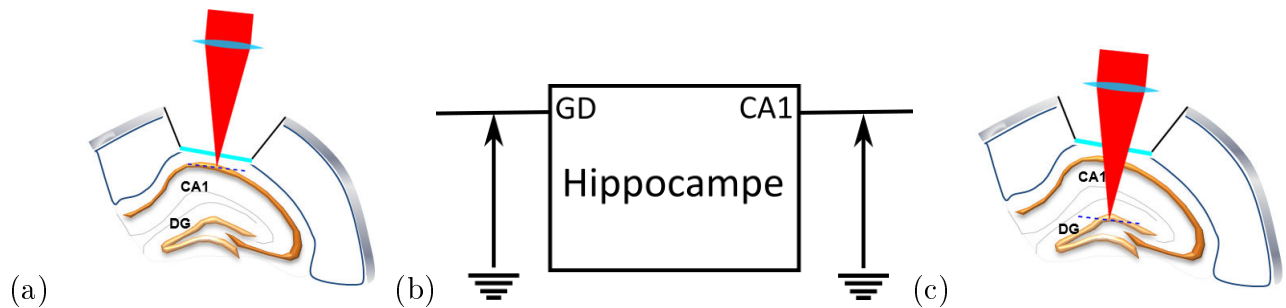


FIGURE 1.1.2 – (a) Grâce au savoir-faire en microchirurgie des neurobiologistes avec qui nous collaborons, il est possible de venir imager en temps réel l'activité des réseaux neuronaux se trouvant dans CA1. (b) En comparant l'hippocampe à un simple circuit électrique, on peut assimiler l'entrée de celui-ci au gyrus denté et la sortie à CA1. (c) De ce fait, l'étude du gyrus denté permettrait d'obtenir de nombreuses données sur l'origine des phénomènes épileptiques intervenant dans cette structure

1.1.2 Les verrous

De manière à obtenir des informations plus détaillées sur la provenance des événements épileptiques mais également sur les processus entraînant la propagation des informations dans l'hippocampe, il est nécessaire de venir imager l'entrée de ce système c'est-à-dire le gyrus denté (Figure 1.1.2 (c)).

Seulement, même avec l'utilisation de techniques de microscopie permettant l'imagerie de fluorescence en profondeur, le gyrus denté est positionné beaucoup trop profondément dans le cerveau (environ 500 μm en dessous de la couche pyramidale de CA1) pour être observé avec les techniques dont nous disposons (Figure 1.1.3 (a)). En effet, la qualité d'imagerie du système va diminuer au fur et à mesure que l'on s'enfoncera dans le tissu et ainsi fera décroître petit à petit la quantité de photons de fluorescence générée.

La détérioration progressive des conditions d'imagerie va être causée par des phénomènes optiques générés par l'échantillon lui-même, dont les effets vont croître avec la portion de matière traversée par l'onde incidente. Ces perturbations vont ainsi évoluer lors du franchissement de la couche pyramidale de CA1 mais également lorsque l'onde incidente rencontrera la zone vascularisée (c'est-à-dire ayant une forte présence de vaisseaux sanguins) se situant exactement entre la fin de CA1 et le *stratum moleculare* correspondant au début du gyrus denté (Figure 1.1.3 (b)).

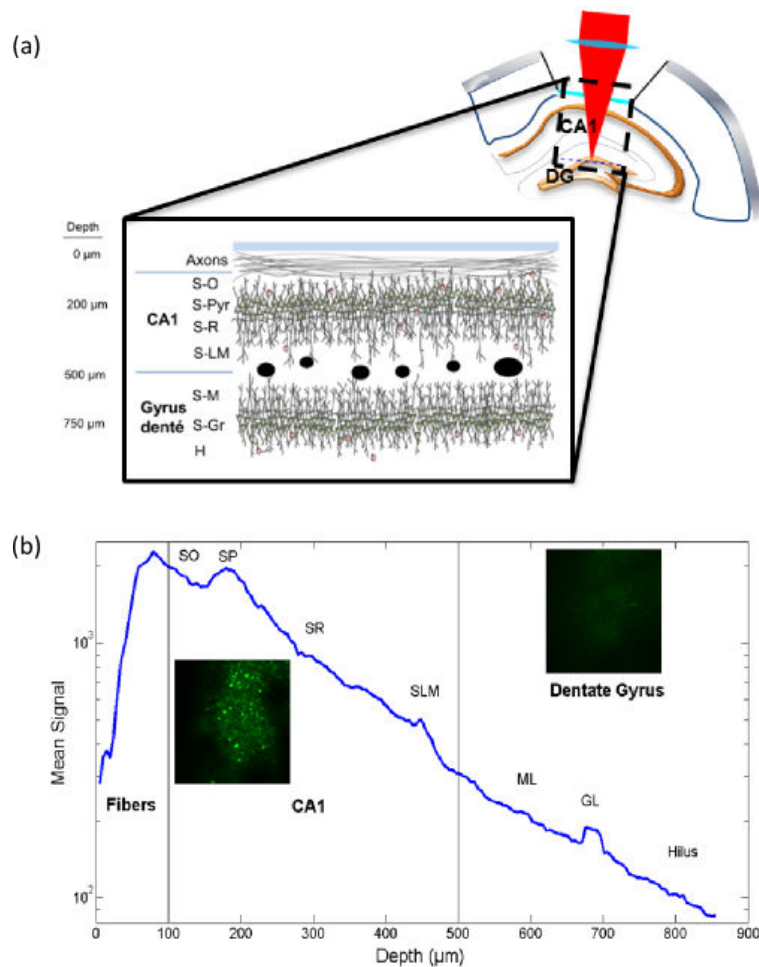


FIGURE 1.1.3 – (a) La portion de matière séparant CA1 du GD étant trop épaisse (environ 500 μm) et étant composée de nombreuses couches aux propriétés optiques différentes, il est extrêmement difficile d’imager le GD. L’utilisation de techniques de contraste basées sur le phénomène d’absorption à deux photons reste limitée et il est totalement impossible d’effectuer de l’imagerie d’activité à cette profondeur. (b) L’évolution du signal de fluorescence diminue fortement lorsqu’on s’introduit de plus en plus dans l’hippocampe. Au voisinage du GD, il est dix fois plus faible que le signal provenant de CA1

Néanmoins certaines de ces perturbations, appelées aberrations optiques, peuvent être quantifiées et leur impact réduit par l’utilisation d’une technique héritée de l’astronomie : l’optique adaptative. Son apport sur un microscope de fluorescence à contraste non linéaire obtenu par absorption à deux photons (microscopie bi-photon), donnerait la possibilité de diminuer grandement l’impact des aberrations optiques sur l’onde incidente. Cela permettrait de conserver des propriétés d’excitation suffisamment bonnes pour tenter d’atteindre le gyrus denté (soit environ à 750 μm de profondeur) et ainsi autoriserait l’imagerie aux portes de l’hippocampe.

1.1.3 Le cahier des charges

L'objectif de ce projet consiste donc à élaborer et à développer un microscope bi-photon doté d'un dispositif permettant le contrôle du front d'onde incident pour la réalisation d'expériences d'imagerie de l'activité calcique *in vivo* en profondeur dans l'hippocampe de souris. La finalité de tout ceci serait d'atteindre les couches inférieures de l'hippocampe afin d'observer le gyrus denté.

De manière à pouvoir comparer nos résultats avec ceux de nos collègues neurobiologistes, nous avons décidé de concevoir notre dispositif de manière à avoir des caractéristiques proches de celles du microscope existant au sein des locaux de l'INMED. Nous avons donc défini un cahier des charges précis prenant en compte l'utilisation de matériel adapté mais également respectant certains paramètres expérimentaux essentiels à l'imagerie *in vivo*.

Pour commencer, nous avons choisi de recourir à une source laser pulsée pouvant émettre à 920 nm. En effet, celle-ci correspond à la longueur d'onde optimale d'excitation à deux photons des fluorophores servant à marquer les cellules dans l'hippocampe. Ensuite, nous avons privilégié l'utilisation d'un microscope droit (c'est-à-dire dont l'objectif est situé au-dessus de l'échantillon) afin de pouvoir positionner une souris éveillée placée sur un tapis roulant. Cela facilitera de la sorte la réalisation des expériences *in vivo* sur notre dispositif. Pour finir, concernant l'objectif du microscope et le détecteur utilisé, nous avons sélectionné ce qui se faisait de mieux dans chacune de ces catégories. Ce choix s'est avéré particulièrement utile pour l'objectif. Cela nous a en effet aidé à réaliser de grands champs d'imagerie tout en permettant le travail en profondeur. Cependant, l'emploi du même objectif a introduit quelques contraintes notamment liées à la taille du faisceau : celle-ci devra correspondre à la taille de la pupille arrière de l'objectif.

Pour les paramètres expérimentaux, nous avons également dû mettre en place une liste d'impératifs à respecter en fonction du but que nous souhaitons atteindre. Effectivement, nos expériences visent à étudier le comportement global des réseaux neuronaux au sein de l'hippocampe et plus particulièrement dans la couche pyramidale de CA1 voire dans la couche granulaire du gyrus denté. Il faudra donc arriver à réaliser des images où nous pourrions observer un très grand nombre de neurones et cela suffisamment rapidement pour enregistrer aussi l'activation de ceux-ci. Sachant que les cellules pyramidales sont assez petites (leur soma fait entre 10 μm et 20 μm de diamètre) et que leur population est très dense, nous allons pouvoir voir un nombre suffisant de cellules en réalisant des champs supérieurs à 200 μm^2 . Seulement, l'angle d'imagerie étant rarement parfaitement perpendiculaire à la couche pyramidale, nous n'observerons en réalité qu'une bande de cellules. Nous avons ainsi décidé d'augmenter la taille du champ d'imagerie en fixant le champ standard à 400 μm^2 . Pour finir, concernant la vitesse d'acquisition, celle-ci sera de dix images par seconde (10 Hz) afin de pouvoir mesurer l'activité des neurones. En effet, la sonde calcique que nous utilisons est un intégrateur de l'activité ayant une constante de temps d'environ 100 ms. Même si la durée moyenne d'un potentiel d'action (i.e l'activation de neurones) est d'environ 1 ms, une cellule n'aura atteint son maximum de fluorescence qu'après 100 ms. Une acquisition à 10 Hz sera donc suffisante pour enregistrer les variations de fluorescence dues à l'activité du réseau neuronal.

Pour conclure, le dernier critère va quant à lui concerner l'utilisation de l'optique adaptative même en introduisant une limite de temps d'utilisation de celle-ci durant une expérience. En effet, une expérience *in vivo* n'excède généralement pas une heure d'acquisition. L'op-

timisation des aberrations optiques par le dispositif d'optique adaptative devra donc être faite au début de chaque expérience ; celle-ci ne devra pas excéder 10% de la durée totale d'expérimentation.

Vous pourrez retrouver l'ensemble des paramètres choisis dans le tableau de la Figure 1.1.4.

Matériel	
Laser	Femto seconde, $\lambda = 920 \text{ nm}$
Détecteur	Hamamatsu H7422-40
Objectif	Nikon 16x/0.8 WD 3 mm Diamètre pupille arrière 20 mm
Statif	Microscope droit

Expérimental	
Champ	400 x 400 μm
Acquisition	10 Hz
AO correction	<10-15 % durée maximale d'une expérience

FIGURE 1.1.4 – Dans ce tableau est regroupée de manière synthétique la liste des différents objectifs que l'on souhaite atteindre lors du développement du nouveau microscope

Maintenant que nous avons introduit le contexte biologique dans lequel s'inscrit notre projet ainsi que les enjeux expérimentaux, nous allons pouvoir aborder un à un les différents aspects techniques liés à celui-ci. Dans la partie suivante, les principes des processus associés aux méthodes d'imagerie de fluorescence seront décrits. Enfin, les autres sections de ce chapitre se concentreront sur l'optique adaptative ainsi que ses applications en microscopie.

1.2 L'imagerie de fluorescence dans les milieux biologiques

Dans cette partie, nous allons traiter des différents aspects liés à l'imagerie de fluorescence en biologie avec une attention particulière à l'imagerie des tissus. Dans un premier temps, nous introduirons les notions liées au processus de fluorescence puis nous aborderons de manière critique les différentes étapes d'évolution des techniques d'imagerie basées sur la fluorescence. Pour finir, nous présenterons les différents phénomènes optiques limitant la réalisation d'images dans les tissus.

1.2.1 Introduction au processus de fluorescence

La fluorescence correspond à un processus d'émission de photons par des atomes (ou des molécules) excités par l'absorption d'énergie provenant d'une source extérieure. L'énergie nécessaire pour engendrer cette transition est $E = \frac{hc}{\lambda}$ où h correspond à la constante de

Planck, c la célérité et λ la longueur d'onde du photon incident. L'absorption de cette énergie est suivie par la désexcitation des électrons internes passant d'un état excité à un état stable. Celle-ci se traduit par l'éjection du surplus d'énergie sous la forme d'un photon. A cause de pertes d'énergie durant des processus de transfert interne, la longueur d'onde du photon émis sera plus grande que celle du photon absorbé initialement.

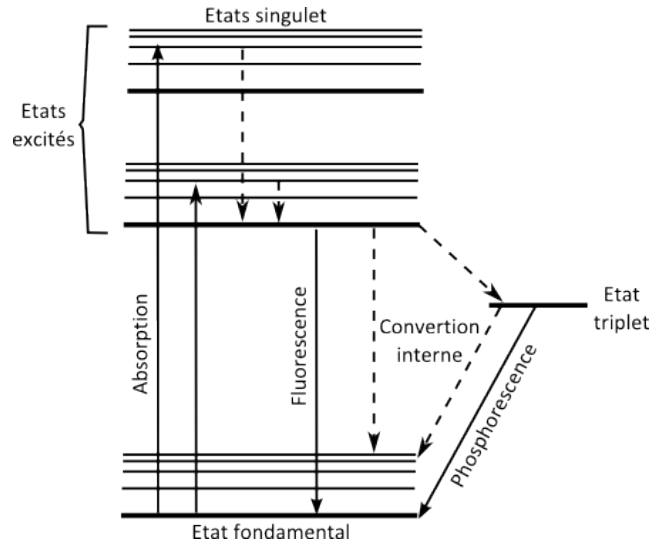


FIGURE 1.2.1 – Diagramme de Jablonski : représentation des différents niveaux d'énergie d'une molécule et des différents processus d'absorption et d'émission

Dans le diagramme de Jablonski (Figure 1.2.1) [13], on peut remarquer qu'il existe deux types d'états excités : l'état singulet et l'état triplet, ceux-ci étant caractérisés par des valeurs de spin différentes pour l'électron excité. La plupart du temps les électrons excités iront occuper les états singulets et lors de leur transition vers l'état stable, ils pourront émettre un photon de fluorescence ou alors dissiper cette énergie sous forme de chaleur par des conversions internes. Lorsque l'électron se trouve dans un état excité, celui-ci peut également transiter vers l'état triplet. Un électron présent dans un état triplet pourra alors retourner à un état stable par des phénomènes de conversion interne ou alors par l'émission de photons de phosphorescence. Seulement, la présence d'électrons dans un état triplet rend la molécule chimiquement active, ce qui peut engendrer des phénomènes problématiques comme l'apparition de photoblanchiment. Ce phénomène sera présenté et discuté plus tard dans ce chapitre.

1.2.2 L'intérêt de la fluorescence en imagerie

L'apport des protéines et des marqueurs fluorescents a été une réelle avancée dans le domaine de l'imagerie en biologie. Effectivement, grâce au phénomène d'absorption à un photon, l'utilisation de marqueurs fluorescents a fortement amélioré les contrastes d'imagerie d'échantillons biologiques mais a également permis augmenter le nombre de structures accessibles et observables grâce aux multiples spécificités qu'ont ces marqueurs.

Absorption à un photon

La fluorescence par absorption à un photon est le contraste le plus simple à utiliser et le plus répandu dans les laboratoires. Il utilise directement le phénomène d'absorption des photons

d'excitation émis par une source monochromatique pour générer directement des photons de fluorescence.

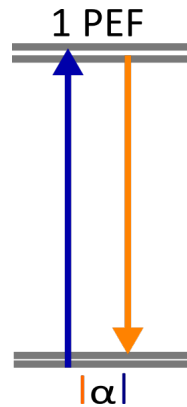


FIGURE 1.2.2 – Représentation du processus d'émission par absorption d'un photon (1PEF)

On qualifie ce processus de processus linéaire car l'absorption d'un photon entraîne la génération d'un photon de fluorescence, rendant l'intensité du signal généré proportionnelle à celle du signal incident (Figure 1.2.2).

Amélioration du contraste

L'utilisation de marqueurs fluorescents a grandement amélioré les contrastes que l'on avait en microscopie de plein champ. En effet, avant l'apparition de ces indicateurs, les microscopes disposaient d'une source de lumière blanche pour éclairer les échantillons par transmission (Figure 1.2.3 (a)).

Comme les échantillons biologiques (tels que des cellules) ont un indice optique très proche de celui de leur environnement, le contraste entre l'environnement autour des cellules et les structures internes de celles-ci (telles que le noyau, les vésicules et autres organelles) est très faible. Effectivement, le contraste correspond à la quantité de lumière absorbée par l'échantillon par rapport au reste du champ. L'emploi de marqueurs fluorescents permet donc d'obtenir un contraste beaucoup plus grand car celui-ci équivaut au signal de fluorescence émis directement (Figure 1.2.3 (b)).

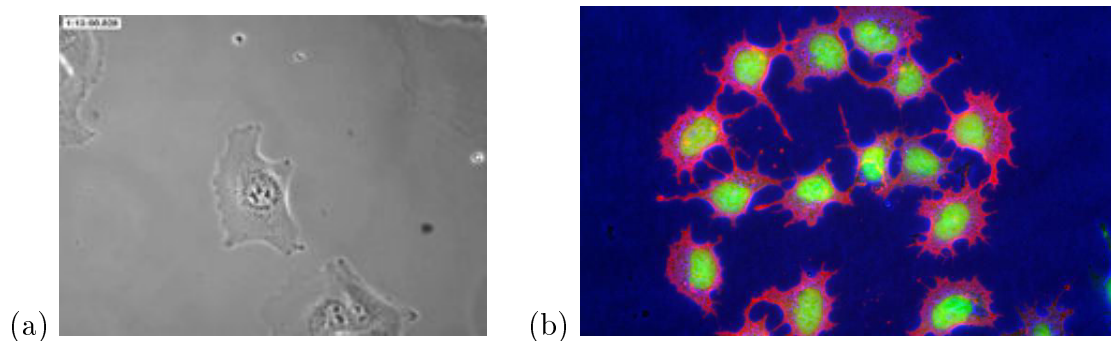


FIGURE 1.2.3 – (a) L'imagerie de plein champ en lumière blanche permet d'avoir rapidement des informations sur l'échantillon étudié, néanmoins le faible contraste limite l'étude de celui-ci . (b) L'application de marqueurs fluorescents entraîne un contraste beaucoup plus fort de l'échantillon permettant une meilleure visualisation de celui-ci

Principe de la spécificité

La spécificité d'un marqueur fluorescent traduit la possibilité de fixer celui-ci à un élément précis sans impacter le reste de l'échantillon. On peut ainsi réaliser plusieurs marquages avec différents fluorophores émettant à des longueurs d'onde précises. Cela permet donc une visualisation simultanée des différentes structures composant l'échantillon en changeant seulement la longueur d'onde de la source d'excitation (Figure 1.2.4).

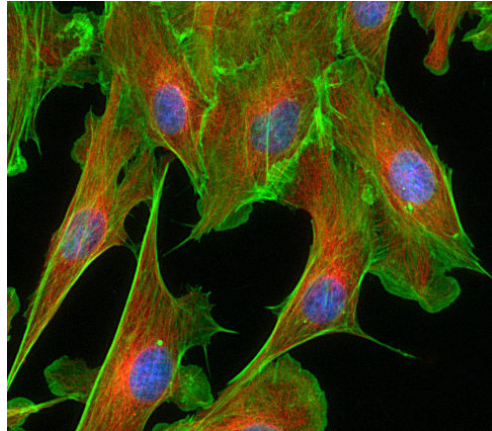


FIGURE 1.2.4 – La spécificité des marqueurs biologiques rend possible l'observation en même temps de plusieurs structures ou éléments présents dans l'échantillon. Ici, on peut voir des cellules marquées de trois manières différentes : la tubuline y apparaît en vert, les filaments d'actine en rouge et l'ADN présent dans les noyaux en bleu

Néanmoins, tout ceci n'aurait pas été possible sans les travaux menés sur l'une des premières protéines fluorescentes : la GFP.

1.2.2.1 La protéine à fluorescence verte GFP

L'une des plus grandes avancées dans l'histoire de l'imagerie de fluorescence fût la découverte de la protéine à fluorescence verte (GFP pour Green Fluorescent Protein). Son nom vient de sa propriété à émettre une lumière verte lorsqu'elle est soumise à un rayonnement ultraviolet. Cette protéine, issue d'une variété de méduse *Aequorea Victoria*, a été décrite pour la première fois en 1962 par Osamu Shimomura [14]; ce qui lui valut le prix Nobel de Chimie en 2008 aux côtés de Martin Chalfie et Roger Y. Tsien pour leurs travaux de développement portant sur cette protéine.

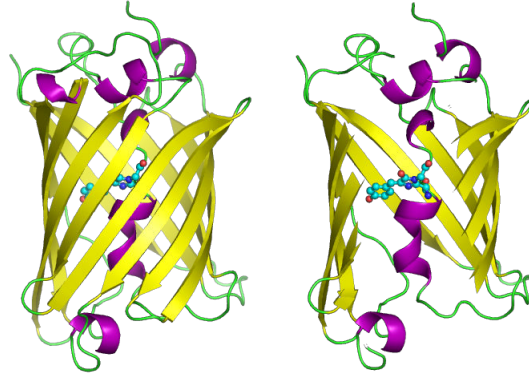


FIGURE 1.2.5 – Modélisation de la structure de la GFP : au coeur, le centre actif du fluorophore permettant la génération de fluorescence est constitué par les chaînes latérales d’une glycine, d’une tyrosine et d’une sérine

La GFP est composée d’une chaîne de 238 acides aminés pour une masse d’environ 27 kDa (Figure 1.2.5). La souche sauvage de cette protéine (notée wtGFP) possède deux pics d’excitation, un pic majeur dans l’ultraviolet à 395 nm et un mineur dans le visible à 475 nm pour un seul pic d’émission maximal situé dans le visible à 504 nm (Figure 1.2.6 (a)).

Les avancées en bio-ingénierie ont permis le développement de nouvelles protéines fluorescentes mais la première avancée majeure fût la création de la souche S65T [15]. Cette mutation a modifié les caractéristiques spectrales de la GFP, déplaçant le principal pic d’absorption à 488 nm et conservant le pic d’émission à 509 nm (Figure 1.2.6 (b)). Ainsi, grâce à cette nouvelle souche, l’utilisation de la GFP en imagerie de fluorescence est rendue plus simple, ne nécessitant plus qu’une source émettant dans le visible et non plus dans l’ultraviolet. Cette mutation a également amélioré la fluorescence de la protéine ainsi que sa photostabilité.

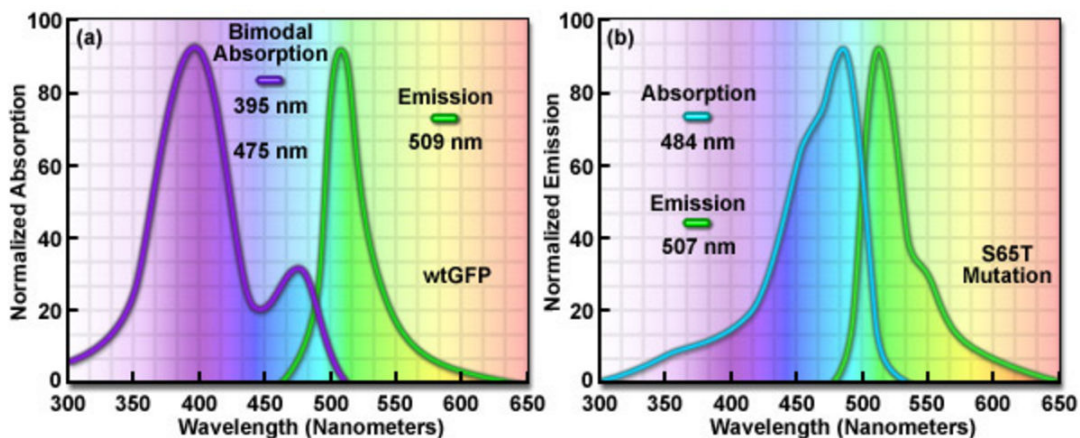


FIGURE 1.2.6 – Spectres d’excitation et d’émission de la GFP sauvage “wtGFP” (a) et de la souche mutante S65T (b).

Source : <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/fpintroduction.html>

Pour finir, ces avancées ont également engendré la création de toute une gamme de pro-

téines fluorescentes dérivées de la GFP comme la protéine fluorescente cyan (CFP) ou jaune (YFP).

1.2.2.2 Les marqueurs calciques

Les marqueurs calciques sont des marqueurs fluorescents ayant une sensibilité aux ions calcium Ca^{2+} présents dans les cellules. Ceux-ci, développés pour suivre l'évolution de la concentration d'ions calcium dans l'échantillon, sont essentiels en imagerie de l'activité cérébrale. Effectivement, les ions calcium créent une multitude de signaux intracellulaires qui contrôlent les fonctions clés, comme la libération de neurotransmetteurs par les vésicules synaptiques. Ces marqueurs sont utilisés en imagerie calcique pour effectuer des mesures directes du flux dynamique de calcium à l'intérieur des neurones et des tissus neuronaux [16].

Le marqueur employé par nos collègues neurobiologistes est appelé GCaMP [17]. Il s'agit d'une molécule de GFP couplée avec la protéine calmoduline (CaM) qui est une protéine ubiquitaire, capable de s'associer aux ions calcium présents dans le milieu cellulaire. Ainsi injectée dans un environnement ayant une faible concentration d'ions, la calmoduline aura un effet inhibiteur sur la génération de fluorescence de la GFP. Néanmoins, sous l'effet de l'entrée d'ions calcium dans la cellule suite à la génération d'un potentiel d'action, l'inhibition diminuera entraînant l'augmentation de la fluorescence de cette protéine (Figure 1.2.7). Pour nos applications *in vivo*, la souche de GCaMP utilisée est ici la source GCaMP6f.

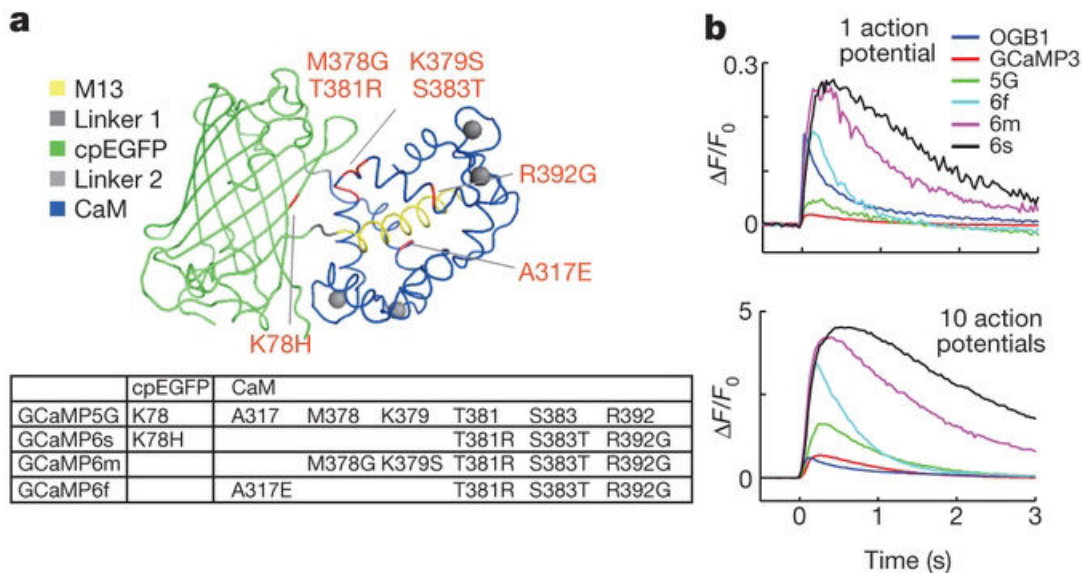


FIGURE 1.2.7 – (a) Représentation de la structure du marqueur GCaMP composée d'une protéine calmoduline (CaM) et d'une molécule de GFP. (b) Evolution temporelle de la fluorescence de différentes souches de GCaMP en réponse à un ou dix potentiels d'action ; $\Delta F/F_0$ correspond à la variation de la fluorescence relative au niveau basal [18]

1.2.3 Modalités d'imagerie de fluorescence

L'apparition des marqueurs fluorescents a permis la naissance de nombreuses techniques d'imagerie basées sur cette technologie et a ainsi donné des outils puissants pour mieux étudier et comprendre la biologie. Celles-ci ont su évoluer au fil des années tentant à chaque

fois de repousser les limites de leurs prédécesseurs, permettant d'aller toujours plus loin dans l'étude du vivant.

Dans cette partie, nous dresserons un portrait de l'évolution des différentes techniques d'imagerie de fluorescence allant de l'imagerie de plein champ jusqu'aux dernières méthodes d'imagerie non linéaires. Mais avant cela, nous allons introduire quelques notions sur la création d'images en microscopie de fluorescence.

1.2.3.1 La fonction d'étalement de point (PSF)

La réponse impulsionnelle est un concept que l'on retrouve dans de nombreux domaines en physique. Elle peut traduire l'inertie temporelle d'un détecteur ou le pouvoir de résolution d'un système d'imagerie. En imagerie, celle-ci est aussi appelé fonction d'étalement de point (*PSF* pour Point Spread Function). Il est possible de définir la *PSF* d'un dispositif de différentes manières, celles-ci étant liées aux caractéristiques du système.

Création d'une image

Dans le cadre de l'imagerie de plein champ, la *PSF* peut être assimilée à la limite de résolution du système optique. En effet, si l'on tente d'imager une source infiniment petite au travers d'un système optique, l'image obtenue de celle-ci sera représentée par une tache plus grande (Figure 1.2.8). Appelée fonction d'Airy, l'obtention de cette tache est associée à la réponse impulsionnelle du système optique.

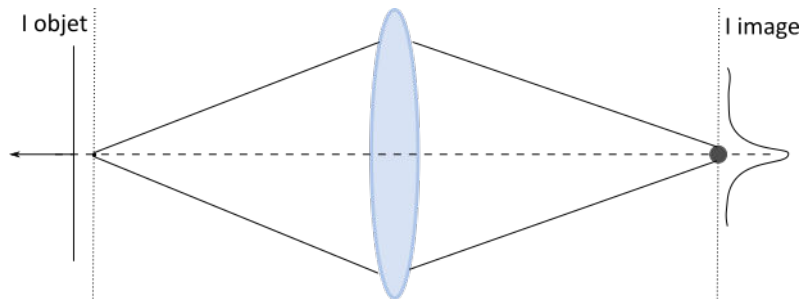


FIGURE 1.2.8 – L'image d'un point source au travers d'un système optique correspond à une tache présentant un profil d'intensité non ponctuel

La taille de la tache ainsi obtenue sera déterminée par ce que l'on appelle la limite de diffraction. Ainsi, les dimensions axiale et radiale de l'image $\sigma_{x,y}$ et σ_z seront définies comme :

$$\sigma_{x,y} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.2.1)$$

$$\sigma_z = \frac{\lambda}{2NA^2} \quad (1.2.2)$$

où λ correspond à la longueur d'onde émise par l'objet et NA l'ouverture numérique de l'objectif du microscope utilisé.

La PSF en microscopie de balayage - PSF d'excitation

Dans le cadre de la microscopie de balayage, la *PSF* est caractérisée de la même manière seulement cette fois-ci il s'agit de l'image obtenue par balayage d'un objet très petit (i.e fonction Dirac) qui est alors l'image du volume de focalisation. En effet, celle-ci correspond à la convolution du point objet et du volume focal (Figure 1.2.9). Ainsi, la résolution d'un tel système est définie par la taille du volume d'excitation qu'on appelle PSF par abus de langage.

En utilisant un tel modèle, l'image I d'un objet notée O est alors donnée par la relation suivante :

$$I(x, y, z) = \int \int \int O(x', y', z') \times PSF(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz' \quad (1.2.3)$$

$$I(x, y, z) = (O * PSF)(x, y, z) \quad (1.2.4)$$

où $*$ correspond à l'opération de convolution.

Ce modèle suppose que la fonction d'étalement de point du système est la même sur tout le champ de vue, ce qui sous-entend que les aberrations et la diffusion sont invariantes ou absentes.

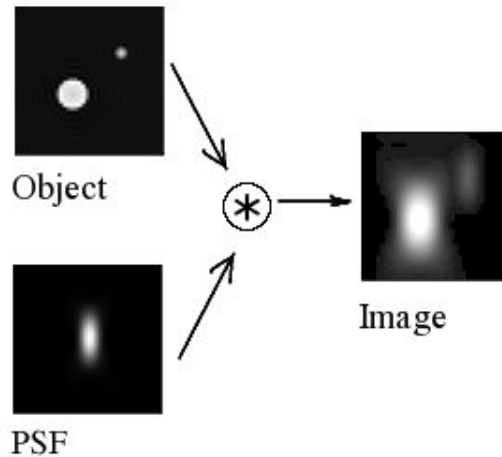


FIGURE 1.2.9 – Dans le cadre d'un système d'imagerie parfait, l'image d'un objet fluorescent au travers d'un objectif de microscope correspond à la convolution de l'objet avec la fonction d'étalement de point

Source : http://exoplanet.as.arizona.edu/~lclose/a302/lecture9/Lecture_9.html

La fonction *PSF* est donnée par la distribution d'intensité du profil d'excitation au foyer notée I . Pour des champs scalaires à symétrie radiale vérifiant l'approximation paraxiale, la *PSF* peut se calculer à l'aide de l'expression suivante :

$$PSF(v) = \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp(ik\psi) \rho d\rho \quad (1.2.5)$$

où J_0 correspond à l'ordre zéro des fonctions de Bessel, $\psi(d, \rho)$ à la phase du front d'onde et v est une coordonnée radiale normalisée liée à la distance radiale r par la relation :

$$v = k.r.n.\sin\alpha \quad (1.2.6)$$

où $n.\sin\alpha$ est l'ouverture numérique NA de l'objectif et $k = 2\pi/\lambda$ le nombre d'onde. Il est ainsi possible d'écrire v sous la forme $v = k.r.NA$. Pour finir, $P(\rho)$ correspond au champ sur la pupille arrière de l'objectif.

Pour un faisceau gaussien, $P(\rho) = \exp(-\rho^2/f_0)$ où f_0 est le facteur de remplissage de la pupille arrière que l'on définit comme $f_0 = \phi_{beam}/\phi_{BA}$ avec ϕ_{beam} le diamètre du faisceau à $1/e^2$ et ϕ_{BA} le diamètre de la pupille arrière de l'objectif du microscope.

Cas multiphotonique - application en imagerie non linéaire

Pour ce qui est de la PSF dans le cadre de l'imagerie multiphotonique à balayage, on peut la définir de la même manière que la PSF à balayage classique, seulement la prise en compte du caractère non linéaire du phénomène devra être faite. On peut alors considérer la fonction d'étalement de point non linéaire PSF_n comme étant le volume focal d'excitation en imagerie multiphotonique à balayage, où n représente le nombre photons excitateurs intervenant dans le contraste.

$$PSF_n(v) = \left[\int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp(ik\psi) \rho d\rho \right]^{2n} \quad (1.2.7)$$

Dans la suite de ce manuscrit, lorsque l'on abordera la notion de PSF , il s'agira du volume focal d'excitation biphotonique PSF_n que l'on prendra en compte.

1.2.3.2 L'imagerie de plein champ

L'imagerie de plein champ repose sur la création directe d'une image de fluorescence issue de l'illumination d'un échantillon par une source monochromatique (Figure 1.2.10 (a)). La lumière, servant de source d'excitation, est envoyée sur l'échantillon excitant à son passage les fluorophores présents dans celui-ci. On récupère alors la lumière transmise ainsi que celle de fluorescence à l'aide d'un objectif de microscope qui va imager un plan de l'échantillon sur une caméra. Un filtrage de la lumière collectée sera effectué juste après la sortie de l'objectif pour supprimer la longueur d'onde de la source d'excitation permettant ainsi d'obtenir une image de fluorescence. En changeant la longueur d'onde de la source et le jeu de filtres, il est alors possible d'observer différents types de marquages et donc différentes structures dans l'échantillon (Figure 1.2.10 (b)).

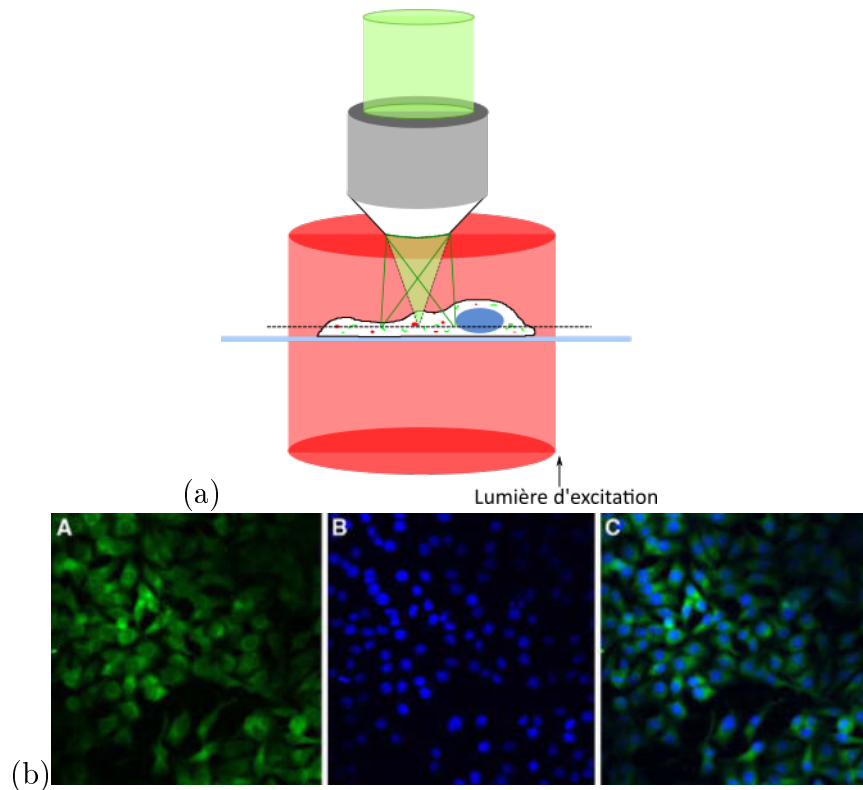


FIGURE 1.2.10 – (a) Schéma de principe de l'imagerie de plein champ. La fluorescence générée grâce à la source d'excitation est collectée par l'objectif puis imagée sur le détecteur. (b) Il est possible de changer la longueur d'onde d'illumination pour observer différents éléments de l'échantillon : A - actine, B- ADN dans les noyaux et C- superposition des deux images de fluorescence

L'imagerie de plein champ a de nombreux avantages. Très simple de mise en place, elle permet d'obtenir rapidement des informations morphologiques et structurales sur l'échantillon étudié. Néanmoins, cette technique possède quelques points faibles comme notamment le fait qu'elle n'est applicable que sur des échantillons relativement fins et transparents de manière à laisser passer la lumière. Enfin, le fait d'exciter la totalité de l'échantillon entraîne une génération de fluorescence globale, causant l'apparition d'un signal de fond issu de la fluorescence provenant des autres plans de celui-ci.

1.2.3.3 La microscopie de balayage

Pour diminuer le problème d'excitation globale de l'échantillon et en même temps améliorer le sectionnement optique, l'une des possibilités est de changer la méthode d'illumination. Pour cela, il suffit de remplacer la source diffuse par une source directement focalisée sur l'échantillon par l'objectif du microscope. Cela nous permet donc d'exciter seulement un petit volume autour du plan d'imagerie, réduisant la profondeur de champ et diminuant grandement le nombre de photons "parasites". Ainsi pour former une image, il suffira de balayer le point de focalisation du laser sur l'échantillon et d'en récupérer le signal de fluorescence généré (Figure 1.2.11).

Pour réaliser ce mouvement de balayage, deux approches sont possibles. La première consiste à focaliser le laser en un point fixe et à effectuer des mouvements de translation

de l'échantillon autour de celui-ci. Quant à la seconde, elle consiste à réaliser un balayage direct du faisceau laser (i.e le point de focalisation) sur l'échantillon exécuté au moyen de miroirs galvanométriques disposés avant l'objectif du microscope. La différence entre ces deux approches va essentiellement résider dans la dynamique du balayage. En effet, il sera possible d'atteindre des vitesses d'acquisition beaucoup plus importantes en utilisant des miroirs galvanométriques qu'en scannant l'échantillon par le déplacement de celui-ci. Cette technique s'appelle communément la microscopie de balayage et sera la base de toutes les autres méthodes présentées par la suite.

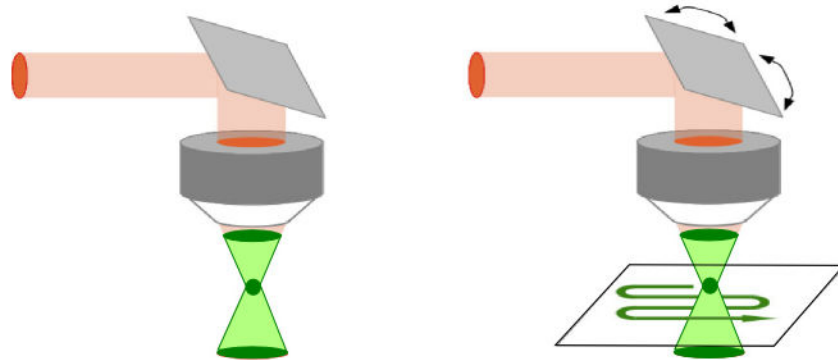


FIGURE 1.2.11 – En focalisant un faisceau laser sur l'échantillon, un double cône de focalisation va être créé et ainsi exciter les fluorophores présents dans ce volume. En effectuant un balayage du spot de focalisation, il est possible de recréer une image de l'échantillon en enregistrant le signal de fluorescence en chaque point du scan

La technique d'imagerie par balayage améliore la profondeur de champ en localisant l'excitation uniquement dans le double cône de focalisation de dimension axiale nettement plus faible que la profondeur de champ en imagerie de plein champ. Néanmoins, cette dimension, de l'ordre de quelques micromètres, reste encore trop importante pour générer des images en trois dimensions de fort contraste.

Pour améliorer notre résolution, il faudrait donc être capable de collecter uniquement les photons de fluorescence issus du plan d'imagerie étudié, c'est-à-dire les photons générés par la zone où la lumière est la plus focalisée. Une technique pour réaliser ce type de mesure existe et s'appelle la microscopie confocale.

1.2.3.4 La microscopie confocale

La microscopie confocale, initialement imaginée en 1953 par Minsky [19], repose sur l'acquisition de photons de fluorescence filtrés via un pinhole positionné devant le détecteur. Le processus d'excitation étant basé sur un phénomène d'absorption à un photon, le principal problème provient de la génération d'un fort signal de fond dû à des photons produits dans les différents plans du double cône d'excitation. L'idée repose alors sur l'insertion d'un pinhole, de manière à effectuer un filtrage spatial de cette source de bruit. Pour réaliser cela, le pinhole est conjugué avec le plan d'imagerie de l'objectif, ce qui permet la conservation des photons émis par tous les fluorophores qui se trouvent dans le même plan. Les photons provenant d'émetteurs présents dans d'autres parties du double cône focal seront alors bloqués par le pinhole et donc non mesurés (Figure 1.2.12).

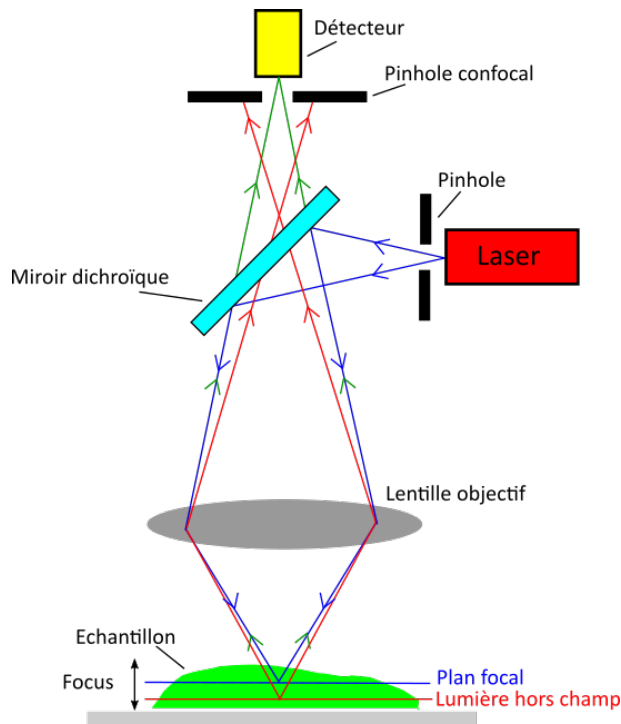


FIGURE 1.2.12 – Schéma de principe d'un système d'imagerie confocale. La fluorescence provenant uniquement du plan d'imagerie est mesurée grâce à l'ajout d'un pinhole devant le détecteur. Ainsi, la fluorescence provenant des autres plans est supprimée, améliorant la qualité des images

L'apparition des premiers microscopes confocaux commerciaux a permis de nombreuses avancées dans le domaine de la biologie cellulaire et pour l'étude des tissus biologiques. Seulement, le processus à un photon étant limité par de nombreux phénomènes optiques (principalement l'absorption), il est délicat d'imager en profondeur dans des échantillons très épais.

1.2.3.5 L'imagerie multiphotonique

L'imagerie multiphotonique est l'étape suivante dans l'évolution des techniques d'imagerie en profondeur. Cette approche est basée sur des processus d'absorption non linéaires pour engendrer des photons de fluorescence.

Absorption à plusieurs photons

L'énergie nécessaire pour entraîner la transition d'un électron vers un état excité étant $E = \frac{hc}{\lambda}$, on peut imaginer apporter celle-ci non pas avec un seul photon mais par le cumul de plusieurs. Pour obtenir des photons de fluorescence issus de l'absorption simultanée de plusieurs photons, il faut donc exciter le fluorophore avec des photons dont l'énergie est un sous-multiple de l'énergie de transition de la molécule. De ce fait, leur énergie devra être d'autant plus petite qu'il y aura de photons absorbés. Cela signifie que par exemple, pour réaliser une absorption à deux photons, l'énergie des photons devra être égale à la moitié de l'énergie d'absorption à un photon du fluorophore (Figure 1.2.13).

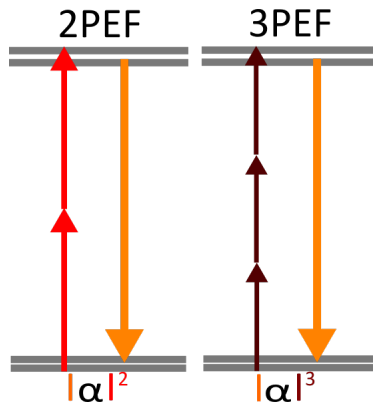


FIGURE 1.2.13 – Représentation du processus d’émission par absorption de deux photons (2PEF) et de trois photons (3PEF)

La probabilité de réalisation de ce type de phénomènes étant faible, cela nécessitera une grande quantité de photons au même endroit et au même instant pour espérer atteindre des niveaux suffisants de fluorescence. Ainsi, il est nécessaire d’effectuer une concentration spatio-temporelle des photons. La concentration spatiale sera réalisée par l’utilisation d’un objectif à grande ouverture numérique, tandis que le recours à des sources laser pulsées femtoseconde (i.e dont la durée des impulsions ne dépasse pas quelques femtosecondes) permettra la concentration temporelle des photons. Ces très courtes impulsions délivrées par le laser permettent de conserver une puissance moyenne du faisceau incident suffisamment faible pour ne pas endommager les échantillons tout en ayant une puissance crête gigantesque, rendant la densité locale de photons suffisante pour que l’effet soit possible.

Ce type de contraste non linéaire possède de réels avantages en terme de résolution et de pénétration optique comme nous allons le voir. Cependant, l’utilisation de sources laser pulsées pouvant émettre dans l’infrarouge peut être une limite. Cela devient d’ailleurs un réel problème pour le cas de l’absorption à trois photons [20]. En effet, à l’heure actuelle il est très rare de trouver des lasers pulsés pouvant émettre à plus de 1100 nm (e.g la longueur d’onde d’excitation à trois photons pour la GFP est d’environ 1350 nm).

L’effet deux photons

Le phénomène d’absorption à deux photons a tout d’abord été prédit par Göppert-Mayer en 1931 [21] puis observé trente ans plus tard par Kaiser et Garrett [22]. Il consiste en l’absorption simultanée par une molécule de deux photons d’énergie E_i entraînant la désexcitation de celle-ci par l’émission d’un photon de fluorescence d’énergie $E_f = 2E_i$. Comme nous l’avons décrit précédemment, l’énergie d’un photon étant $E = \frac{hc}{\lambda}$, la longueur d’onde des photons d’excitation devra être égale à $\lambda_i = 2\lambda_f$.

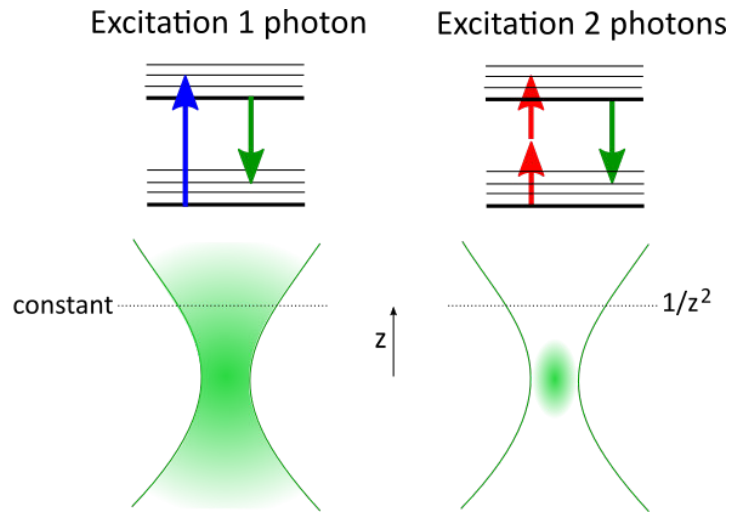


FIGURE 1.2.14 – Contrairement au processus d’absorption à un photon où la probabilité de génération de photons de fluorescence est forte et donc s’opère sur une grosse portion des doubles cônes de focalisation, l’effet deux photons nécessite une forte densité de photons permettant de se limiter uniquement à la PSF du système

Le processus d’absorption à deux photons étant complexe, la zone spatiale où ce phénomène aura lieu sera exclusivement située là où la densité de photons (donc l’intensité) sera la plus forte (Figure 1.2.14). En microscopie à balayage, la zone où l’intensité est la plus concentrée se trouve être le point de focalisation de la lumière via l’objectif du microscope. Cette zone aura donc pour dimensions les résolutions axiale σ_z et radiale $\sigma_{x,y}$ définies par l’objectif, soit :

$$\sigma_{x,y} = \frac{\lambda}{2NA} \quad (1.2.8)$$

$$\sigma_z = \frac{\lambda}{2NA^2} \quad (1.2.9)$$

où λ correspond à la longueur d’onde de la lumière focalisée et NA l’ouverture numérique de l’objectif de microscope utilisé.

De cette propriété résulte l’un des principaux avantages de l’utilisation de l’absorption à deux photons en microscopie. En effet, la concentration nécessaire pour la réalisation de ce phénomène permet la localisation tridimensionnelle très précise de la source de photons de fluorescence. Tout photon de fluorescence détecté proviendra ainsi forcément des fluorophores présents dans ce volume.

La microscopie deux photons

La première observation dans un milieu organique a été effectuée par Peticolas et al. [23]. Quelques années plus tard, la microscopie laser fondée sur l’absorption à deux photons a été proposée par Sheppard et Kompfner [24]. Enfin, c’est en 1990 que Denk et al. [25] ont rapporté la première application expérimentale de l’absorption à deux photons à la microscopie laser. L’avantage de cette technique par rapport à la microscopie confocale conventionnelle réside en deux points :

- Le processus d'absorption à deux photons étant non linéaire, une énorme densité de photons est nécessaire. Par conséquent, seule la zone où le laser d'excitation est le plus focalisé permet de suffisamment concentrer les photons pour rendre la génération de photons de fluorescence possible. Cette contrainte permet d'avoir un volume d'émission de photons de fluorescence extrêmement localisé et donc supprime l'utilisation du pinhole de la microscopie confocale dans le rôle de filtre spatial, donnant ainsi la possibilité de collecter une partie des photons diffusés.
- Le second avantage est dû aux longueurs d'onde d'excitation nécessaires pour obtenir l'effet deux photons. En effet, les longueurs d'onde de travail doivent se situer dans le proche infrarouge, ce qui nous positionne dans ce que l'on appelle la fenêtre de l'eau (Figure 1.2.15). Les tissus étant composés à 70% d'eau, travailler dans le proche infrarouge nous permettra une meilleure pénétration dans le tissu par rapport aux longueurs d'onde dans le domaine du visible.

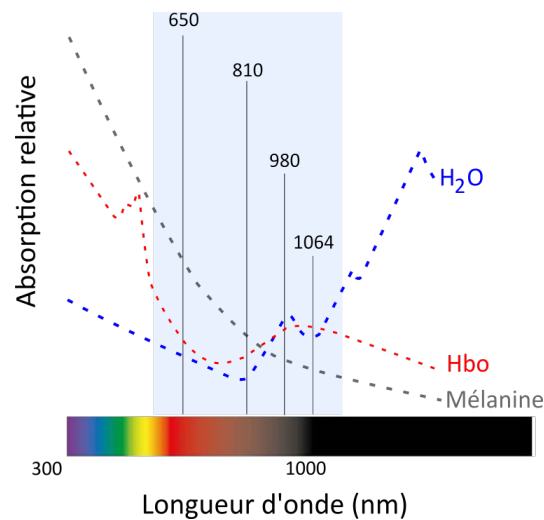


FIGURE 1.2.15 – Diagramme de l'absorption de l'eau (bleu), de la mélanine (marron) et de l'hémoglobine (rouge) en fonction de la longueur d'onde

Par rapport à la microscopie confocale, l'imagerie de fluorescence à deux photons semble clairement plus efficace. Seulement, là où un microscope confocal aura besoin d'une lampe de fluorescence ou d'un laser continu monochromatique pour fonctionner, un microscope à deux photons nécessitera quant à lui une source laser pulsée. Celle-ci devra pouvoir émettre dans le proche infrarouge avec une intensité en sortie suffisamment élevée pour engendrer de la fluorescence par absorption deux photons. Or, ces sources sont nettement plus coûteuses que les sources utilisées en microscopie confocale. Cela explique donc le fait que les microscopes confocaux soient bien plus courants que les microscopes bi-photons.

1.2.3.6 Les alternatives à l'imagerie de fluorescence - les contrastes sans marquage

Précédemment, nous avons abordé des techniques basées sur la fluorescence générée par des fluorophores présents dans l'échantillon. Or, il est aussi possible d'obtenir du signal de fluorescence sans marqueur en venant exciter suffisamment la matière pour que celle-ci se

déexcite par l'émission de photons. Ces contrastes dits sans marquage vont être intrinsèquement liés à la structure même de l'échantillon.

Génération de seconde et troisième harmonique

La génération de seconde harmonique (SHG pour Second Harmonic Generation) [26] est un phénomène optique non linéaire. Il s'agit de la recombinaison de deux photons après avoir interagi avec un matériau non linéaire. Ceux-ci sont combinés pour former de nouveaux photons avec le double de l'énergie des photons incidents et donc la moitié de la longueur d'onde des photons initiaux. Dans le cadre d'échantillons biologiques, ce seront les structures moléculaires non centrosymétriques qui généreront un signal de seconde harmonique. Les systèmes fortement organisés comme le collagène fibrillaire présent dans de nombreux types de tissus sont des structures générant un fort signal SHG. Il est donc possible d'obtenir des informations sur ce type de structures dans l'échantillon en observant les variations du signal SHG mesurées.

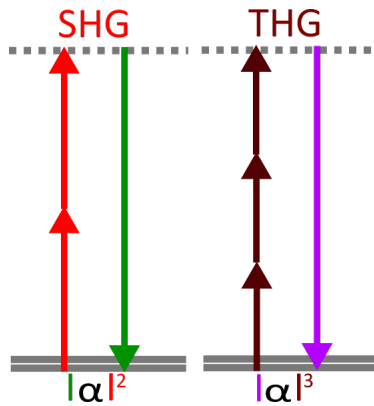


FIGURE 1.2.16 – Représentation du processus d'émission de photons par génération de seconde harmonique (SHG) et de troisième harmonique (THG)

En ce qui concerne le contraste par génération de troisième harmonique (THG pour Third Harmonic Generation) [27], le principe de création de ce signal est du même type que la SHG (Figure 1.2.16). Seulement, là où le signal de seconde harmonique sera produit par des structures non centrosymétriques, le signal de troisième harmonique pourra être généré par n'importe quelle molécule ou structure. A cause de phénomènes d'interférences destructives, il n'est pas possible de mesurer le signal THG provenant d'un milieu homogène. Il sera néanmoins observable aux abords des interfaces entre les différents matériaux ou structures présentes dans l'échantillon.

Mélange à quatre ondes

La microscopie CARS est une méthode spectroscopique permettant d'obtenir, avec une résolution tri-dimensionnelle, une signature vibrationnelle des molécules présentes dans l'échantillon [28,29]. Plus précisément, le processus non linéaire intervenant est un mélange à quatre ondes au cours duquel des faisceaux de pompe ω_P et de sonde ω_S interagissent avec le milieu pour générer un signal à la fréquence anti-Stokes ω_{AS} .

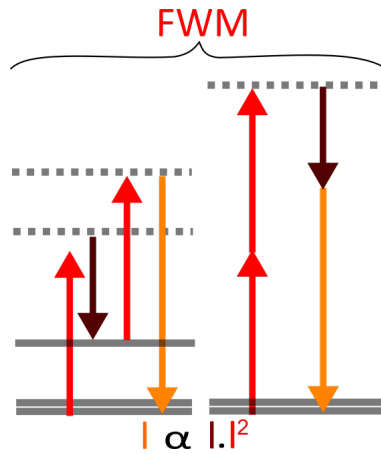


FIGURE 1.2.17 – Processus intervenant dans le signal CARS. A gauche la partie résonnante, à droite partie non résonnante

Deux types d'interactions sont en compétition au cours de ce processus : la première est dite non résonnante car spectralement non spécifique, alors que la deuxième est dite résonnante car elle fait intervenir les niveaux vibrationnels des molécules (Figure 1.2.17). Par conséquent, en sélectionnant précisément les longueurs d'onde des faisceaux pompe et sonde, il est possible de mesurer le signal anti-Stokes résonnant provenant d'un type de liaison vibrationnelle. Cela permettra d'obtenir une information sur la composition chimique et structurale de l'échantillon [30, 31, 32].

L'emploi d'un tel contraste peut être très intéressant en neurosciences pour notamment réaliser des études structurales de certains éléments néanmoins cette technique n'est pas efficace dans le cas où l'on souhaite réaliser de l'imagerie de l'activité calcique. En effet, comme nous l'avons expliqué précédemment, le recours à des marqueurs calciques est indispensable pour cela et de ce fait incompatible avec le mélange à quatre ondes.

Néanmoins, que ce soit en utilisant des contrastes de fluorescence linéaires, non linéaires ou encore des contrastes sans marquage, toutes ces techniques d'imagerie sont sensibles à de nombreux phénomènes optiques. Ceux-ci, introduits par les structures complexes qui composent les tissus biologiques, tendent à dégrader les capacités d'imagerie dès lors que l'on s'enfonce dans l'échantillon.

1.2.4 Les principales sources de problèmes en imagerie des tissus

Malgré le fort développement des techniques de microscopie et de biophotonique au cours de ces trente dernières années, l'imagerie des tissus biologiques demeure un réel défi. En effet, leur complexité entraîne de nombreuses perturbations optiques comme la diffusion ou encore les aberrations optiques. Ainsi, là où les qualités optiques d'un objectif de microscope sont garanties du moment où l'on se trouve dans sa distance de travail (WD pour working distance), celles-ci se verront diminuées au fur et à mesure que l'on s'enfoncera dans le tissu.

1.2.4.1 La diffusion optique

La diffusion optique est un processus physique qui perturbe fortement la propagation d'une onde lumineuse à cause de la présence d'inhomogénéités dans le milieu où elle se propage. Sous l'effet de l'onde incidente, les charges de la particule diffusante se mettent à osciller se transformant ainsi en dipôles oscillants qui rayonnent des ondes secondaires à la même fréquence que l'onde incidente. La particule se comporte alors comme une source de lumière secondaire avec une distribution angulaire d'intensité qui lui est propre et qui dépend en particulier de sa taille, de son indice de réfraction ainsi que de la longueur d'onde d'illumination. Il existe différents types de diffusion liés principalement au rapport de taille entre la particule diffusante et la longueur d'onde de l'onde incidente. Ces différents régimes sont :

- La diffusion Rayleigh : ce régime correspond au cas où les particules diffusantes sont très petites devant la longueur d'onde incidente. On peut considérer que l'on se trouve dans des conditions de diffusion Rayleigh lorsque les particules sont inférieures à $\lambda/10$.
- La diffusion de Mie : le régime de Mie est considéré lorsque les particules sont du même ordre de grandeur que la longueur d'onde de l'onde incidente. Dans ce cas-ci, plus la particule sera grande plus la diffusion aura lieu préférentiellement vers l'avant.
- La diffusion "géométrique" : elle est applicable lorsque l'objet diffusant est grand devant la longueur d'onde, comme par exemple les particules d'eau en suspension dans le brouillard (Figure 1.2.18). Dans ce cas-ci, les lois de l'optique géométrique permettent de résoudre le problème.

Dans les tissus biologiques, la lumière rencontre des structures de tailles variées ne permettant pas d'appliquer directement une théorie comme celle de Rayleigh ou de Mie. Il est donc nécessaire de raisonner à l'échelle macroscopique en introduisant un coefficient de diffusion moyen μ_s caractérisant le milieu. Celui-ci (généralement exprimé en cm^{-1}) peut être défini de la même façon que pour l'absorption. La quantité de lumière collimatée I , qui traverse un échantillon diffusant mais non absorbant d'épaisseur z sans être diffusée (c'est-à-dire l'intensité balistique), s'exprime sous la forme :

$$I = I_0 \exp(-\mu_s z) \quad (1.2.10)$$

Il nous est possible d'établir un libre parcours moyen correspondant à la distance que peut parcourir un photon sans subir un événement de diffusion. Ce libre parcours moyen est alors défini par : $l_s = \frac{1}{\mu_s}$. Dans les tissus biologiques, cette grandeur peut ainsi aller de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres.



FIGURE 1.2.18 – Le brouillard est la représentation naturelle la plus évidente du phénomène de diffusion optique. Les photons, pénétrant dans le brouillard, se retrouvent alors déviés de nombreuses fois par les particules d'eau en suspension dans l'air. Au bout de quelques mètres, les photons ont tellement changé de direction qu'ils perdent l'information de leur source d'origine. C'est pour cela qu'il est très difficile de voir au travers d'un épais brouillard

En microscopie, la diffusion optique demeure le principal inconvénient lorsqu'on souhaite effectuer de l'imagerie de tissus en profondeur. Effectivement, ce phénomène intervient à deux reprises :

- Sur le faisceau d'excitation dégradant la PSF : la diffusion diminuera l'efficacité d'excitation et donc entraînera une perte non négligeable de fluorescence. Ceci est d'autant plus grave en microscopie à deux photons où l'intensité de fluorescence générée est proportionnelle au carré de l'intensité déposée par le laser.
- Sur les photons de fluorescence générés : ceux-ci peuvent perdre l'information de leur source d'émission générant un signal diffus en fond et donc dégradant par conséquent la qualité des images obtenues par l'apparition de ce bruit de fond.

Malheureusement, il est à l'heure actuelle impossible de contrecarrer la diffusion optique dans le cadre de l'imagerie des tissus. De nombreux travaux mettent en évidence la possibilité de compenser la diffusion par le contrôle des speckles [33, 34], cependant ceux-ci ne sont pas pour le moment applicables pour des objets aussi complexes que des tissus biologiques.

1.2.4.2 Les aberrations optiques

Une seconde difficulté lorsqu'on tente d'imager des tissus biologiques est la présence d'aberrations optiques. Il s'agit de perturbations introduites sur le front d'onde par des inhomogénéités d'indice optique dans le milieu où se propage l'onde. Contrairement à la diffusion, les perturbations causées par les aberrations sont des déformations d'assez basses fréquences spatiales, ce qui n'entraînera pas une perte des photons incidents mais une déformation excessive de la PSF. Or en imagerie non linéaire, avoir une PSF plus grosse que la limite de diffraction cause une réelle perte de signal de fluorescence mais également une détérioration de la résolution spatiale (Figure 1.2.19).

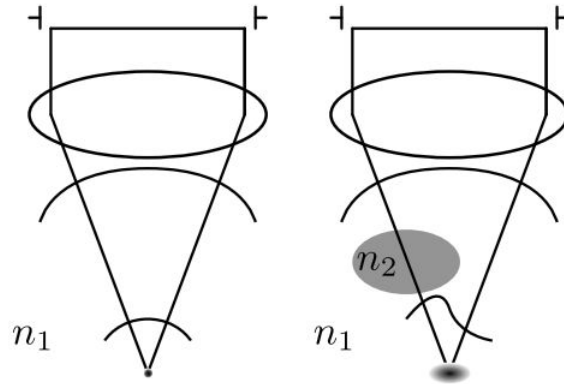


FIGURE 1.2.19 – Lorsqu’on focalise une onde plane dans un milieu d’indice optique homogène n_1 , celle-ci va se concentrer en un point dont la taille est définie par la limite de diffraction. Mais lorsque cette onde rencontrera une zone d’indice optique $n_2 \neq n_1$, celle-ci se retrouvera déformée entraînant une augmentation du volume d’excitation

Dans le cadre de l’imagerie des tissus biologiques, les principales sources d’aberrations vont être introduites par des objets dont l’indice optique diffère de celui de l’environnement dans lequel ils se trouvent [35, 36]. De ce fait, pour les tissus neurobiologiques, on peut s’attendre à l’introduction d’aberrations par différentes structures comme les vaisseaux sanguins, certaines zones très fibreuses mais également les zones de transition entre matière blanche et matière grise qui ne possèdent pas exactement le même indice optique.

1.2.4.3 Le photoblanchiment

Le photoblanchiment est un autre désagrément rencontré lorsqu’on effectue de l’imagerie de fluorescence dans les tissus biologiques. En effet, celui-ci n’est pas dû à des perturbations optiques introduites par l’échantillon mais il est lié à une propriété propre au processus de fluorescence. Effectivement, comme nous l’avons décrit précédemment, lorsqu’une molécule fluorescente est excitée par une source d’énergie externe, ses électrons sont amenés dans un état d’énergie excité. A ce moment-là, ils peuvent se désexciter en émettant un photon de fluorescence mais peuvent également transiter dans un état triplet par des processus internes. Une fois dans cet état, la molécule devient chimiquement active rendant le photoblanchiment de celle-ci possible. Le photoblanchiment correspond à la rupture de la capacité d’un fluorophore de générer des photons de fluorescence lorsque celui-ci se désexcite.

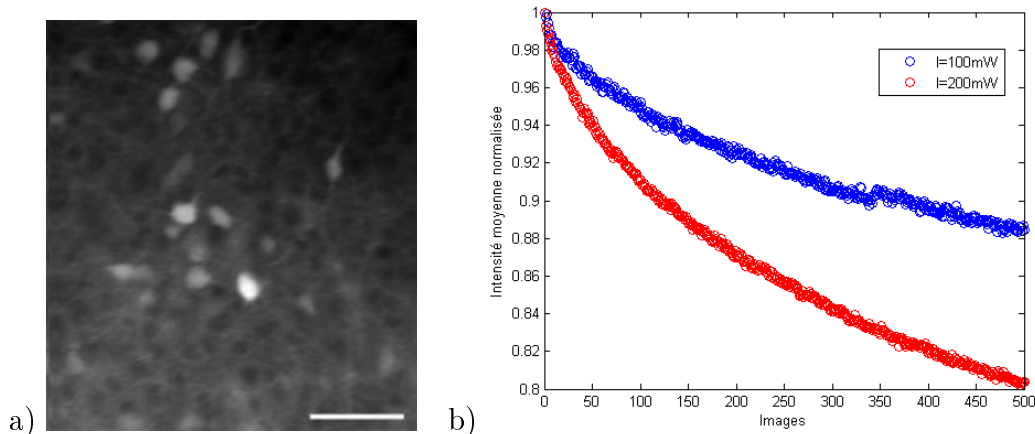


FIGURE 1.2.20 – L'évolution de l'intensité de fluorescence moyenne provenant du champ diminue au cours des acquisitions successives. a) Image de fluorescence d'un champ de $400 \mu\text{m}$, 256 pxl^2 à $200 \mu\text{m}$ de profondeur, taille de la barre d'échelle = $100 \mu\text{m}$, b) Evolution de l'intensité de fluorescence moyenne du champ d'imagerie pour une intensité du signal incident de 100 mW et de 200 mW

De ce fait, en imagerie des tissus, ce processus devient très problématique. Par exemple, pour contrecarrer les effets de la diffusion ou alors lorsqu'on commence à aller en profondeur dans le tissu, il est nécessaire d'augmenter la puissance du laser permettant l'excitation des fluorophores. Or, cela revient à augmenter le taux de blanchiment des molécules et donc diminuer fortement la fluorescence émise (Figure 1.2.20). De plus, si la présence d'aberrations optiques tend à déformer la PSF, cela rend l'imagerie des tissus biologiques en profondeur très difficile.

Comme nous avons pu le voir, il est délicat d'aller observer des structures profondes tout en essayant d'avoir le plus de signal possible pour conserver un bon contraste. En effet, deux principaux phénomènes optiques se produisent dans l'échantillon. L'un d'entre eux, la diffusion, n'est pas corrigeable et restera une limite physique de notre système. Quant au second, il pourra être atténué voire compensé : il s'agit des aberrations optiques. Pour cela, nous utiliserons une technique appelée optique adaptative qui permettra de corriger les aberrations optiques et d'améliorer nos capacités d'imagerie. Cette technique est celle que nous avons choisi pour la suite du projet et sera décrite dans les sections suivantes de ce chapitre.

1.3 Introduction à l'optique adaptative conventionnelle

L'optique adaptative est une technique ayant pour but la correction des aberrations optiques. Celles-ci, impactant le front d'onde lumineux, sont corrigées via l'utilisation d'un système optique déformable. Dans cette partie, nous aborderons les fondamentaux de l'optique adaptative conventionnelle en commençant par la présentation des différents instruments essentiels pour cette technique. Nous aborderons ensuite les différentes approches expérimentales existantes pour effectuer de l'optique adaptative.

1.3.1 Les aberrations optiques

Les aberrations optiques sont des phénomènes optiques issus de l'interaction d'une onde lumineuse et de l'environnement dans lequel l'onde se propage. Celles-ci représentent un inconvénient en microscopie car elles viennent détériorer la qualité d'imagerie des appareils. Ainsi, leur contrôle et la suppression de leurs effets semblent être une option valable pour améliorer les capacités d'imagerie en profondeur de notre système et l'optique adaptative demeure la technique reine dans ce domaine.

1.3.1.1 L'origine des aberrations optiques

Telles des gouttes d'eau sur une surface transparente qui viennent distordre l'image de l'extérieur (Figure 1.3.1), ces inhomogénéités vont venir perturber localement le front d'onde et ainsi lors de la focalisation de celui-ci, le volume focal s'en retrouvera déformé entraînant la détérioration des capacités optiques du système (tant en résolution qu'en pouvoir d'excitation).



FIGURE 1.3.1 – Lorsqu'il pleut, les gouttes de pluie s'accumulant sur le pare-brise viennent déformer l'image des véhicules se trouvant autour de nous. Ces distortions sont, en réalité, l'application locale d'aberrations optiques par ces gouttes d'eau dont l'indice optique diffère de celui du verre et de l'air. Il en résulte des contours déformés et des sources lumineuses distordues

Les aberrations que l'on peut rencontrer dans un système optique peuvent être introduites par différents éléments :

- Par des défauts liés à des éléments du système
- Par des imperfections liées à de mauvais alignements optiques dans le système
- Par l'échantillon lui-même, dû à une mauvaise "jonction" optique (variation entre l'indice de l'échantillon et l'indice du milieu de montage) ou alors à des variations spatiales d'indice dans l'échantillon

Pour les aberrations issues des deux premières conditions, la réduction de celles-ci peut s'effectuer manuellement via l'amélioration du système optique. Néanmoins, certaines d'entre elles ne seront pas supprimables et l'utilisation de l'optique adaptative sera nécessaire. Pour les aberrations introduites par l'échantillon, il n'est pas possible de réduire celles-ci et l'usage de l'optique adaptative devient essentiel.

1.3.1.2 Les principales aberrations optiques

On utilise le terme générique d'aberration optique pour définir les perturbations impactant le front d'onde. Néanmoins, certaines de ces perturbations proviennent de conditions établies depuis bien longtemps et sont caractérisées précisément. Les plus connues d'entre elles sont l'astigmatisme, la coma ou encore l'aberration sphérique.

L'astigmatisme

L'astigmatisme est une aberration optique liée à une dissymétrie de révolution du système optique. Elle se traduit par une focalisation différente du front d'onde selon l'axe horizontal ou vertical de l'optique entraînant la création de deux foyer distincts : le foyer sagittal et le foyer tangentiel. Cette aberration aura pour effet de distordre le front d'onde pour lui donner une forme de selle de cheval, c'est-à-dire une courbure positive selon un axe et négative selon l'autre axe (Figure 1.3.2).

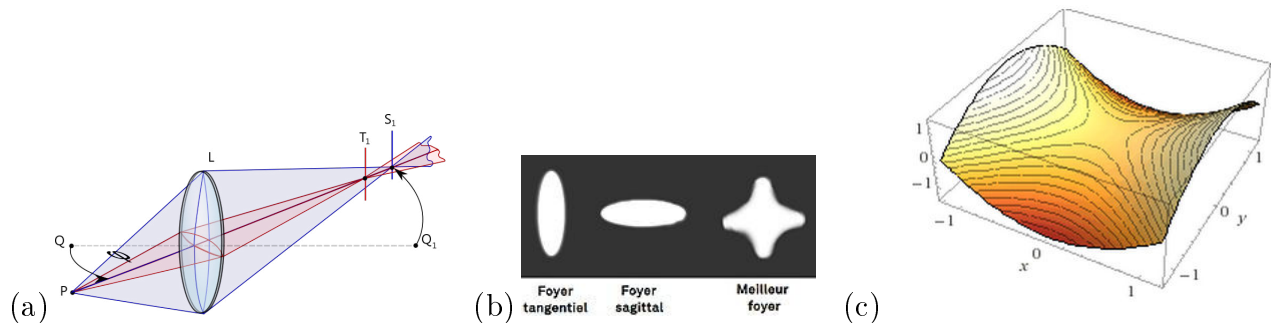


FIGURE 1.3.2 – (a) L'image d'un point au travers d'un système astigmatique est déformée car les rayons provenant de l'axe vertical et horizontal ne sont pas focalisés de la même manière. (b) Cela entraîne une tâche focale ayant une forme de croix car les rayons sont focalisés avec une orientation différente. (c) Cette séparation des foyers de focalisation, caractéristique de l'astigmatisme, correspond à une distortion du front d'onde accélérant celui-ci selon un axe et introduisant un retard selon l'autre axe, donnant ainsi une forme de selle de cheval au front d'onde

La coma

La coma ou aberration comatique provient d'une variation de la courbure du front d'onde le long d'un axe vertical ou horizontal (i.e il y a donc deux comas). Les comas sont induites par l'utilisation d'une lentille en dehors de son axe optique. Cette aberration se traduit par un désaxement du volume focal par l'apparition d'une queue (coma) telle une comète (Figure 1.3.3).

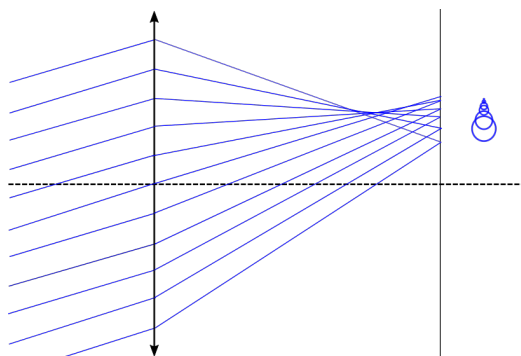


FIGURE 1.3.3 – La coma entraîne la création d’une traîne générant un étalement du point de focalisation

L’aberration sphérique

L’aberration sphérique est une aberration courante dans les dispositifs optiques. Celle-ci est intrinsèque aux optiques sphériques qui n’induisent pas la même courbure sur l’axe et hors axe. En effet, seule une optique parabolique induit une courbure identique en tout point. L’aberration sphérique peut aussi apparaître à l’interface avec un échantillon. Elle amène à un étalement axial de la tâche de focalisation car le centre du faisceau ne se focalise pas à la même distance que les bords (Figure 1.3.4).

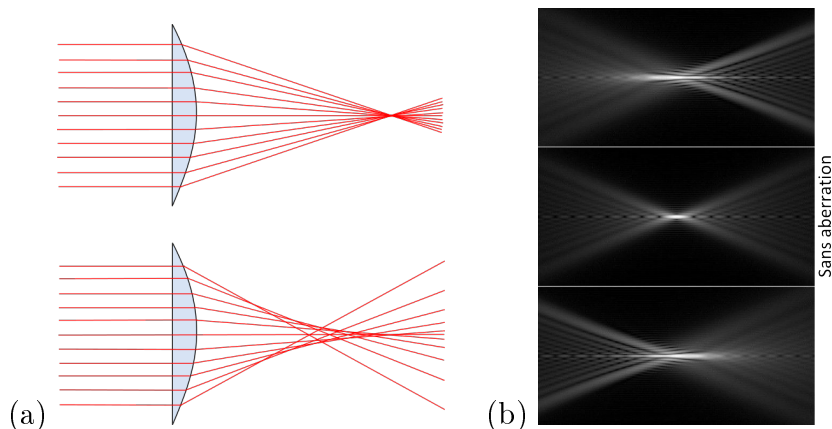


FIGURE 1.3.4 – (a) L’effet de l’aberration sphérique introduite par une optique va entraîner une focalisation prématurée de la portion de l’onde passant par la périphérie de l’optique. Cette aberration va alors causer un étalement axial du volume de focalisation comme on peut le voir dans la figure de droite. (b) L’ajout d’aberration sphérique allonge dans un sens ou l’autre le volume focal en comparaison d’un cas sans aberration (au centre)

1.3.1.3 Impact des aberrations optiques en imagerie de fluorescence à deux photons

Dans le cadre de l’imagerie multiphotonique, les aberrations optiques sont la source d’une forte dégradation de la qualité des images. Comme nous l’avons expliqué précédemment, les aberrations optiques ont pour effet de déformer localement le front d’onde, ce qui entraîne au moment de la focalisation de celui-ci une déformation ainsi qu’un élargissement de la PSF.

Précédemment, nous avons défini la *PSF* non linéaire dans des conditions dites parfaites, c'est-à-dire dans un environnement libre de toutes formes de perturbations, comme étant :

$$PSF_n(v) = \left[\int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp(ik\psi) \rho d\rho \right]^{2n} \quad (1.3.1)$$

Or, dans le cas où le front d'onde est soumis à des aberrations optiques, une phase supplémentaire ψ_{ab} vient perturber la phase initiale de front d'onde. Ainsi, il est possible de définir l'expression de la nouvelle *PSF* :

$$PSF_n(v) = \left[\int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \exp(ik\psi^*) \rho d\rho \right]^{2n} \quad (1.3.2)$$

où $\psi^* = \psi + \psi_{ab}$ la nouvelle phase du front d'onde soumis à des aberrations optiques.

Enfin, en présence d'aberrations optiques, la *PSF* est déformée entraînant une diminution de la résolution radiale et axiale mais pas seulement. En effet, les déformations induites vont grandement diminuer la densité locale de photons causant ainsi une forte chute de la probabilité de génération de photons de fluorescence par excitation multiphotonique.

1.3.2 Les différents outils de l'optique adaptative

L'optique adaptative est une technique complexe nécessitant l'utilisation de nombreux systèmes permettant la mesure de front d'onde et la correction des aberrations optiques sur celui-ci. Nous aborderons rapidement les différents systèmes de mesure de front d'onde. Puis, nous ferons un point plus détaillé sur les différentes technologies de correcteur de front d'onde en traitant les différents types de miroirs déformables mais également les modulateurs spatiaux de lumière, de manière à définir leur domaine optimal d'utilisation ainsi que la technologie la plus adaptée à notre problématique.

1.3.2.1 Les détecteurs de front d'onde

Les détecteurs de front d'onde sont des éléments centraux en optique adaptative conventionnelle. Ils effectuent des mesures directes du front d'onde, donnant l'opportunité de connaître l'état de celui-ci en temps réel et donc de permettre une correction dynamique.

Détecteur de front d'onde Shack-Hartmann

Le Shack-Hartmann est un système permettant la mesure précise d'un front d'onde lumineux par le biais d'une matrice de microlentilles focalisant sur un capteur CCD. Lorsqu'un front d'onde plan arrive sur le détecteur, les microlentilles vont focaliser la lumière sur le capteur créant des points de focalisation lumineux dont les positions définiront la référence du système. Si le front d'onde incident est soumis à des aberrations optiques, alors la position des spots lumineux sur le capteur sera modifiée (Figure 1.3.5).

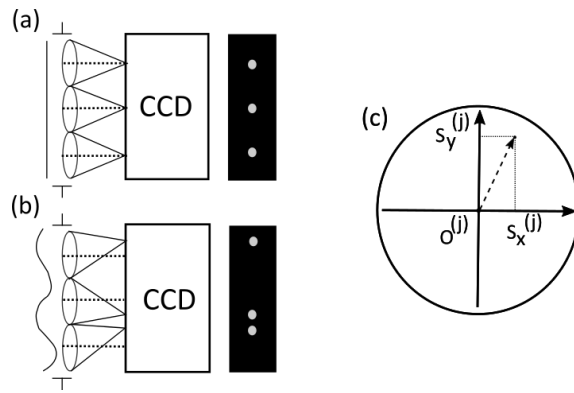


FIGURE 1.3.5 – Illustration du principe de fonctionnement d'un détecteur de front d'onde Shack-Hartmann. (a) La focalisation d'un front d'onde plan par la matrice de microlentilles sur le capteur CCD permet d'enregistrer la position de référence pour chaque lentille. (b) La focalisation d'un front d'onde déformé entraîne le déplacement des point focaux sur le capteur. (c) Représentation d'un vecteur de déplacement $(s_x^{(j)}, s_y^{(j)})$ d'un point de référence $O^{(j)}$ correspondant à une lentille j

Il sera alors possible de définir la forme du front d'onde incident en calculant l'écart entre la position des points de focalisation lumineux et leur position de référence.

1.3.2.2 Les miroirs déformables

S'il y a bien un élément essentiel en optique adaptative, c'est le miroir déformable (DM). En effet, il a pour rôle le contrôle et la modification du front d'onde afin de compenser les aberrations optiques. Il existe plusieurs technologies de miroirs avec leurs avantages et leurs inconvénients, néanmoins le principe de fonctionnement reste le même.

Principe de fonctionnement

Un miroir déformable est constitué d'une surface réfléchissante (pouvant être une fine membrane ou alors des segments solides) contrôlée par des actionneurs lui permettant de modifier sa forme. Ces actionneurs peuvent être de différents types : piézoélectriques ou électrostatiques (Figure 1.3.6).

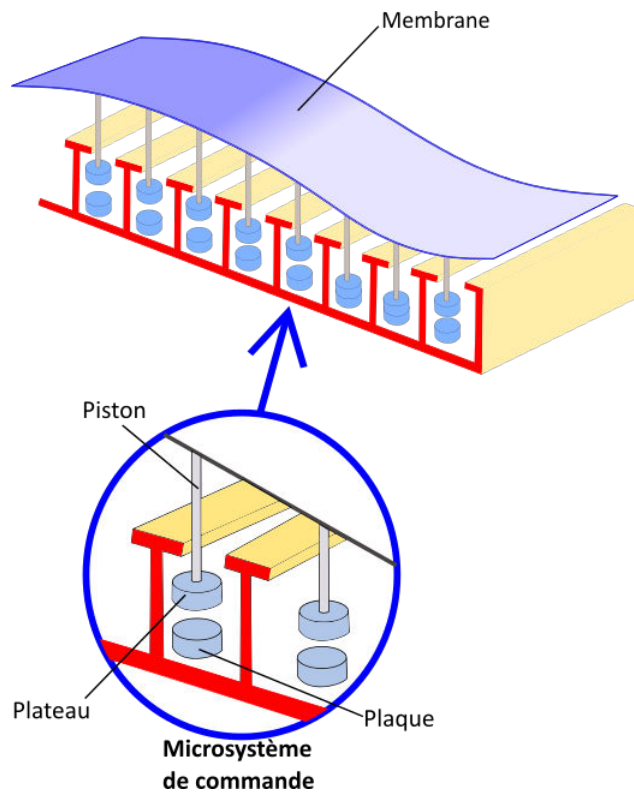


FIGURE 1.3.6 – Schéma descriptif de l'architecture d'un miroir déformable. Dans ce cas-ci, la membrane réfléchissante est déposée sur des pistons activés par le déplacement du plateau par rapport à la plaque (technologie d'actionneurs électrostatiques). Ainsi, en modifiant la distance entre plateau et plaque, il est possible de déformer la surface de la membrane

On peut définir un miroir déformable par différents paramètres comme son stroke (i.e l'amplitude maximale qu'un actionneur peut atteindre), son diamètre ou encore sa vitesse de réponse à une commande. Néanmoins, l'une des caractéristiques essentielles d'un miroir déformable est son nombre d'actionneurs. Effectivement, ce paramètre définit la capacité d'échantillonnage du miroir et donc la complexité des formes que l'on pourra appliquer sur le front d'onde.

Miroir membranaire

Les miroirs membranaires sont constitués d'une fine membrane réfléchissante que les actionneurs viendront déformer en poussant ou en tirant dessus. Le principal avantage de ce type de miroirs réside dans la continuité de la surface permettant de générer des variations continues. Néanmoins, cela introduit également le principal problème de cette technologie. En effet, la continuité de la surface du miroir fait que l'action des différents actionneurs influe sur leurs voisins et donc introduit des couplages difficiles à compenser.

Miroir segmenté

Les miroirs déformables segmentés sont des dispositifs composés d'une matrice de micro-miroirs appelés segments dont chacun est monté sur des actionneurs. Ceux-ci peuvent alors induire au segment des mouvements de piston (déplacements d'avant en arrière) ou alors de tip et de tilt (inclinaison selon l'axe x ou y). Le principal avantage de ces miroirs réside

dans le fait que chaque actionneur et donc chaque segment peut se déplacer indépendamment des éléments. Cela rend les systèmes segmentés totalement libres de tout couplage, contrairement aux miroirs membranaires. De plus, la liberté de déplacement que permettent les actionneurs ainsi que l'absence de limitation due à des couplages font que le stroke de ce type de miroirs est généralement plus grand que les miroirs composés d'une membrane. C'est ainsi que la combinaison d'un grand stroke et de la possibilité d'effectuer des mouvements de tip et de tilt avec les segments rendent la technologie des miroirs déformables segmentés très pratique pour la correction de déformations de basses et d'assez hautes fréquences spatiales. Néanmoins, les discontinuités de surface introduites par les bords des différents segments entraînent l'apparition de phénomènes de diffraction induisant principalement une perte d'énergie.

1.3.2.3 Les modulateurs spatiaux de lumière à cristaux liquides

Hormis la technologie des miroirs déformables, il existe d'autres systèmes permettant la correction de front d'onde : il s'agit des modulateurs spatiaux de lumière à cristaux liquides aussi couramment appelés SLM (pour Spatial Light Modulator). Là où les miroirs déformables vont intervenir sur la phase du front d'onde en changeant leur surface pour ainsi modifier directement la longueur du chemin optique parcouru par l'onde, les SLM vont quant à eux intervenir sur la phase en modifiant les propriétés optiques de leur surface.

La plupart du temps, les modulateurs spatiaux de lumière à cristaux liquides sont composés d'une fine couche de cristaux liquides biréfringents prise en sandwich entre deux lames de verres. Ainsi, en appliquant un champ électrique, ces cristaux auront tendance à orienter leur grand axe de manière à s'aligner avec le champ. Cette modification de l'organisation de la matrice entraînera alors un changement de l'indice de réfraction. L'écran à cristaux liquides composant la surface du SLM sera typiquement divisé en pixels permettant une modification locale de l'indice de réfraction de manière totalement découplée des autres pixels de l'écran. Néanmoins, le fait que le système soit basé sur l'utilisation de cristaux liquides biréfringents impose la condition que l'onde incidente soit polarisée selon une certaine orientation pour que le SLM puisse être utilisé de manière optimale.

Le réel avantage que possèdent les SLM par rapport aux autres technologies telles que les miroirs déformables est le fait que la taille de l'écran de cristaux liquides permette d'avoir à disposition une zone active très grande dont le nombre de pixels peut aller jusqu'à 1920 x 1080 pour les dernières générations de SLM haute définition. Ce grand nombre de pixels donne ainsi la capacité d'effectuer des modifications du front d'onde extrêmement fines pouvant atteindre de très hautes fréquences spatiales. Néanmoins, de nombreuses contraintes viennent ternir ce portrait. Pour commencer, le fait de devoir utiliser un certain état de polarisation pour être pleinement efficace peut poser souci. De plus, les cristaux liquides n'étant pas achromatiques, il est également nécessaire de calibrer le dispositif pour chaque longueur d'onde utilisée. Pour finir, un autre problème lié à cette technologie réside dans la faible fréquence de rafraîchissement de ces systèmes. En effet, les cristaux liquides composant la surface du SLM ont besoin d'un certain temps pour prendre une position. Ainsi, la fréquence de rafraîchissement sera alors souvent (pour les modèles standards) limitée à 60 Hz. Cette faible vitesse d'activation représente une réelle limitation pour des applications nécessitant des modifications rapides du front d'onde comme en microscopie de balayage.

1.3.2.4 Quel système choisir ?

Maintenant que nous avons présenté les différentes technologies de modulateurs de front d'onde, il ne nous reste plus qu'à élucider la question suivante : quel système devons nous choisir pour notre projet ? Pour répondre à cela, il est essentiel de définir les caractéristiques techniques qui nous seront nécessaires.

Dans notre cas, un dispositif rapide est indispensable car comme nous l'avons mentionné dans la première partie de ce chapitre, le temps alloué à la phase d'optimisation doit être le plus court possible. Celui-ci devra également être capable de générer des déformations de fréquences spatiales suffisamment hautes pour générer les premiers modes de la base de Zernike avec des amplitudes assez importantes (amplitudes de déformation d'au moins 2 radians). Enfin, le dispositif étant amené à être utilisé pour différentes expériences, il faudra qu'il s'adapte selon la longueur d'onde employée. A cet effet, un système membranaire ou segmenté sera donc plus à même de répondre à tous ces critères, contrairement aux SLM souffrant de chromatisme et de manière générale étant trop lents pour nos applications.

1.3.3 Les différentes méthodes d'optique adaptative

L'histoire de l'optique adaptative commença avec la publication en 1953 d'Horace Babcock décrivant comment les turbulences atmosphériques pourraient être compensées pour les télescopes basés sur Terre [37]. Par la suite, l'idée fut reprise par l'armée américaine dans les années 1970 et par les astronomes dans les années 1980. Cependant pour des raisons technologiques, celle-ci fut laissée de côté jusqu'à la fin des années 1990 où l'intérêt pour cette technique revint au goût du jour. L'astronomie devint alors la première discipline à utiliser l'optique adaptative de manière courante. Son but est de compenser les perturbations introduites par l'atmosphère terrestre sur le front d'onde de manière à améliorer la qualité des images d'objets célestes.

Par la suite, l'optique adaptative fut utilisée pour améliorer les techniques d'imagerie du vivant, notamment en ophtalmologie où elle permet de corriger les aberrations introduites par l'oeil lors d'observation de la rétine [38, 39] mais également en microscopie [40, 41]. De nos jours, il est possible d'appliquer l'optique adaptative à toutes sortes de techniques d'imagerie allant de l'imagerie non linéaire [42, 43], en passant par la tomographie [44, 45, 46] ou encore la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) [47, 48].

1.3.3.1 La méthode historique : la méthode par mesure directe

Comme nous l'avons expliqué, l'optique adaptative a été initialement utilisée en astronomie où elle aide à corriger les aberrations introduites par les perturbations atmosphériques sur la lumière provenant des étoiles [49]. Ainsi, le principe de base de cette technique (dite méthode historique ou méthode directe) consiste à effectuer une mesure directe des déformations du front d'onde par le biais d'un détecteur de front d'onde.

Effectivement, en astronomie, le front d'onde provenant de l'espace est tellement étalé de part les distances gigantesques qu'il a parcouru, qu'il doit apparaître totalement plan dans l'angle solide d'observation des télescopes. De ce fait, connaissant la forme attendue du front d'onde (normalement plan), une mesure directe de celui-ci après son passage dans l'atmosphère donne directement les informations nécessaires sur les aberrations présentes dans la portion d'atmosphère traversée (Figure 1.3.7 (a)). Ainsi, grâce à cette mesure, il

est possible de définir une commande précise permettant au dispositif actif (i.e le miroir déformable) de venir corriger le front d'onde de manière à retrouver un front d'onde plan.

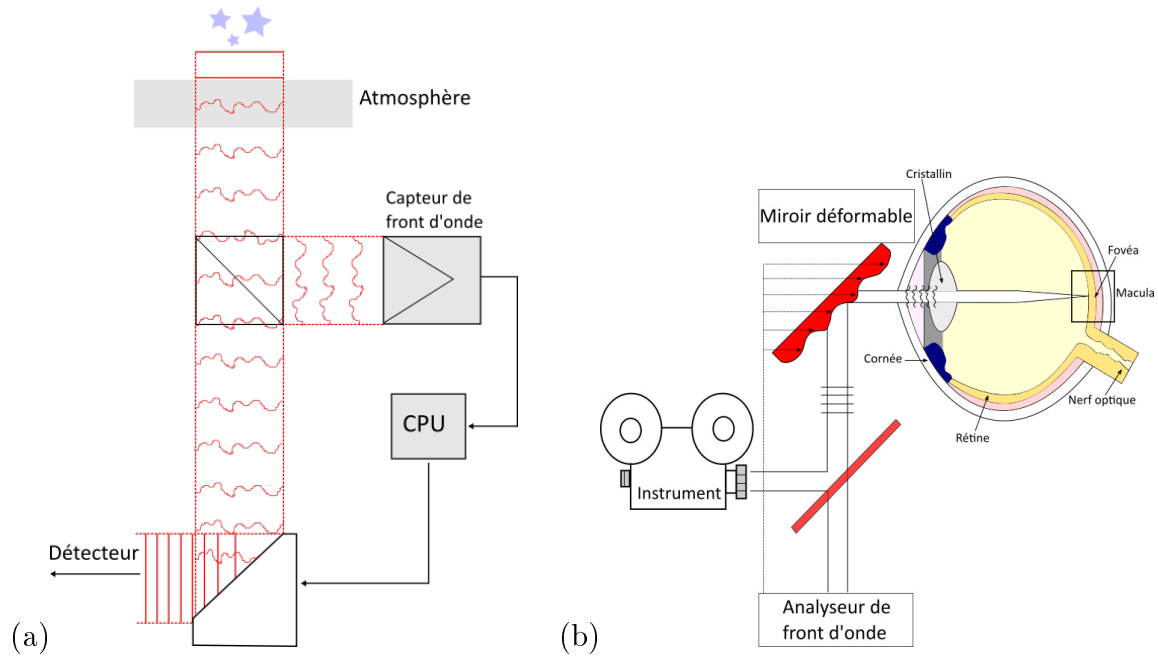


FIGURE 1.3.7 – Schéma de principe du fonctionnement de la méthode directe. (a) En astronomie, les aberrations introduites par l'atmosphère sont mesurées en temps réel par un détecteur de front d'onde. (b) En ophtalmologie, les aberrations introduites par la cornée de l'oeil sont corrigées dans le but d'améliorer la qualité d'imagerie du fond de l'oeil

La méthode directe est également employée en ophtalmologie [39] pour améliorer l'imagerie du fond de l'oeil. En effet, pour réaliser cela, un faisceau laser illumine l'intérieur du globe oculaire et la lumière réfléchiée est recueillie et mesurée sur une caméra. Or, au moment où le front d'onde traverse le cristallin et la cornée pour sortir de l'oeil, celui-ci se retrouve soumis à des aberrations introduites par ces structures, ce qui entraîne une dégradation des images (Figure 1.3.7 (b)). C'est ainsi qu'en effectuant une mesure de cette lumière par le biais d'un détecteur de front d'onde, il est possible de corriger ces aberrations à l'aide d'un miroir déformable.

Cette méthode est peut-être l'approche la plus efficace qu'il est possible d'utiliser pour corriger des aberrations. Néanmoins, celle-ci repose sur une condition essentielle : la mesure directe du front d'onde. En effet, dans les deux domaines précédemment décrits, les aberrations interviennent sur le signal mesuré et il est donc aisé de les corriger en mesurant celles-ci sachant que théoriquement le front d'onde idéal est plan. Or, dans le cas où les aberrations ne sont pas introduites sur le signal mesuré mais sur le signal excitateur, il est difficile de venir faire une mesure directe du front d'onde. La microscopie est l'un de ces cas où les aberrations sont introduites par l'échantillon sur le laser illuminateur qui excite les fluorophores. Il est donc impossible de venir mesurer le front d'onde à l'intérieur de l'échantillon et de ce fait d'utiliser la méthode par mesure directe. Pour conclure, il sera nécessaire de trouver une approche indirecte pour quantifier les aberrations impactant notre système.

1.3.3.2 La méthode par mesure indirecte

La difficulté d'appliquer la méthode directe en microscopie a permis l'apparition de nombreuses méthodes dites indirectes permettant de quantifier les aberrations présentes dans l'échantillon. Celles-ci seront détaillées dans la dernière partie de ce chapitre, néanmoins la plupart d'entre elles reposent sur les mêmes fondements.

Pour rappel, en microscopie de fluorescence, le signal est intrinsèquement lié à la qualité de l'excitation c'est-à-dire à la qualité de focalisation du faisceau laser que l'on envoie dans l'échantillon. De ce fait, comme nous l'avons expliqué précédemment, les aberrations introduites par l'échantillon sur le laser dégradent le front d'onde entraînant une déformation du volume focal diminuant par conséquent l'intensité du signal de fluorescence généré. Ainsi, en se servant de la fluorescence comme indicateur, il est possible d'avoir une information sur la qualité de notre focalisation et donc des aberrations présentes dans notre système.

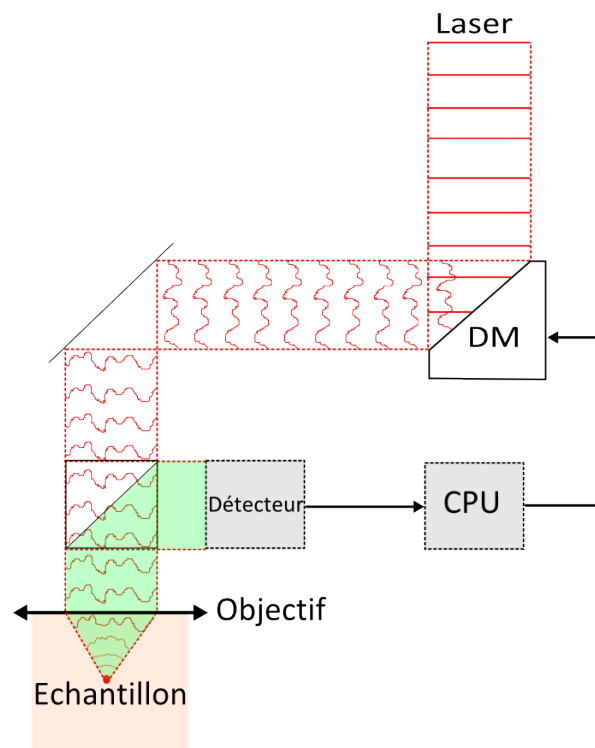


FIGURE 1.3.8 – Schéma de principe du fonctionnement de la méthode indirecte en microscopie. Les modifications du front d'onde combinées à la mesure de la métrique permettent d'obtenir des renseignements sur les aberrations dans l'échantillon

C'est ainsi que fonctionnent la plupart des méthodes utilisées en microscopie. De manière plus générale, celles-ci se servent de métriques pouvant changer d'une technique à l'autre et qui peuvent être des signaux physiques [47] ou alors des grandeurs issues d'analyse d'images [50]. En modifiant le front d'onde "manuellement" à l'aide du correcteur de front d'onde présent dans le système, il est donc possible de quantifier l'impact de ces modifications directement en mesurant la métrique (Figure 1.3.8). Ainsi, une évolution positive de la métrique traduira une amélioration de la qualité de focalisation correspondant à la réduction des aberrations optiques présentes dans le système.

1.4 L'optique adaptative pour la microscopie

C'est en 1998 que Booth et al [51] proposèrent pour la première fois l'idée de compenser les aberrations optiques venant dégrader la qualité optique en microscopie confocale. Ces aberrations sont notamment introduites par un mauvais ajustement entre l'indice optique du milieu de montage et celui de l'échantillon. Pour réaliser cela, Booth et al proposent de s'appuyer sur l'optique adaptative utilisée en astronomie pour corriger les perturbations introduites par les turbulences atmosphériques sur le front d'onde lumineux provenant d'objets célestes. Ainsi, en caractérisant les aberrations introduites sur le front d'onde lorsqu'un objectif à huile est utilisé pour imager dans un échantillon composé principalement d'eau (par le biais d'un détecteur de front d'onde), il serait possible de compenser ces perturbations par l'emploi d'un modulateur spatial de lumière. C'est avec cette première pierre que l'optique adaptative fit son entrée dans le monde de la microscopie. Depuis, de nombreuses techniques visant à quantifier et compenser les aberrations optiques introduites par l'échantillon ont vu le jour. Néanmoins, même si leur objectif est identique, les approches proposées sont clairement différentes.

Nous allons donc dans cette partie décrire ces différentes techniques afin de définir celle qui serait la plus en adéquation avec notre problématique et ainsi avoir une base de départ solide qui pourra être adaptée à nos contraintes expérimentales. Nous allons notamment aborder les principales approches existantes au moment où ce projet a démarré, soit les publications parues avant 2013-2014. Cependant, le domaine ayant fortement évolué durant la période de cette thèse, les travaux publiés après 2013-2014 jusqu'à aujourd'hui seront traités dans le dernier chapitre de ce manuscrit permettant de situer nos travaux dans le paysage de l'optique adaptative en microscopie et ainsi pouvoir tirer des conclusions sur les performances de notre approche.

Dans un premier temps, nous présenterons donc les méthodes basées sur l'optimisation de signaux et de paramètres issus d'analyse d'images, pour continuer avec la méthode par segmentation de pupille et nous terminerons par les méthodes dites multiplexées.

1.4.1 Méthode par optimisation modale

Cette méthode repose sur le concept visant à quantifier les aberrations optiques présentes dans le système par le biais de l'étude d'une grandeur appelée métrique liée aux capacités d'imagerie du système. De ce fait, en intervenant sur le front d'onde via le système actif, il sera possible d'observer l'effet de ces modifications en mesurant la métrique. Ainsi, il sera possible de corriger les aberrations optiques par le biais d'une routine tentant de maximiser la métrique d'intérêt. Pour réaliser cela, plusieurs approches sont possibles tant du point de vue algorithmique pour l'optimisation que du choix de la métrique ou tout autre élément donnant des informations sur l'état du système.

Afin de déterminer l'amplitude de la correction permettant de compenser les aberrations dans le système (via un miroir déformable ou un SLM), la plupart des méthodes indirectes se basent sur l'optimisation du signal de fluorescence détecté par le biais d'un algorithme d'optimisation [52, 53]. Ces algorithmes comprennent des algorithmes génétiques, des approches par hill-climbing, des recherches aléatoires ou encore des recherches aléatoires adaptatives [54]. Toutes ces méthodes fonctionnent sur la même base, se servant d'une séquence d'aberrations à appliquer via le système actif, mesurant l'impact de ces modifications sur la fluorescence

détectée. Ainsi, Booth [50] proposa une approche d'optimisation basée sur un modèle de sphères compactées permettant d'arriver sous certaines conditions à la correction complète des aberrations optiques d'un système avec seulement $N + 1$ mesures où N correspond au nombre de modes de déformations utilisés.

L'approche par hill-climbing fut d'ailleurs utilisée dans les travaux de Débarre et Beau-repaire [55, 56, 57] où les amplitudes optimales à appliquer ont été déterminées par l'optimisation d'une métrique (issue de l'analyse des images enregistrées) suite à l'application de perturbations d'amplitudes variables.

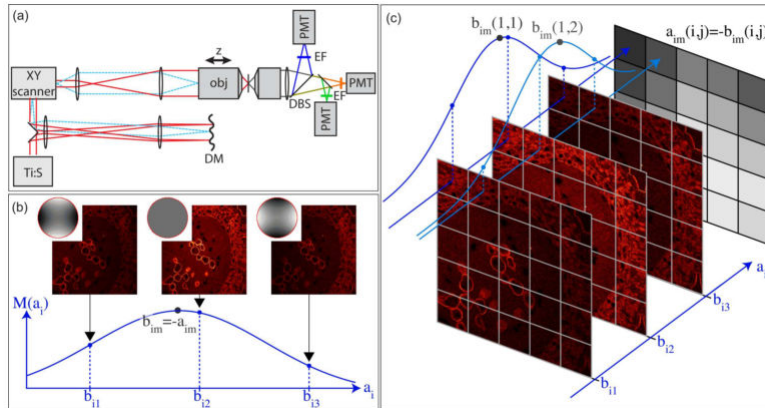


FIGURE 1.4.1 – La méthode d'optimisation par l'utilisation d'une approche hill-climbing consiste à rechercher des maximums locaux d'une métrique issue de l'analyse des images acquises. (b) En appliquant des modifications connues sur le front d'onde, il est possible de trouver l'amplitude optimale venant maximiser notre métrique. (c) Cette approche globale peut être également appliquée à des sous-régions du champ (définies par l'utilisateur). Cela donne accès à une correction locale des aberrations optiques dans le champ d'imagerie plus fine mais également à des informations sur les variations spatiales de celles-ci pouvant permettre la cartographie des aberrations dans l'échantillon [57]

Une autre approche est basée sur l'emploi d'étoiles guides (guide stars) comme objets de référence à optimiser [58, 59]. Cette méthode consiste à utiliser des petites structures présentes dans l'échantillon ou à insérer des petits objets comme par exemple des microbilles fluorescentes dans celui-ci. Ainsi, il est possible de venir optimiser le signal provenant de ces objets permettant d'avoir des sources identiques réparties correctement dans l'échantillon.

1.4.2 Méthode par segmentation de pupille

Cette approche repose sur l'idée qu'il serait possible de corriger les aberrations optiques non pas en modifiant de manière globale le front d'onde, mais en venant corriger localement le trajet de la lumière dans l'échantillon. Pour réaliser cela, Ji et al [60] proposèrent une approche basée sur la segmentation de la pupille arrière en sous-pupilles conjuguées avec des sous-régions définies sur un SLM. Ainsi, la modification de la phase de chacune de ces sous-régions entraîne une modification locale du trajet optique emprunté par lumière passant par la sous-pupille.

Pour retrouver la correction à appliquer, la procédure repose sur l’ajustement d’une image de référence avec des images obtenues uniquement avec la lumière passant par une sous-pupille. La référence correspond alors à une image réalisée avec un remplissage complet de la pupille arrière de l’objectif. Etant donné que la lumière passant par une sous-pupille parcourt un chemin différent des autres sous-pupilles, l’image faite avec chaque zone sera légèrement différente de la référence. Cela est dû à la différence de chemin optique mais également aux aberrations optiques rencontrées. De ce fait, il est possible de définir une phase à appliquer sur chaque sous-région du SLM pour faire en sorte que l’image obtenue soit parfaitement superposée avec l’image de référence. Ainsi, en répétant ce procédé pour chaque sous-pupille, la totalité de la lumière sera focalisée au même endroit.

Une fois la correction spatiale réalisée, la correction temporelle est effectuée par le biais d’un rephasage des différentes sous-pupilles. Cela consiste à déterminer une phase constante (i.e une phase offset) propre à chaque sous-pupille de manière à maximiser le signal. En réalisant ainsi ces deux étapes, Ji et al montrèrent qu’il était possible de corriger les aberrations optiques présentes dans des échantillons biologiques.

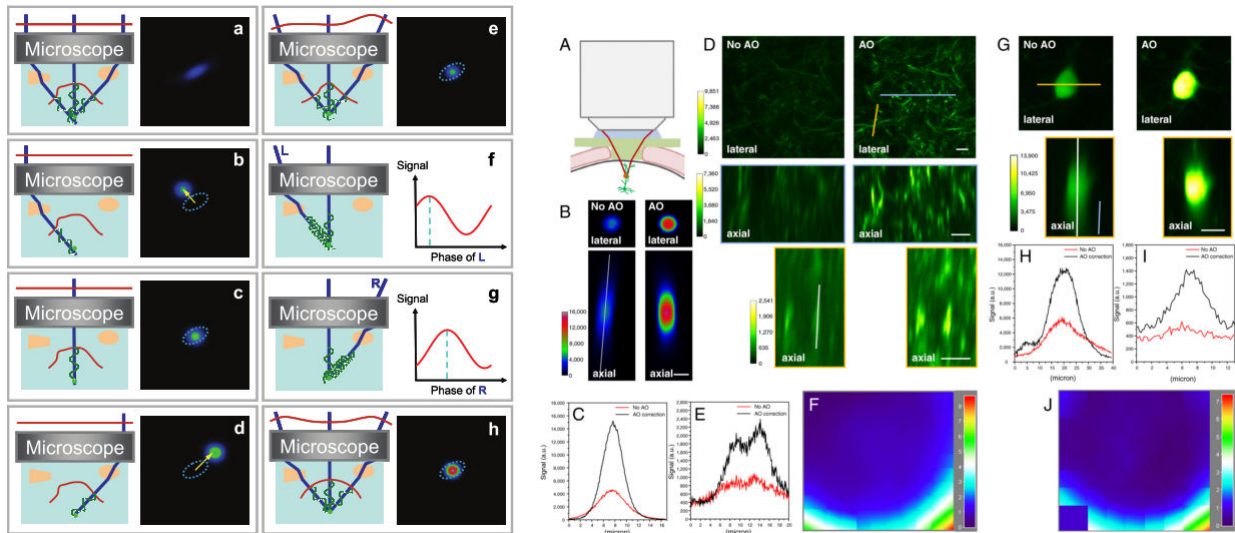


FIGURE 1.4.2 – [a-h] Représentation schématique de la méthode d’optimisation par segmentation de pupille. Elle consiste à effectuer un ajustement local du trajet optique de chaque sous-pupille, suivi du rephasage de chacune d’entre elles par ajout d’une phase ajustée individuellement. [A-J] Cette méthode a montré son efficacité dans le cadre de l’imagerie d’échantillons biologiques comme ici sur des images du cortex cérébral de la souris [60]

1.4.3 Méthode multiplexée

La méthode multiplexée proposée par Wang et al [61] est une approche permettant d’accélérer la mesure et la correction des aberrations optiques présentes dans les échantillons biologiques. En effet, que ce soit via la méthode d’optimisation modale ou via la méthode par segmentation de pupille, un grand nombre d’images est nécessaire pour arriver à une correction totale du front d’onde. Le problème étant que la répétition d’acquisition d’une même zone peut entraîner un photoblanchiment réduisant le contraste du champ étudié. Pour cela, cette méthode repose sur une modulation fréquentielle des différentes sous-pupilles,

de manière à pouvoir obtenir les informations sur le parcours optique de la lumière passant par chacune d'elles simultanément par simple analyse de Fourier du signal mesuré.

A cet effet, une matrice de micro-miroirs (DMD) ou un miroir segmenté est conjugué avec le SLM de manière à obtenir une conjugaison entre chaque segment du premier système et les zones définissant les sous-pupilles sur le SLM. En faisant vibrer chaque segment à des fréquences différentes, il est alors possible de retrouver la contribution de chaque sous-pupille en effectuant une analyse fréquentielle du signal, dont l'amplitude de chaque harmonique du spectre correspondra à l'amplitude du signal généré par la lumière passant la sous-pupille. Ainsi, en modifiant la phase de chacune d'entre elles via le SLM, il sera possible de définir la phase corrigeant les aberrations optiques uniquement en maximisant l'amplitude de chaque harmonique du spectre fréquentiel.

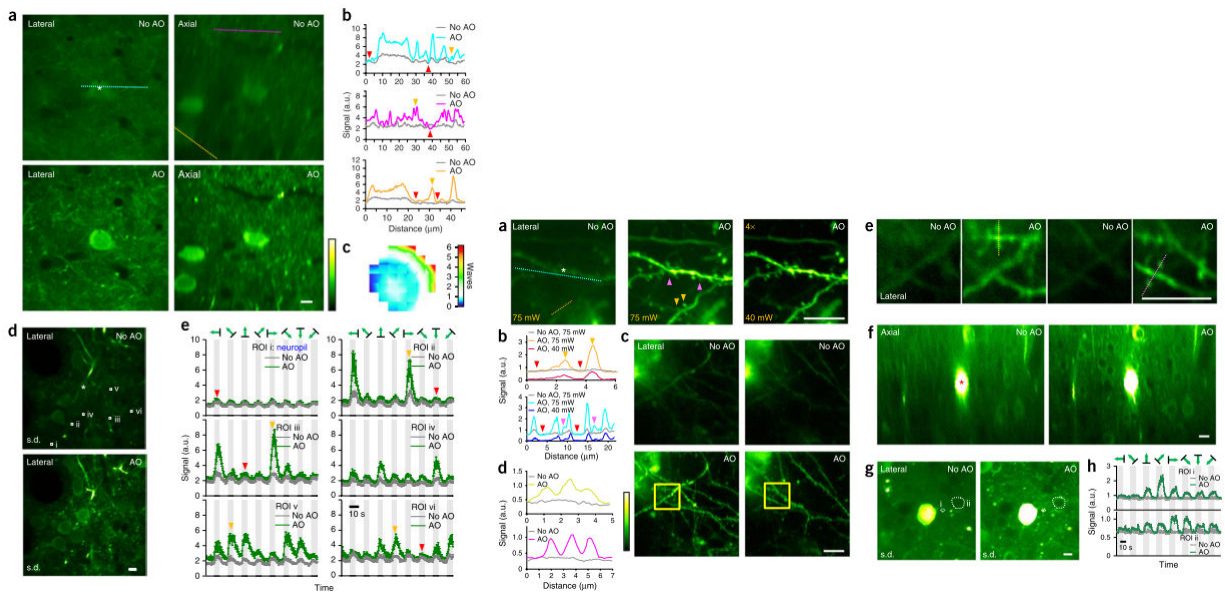


FIGURE 1.4.3 – La méthode d’optimisation multiplexée a montré une réelle efficacité en imagerie biologique permettant des corrections rapides accompagnées de gains en signal et en résolution (axiale et radiale) d’échantillons biologiques à de grandes profondeurs (480 μm). Dans ces exemples, il s’agit d’images *in vivo* des couches 2/3 (a-e) soit environ à 150 μm et 4/5 (a-g) soit environ à 450 μm dans le cortex visuel de la souris [61]

Ainsi grâce à cette approche multiplexée, Wang et al ont permis d’améliorer le temps nécessaire pour corriger les aberrations le rendant dix huit fois plus rapide que celui obtenu par la méthode par segmentation de pupille classique.

Bibliographie

- [1] Williamson P. D., Engel J., Jr. Anatomic classification of focal epilepsies. In : Engel J Jr, Pedley TA, editors. *Epilepsy : A Comprehensive Textbook*. 2nd ed. Philadelphia, PA : Wolters Kluwer Lippincott Williams & Wilkins, 2008. pp. 2465–2477
- [2] Tuving E. and Markowitsch H. J., Episodic and declarative memory : Role of the hippocampus, *Hippocampus*, 1998, Vol. 8, Issue 3, 198-204
- [3] Sheffield M. E. and Dombeck D. A., Calcium transient prevalence across the dendritic arbour predicts place field properties, *Nature*, 2015, Vol. 517, Issue 7533, 200-4
- [4] Danielson N. B., Zaremba J. D., Kaifosh P., Bowler J., Ladow M. and Losonczy A., Sublayer-Specific Coding Dynamics during Spatial Navigation and Learning in Hippocampal Area CA1, *Neuron*, 2016, Vol. 91, 1-14
- [5] Villette V., Malvache A., Tressard T., Dupuy N. and Cossart R., Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information, *Neuron*, 2015, Vol. 88, Issue 2, 357-66
- [6] Andersen P., Organization of hippocampal neurons and their interconnections. In R.L. Isaacson & K.H. Pribram (Eds.) *The Hippocampus Vol. I*(pp. 155-175), New York, Plenum Press. (1975)
- [7] Hubbard J. I., Llinas R., Quastel D. M. J. (Williams Wilkins Co., 1969, 372p), *Electrophysiological Analysis of Synaptic Transmission, Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 1971, Vol. 30, Issue 5, p 473
- [8] Kandel E. R., Spencer W. A., *Electrophysiology of hippocampal neurons. II. Afterpotential and repetitive firing*, *Journal of Neurophysiology*, 1961, Vol. 24, 243–259
- [9] Stosiek C., Garaschuk O., Holthoff K. and Konnerth A., In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, Vol. 100, 7319-24
- [10] Dombeck D. A., Harvey C. D., Tian L., Looger L. L. and Tank D. W., Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation, *Nature Neuroscience*, 2010, Vol. 13, Issue 11, 1433-40
- [11] Guénard H., *Physiologie humaine 3ème édition*, Pradel, p. 485, 2001
- [12] Muldoon S. F., Villette V., Tressard T., Malvache A., Reichinnek S., Bartolomei F. and Cossart R., GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice, *Brain*, 2015, Vol. 138, 2875-2890
- [13] Murphy D. B., *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging*, Wiley-Liss ed, p180, (2001)

- [14] Shimomura O., Johnson F. H. and Saiga Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1962, Vol. 59, Issue 3, 223–239
- [15] Heim R., Cubitt A. B. and Tsien R. Y., Improved green fluorescence, *Nature*, 1995, Vol. 373, 663-664
- [16] Cossart R., Ikegaya Y. and Yuste R., Calcium imaging of cortical networks dynamics, *Cell Calcium*, 2005, Vol. 37, 451-7
- [17] Nakai J., Ohkura M. and Imoto K., A high signal-to-noise $\text{Ca}(2+)$ probe composed of a single green fluorescent protein, *Nature Biotechnology*, 2001, Vol. 19, Issue 2, 137-41
- [18] Chen T. W., Wardill T. J., Sun Y., Pulver S. R., Renninger S. L., Baohan A., Schreiter E. R., Kerr R. A., Orger M. B., Jayaraman V., Looger L. L., Svoboda K. and Kim D. S., Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity, *Nature*, 2013, Vol. 499, 295–300
- [19] Prof. M. Minsky, Memoir on inventing the confocal scanning microscope, *Scanning*, 1988, Vol. 10, Issue 4, 28–138
- [20] Horton N. G., Wang K., Kobat D., Clark C. G., Frank W. W., Schaffer C. B. and Xu C. In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain, *Nature photonics*, 2013, Vol. 7, 205-209
- [21] Göppert-Mayer M., Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen, *Annalen der Physik*, 1931, Vol. 401, Issue 3, 273–294
- [22] Kaiser W. and Garrett C. G. B., Two-Photon Excitation in $\text{CaF}_2 : \text{Eu}^{2+}$, *Physical Review Letters*, 1961, Vol. 7, 229
- [23] Peticolas W. L., Goldsborough J. P., and Rieckhoff K. E., Double Photon Excitation in Organic Crystals, *Physical Review Letters*, 1963, Vol. 10, 43
- [24] Sheppard C.J. and Kompfner R., Resonant scanning optical microscope, *Applied Optics*, 1978, Vol. 17, Issue 18, 2879-2882
- [25] Denk W., Strickler J. H. and Webb W. W., Two-photon laser scanning fluorescence microscopy, *Science*, 1990, Vol. 248, Issue 4951, 73-76
- [26] Franken P. A., Hill A. E., Peters C. W. and Weinreich G., Generation of optical harmonics, *Physical Review Letters*, 1961, Vol. 7, 118
- [27] Barad Y., Eisenberg H., Horowitz M. and Silberberg Y., Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation, *Applied Physics Letters*, 1997, Vol. 70, 922
- [28] Maker P. D. and Terhune R. W., Study of optical effects due to an induced polarization third order in electric field strength, *Physical Review*, 1966, Vol. 148, 990
- [29] Zumbusch A., Holtom G. R. and Xie X. S., Three-dimensional vibrational imaging by coherent anti-Stokes Raman scattering, *Physical Review Letters*, 1999, Vol. 82, Issue 20, 4142-4145
- [30] Wang H., Le T. T. and Cheng J., Label-free imaging of arterial cells and extracellular matrix using a multimodal CARS microscope, *Optics Communications*, 2008, Vol. 281, 1813-1822

- [31] Pfeffer C. P., Olsen B. R., Ganikhanov F. and Légaré F., Multimodal nonlinear optical imaging of collagen arrays, *Journal of Structural Biology*, 2008, Vol. 164, 140-145
- [32] Chen X., Grégoire S., Formanek F., Galey J. and Rigneault H., Quantitative 3D molecular cutaneous absorption in human skin using label free nonlinear microscopy, *Journal of Controlled Release*, 2015, Vol. 200, 78-86
- [33] Bertolotti J., van Putten E. G., Blum C., Lagendijk A., Vos W. L. and Mosk A. P., Non-invasive imaging through opaque scattering layers, *Nature*, 2012, Vol. 491, 232–234
- [34] de Aguiar H. B., Gigan S. and Brasselet S., Enhanced nonlinear imaging through scattering media using transmission matrix based wavefront shapping, arXiv :1603.07092 (2016)
- [35] Wan D. S., Rajadhyaksha M. and Webb R. H., Analysis of spherical aberrations of a water immersion objective : application to specimens with refractive index 1.33-1.40, *Journal of Microscopy*, 2000, Vol. 197, 274-284
- [36] Wilson T and Carlini A. R., The effect of aberrations on the axial response of confocal imaging systems, *Journal of Miscroscopy*, 1989, Vol. 154, 243-256
- [37] Babcock H. W., The Possibility of Compensating Astronomical Seeing, *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 1953, Vol. 65, No. 386, 229
- [38] Liang J., Williams D. R. and Miller D. T., Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics, *Journal of the Optical Society of America A*, 1997, Vol. 14, Issue 11, 2884-2892
- [39] Godara P., Dubis A. M., Roorda A., Duncan J. L. and Carroll J., Adaptive optics retinal imaging : emerging clinical applications, *Optometry & Vision Science*, 2010, Vol. 87, Issue 12, 930-941
- [40] Girkin J. M. and Marsh P. N., Use of adaptive optics for improved multiphoton imaging, *Proc. SPIE 5323, Multiphoton Microscopy in the Biomedical Sciences IV*, 260 (2004)
- [41] Biss D. P., Sumorok D., Burns A., Webb R. H., Zhou Y., Bifano T. G., Coté D., Veilleux I., Zamiri P. and Lin C. P., In vivo fluorescent imaging of the mouse retina usig adaptive optics, *Optics Letters*, 2007, Vol. 32, Issue 6, 659-661
- [42] Wright A. J., Poland S. P., Girkin J. M., Freudiger C. W., Evans C. L. and Xie X. S., Adaptive optics for enhanced signal in CARS microscopy, *Optics Express*, 2007, Vol. 15, Issue 26, 18209-18219
- [43] Olivier N., Débarre D. and Beaurepaire E., Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy, *Optics Letters*, 2009, Vol. 34, Issue 20, 3145-3147
- [44] Hermann B., Fernandez E. J., Unterhuber A. Sattmann H., Fercher A. F., Drexler W., Prieto P. M. and Artal P., Adaptive-optics ultrahigh-resolution optical coherence tomography, *Optics Letters*, 2004, Vol. 29, Issue 18, 2142-2144
- [45] Zawadzki R. J., Jones S. M., Olivier S. S., Zhao M., Bower B. A., Izatt J. A., Choi S., Laut S. and Werner J. S., Adaptive-optics optical coherence tomography for high-resolution and high-speed 3D retinal in vivo imaging, *Optics Express*, 2005, Vol. 13, Issue 21, 8532-8546

- [46] Jian Y., Xu J., Gradowski M. A., Bonora S., Zawadzki R. J. and Sarunic M. V., Wavefront sensorless adaptive optics optical coherence tomography for in vivo retinal imaging in mice, *Biomedical Optics Express*, 2014, Vol. 5, Issue 2, 547-559
- [47] Leroux C. E., Wang I., Derouard J. and Delon A., Adaptive optics for fluorescence correlation spectroscopy, *Optics Express*, 2011, Vol. 19, Issue 27, 26839- 26849
- [48] Leroux C. E., Grichine A., Wang I. and Delon A., Correction of cell-induced optical aberrations in a fluorescence fluctuation microscope, *Optics Letters*, 2013, Vol. 38, Issue 14, 2401-2403
- [49] Tyson R. K., *Principles of adaptive optics*, New York Academic Press (1998)
- [50] Booth M. J., Wave front sensor-less adaptive optics : a model-based approach using sphere packings, *Optics Express*, 2006, Vol. 14, Issue 4, 1339-1352
- [51] Booth M. J., Neil M. A. A. and Wilson T., Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media, *Journal of Microscopy*, 1998, Vol. 192, Issue 2, 90-98
- [52] Marsh P. N., Burns D., and Girkin J. M., Practical implementation of AO in multiphoton microscopy, *Optics Express*, 2003, Vol. 11, Issue 10, 1123-1130
- [53] O. Albert, L. Sherman, G. Mourou, T. B. Norris, and G. Vdovin, Smart microscope : an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy, *Optics Letters*, 2000, Vol. 25, Issue 1, 52-54
- [54] Wright A. J., Burns D., Patterson B. A., Poland S. P., Valentine G. J. and Girkin J. M., Exploration of the optimisation algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy, *Microscopy Research and Technique*, 2005, Vol. 67, Issue 1, 36-44
- [55] Débarre D., Botcherby E. J., Watanabe T., Srinivas S., Booth M. J. and Wilson T., Image-based adaptive optics for two-photon microscopy, *Optics Letters*, 2009, Vol. 34, Issue 16, 2495-2497
- [56] Facomprez A., Beaurepaire E. and Débarre D., Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics, *Optics Express*, 2012, Vol. 20, Issue 3, 2598-2612
- [57] Zeng J., Mahou P., Schanne-Klein M. C., Beaurepaire E. and Débarre D., 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues, *Biomedical Optics Express*, 2012, Vol. 3, Issue 8, 1898-1913
- [58] Aviles-Espinosa R., Andilla J., Porcar-Guezenec R., Olarte O. E., Nieto M., Levecq X., Artigas D. and Loza-Alvarez P., Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy, *Biomedical Optics Express*, 2011, Vol. 2, Issue 11, 3135-3149
- [59] Tao X., Norton A., Kissel M., Azucena O. and Kubby J., Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars, *Optics Letters*, 2013, Vol. 38, 5075-5078
- [60] Ji N., Milkie D. E. and Betzig E., Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues, *Nature Methods*, 2010, Vol. 7, 141 - 147

- [61] Wang C., Liu R., Milkie D. E., Sun W., Tan Z., Kerlin A., Chen T. W., Kim D. S. and Ji N., Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging in vivo, *Nature Methods*, 2014, Vol. 11, 1037–1040

Chapitre 2

Le dispositif expérimental

Durant ma thèse, une partie importante de mon travail (et peut-être celle où j'ai pris le plus de plaisir) a été l'élaboration et la construction du microscope équipé du système d'optique adaptative ainsi que la création des outils logiciels permettant le contrôle de celui-ci. Dans ce chapitre, nous mettrons en évidence tous les travaux menés à ce sujet.

Dans un premier temps, nous aborderons tous les aspects techniques liés à la conception du microscope et nous décrirons les choix que nous avons fait durant la construction de celui-ci. Par la suite, nous nous focaliserons sur la partie logicielle. Enfin, nous présenterons les différentes fonctions utilisées et nous détaillerons la structure complète du logiciel contrôlant à la fois l'acquisition des images et l'optique adaptative.

2.1 Le système optique

La première chose que j'ai eu à réaliser au début de ma thèse fût la conception du microscope. J'ai ainsi réfléchi au choix de chaque optique présente dans le système mais également fait en sorte d'optimiser l'espace que prenait celui-ci sur la table optique en réduisant au maximum le chemin parcouru par le laser d'excitation.

Dans cette partie, nous allons donc présenter tous les aspects liés à la conception du microscope. Nous débuterons par l'introduction de deux règles élémentaires lorsqu'on construit un système optique puis, nous aborderons les différents éléments indispensables composant le microscope. Pour finir, la description complète de l'instrument que j'ai développé sera réalisée.

2.1.1 Rappels sur les alignements optiques

Pour commencer, je souhaiterais faire un rappel sur quelques notions essentielles lorsqu'on souhaite construire un microscope. En effet, j'aimerais prendre le temps d'introduire le système afocal que l'on retrouve dans tous les montages optiques ainsi que la notion de conjugaison indispensable en microscopie et en optique adaptative.

2.1.1.1 Le système afocal

On appelle système afocal (ou télescope) un montage composé de deux lentilles permettant la propagation d'un faisceau collimaté avec la possibilité de modifier la taille de celui-ci. Prenons le cas de deux lentilles L1 et L2 (de focales f_1 et f_2) positionnées l'une après l'autre de manière à ce que le plan focal image de L1 soit confondu avec le plan focal objet de L2 (Figure 2.1.1). D'après les propriétés des lentilles minces convergentes, un faisceau parallèle arrivant de l'infini se focalisera sur le plan image de la lentille et tout rayon issu du plan focal objet d'une lentille sera focalisé ainsi à l'infini. Il est alors possible de modifier le diamètre d'un faisceau parallèle en garantissant la bonne collimation de celui-ci.

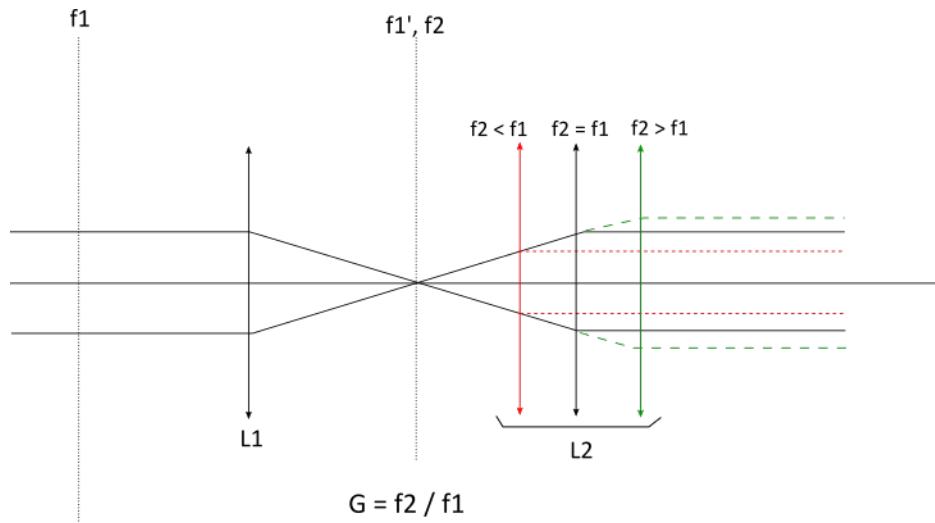


FIGURE 2.1.1 – Un télescope permet de modifier le diamètre d'un faisceau collimaté par le biais de son grandissement G

Il est donc possible d'ajuster le grandissement que le télescope applique sur le faisceau incident en choisissant correctement les focales des deux lentilles utilisées. On définit ainsi le grandissement G comme étant le rapport entre les focales des deux lentilles employées, soit :

$$G = \frac{f_2}{f_1} \quad (2.1.1)$$

De ce fait, en utilisant deux lentilles de focales identiques, le télescope conservera la taille initiale du faisceau. Au contraire, le choix d'une focale plus grande ou plus petite pour la seconde lentille rendra la taille de celui-ci respectivement plus grande ou plus petite.

Ainsi grâce à ce simple montage, il nous est possible d'adapter notre faisceau tout au long du microscope de manière à ajuster celui-ci aux différentes optiques. Enfin, les télescopes sont également très importants en imagerie car ils sont utilisés pour réaliser des conjugaisons optiques entre différents éléments du système.

2.1.1.2 La conjugaison optique

La conjugaison est une caractéristique optique essentielle en microscopie. En effet, on utilise celle-ci pour reproduire le front d'onde se trouvant dans le plan objet du système conjuguant sur son plan image en garantissant la conservation des propriétés optiques de celui-ci. Ainsi, en positionnant deux éléments optiques sur les plans d'imagerie du système, le front d'onde sur le premier élément sera transmis et reproduit à l'identique sur le second (Figure 2.1.2). Pour réaliser cela, on utilise des télescopes introduits entre chaque élément que l'on souhaite conjuguer.

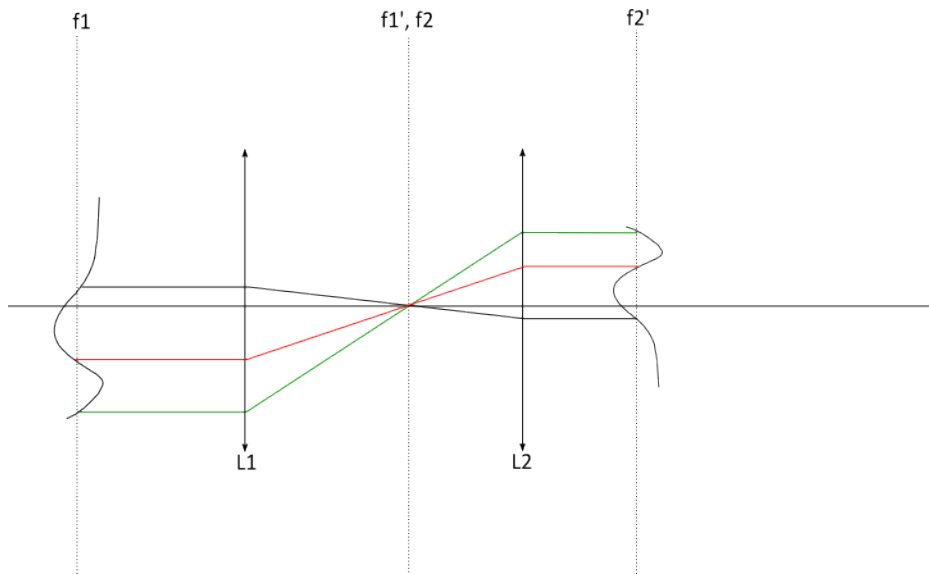


FIGURE 2.1.2 – Un front d’onde situé sur le plan focal objet (f_1) de la première lentille du télescope est reproduit dans le plan focal image (f_2'). Ainsi, si deux éléments optiques sont positionnés sur chacun de ces plans, le front d’onde sur ceux-ci sera identique quelque soit le grandissement du télescope

Les relations de conjugaison sont indispensables en microscopie à balayage. En effet, il est nécessaire d’avoir une conjugaison optique parfaite entre le miroir permettant le balayage et la pupille arrière de l’objectif. Dans le cas contraire, cela entraîne un mouvement de balayage du faisceau à l’arrière de l’objectif amenant à une perte d’intensité. De plus, une bonne conjugaison optique est essentielle en optique adaptative. Effectivement, il est de rigueur de toujours conjuguer le système actif (dans notre cas le miroir déformable) avec la pupille arrière de l’objectif. En effectuant cela, nous pouvons savoir exactement quelle forme a le front d’onde que nous envoyons dans l’échantillon car la pupille arrière de l’objectif est l’image de la surface du miroir.

2.1.2 Les cinq piliers du microscope

Un microscope est un instrument complexe pouvant contenir plusieurs dizaines d’optiques et composants variés. Seulement, certains d’entre eux sont indispensables au fonctionnement du dispositif tels les organes vitaux du corps humain. Ces éléments, souvent de très haute technologie, interviennent à toutes les étapes de fonctionnement du microscope et dans notre cas sont (dans l’ordre d’apparition dans le système) : le laser, le miroir déformable, les miroirs de balayage, l’objectif et le détecteur (Figure 2.1.3). Le dernier organe de ce système est à mon sens l’ordinateur et les programmes qui y sont installés. Celui-ci ayant pour rôle le contrôle de tous les autres éléments du système, il sera abordé séparément dans la seconde partie de ce chapitre.

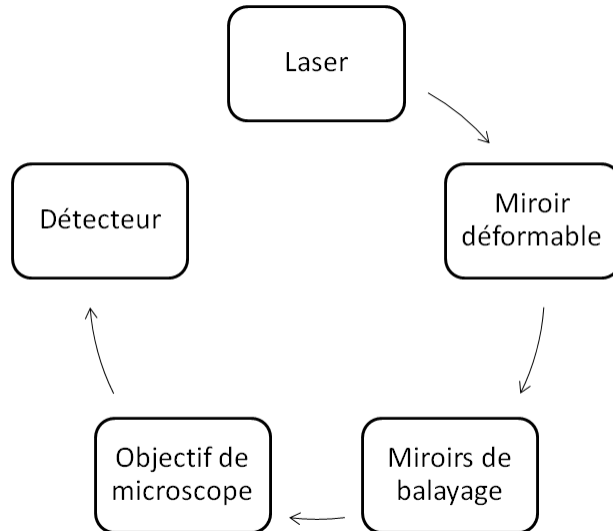


FIGURE 2.1.3 – Un microscope de balayage repose sur quatre instruments indispensables à son fonctionnement. L’utilisation de l’optique adaptative nécessite l’ajout d’un cinquième dispositif essentiel : le miroir déformable

Dans cette section, nous allons donc présenter ces différents éléments de manière à les décrire pleinement.

2.1.2.1 Le laser

La source de lumière est le point de départ de tout microscope et dans ce rôle, le laser est la source la plus adaptée à la microscopie de balayage. Il génère la lumière permettant de venir sonder la matière et exciter les différents marqueurs présents dans les échantillons.

Comme cela a été expliqué dans le premier chapitre, l’imagerie multiphotonique nécessite l’utilisation de lasers pulsés puissants pouvant émettre dans le proche infrarouge. Pour cela, nous utilisons une source laser femtoseconde Chameleon Ultra II du constructeur COHERENT. Elle fonctionne à partir d’un cristal Titane-Saphire (Ti :Sapphire) excité dans une cavité accordable donnant accès à une large bande de longueurs d’onde allant de 680 nm à 1080 nm avec de fortes puissances de sortie (Figure 2.1.4 (b)). La durée des impulsions émises est de 140 femtosecondes avec une fréquence de répétition de 80 MHz.

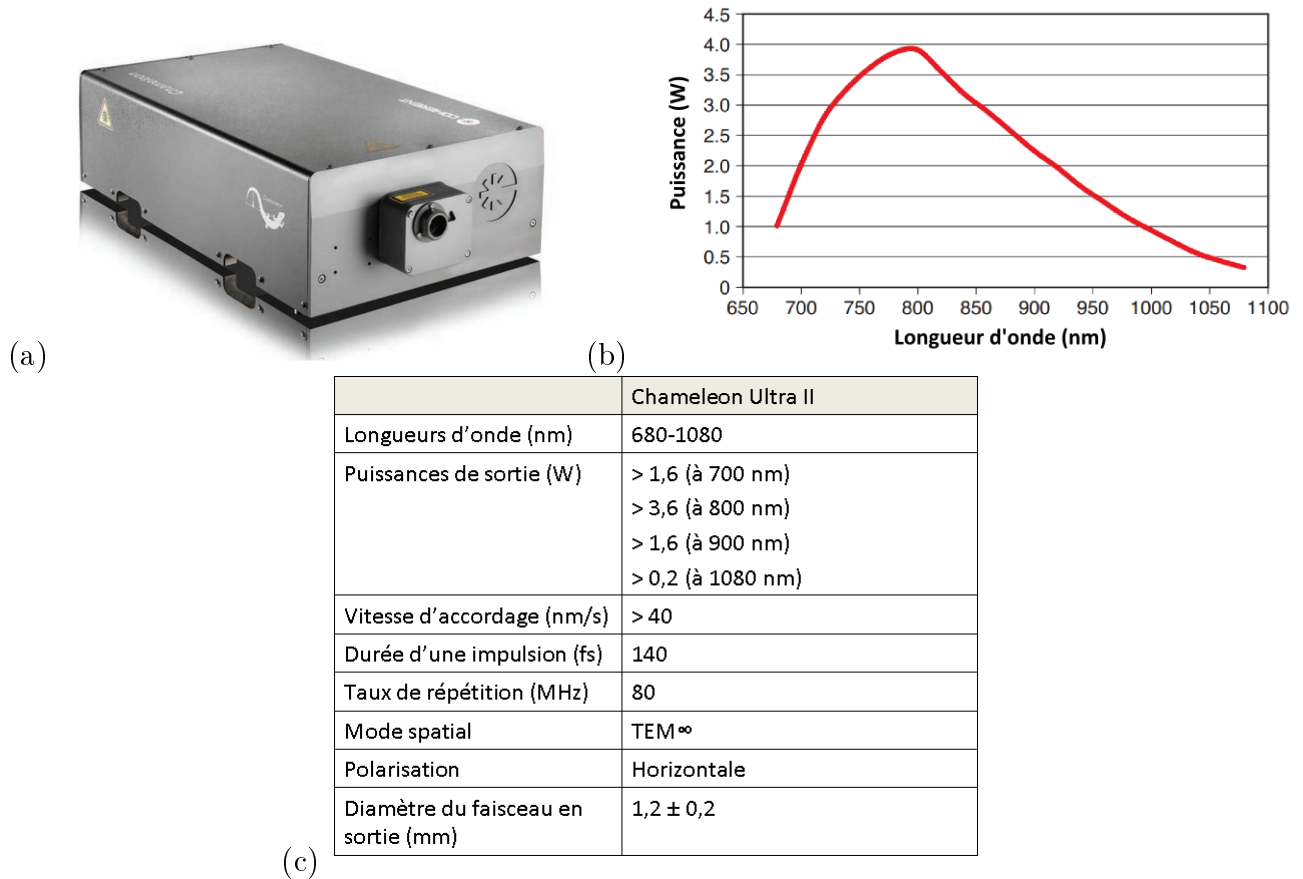


FIGURE 2.1.4 – (a) Laser accordable Chameleon Ultra II de COHERENT (b) La large bande de longueurs d'onde qu'il est capable de générer à de hautes puissances le rend très utile pour des applications en imagerie non linéaire et en spectroscopie. (c) Récapitulatif des différentes caractéristiques du modèle Ultra II

2.1.2.2 Le miroir déformable

Le miroir déformable présent dans notre montage est un élément peu courant en microscopie mais néanmoins indispensable lorsqu'on souhaite faire de l'optique adaptative. Le système que nous utilisons est un miroir déformable segmenté, modèle PTT111-5 du constructeur Iris AO. Celui-ci possède cent onze actuateurs électrostatiques répartis trois par trois, de manière à contrôler les trente-sept segments indépendants de forme hexagonale qui composent la surface du miroir en forme de nid d'abeille. Chaque segment mesure 606,2 μm entre chaque face parallèle portant ainsi la taille totale de ce modèle à 3,5 mm de diamètre. La présence de trois actuateurs par segment permet à celui-ci d'avoir trois degrés de liberté donnant accès à des mouvements de tip et tilt et à des mouvements de piston (ainsi que des combinaisons de ceux-ci). Ainsi, il lui est possible de réaliser des angles atteignant ± 5 mrad. Combiné au stroke maximal de 5 μm qu'accordent les actuateurs, cela donne au miroir PTT111-5 la possibilité de réaliser de nombreuses formes (dont les premiers ordres des polynômes de Zernike que l'on abordera dans le prochain chapitre) permettant de corriger le front d'onde. Vous trouverez dans la Figure 2.1.5 un récapitulatif de toutes les caractéristiques du miroir.

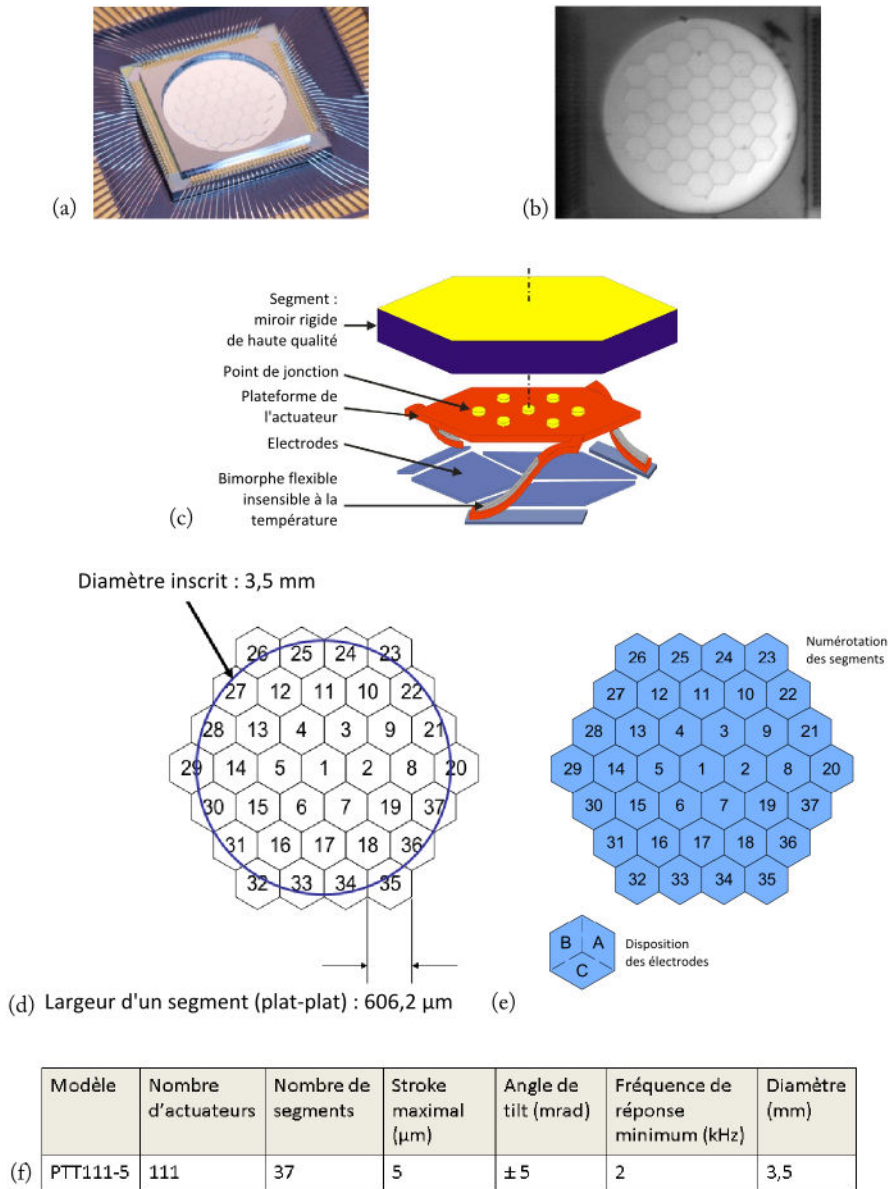


FIGURE 2.1.5 – Image commerciale (a) et prise en laboratoire (b) de la surface active du miroir. On peut noter que le matériau (couche d'or) composant la surface active ainsi que la monture adjacente est le même. Dans des conditions optimales d'utilisation, il faudra faire attention à ce que le faisceau ne sorte pas du cercle inscrit dans l'hexagone qui compose la surface segmentée de manière à ne pas avoir de lumière réfléchi non contrôlée. (c) Les segments sont des miroirs rigides de haute qualité fixés sur une plateforme elle-même reliée à la monture par le biais de bimorphes flexibles. Les mouvements du segment sont réalisés grâce à des électrodes générant des champs électriques venant déplacer le segment en trois endroits. (d)-(e) Le modèle PTT111-5 est composé de trente-sept segments disposés de manière à former un hexagone. La taille de chaque segment porte la surface active totale du miroir à un hexagone dont le cercle inscrit dans celui-ci fait 3,5 mm de diamètre. (f) Récapitulatif des différentes caractéristiques techniques du modèle PTT111-5

A la création de ce projet, n'ayant aucune approche méthodologique définie, le choix d'un miroir segmenté nous a semblé judicieux. En effet, grâce à la polyvalence de celui-ci, il est possible d'employer la méthode classique par optimisation modale ainsi que l'approche par segmentation de pupille en assignant chaque segment du miroir déformable à une sous-pupille. La seconde raison de ce choix est quant à elle plus subjective. Ce type de miroir étant déjà connu et employé dans l'équipe MOSAIC pour des applications en endoscopie, un savoir-faire sur le contrôle de cette technologie était déjà présent avant mon arrivée au sein de l'équipe.

2.1.2.3 Les miroirs galvanométriques

Les dispositifs venant après le miroir déformable sont les miroirs galvanométriques aussi appelés scanners. Ceux-ci permettent d'effectuer un balayage de l'échantillon avec le faisceau laser focalisé afin de construire une image.

Le système que nous utilisons est produit par la société Cambridge Technology. Le modèle 6200H est constitué de deux miroirs dont l'ouverture sur les deux axes est de 3 mm. Chacun est monté sur un moteur magnétique, c'est-à-dire que le rotor sur lequel est fixé le miroir est un aimant. L'avantage de cette technologie est qu'il est possible d'exécuter de grands angles de torsion très rapidement. Ainsi, chaque miroir peut effectuer des angles pouvant aller jusqu'à 20 degrés permettant de réaliser l'imagerie de grand champ indispensable pour nos expériences.

2.1.2.4 L'objectif

En microscopie, l'objectif est (avec le laser) l'élément le plus important dans le dispositif. Il permet de focaliser la lumière sur l'échantillon et en même temps de récupérer les photons de fluorescence générés pour les transmettre ensuite vers le détecteur. Dans notre montage expérimental, nous utilisons un Nikon Plan Fluorite Physiology Objective. Il s'agit d'un objectif à eau doté d'un grandissement de 16, d'une ouverture numérique de 0,8 et possédant une distance de travail de 3 mm. Le faible grandissement combiné à l'ouverture numérique élevée de celui-ci assure l'observation de champs suffisamment importants pour étudier le réseau tout en garantissant une bonne capacité de collecte des photons générés. De plus, la grande distance de travail de cet objectif est indispensable pour le projet. Ainsi, les 3 mm que celui-ci possède sont amplement suffisants pour aller imager les couches profondes de l'hippocampe.

Néanmoins, ces caractéristiques introduisent quelques contraintes. Hormis l'aspect financier (son prix d'achat étant élevé), la vraie problématique qu'impose cet objectif est la taille de la pupille arrière. En effet, pour avoir un faible grandissement et une forte ouverture numérique, une très grande pupille est nécessaire. Pour le Nikon 16x/0,8, la lentille arrière mesure 20 mm de diamètre. Seulement, pour ne pas perdre en résolution ni en efficacité d'excitation, le faisceau incident doit remplir totalement la pupille. Ainsi, en plus de gérer de nombreuses conjugaisons entre les différents éléments du système, il faudra également prendre en compte la taille du faisceau et adapter celui-ci en appliquant un grandissement très important juste après les miroirs galvanométriques.

2.1.2.5 Le détecteur

Le détecteur, dernier élément actif du microscope, est un photomultiplicateur (PMT) modèle H7422P-40 du constructeur HAMAMATSU. Celui-ci est composé d'un tube photomul-

tiplicateur doté d'une photocathode GaAsP permettant le comptage des photons incidents et dont la bande de détection est optimisée pour les longueurs d'onde allant de 300 nm à 720 nm avec un maximum d'efficacité entre 500 nm et 600 nm (Figure 2.1.6 - (b)). Ainsi, il est parfaitement adapté pour l'imagerie de fluorescence et tout particulièrement pour la GFP dont la longueur d'onde d'émission (504 nm) se situe dans la zone d'utilisation optimale de celui-ci.

Ce détecteur est équipé d'un système de refroidissement autonome composé d'un radiateur, d'un ventilateur et d'une sonde thermique. Ainsi, le système peut réguler la température du tube photomultiplicateur par le contrôle du courant de sortie de la sonde et un asservissement de fait par le ventilateur. Cela permet donc de réduire le bruit thermique émis par la photocathode et ainsi obtenir un ratio signal sur bruit élevé également à de faibles niveaux de lumière.

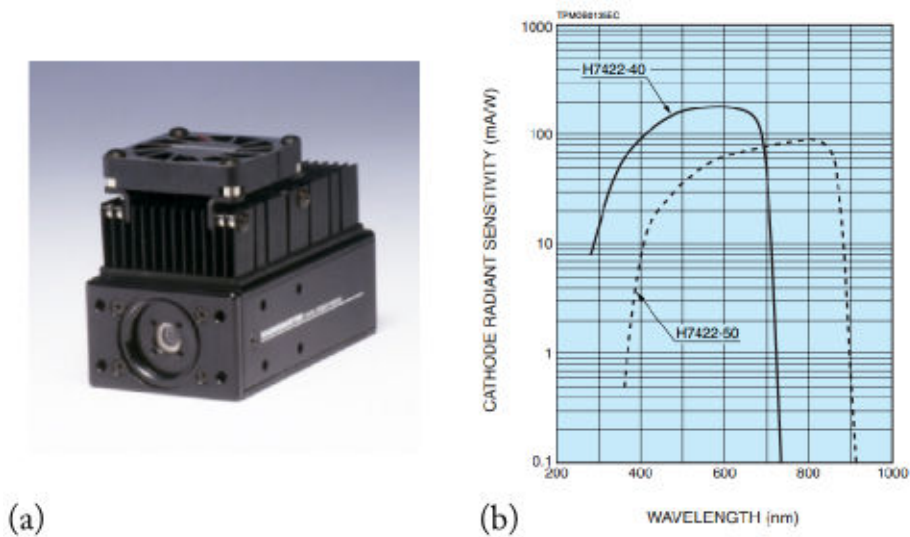


FIGURE 2.1.6 – (a) Modèle H7422P-40 de la gamme des photomultiplicateurs de chez HAMAMATSU. (b) La grande sensibilité aux longueurs d'onde autour de 600 nm le rend extrêmement utile pour des applications utilisant la GFP comme marqueur ou tout autre élément fluorescent dans cette même gamme de longueur d'onde

Source : <http://www.hamamatsu.com/resources/pdf/etd/m-h7422e.pdf>

2.1.3 Le microscope complet

Maintenant que nous avons présenté les principaux éléments présents dans le microscope, nous allons pouvoir nous pencher sur le montage dans sa globalité.

Pour décrire le système, nous allons le diviser en trois ensembles. Dans un premier temps, nous décrirons la partie avant le miroir déformable composée des optiques permettant le contrôle de la puissance ainsi que celles effectuant une première mise en forme du faisceau laser. Par la suite, nous aborderons la section du montage dédiée à l'optique adaptative et au balayage. Pour finir, nous traiterons l'ensemble consacré à l'excitation et à la détection de la fluorescence. Vous trouverez dans la Figure 2.1.7 le schéma complet du microscope avec les références de tous les éléments entrant dans sa composition, mais également un tableau récapitulatif des différentes focales utilisées.

Première partie : la mise en forme du faisceau

Avant d'envoyer le faisceau laser vers le miroir déformable, il est nécessaire d'adapter la taille de celui-ci pour qu'il remplisse la totalité du miroir. De plus, il est indispensable d'ajuster sa puissance de manière à ce que celle-ci corresponde à nos besoins expérimentaux.

Pour commencer, après la sortie du laser, une succession de deux paires d'optiques composées d'une lame demi-onde (modèle AHWP05M-980 de chez Thorlabs) et d'un cube polarisé diviseur de faisceau (modèle PBS252 pour le premier et PBS122 pour le second de chez Thorlabs) permettent de répartir et de contrôler la puissance du laser. En effet, le laser étant utilisé sur plusieurs dispositifs, le premier cube distribue le faisceau sur les deux lignes et l'utilisation de la lame demi-onde modifie alors la polarisation du faisceau ajustant ainsi la proportion de lumière allant sur les deux lignes. Un dispositif identique est présent dès le début de la ligne du faisceau allant sur le microscope de manière à cette fois-ci contrôler la puissance en divisant le faisceau pour qu'une partie soit envoyée vers l'objectif et l'autre bloquée par un panneau absorbant.

Ensuite, le faisceau passe par un télescope composé d'une lentille (L1) de focale de 50 mm (modèle LA1131-B de chez Thorlabs) et d'une autre (L2) de focale 100 mm (modèle LA1509-B de chez Thorlabs). Le grandissement de ce télescope étant de deux, son rôle sera d'augmenter la taille du faisceau laser de façon à ce que celui-ci soit suffisamment grand pour remplir la surface active du miroir déformable délimitée par un cercle inscrit de 3,5 mm de diamètre.

Pour terminer avec cette section du microscope, un shutter mécanique (modèle SH1/M de chez Thorlabs) contrôlé par ordinateur a été installé de manière à bloquer le faisceau laser lorsqu'on ne souhaite pas que celui-ci éclaire l'échantillon. Un dernier élément après ce shutter est présent, il s'agit d'un iris ajustable. Il permet d'adapter parfaitement la taille du laser à la surface du miroir déformable en bloquant légèrement la périphérie du faisceau de manière à éviter toute lumière réfléchie par la couronne du miroir.

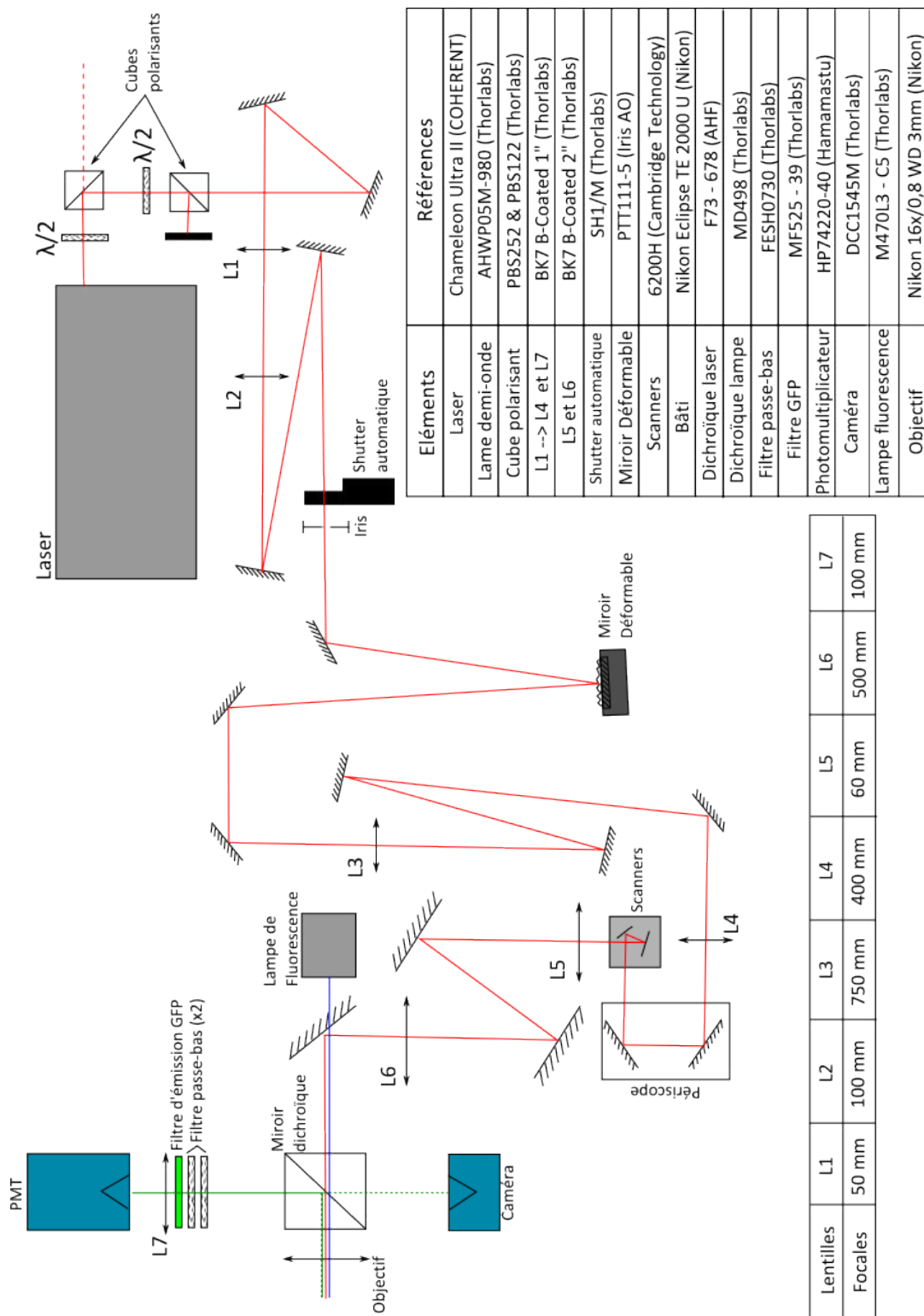


FIGURE 2.1.7 – Schéma optique du microscope avec récapitulatif complet de tous les éléments présents dans le système avec leur référence ainsi qu'un tableau résumant les différentes focales des lentilles utilisées

Seconde partie : conjugaison du miroir déformable avec le reste du système

La plus grosse partie du microscope est dédiée à effectuer la conjugaison du miroir déformable avec les autres éléments du système, c'est-à-dire les scanners et l'objectif du microscope. Effectivement, comme cela a été expliqué précédemment, il est nécessaire d'avoir une conjugaison parfaite entre le miroir déformable et la pupille arrière de l'objectif mais également entre les scanners et la pupille arrière. Or, pour rappel, l'ouverture de tous ces éléments est définie et limitée. Leurs diamètres respectifs devront donc être pris en considération :

- Miroir déformable : 3,5 mm
- Scanners : 3 mm (maximum)
- Objectif : 20 mm

Comme l'ouverture de l'objectif et du miroir déformable sont fixes, il ne reste plus que les scanners comme degré de liberté pour faciliter les conjugaisons de tous ces éléments. Un choix judicieux dans le grandissement des télescopes effectuant les conjugaisons est donc nécessaire. Pour rendre la dernière conjugaison (i.e entre les scanners et l'objectif) plus simple à mettre en place, la taille du faisceau laser sur les miroirs composant les scanners a été fixée 2 mm de manière à ne faire qu'un télescope avec un grandissement standard : dans notre cas, un grandissement de dix.

Le premier télescope est donc composé d'une paire de lentilles (L3 et L4) de focales 750 mm et 400 mm (modèles LA1978-B et LA1172-B de chez Thorlabs) de manière à obtenir un grandissement $G_2 = 400/750 = 0,53$ faisant passer le faisceau de 3,5 mm à 1,9 mm.

Pour réaliser une bonne conjugaison des miroirs galvanométriques, la méthode générale consiste à séparer les deux miroirs de manière à effectuer une conjugaison supplémentaire entre eux. Seulement, des problèmes de place m'ont contraint à conserver les miroirs couplés sur leur monture. Ainsi, pour limiter un trop fort déplacement sur un des deux axes, nous avons choisi comme plan de conjugaison le point se trouvant à égale distance entre les deux miroirs. Ceci permettra de répartir les translations du faisceau sur la pupille arrière le long des deux axes.

Le second télescope, formé de la lentille L5 et L6, sert à effectuer la conjugaison optique entre les scanners et la pupille arrière de l'objectif. Il rend également possible l'augmentation de la taille du faisceau pour que celui-ci remplisse complètement la pupille. A ce niveau-là, il y a cependant un autre inconvénient. Effectivement, nous devons être capables de réaliser de grands champs d'imagerie. Cela nécessite donc l'utilisation d'optiques (i.e miroirs et lentilles) de 2 pouces (soit environ 5 cm) contrairement aux optiques habituelles mesurant 1 pouce (soit environ 2,5 cm). Le problème est que les focales disponibles pour de telles lentilles ne sont pas aussi variées qu'avec des optiques classiques. Ainsi, pour effectuer cette conjugaison, nous avons choisi une première lentille (L5) avec une focale de 60 mm (modèle LA1401-B de chez Thorlabs) et une seconde (L6) avec une focale de 500 mm (modèle LA1380-B de chez Thorlabs).

A ce niveau-là, nous avons donc permis au faisceau issu du laser d'arriver jusqu'à l'objectif tout en respectant toutes les relations de conjugaison indispensables en imagerie et en optique adaptative.

Troisième partie : génération et détection des photons de fluorescence

Dans cette dernière partie, nous allons nous intéresser à la fin du parcours du faisceau excitateur ainsi qu'au chemin que prend la fluorescence pour être détectée. Tout cela se passe

à l'intérieur du bâti du microscope. Le modèle utilisé est un Nikon Eclipse TE2000 U (Nikon) possédant quatre sorties : une pour une vision directe à l'oeil et trois autres où l'on peut y fixer des détecteurs. Deux d'entre elles (la sortie droite et gauche) sont d'ailleurs employées : l'une pour le bras de détection où est installé le détecteur (à gauche) et l'autre pour un point de mesure de contrôle via une caméra (modèle DCC1545/M de chez Thorlabs) (à droite). Mais, le réel avantage de ce bâti est qu'il possède deux entrées chacune équipée de sa propre roue à filtre. Cela nous laisse la possibilité de nous servir de l'entrée supérieure pour le passage du faisceau laser et de l'entrée inférieure pour la lumière issue de la lampe de fluorescence. Cette lampe (modèle M470L3-C5 de chez Thorlabs) est une source monochromatique émettant à la longueur d'onde de 470 nm. Elle permet l'excitation à un photon des molécules fluorescentes présentes dans nos échantillons, rendant possible l'observation directe du champ d'imagerie via la caméra ou la binoculaire.

Seulement, que ce soit pour le faisceau laser ou pour la lampe de fluorescence, il est nécessaire d'envoyer les faisceaux d'excitation tout en pouvant transmettre la fluorescence détectée. Pour cela, l'utilisation de miroirs dichroïques est obligatoire. Il s'agit de filtres spéciaux dont la transmittance et la réflectance sont dépendantes de la longueur d'onde. Ainsi, il est possible de sélectionner un miroir dichroïque permettant la transmission de la longueur d'onde d'émission des marqueurs présents dans l'échantillon et la réflexion de la longueur d'onde de la source d'excitation.

Dans notre cas, nous nous servons de deux miroirs dichroïques. Le premier (modèle F73-678 de chez AHF) est un filtre passe-bas dont la longueur d'onde de coupure se trouve à 678 nm. Cela permet donc la réflexion du faisceau laser de longueur d'onde 920 nm et transmet la fluorescence provenant des marqueurs soit une onde à 550 nm. Le second, utilisé avec la lampe de fluorescence, est un filtre passe-bande (modèle MD498 de chez Thorlabs) transmettant les photons de fluorescence mais cette fois-ci en réfléchissant les longueurs d'onde inférieures à 498 nm.

Maintenant que nous pouvons exciter l'échantillon et collecter les photons de fluorescence, une dernière étape reste à faire avant d'arriver au détecteur. Il s'agit du bras de détection où quelques filtrages sont appliqués de manière à débarrasser le signal de fluorescence de toute source de bruit liée à une très faible proportion de faisceau excitateur transmise par le miroir dichroïque. Pour réaliser cela, deux filtres passe-bande (modèle FESH0730 de chez Thorlabs) dont les longueurs d'onde de coupure sont environ de 400 nm pour la basse et de 730 nm pour la haute ont été installés. Ainsi, tous les photons à 920 nm provenant de la source laser sont sûrs d'être arrêtés et ne risquent pas de venir polluer le détecteur. En plus de ces deux filtres, un troisième est présent. Il s'agit d'un filtre de fluorescence pour la GFP (modèle MF525-39 de chez Thorlabs). Il effectue une dernière sélection des photons en ne gardant que ceux dont la longueur d'onde se trouve autour de 529 nm. Dans la Figure 2.1.8 sont répertoriés tous les spectres des différents filtres et miroirs dichroïques utilisés dans le microscope.

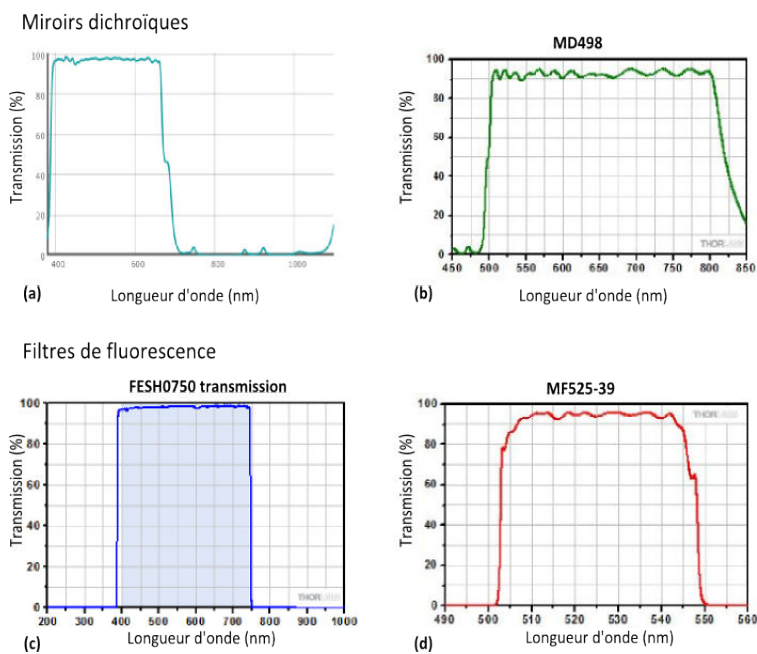


FIGURE 2.1.8 – Spectres du taux de transmission des différents miroirs dichroïques et filtres utilisés dans le montage. (a) Miroir dichroïque d’excitation via le laser, (b) miroir dichroïque d’excitation via la lampe de fluorescence, (c) filtre passe-bande premium, (d) filtre de fluorescence pour la GFP

Sources : (a) https://www.ahf.de/optical_filter_systems.html (b-c-d) <https://www.thorlabs.com/>

Enfin, une dernière lentille avec une focale de 50 mm (modèle LA1131-B de chez Thorlabs) permet de collecter et de concentrer tous les photons de fluorescence sur la surface active du détecteur nous garantissant une détection optimale de tous les photons provenant de la sortie du bâti.

Pour terminer avec les éléments présents dans le microscope, une platine de translation piézoélectrique (non représentée sur le schéma optique de la Figure 2.1.7) modèle PI-545 PInanoXYZ (PI) possédant une course sur les trois axes de 200 μm est installée sur le bâti. Celle-ci, servant de porte-échantillons, rend possible la réalisation de mouvements très fins de ceux-ci. Cette platine nous sert principalement à effectuer des acquisitions de volumes entiers par le biais de translations selon l’axe vertical.

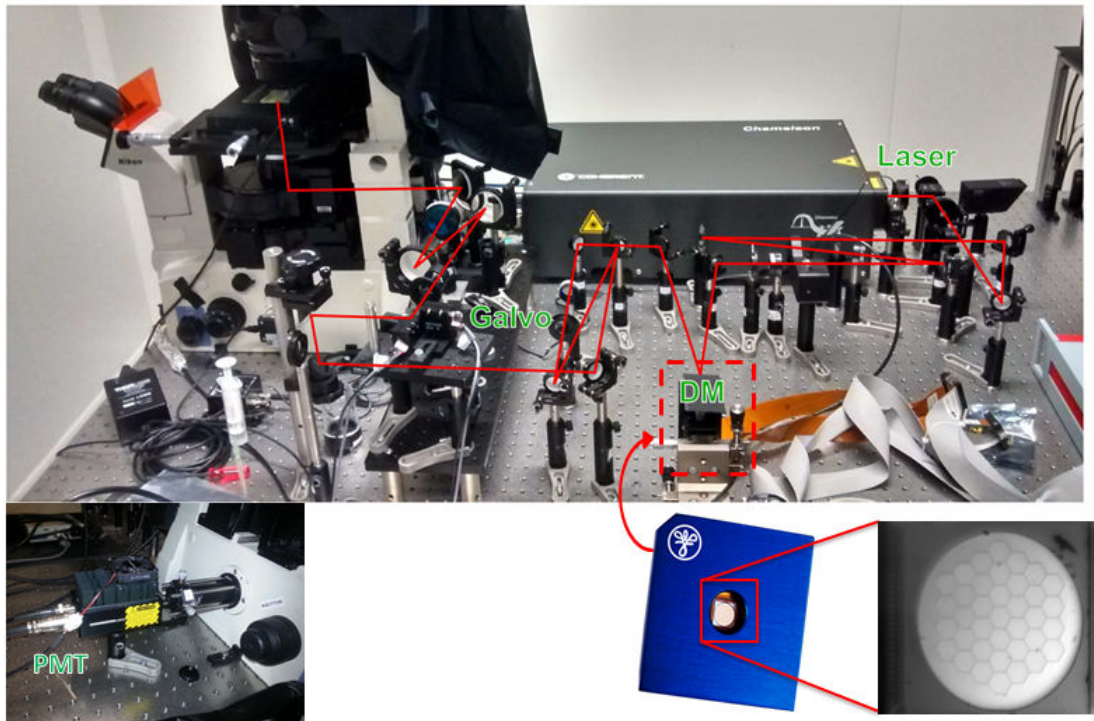


FIGURE 2.1.9 – Photographies du microscope tel qu’il a été décrit précédemment

Maintenant que nous avons fini d’introduire le microscope d’un point de vue optique, nous allons pouvoir passer à la présentation et à la description des différents programmes informatiques permettant son contrôle complet.

2.2 Le logiciel d’imagerie

La construction mécanique et optique du microscope étant réalisée, il est nécessaire maintenant de parler des outils qui ont été conçus pour contrôler cet instrument. Pour cela, un programme d’imagerie a été développé avec LabVIEW 2011 (National Instrument) et MATLAB R2011a de manière à pouvoir créer une interface visuelle accessible à tout utilisateur.

Dans cette partie, nous allons dans un premier temps nous intéresser à un élément important en instrumentation : la carte d’acquisition. Par la suite, nous présenterons de manière détaillée les différents sous-programmes effectuant certaines actions élémentaires. Pour finir, comme pour le montage optique, nous décrivons l’architecture complète du programme contrôlant l’ensemble du microscope ainsi que ses multiples fonctionnalités.

2.2.1 L’outil de dialogue avec l’ordinateur : la carte d’acquisition

Lorsqu’on souhaite développer via LabVIEW un logiciel permettant d’interfacer un ordinateur avec un système expérimental, le recours à des cartes d’acquisition National Instrument est pratique. En effet, celles-ci sont parfaitement adaptées à des applications nécessitant la génération de commandes et l’acquisition de nombreux signaux provenant de tout type de capteurs. De plus, leur utilisation garantit une compatibilité parfaite avec tous les outils

proposés par l'environnement LabVIEW.

C'est ainsi que nous avons décidé de nous servir de l'une d'entre elles pour permettre la communication entre nos instruments et l'ordinateur. Pour cela, nous avons sélectionné le modèle NI-6361 (National Instrument). Il s'agit d'une carte d'acquisition possédant seize entrées analogiques dont huit d'entre elles sont directement accessibles sur la carte via des connectiques BNC. Elle a également deux sorties analogiques (connexions BNC) et vingt quatre entrées/sorties numériques dont huit d'entre elles sont cadencées jusqu'à 1 MHz. La communication avec l'ordinateur se fait via une simple connexion USB rendant son installation extrêmement facile.



FIGURE 2.2.1 – La carte National Instrument modèle 6361 est un dispositif essentiel en instrumentation. Son grand nombre d'entrées/sorties directement accessibles via des connectiques BNC et la liaison avec l'ordinateur via port USB rendent cette carte extrêmement polyvalente
Source : <http://sine.ni.com/nips/cds/view/p/lang/fr/nid/209073>

La présence de cette carte d'acquisition dans un système de microscopie est un réel avantage. Celle-ci donne en effet la possibilité d'utiliser de nombreux instruments comme des détecteurs ou encore des sondes de powermètre ou tout autre instrument de mesure. Les deux sorties analogiques sont indispensables pour nos applications, le but étant que chacune d'entre elles contrôle un miroir galvanométrique. Pour finir, les multiples entrées/sorties numériques seront très pratiques pour l'utilisation d'un détecteur compteur de photons ou si certains dispositifs automatiques sont installés dans le système (comme par exemple le shutter).

Ainsi, la carte d'acquisition NI-6361 est clairement un élément importants du dispositif expérimental. Permettant la liaison entre le microscope et l'utilisateur, elle offre la possibilité de connecter un grand nombre d'éléments du système rendant le contrôle de ceux-ci possible via les différents programmes LabVIEW.

2.2.2 Les briques élémentaires du programme

L'utilisation de LabVIEW rend l'apprentissage et la compréhension des programmes (nommés VI) plus simple grâce à son environnement de développement graphique. Il est ainsi possible de créer des sous-programmes (appelés sous-VI) permettant la réalisation de tâches précises et de se servir de ceux-ci dans d'autres VI juste sous la forme d'une icône. On peut donc construire des programmes complexes seulement avec un petit groupe de sous-VI.

Il s'agit de ces sous-programmes dont nous allons parler dans cette section. En effet, nous avons utilisé et mis au point de nombreux sous-VI tant pour la partie imagerie que pour la partie optique adaptative, de manière à simplifier le développement et la lisibilité du logiciel principal d'imagerie.

Nous commencerons par introduire les sous-programmes créés au sein de l'équipe MO-SAIC permettant l'acquisition d'images par balayage. Enfin, seront présentés les sous-VI que j'ai développé pour contrôler le miroir déformable.

2.2.2.1 Les sous-programmes d'imagerie

L'équipe MOSAIC étant spécialisée en biophotonique, de nombreux microscopes ont été conçus pour diverses applications. Seulement, la plupart de ces techniques étant basées sur l'acquisition d'images par microscopie de balayage, un certain nombre de programmes d'imagerie ont été développés.

Afin de créer une base logicielle commune à ces techniques, un programme d'acquisition sous LabVIEW appelé *GPScan.VI* a été développé par Patrick Ferrand [1]. Ce programme utilise les fonctions DAQmx et les caractéristiques des cartes d'acquisition tout-en-un à grande vitesse de National Instrument. Ainsi, seulement deux sorties analogiques (AO pour Analog output) servent, contrôlant indépendamment et ce à grande vitesse les éléments permettant le balayage bi-dimensionnel par la génération de tensions de commande. L'acquisition des données peut être réalisée en parallèle par le biais d'entrées analogiques (AI pour Analog input) et/ou de compteurs. Les entrées analogiques sont parfaitement adaptées pour les détecteurs et équipements générant un signal de sortie sous la forme d'une tension. Au contraire, les compteurs pourront être utilisés pour collecter des signaux TTL générés par les détecteurs tels que les compteurs de photons.

Le programme *GPScan.VI* est composé de trois sous-VI permettant respectivement l'initialisation de la séquence (*INIT.VI*), l'acquisition des données (*SCAN.VI*) et son arrêt (*CLOSE.VI*).

La synchronisation du balayage avec l'acquisition des images est réalisée par le sous-VI *INIT.VI*. Il est alors possible de définir le nombre de points composant l'image ainsi que le temps de pause c'est-à-dire le temps d'arrêt du système de balayage sur chaque point. Les tâches des sorties et entrées analogiques sont définies de manière à respectivement générer et mesurer des séries de tension à la vitesse appropriée. L'acquisition via les compteurs est gérée par les fonctions d'origine de NI-DAQmx permettant la mesure automatique de la durée d'impulsions inconnues servant d'horloge de référence. Seulement, dans notre cas, le signal d'horloge est remplacé par un signal connu généré par un compteur (appelé pixel clock pour l'horloge des pixels) et le signal mesuré par les impulsions TTL provenant du détecteur. Ainsi, dans ces conditions, la durée des impulsions mesurées par le système correspondra au nombre d'impulsions TTL mesuré sur chaque pixel. Pour finir, de manière à garantir une parfaite

synchronisation, les entrées analogiques, la génération des impulsions d'horloge et les compteurs ont été configurés pour démarrer à la phase ascendante de l'impulsion de démarrage du trigger (i.e déclencheur de l'évènement) des sorties analogiques.

Par la suite, le balayage d'une image entière est effectué par le sous-VI *SCAN.VI*. La totalité des horloges ainsi que l'acquisition par les entrées analogiques et les compteurs sont activés de manière à pouvoir démarrer dès l'arrivée du signal du trigger provenant de la sortie analogique. Un balayage de trame (raster scan) est également calculé en prenant en compte les différents paramètres de balayage (nombre et taille des pixels) ainsi que les facteurs de balayage. Ceux-ci correspondent aux tensions permettant un déplacement unitaire des miroirs et nécessitant une calibration pour chacun d'entre eux. Ainsi, grâce à cette trame, les valeurs de tension à générer par la sortie analogique sont calculées et écrites dans la mémoire du système. De ce fait, au moment où les sorties analogiques commenceront à produire les tensions de commande, l'acquisition des données débutera en parfaite synchronisation. Ainsi, dès lors que la totalité des informations et des mesures provenant d'une image seront disponibles, elles seront transférées vers l'ordinateur.

Pour terminer, la totalité des canaux ouverts durant les séquences d'acquisition seront supprimés à la fin par le sous-VI *CLOSE.VI*.

Il est enfin également possible d'effectuer des acquisitions répétées d'un champ en insérant *SCAN.VI* dans une boucle while comme cela est présenté dans la Figure 2.2.2. Les informations de la trame de balayage étant enregistrées dans la carte, celles-ci seront modifiées seulement lorsque les paramètres de balayage se trouveront être changés par l'utilisateur.

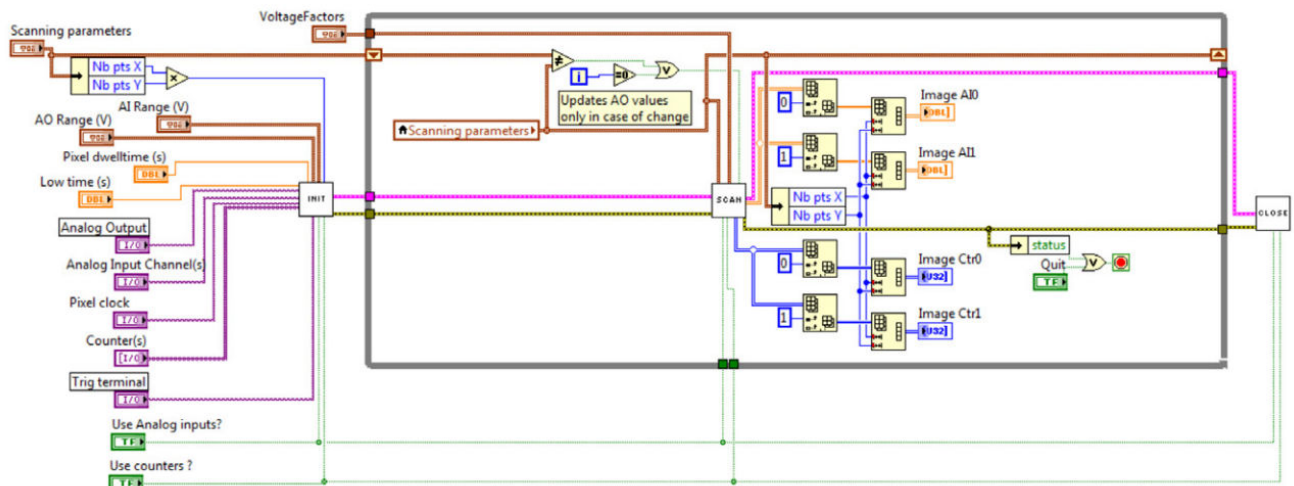


FIGURE 2.2.2 – Diagramme du programme *GPSCAN.VI* entraînant l'acquisition continue d'un champ défini par des paramètres de balayage (scan parameters) et permettant dans cet exemple-ci l'acquisition simultanée de données sur quatre canaux : deux canaux analogiques (*Image AI0* et *AI1*) et deux compteurs (*Image Ctr0* et *Ctr1*)

Ainsi, grâce à ces fonctions de base, il est possible de construire n'importe quel type de programme d'imagerie permettant de contrôler des systèmes complexes quelque soit les conditions expérimentales imposées. Néanmoins, en ce qui nous concerne, des éléments supplémen-

taires vont être nécessaires : il s'agit de toute la partie logicielle liée à l'optique adaptative et au contrôle du miroir déformable.

2.2.2.2 Les sous-programmes de contrôle du miroir déformable

Le miroir déformable ne disposant pas de fonctions permettant son utilisation directe dans LabVIEW, j'ai créé des sous-VI de manière à intégrer pleinement le contrôle du miroir déformable dans le programme d'imagerie. Pour cela, nous sommes partis des fonctions Matlab fournies avec le miroir déformable par le constructeur. Celles-ci, au nombre de quatre, permettent d'effectuer :

- L'initialisation du miroir déformable
- Le contrôle de chaque segment de manière indépendante
- La génération de polynômes de Zernike
- La mise à l'arrêt du miroir déformable

Ainsi, il est possible de générer les vingt premiers modes de la base des polynômes de Zernike avec seulement deux vecteurs de données en commande. Le premier vecteur correspond aux modes désirés indiqués par les numéros dans la base (entiers entre 0 et 20) et le second vecteur aux amplitudes souhaitées. Ces amplitudes en micromètres seront appliquées aux modes choisis et générées par le miroir déformable. De cette manière, il est possible de générer indépendamment les différents modes accessibles ou alors une combinaison linéaire de plusieurs modes avec leur amplitudes associées. Le stroke maximal accessible étant de 5 μm , les amplitudes applicables pour les différents modes de Zernike seront limitées. En effet, passé une certaine amplitude (dépendante des modes), une partie des segments seront bloqués car ils auront atteint leur stroke maximal. Néanmoins, les amplitudes que nous appliquons ($\pm 0,1 \mu\text{m}$ soit $\pm 1,5$ radians) sont suffisamment faibles pour ne pas entraîner ces bloquages (Figure 2.3.3). Pour finir, l'erreur sur la position des segments pour le modèle PTT111-5 a été estimée à moins de 5 nm rms [2] ce qui équivaut à environ 0,08 radians rms.

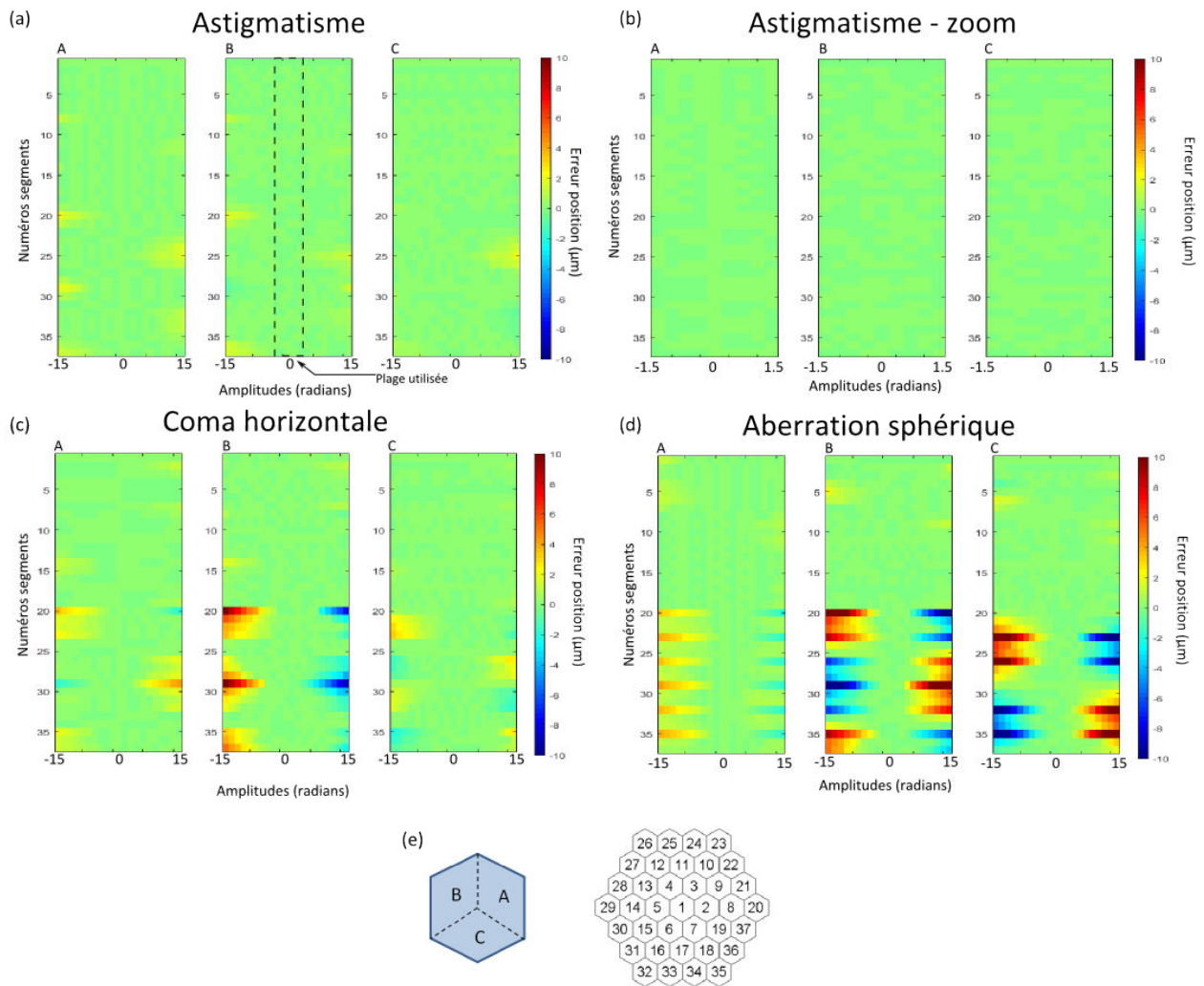


FIGURE 2.2.3 – Représentation de l’erreur entre la commande (modes de la base des polynômes de Zernike) et la position atteinte pour les différents actuateurs (A, B et C) des trente-sept segments qui composent la surface du PTT111-5. Les amplitudes exprimées en radians correspondent à des commandes (maximales) de $\pm 1 \mu\text{m}$. (a) Application sur l’astigmatisme, la zone définie par les pointillés correspond à la plage d’amplitudes utilisées durant les optimisations. (b) Agrandissement de la plage définie dans (a) pour l’astigmatisme entre $\pm 1,5$ radians (soit $\pm 0,1 \mu\text{m}$). (c - d) Exemples pour l’application de coma horizontale (c) et de l’aberration sphérique (d). (e) Schémas indicatifs de la position des trois actuateurs sur un segment et de la position de tous les segments sur la surface du miroir

Cependant, il n’est pas possible de contrôler pleinement le miroir, ce qui m’a amené à créer une cinquième fonction. Celle-ci, entraînant la mise à plat du miroir déformable, se base sur la fonction permettant le contrôle des segments. En effet, nous avons constaté lors de la mise sous tension du miroir déformable que la forme prise par celui-ci n’était pas plane. Celle-ci, appelée forme au repos, correspond à une surface ”aléatoire” prise par les segments et est due à des positions de référence différentes des actionneurs lorsqu’on ne leur applique pas de tension. Ainsi, il est nécessaire de créer une commande permettant la mise à plat du miroir en assignant tous les segments à la même position. Cette commande, appelée *DM_Flat*, vient s’ajouter à l’ensemble de fonctions de base. Pour terminer, l’erreur pour la mise à plat de la

surface a été estimée à 4 nm rms soit 0,06 radians rms [2].

J'ai donc développé quatre sous-VI permettant le contrôle du miroir déformable directement depuis LabVIEW. Pour pouvoir faire appel à des commandes Matlab dans LabVIEW, j'ai utilisé des fenêtres Mathscript permettant l'écriture de scripts dans différents langages de programmation comme le C/C++ ou encore appelé des fonctions Matlab.

De tous ces sous-VI, le plus important est celui appelé *DM_Initial*. Il s'agit de la fonction d'initialisation du miroir déformable. Générant un tableau de valeurs appelé InitData, celui-ci est indispensable pour toutes les autres fonctions. Les fonctions *DM_Flat* et *DM_ShutDown* ont notamment uniquement besoin de cette variable pour fonctionner. Ces deux fonctions permettent la mise à plat du miroir comme décrit précédemment ainsi que son arrêt. Pour terminer, le dernier sous-VI, *DM_Zernike* nécessite quant à lui plus de variables pour fonctionner. En effet, le rôle de ce sous-VI est de modifier la surface du miroir déformable, permettant la génération des premiers ordres des polynômes de Zernike ainsi que des combinaisons de ceux-ci. Ainsi, en plus d'InitData (comme pour toutes les autres fonctions), *DM_Zernike* nécessitera également deux variables : un tableau d'entiers correspondant aux indices des modes de Zernike et un tableau de grandeurs numériques correspondant aux amplitudes (en μm) des modes utilisés.

Ainsi, grâce à ces fonctions, nous avons en main les briques élémentaires qui nous donnent le contrôle du miroir déformable afin d'utiliser celui-ci pour faire de l'optique adaptative.

2.2.3 Architecture complète du programme

Maintenant que nous sommes en possession de tous les éléments nécessaires, il nous est possible de développer un programme permettant le contrôle du microscope complet, l'acquisition d'images et l'optimisation des aberrations optiques grâce au miroir déformable.

Le logiciel devant être le plus complet possible, de nombreuses fonctionnalités devront y être incluses de manière à avoir en main tous les outils nécessaires pour l'observation des échantillons biologiques, l'utilisation de l'optique adaptative et l'étude des aberrations optiques. Ainsi, les fonctions que nous devons intégrer sont :

- La visualisation en temps réel du champ d'imagerie et la possibilité de s'y déplacer facilement selon les trois axes (via la platine de translation)
- L'enregistrement de séquences d'images d'un même champ en continu (Timelapse)
- L'enregistrement de volumes entiers dans l'échantillon (z-stack)
- La réalisation de boucles d'optimisation des aberrations optiques par la méthode modale (enregistrement de chaque image), le calcul des métriques et la définition de la forme optimale à appliquer et ce en boucle fermée
- La possibilité (hors boucle d'optimisation) de faire évoluer certains modes de déformation du miroir pour des études plus spécifiques (avec enregistrement de chaque image)

De manière à détailler l'ensemble de ces fonctions, un diagramme récapitulatif est présenté Figure 2.2.4 où sont indiquées les différentes variables d'entrées (contrôlables par l'utilisateur) et celles de sorties ainsi qu'un court descriptif de chaque fonction du programme.

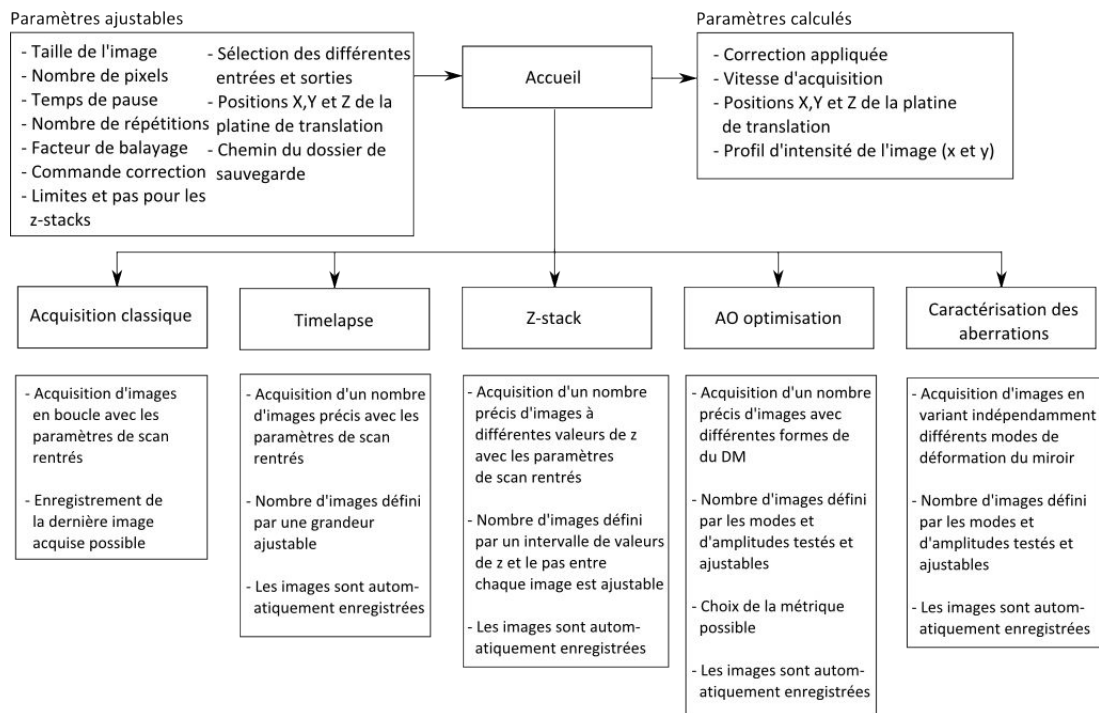


FIGURE 2.2.4 – Le logiciel développé pour contrôler le microscope possède de nombreuses fonctions permettant l'acquisition et la gestion de l'optique adaptative

De manière à être plus exhaustif, nous allons maintenant détailler chaque fonction (ou groupe de fonctions) en décrivant les étapes qui les composent. Pour commencer, nous aborderons les éléments présents sur l'interface utilisateur en expliquant leur rôle. Puis, nous présenterons le groupe composé des trois options d'acquisition de base c'est-à-dire l'imagerie classique, le timelapse et les z-stack. Pour finir, nous étudierons le groupe de fonctions liées à l'optique adaptative et à l'utilisation du miroir déformable.

2.2.3.1 La face avant de l'instrument

On appelle face avant, l'interface principale du programme permettant à l'utilisateur de modifier une grande partie des paramètres expérimentaux et de visualiser les images en cours d'acquisition. Ainsi, de très nombreux paramètres sont accessibles directement via cette interface. On y trouve :

- Les paramètres de scan (taille du champ, nombre de pixels et temps de pause)
- Les adresses des entrées et sorties des différents détecteurs
- Les paramètres liés à l'acquisition de timelapse ou de z-stack
- Le chemin permettant de définir le lieu de sauvegarde des données

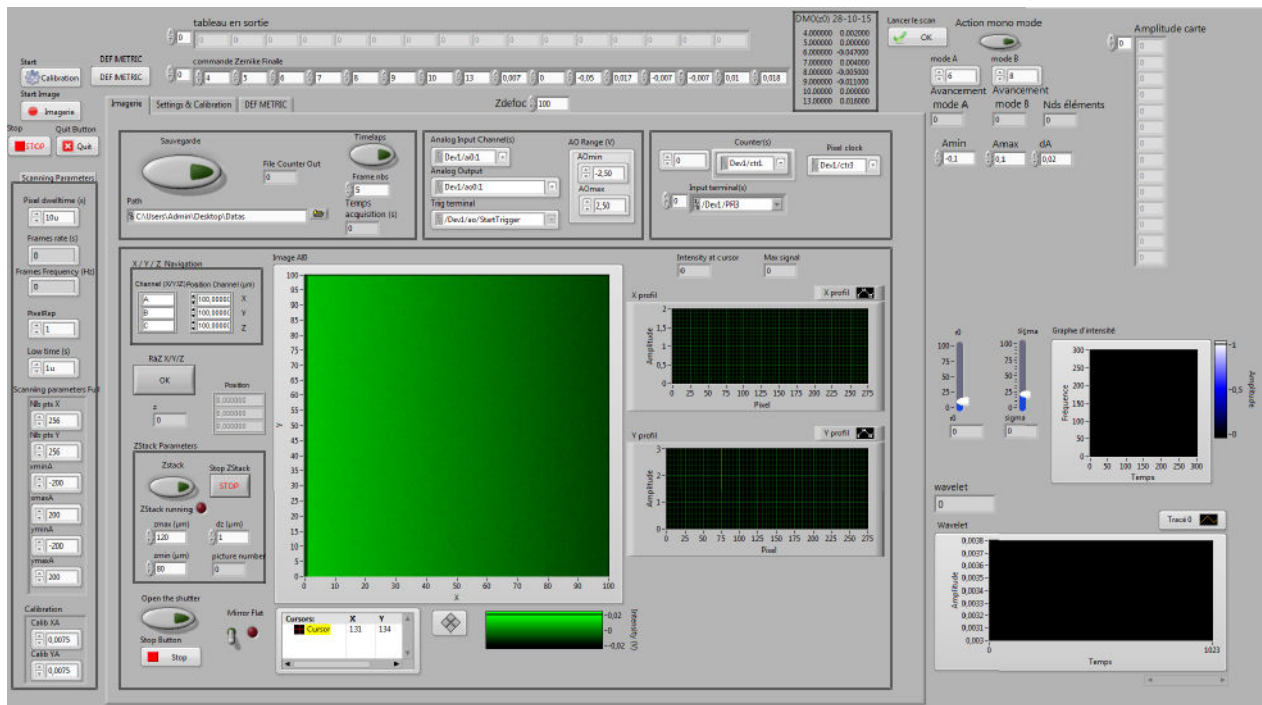


FIGURE 2.2.5 – Lorsque l’expérimentateur souhaite utiliser le logiciel, celui-ci est accueilli sur la face avant de l’instrument virtuel, lui donnant accès à tous les paramètres nécessaires pour utiliser pleinement le microscope et le miroir déformable installé dans le dispositif

Dans la Figure 2.2.5 est représentée une capture d’écran correspondant au visuel lorsque l’expérimentateur se sert du programme d’acquisition. De nombreux éléments graphiques y sont intégrés comme par exemple la visualisation du champ d’imagerie durant l’acquisition qui est essentielle. D’autres éléments moins importants sont également disponibles comme par exemple la présence de courbes correspondant au profil de l’intensité du signal selon les deux axes et pouvant être positionnées n’importe où dans l’image. Pour finir, une visualisation de la métrique wavelet (abordée dans le prochain chapitre) est présente, permettant d’avoir des informations en temps réel sur l’état de celle-ci durant les acquisitions.

Maintenant que nous avons décrit la partie visuelle du logiciel, nous allons développer les différentes fonctionnalités de celui-ci.

2.2.3.2 Les modalités d’acquisition

Le programme possède différentes modalités d’acquisition. La première est l’imagerie classique. Elle donne la possibilité de réaliser l’acquisition en boucle d’images du champ défini par l’utilisateur via les paramètres de balayage. Ceux-ci correspondent au nombre de points (pixels) composant l’image (selon x et y) ainsi qu’à la taille du champ. Cette taille est ajustable par quatre paramètres représentant les limites du champ selon les deux axes (en micromètres). La vitesse de ces acquisitions successives dépend de la combinaison des précédents paramètres et du temps de pause par pixel. Ainsi, grâce à la fonction d’imagerie classique, il sera possible de visualiser en temps réel l’échantillon, servant à localiser et à définir les zones d’intérêt sur lesquelles on pourra travailler par la suite.

L’utilisation de la platine de translation manuelle et de la platine piézoélectrique donne la possibilité d’effectuer des translations en temps réel de grandes amplitudes (platine ma-

nuelle) et de très petites et précises amplitudes (platine piézoélectrique) durant l'acquisition. L'enregistrement d'images est possible seulement à l'arrêt de l'acquisition, sauvegardant uniquement la dernière image.

Pour pouvoir réaliser l'acquisition et l'enregistrement d'une séquence temporelle d'images (i.e la sauvegarde à la suite de toutes les images acquises), la fonction Timelapse est disponible. Elle permet d'enregistrer un nombre fini d'images du champ étudié. Ainsi, il est possible d'acquérir des séquences d'images permettant de suivre dans le temps l'évolution de l'échantillon. Nous utiliserons d'ailleurs cette fonction pour effectuer les études sur l'activité des réseaux neuronaux.

La dernière fonction, indispensable lorsqu'on effectue de l'imagerie d'échantillons biologiques, est celle réalisant l'acquisition de volumes complets d'échantillons, offrant ainsi la possibilité de visualiser ces derniers (ou une portion de ceux-ci) en trois dimensions. Pour arriver à cela, nous utilisons la platine de translation piézoélectrique pour exécuter des déplacements selon l'axe z , c'est-à-dire selon l'axe perpendiculaire au plan d'imagerie.

Ainsi, l'acquisition de volumes (que l'on appellera z -stack) s'opère via seulement trois paramètres en plus de ceux permettant l'acquisition d'images. Ceux-ci sont la position minimum et maximum que la platine doit atteindre (z_{min} et z_{max}) et le pas entre chaque image (dz). La platine ne possédant qu'une amplitude de déplacement de $200\ \mu\text{m}$ (allant de 0 à 200), la position centrale sera fixée par défaut à la valeur de mi-course soit $100\ \mu\text{m}$. Pour donner un exemple, si l'on souhaite acquérir un stack de $40\ \mu\text{m}$ d'épaisseur avec un pas de $1\ \mu\text{m}$, les paramètres à appliquer seront : $z_{min} = 80\ \mu\text{m}$; $z_{max} = 120\ \mu\text{m}$ et $dz = 1\ \mu\text{m}$.

Une fois les paramètres définis, la procédure d'acquisition est très simple. Dans un premier temps, la platine prend la position correspondant à z_{min} puis l'acquisition d'images commence. La platine effectuera alors un déplacement de dz entre chaque image jusqu'à arriver à z_{max} qui sera la dernière position de la série. Chaque image étant enregistrée, il est possible de reconstruire le volume observé.

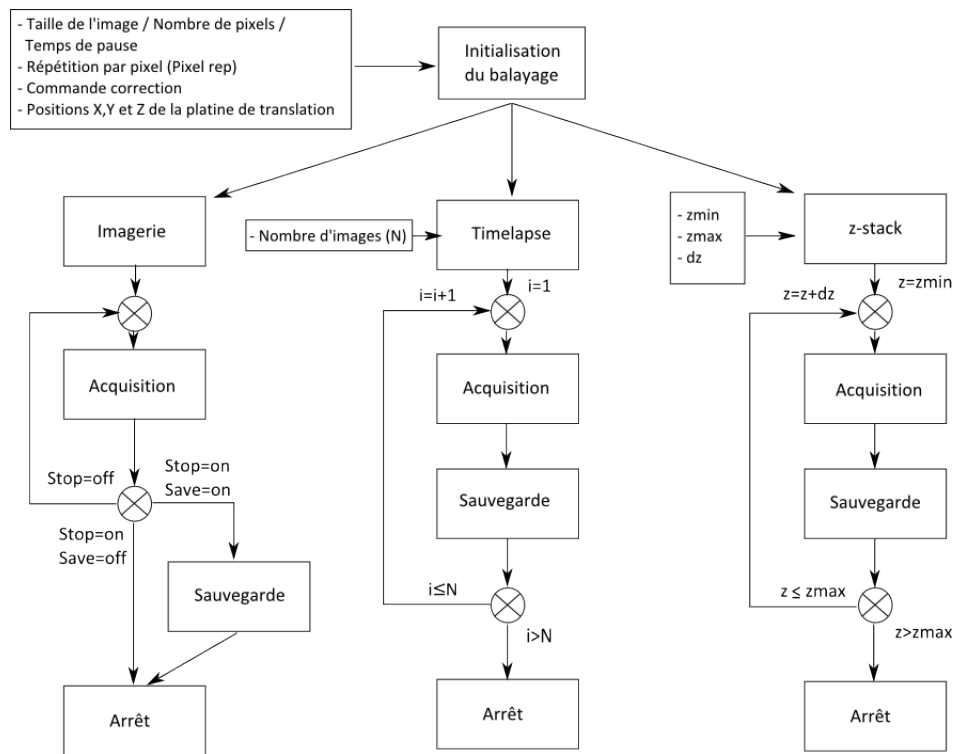


FIGURE 2.2.6 – Représentation schématisée de l'architecture des différents modes d'acquisition accessibles par l'utilisateur

Bien évidemment, il est possible de définir une commande sur le miroir déformable permettant la correction des aberrations optiques. Celle-ci sera appliquée sur toutes les images acquises quelque soit la fonction utilisée, garantissant une qualité optimale des images obtenues.

2.2.3.3 Correction et étude des aberrations optiques

Maintenant que nous sommes capables d'effectuer différents types d'acquisition, la question restante est : quels sont les outils nécessaires pour caractériser et corriger les aberrations optiques ?

A cet effet, nous avons implémenté la méthode mise au point durant cette thèse (la présentation de celle-ci est le sujet du chapitre suivant). Pour cela, nous nous sommes basés sur une approche de reconstruction modale du front d'onde par l'optimisation de métriques dépendantes des images acquises. De ce fait, nous n'avons besoin que de deux paramètres en plus de ceux utilisés pour réaliser l'acquisition classique d'images. Ces deux grandeurs sont des vecteurs contenant respectivement les indices des modes de Zernike que nous souhaitons tester et leurs amplitudes. Ainsi, la routine d'exécution consiste à appliquer pour chaque mode présent dans la commande les différentes amplitudes définies, de manière à pouvoir calculer la valeur de la métrique dans chacun des cas. Enfin, une fois toutes les images acquises, la valeur de la métrique est calculée et les amplitudes optimales permettant la meilleure correction des aberrations sont déterminées par interpolation parabolique des différentes valeurs calculées. La commande finale est alors enregistrée et servira comme forme de départ pour d'éventuelles réitérations de la boucle d'optimisation. Pour finir, il est possible de sélectionner deux options lorsqu'on utilisera cette fonction, celles-ci étant : le choix de la métrique mais également

l'accès à l'enregistrement (ou non) de toutes les images acquises durant l'optimisation. Une autre fonction est également disponible, celle-ci permet d'étudier plus précisément certaines aberrations et leur impact sur les images réalisées de manière indépendante. La procédure pour faire ce type d'études est similaire à celle employée dans la boucle d'optimisation. L'utilisateur définit le ou les modes qu'il souhaite tester ainsi que les amplitudes à appliquer et s'ensuit l'acquisition des images correspondant aux combinaisons des modes aux amplitudes souhaitées. De plus, il est possible de réaliser des cartes d'aberrations (i.e évolution de la métrique en fonction de deux aberrations différentes). Pour finir, pour cette fonction-ci, la totalité des images obtenues est automatiquement enregistrée.

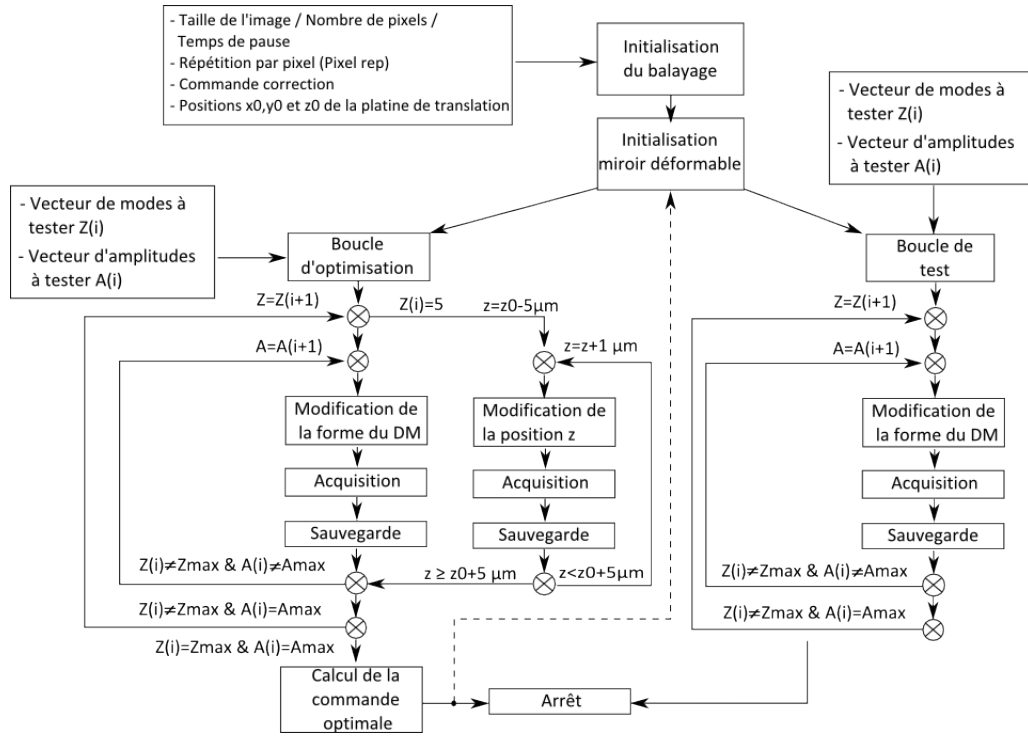


FIGURE 2.2.7 – Représentation schématique du fonctionnement des différentes méthodes liées à l'utilisation de l'optique adaptative par le système

Dans la Figure 2.2.7 est représentée l'architecture complète des fonctions précédemment décrites. Nous pouvons d'ailleurs noter qu'une étape supplémentaire est ajoutée dans l'utilisation de la fonction d'optimisation des aberrations. En effet, une branche entraînant la modification automatique de la position de la platine de translation y est représentée. Il s'agit ici d'une particularité liée à la méthode que nous avons développée pour l'étude de nos échantillons neurobiologiques qui sera décrite dans le chapitre suivant.

Maintenant que nous sommes en possession d'un instrument d'imagerie fonctionnel ainsi que des outils nécessaires pour utiliser l'optique adaptative, une méthode adaptée à nos contraintes expérimentales est indispensable.

Bibliographie

- [1] Ferrand P., GPScan.VI : A general-purpose LabVIEW program for scanning imaging or any application requiring synchronous analog voltage generation and data acquisition, *Computer Physics Communications*, 2015, 192, 342-347
- [2] Helmbrecht M. A., He M., Kempf C. J. and Besse M., MEMS DM development at Iris AO, Inc, *Proceedings of SPIE*, 2011, Vol. 7931, Issue 793108, 1-6

Chapitre 3

La méthode d'optimisation

3.1 Introduction aux polynômes de Zernike

Les polynômes de Zernike sont des fonctions mathématiques très importantes en optique des faisceaux et en optique adaptative. En effet, ils constituent une base intéressante pour représenter la déformation du front d'onde d'un faisceau à symétrie circulaire. On retrouve parmi les premiers éléments de celle-ci des aberrations standards comme : la coma, le défocus, l'astigmatisme et l'aberration sphérique.

En mathématiques, les polynômes de Zernike constituent une base composée d'une série de polynômes orthogonaux sur le cercle unité [1]. Celle-ci a été baptisée ainsi suite à l'obtention par son créateur Frederik Zernike du Prix Nobel de Physique en 1953 pour la création de la microscopie à contraste de phase.

Les polynômes de Zernike peuvent se décomposer en fonctions paires (3.1.1) et impaires (3.1.2) :

$$Z_n^m(\rho, \varphi) = R_n^m(\rho)\cos(m\varphi) \quad (3.1.1)$$

$$Z_n^{-m}(\rho, \varphi) = R_n^m(\rho)\sin(m\varphi) \quad (3.1.2)$$

où m et n sont des nombres entiers naturels non nuls, avec $n \geq m$, φ l'angle d'azimuth exprimé en radians et ρ la distance radiale normalisée. Les polynômes radiaux R_n^m sont, eux, définis tels que :

$$R_n^m(\rho) = \sum_{k=0}^{(n-m)/2} \frac{(-1)^k (n-k)!}{k!((n+m)/2-k)!((n-m)/2-k)!} \rho^{n-2k} \quad (3.1.3)$$

Cette expression (3.1.3) est valable pour $(n-m)$ pair et sera égale à 0 pour $(n-m)$ impair. Pour $m=0$, le polynôme se réduit à $R_n^0(\rho)$.

Il est ainsi possible de calculer les premiers ordres radiaux de la base, soit :

$$\begin{aligned} R_0^0(\rho) &= 1 \\ R_1^1(\rho) &= \rho \\ R_2^0(\rho) &= 2\rho^2 - 1 \\ R_2^2(\rho) &= \rho^2 \\ &\text{etc...} \end{aligned}$$

On peut alors définir la forme littérale des premiers polynômes de la base (Z_j) et associer ceux-ci aux effets optiques qu'ils introduisent sur le front d'onde. Cela permettra ainsi de les assimiler aux différentes aberrations connues.

Sachant que ceux-ci sont normalisés sur le cercle unité :

$$\int_0^{2\pi} \int_0^1 Z_j^2 \rho d\rho d\theta \quad (3.1.4)$$

On obtient donc les expressions des premiers modes de la base rassemblés dans le tableau suivant :

Indice j	Ordre radial (n)	Ordre azimuthal (m)	Z_j	Nom
1	0	0	1	Piston
2	1	1	$2\rho\cos\theta$	Tip
3	1	-1	$2\rho\sin\theta$	Tilt
4	2	0	$\sqrt{3}(2\rho^2 - 1)$	Défocus
5	2	-2	$\sqrt{6}\rho^2\sin 2\theta$	Astigmatisme oblique
6	2	2	$\sqrt{6}\rho^2\cos 2\theta$	Astigmatisme vertical
7	3	-1	$\sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho)\sin\theta$	Coma verticale
8	3	1	$\sqrt{8}(3\rho^3 - 2\rho)\cos\theta$	Coma horizontale
9	3	-3	$\sqrt{8}\rho^3\sin 3\rho$	Trefoil vertical
10	3	3	$\sqrt{8}\rho^3\cos 3\rho$	Trefoil oblique
11	4	0	$\sqrt{5}(6\rho^4 - 6\rho^2 + 1)$	Sphérique 1

Dans la Figure 3.1.1 sont représentés graphiquement ces mêmes premiers ordres.

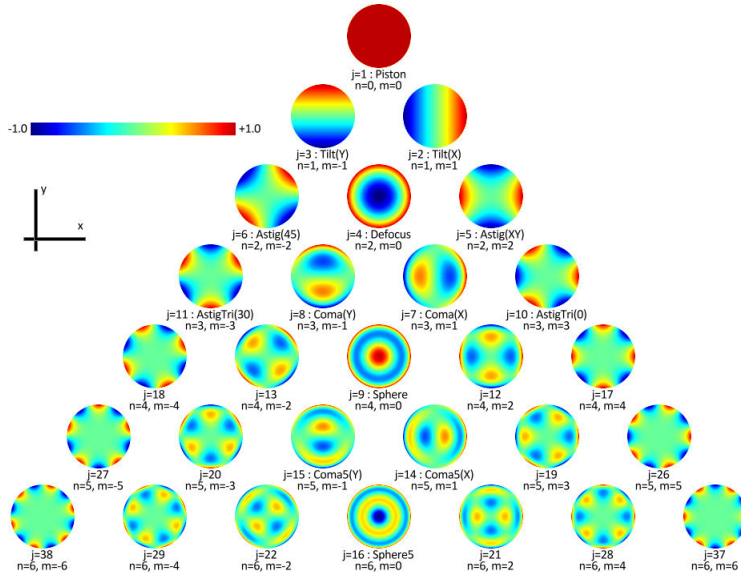


FIGURE 3.1.1 – La pyramide des polynômes de Zernike permet la visualisation des premiers ordres de la base classés en fonction des valeurs des ordres radiaux (n) et azimuthaux (m).

Ainsi, il est très facile de comprendre l'intérêt qu'apporte l'utilisation de cette base mathématique en optique adaptative. En effet, ces polynômes étant définis sur le cercle unitaire, ils sont parfaitement applicables sur des faisceaux optiques. De plus, le fait qu'ils soient assimilables aux différentes aberrations optiques rend l'interprétation des résultats beaucoup plus claire et permet également une meilleure compréhension des propriétés optiques des échantillons étudiés.

Maintenant que nous avons introduit les polynômes de Zernike, nous allons pouvoir nous intéresser à la méthode que nous avons mise en place pour corriger les aberrations dans les tissus neurobiologiques.

3.2 La méthode d'optimisation par reconstruction modale

Comme cela a été expliqué dans le premier chapitre, la méthode la plus efficace pour quantifier et corriger les aberrations optiques consiste à mesurer directement celles-ci avec un détecteur de front d'onde, de manière à obtenir instantanément l'information. Seulement, en microscopie, cette approche n'est pas envisageable car les aberrations sont introduites principalement par l'échantillon lui-même et ne peuvent donc être mesurées directement. Ainsi, il est nécessaire d'utiliser des approches différentes appelées méthodes indirectes pour effectuer cette tâche. Pour cela, nous avons choisi de nous baser sur l'approche d'optimisation par reconstruction modale comme méthode de correction des aberrations optiques. Nous allons décrire dans cette partie l'évolution de notre compréhension de cette méthode, commençant à ses origines pour terminer par celle que nous avons mise en place : la méthode locking.

3.2.1 Le concept de base de la méthode

La méthode par reconstruction modale, comme nous l'utilisons, fut proposée par Booth et al en 2000 [2]. Celle-ci repose sur l'optimisation d'une métrique caractérisant "l'état optique" du système en appliquant des perturbations contrôlées (aussi appelées biais) sur le front d'onde.

Ainsi en mesurant ou en calculant la métrique choisie, il est possible de quantifier l'impact des biais ainsi que leurs amplitudes permettant de maximiser la métrique. Si la métrique est bien choisie, cela entraîne une réduction des aberrations optiques et donc une amélioration des conditions optiques d'imagerie de notre système.

3.2.1.1 Optimisation d'une métrique basée sur l'image

Prenons le cas d'une métrique, que l'on appellera M , dépendante de la qualité de focalisation du faisceau incident. Dans des conditions idéales, la valeur de cette métrique est maximale et définie par les caractéristiques du système optique complet. Seulement, en présence d'aberrations optiques, la valeur de M s'en trouve réduite. En introduisant des biais $Z_i(a_i)$ correspondant à des perturbations connues dont l'amplitude a_i est ajustable, il est possible de quantifier l'impact de ces perturbations sur les aberrations du système par des mesures de M . Ainsi, en appliquant une série d'amplitudes différentes et en évaluant la métrique, une amplitude permettant de maximiser M peut être trouvée ce qui traduit une réduction des aberrations optiques impactant le système.

Le nombre de mesures à effectuer est variable et dépendant des besoins expérimentaux. En effet, une méthode efficace pour garantir une bonne détection d'un maximum local de la métrique consiste à faire un grand nombre de mesures de celle-ci en appliquant plusieurs amplitudes. Cependant, dans le cas de métriques basées sur des paramètres issus d'analyse d'images, un grand nombre de mesures accroît considérablement la durée des phases d'optimisation. En effet, pour réaliser une correction complète, il est nécessaire de tester différents biais, ce qui augmente le nombre de mesures à réaliser.

C'est ainsi que Booth et al [3] montrèrent qu'il était possible d'effectuer des corrections efficaces avec seulement $3N$ voire $2N + 1$ mesures où N est le nombre de perturbations testées (biais différents) et les valeurs numériques (3 et 2) correspondent au nombre d'amplitudes appliquées à celles-ci. Cette méthode est basée sur l'hypothèse des faibles perturbations : au

voisinage du maximum de la métrique, la variation de celle-ci est quadratique. Une parabole peut donc être utilisée pour trouver le maximum à partir de la mesure de seulement trois points ($3N$). Nous rediscuterons de la validité de cette approximation plus loin dans ce chapitre. La méthode $2N + 1$, quant à elle, part du principe qu'une des trois mesures est effectuée pour une amplitude de biais nulle, elle est donc identique quelque soit le biais et n'est pas répétée. Pour terminer, le calcul de la valeur optimale de l'amplitude à appliquer a_{op} est réalisé grâce à un ajustement des mesures avec une fonction parabolique (Figure 3.2.1).

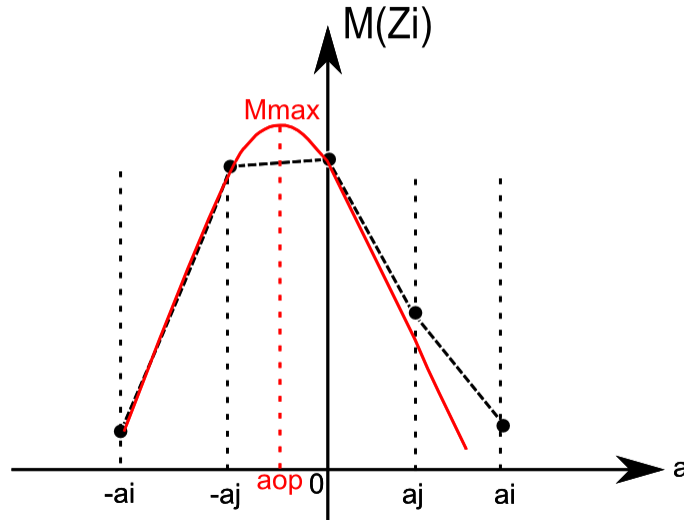


FIGURE 3.2.1 – Représentation schématique de l'optimisation de la métrique M pour une perturbation Z_i d'amplitude variable a . Grâce à une interpolation parabolique, il est possible de définir l'amplitude optimale à appliquer correspondant au maximum de M

Seulement dans le cadre de cette méthode, un mauvais choix de biais peut poser problème. En effet, l'application de perturbations non adaptées peut entraîner le risque d'apparition de couplages entre les biais rendant l'optimisation du front d'onde plus difficile.

3.2.1.2 L'utilité d'une base orthogonale

Pour empêcher ces problèmes de couplages durant les tentatives d'optimisation, la solution consiste à avoir recours à une base orthogonale de biais. En effet, l'utilisation d'une telle base signifie que la totalité des différents éléments de celle-ci sont totalement découplés les uns des autres. Ainsi, chaque perturbation ajoutée au front d'onde interviendra de manière indépendante sans impacter le reste de celui-ci.

Dans la figure ci-dessous sont représentés des exemples où les perturbations appliquées pour trouver le maximum d'une métrique sont orthogonales et soumises ou non à des couplages [4]. Nous pouvons voir dans le premier cas (Figure 3.2.2 (a)) que la base orthogonale est employée pour des optimisations basées sur les méthodes $2N + 1$ (à gauche) et $3N$ (à droite). En commençant dans un état identique symbolisé par le point bleu, il est possible de définir les amplitudes optimales pour les deux modes testés (point violet) en réalisant seulement trois mesures sur ceux-ci (point vert). Dans le cas $2N + 1$ (à gauche), la solution

finale (point orange) est obtenue après avoir testé séparément les deux modes de déformation et définie leurs amplitudes optimales respectives. Dans le cas $3N$ (à droite), la valeur maximale de la métrique (point rouge) est calculée en deux temps. Tout d'abord, le maximum d'un premier mode est défini (point violet) en partant du point de départ. Par la suite, le second mode est testé en démarrant à la position calculée par le mode précédent permettant d'atteindre les amplitudes optimales pour maximiser la métrique.

Dans le second cas (Figure 3.2.2 (b)) sont présentés des exemples où les biais utilisés sont couplés. A gauche est illustré un cas sans couplage (modélisé par la ligne verte). Dans ces conditions, les deux méthodes maximisent la métrique sans aucune erreur. En présence de couplages linéaires (au centre) ou non linéaires (à droite), le résultat atteint avec les deux méthodes n'est pas optimal. Nous pouvons néanmoins noter le fait que la méthode $3N$ donne lieu à un résultat plus précis en présence de couplages non linéaires par rapport à la méthode $2N + 1$. Ainsi, nous pouvons constater qu'en présence de couplages, il est difficile de retrouver le maximum de la métrique.

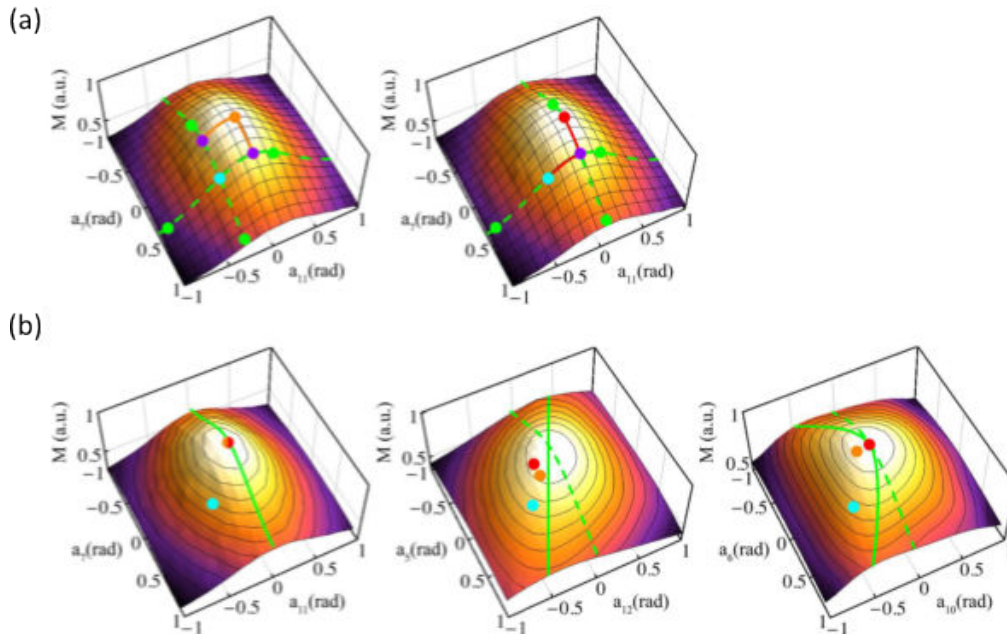


FIGURE 3.2.2 – Représentation schématique des différentes méthodes d'optimisation d'une métrique. La métrique M est tracée en fonction des amplitudes de deux biais appliqués (axes du graphique). (a) Représentation des méthodes $2N + 1$ (à gauche) et $3N$ (à droite). (b) Exemples de corrections non optimales dues à la présence de couplages entre les deux biais. A gauche exemple sans couplage, le maximum défini par les méthodes (point orange pour $2N + 1$ et point rouge pour $3N$) se trouve sur le maximum de M . Au centre, exemple en présence d'un couplage linéaire entre les deux biais. A droite, cas où le couplage est non linéaire. Dans tous les cas, chaque tentative de correction démarre à la position définie par le point bleu [4]

Ainsi, il est clair qu'en appliquant des biais couplés entre eux, les résultats obtenus par les méthodes de correction risquent d'être faux. C'est pour cela que la base des polynômes de Zernike est si importante en optique adaptative. En effet, comme nous l'avons décrit plus

haut, celle-ci est une base orthogonale. De ce fait, elle est à priori parfaitement adaptée pour être utilisée comme biais.

3.2.2 Problèmes de convergence : réorthogonalisation ou itération ?

La base des polynômes de Zernike est un outil très important en optique adaptative. Cette base étant théoriquement orthogonale, en réalité des couplages restent présents : ceux-ci étant dus à deux sources distinctes. La première, pouvant être évitée, est liée à la technologie de correcteur de front d'onde utilisée. En effet, les miroirs déformables membranaires sont soumis à des couplages dus à la continuité de leurs surfaces. Le recours à des systèmes segmentés ou des SLM permet d'éviter ce problème. La seconde, impactant toutes les technologies, provient de la base des polynômes de Zernike elle-même. Effectivement, les polynômes forment bien une base orthogonale en ce qui concerne la phase du faisceau. Seulement, à la focalisation du faisceau, cette propriété tend à disparaître, entraînant l'apparition de couplages au niveau de la PSF. Ainsi, la réponse en intensité du système (signal de fluorescence) peut fluctuer lors l'ajout de certains modes de déformation.

Dans la Figure 3.2.3 est présenté un exemple mettant en évidence la présence de couplage lorsqu'on utilise certains modes de la base des polynômes de Zernike. Ici, nous avons appliqué avec le miroir déformable une aberration correspondant à la coma (mode numéro 8) avec une amplitude de 1,5 radians (soit 100 nm) lors de l'acquisition d'images d'une microbille (Figure 3.2.3 (a)). On peut remarquer qu'un léger décalage est apparu entre la position de la bille sans et avec l'application d'aberration (Figure 3.2.3 (b)). Celui-ci, d'environ un micromètre, est du même ordre de grandeur que le diamètre des billes utilisées. Ainsi, il est clair que l'introduction de coma sur le front d'onde entraîne l'apparition d'un tip lors de la focalisation de celui-ci.

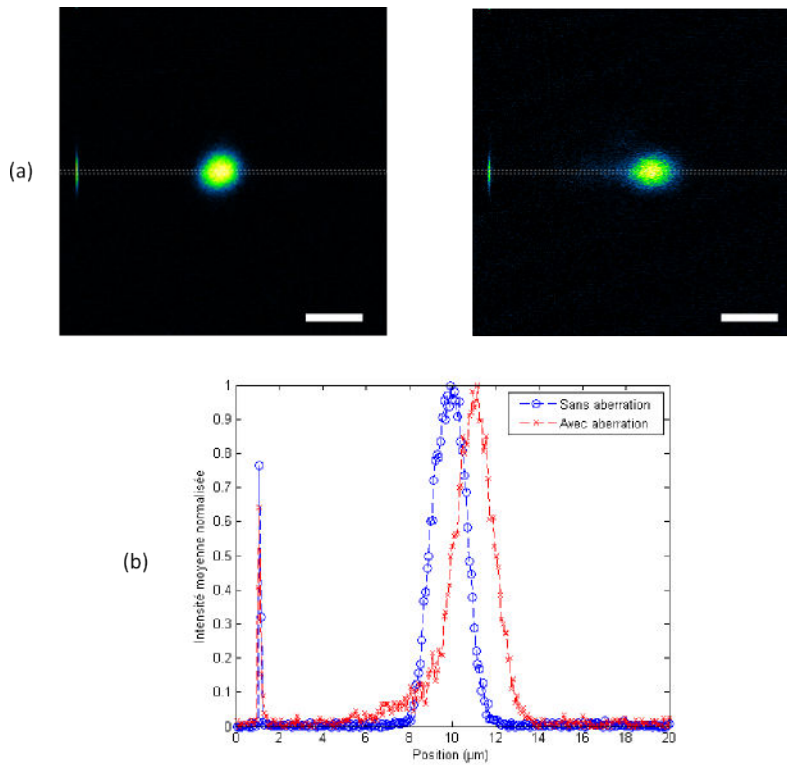


FIGURE 3.2.3 – (a) Image d’une microbille de 1 μm de diamètre dans le cas sans aberration (à gauche) et en présence de 1,5 radians (soit 100 nm) de coma (à droite). Echelle 3 μm (b) Profil d’intensité des deux cas présentés calculé en réalisant la moyenne des pixels présents dans la zone délimitée en pointillés

Une solution proposée par Débarre et al [5] consiste à créer une nouvelle base orthogonale en partant de celle des polynômes de Zernike. En effet, il est possible de définir, via des mesures de la métrique, les couplages présents entre différents modes en les testant deux à deux. Pour cela, il est nécessaire d’appliquer une perturbation donnée par :

$$Z = \alpha Z_a + \beta Z_b \quad (3.2.1)$$

avec

$$\alpha = \cos\theta \quad (3.2.2)$$

$$\beta = \sin\theta \quad (3.2.3)$$

où (Z_a, Z_b) sont deux modes différents de la base des polynômes de Zernike et (α, β) sont les amplitudes variables suivant la relation de conservation $\alpha^2 + \beta^2 = 1$.

En représentant les valeurs de M mesurées dans un graphique circulaire, il est possible de définir trois cas de figure :

- Les valeurs représentent un cercle
- Les valeurs décrivent une ellipse orientée selon l’axe x ou l’axe y (angle de 0° ou de 90°)
- Les valeurs forment une ellipse orientée d’une autre manière

Les deux premiers cas correspondent à des configurations où les modes testés ne sont pas soumis à des couplages. L'orientation de l'ellipse selon un axe ou l'autre indique que l'un des modes possède un poids plus important que l'autre dans la configuration expérimentale. Le cas circulaire, quant à lui, montre que les deux modes ont le même effet sur la métrique. Enfin, le troisième cas met en évidence la présence de couplages caractérisée par une orientation de l'ellipse selon un angle différent de 0° ou de 90° .

Ainsi, en définissant ces couplages entre tous les modes que nous souhaitons utiliser, il est possible de construire une matrice de couplages. On peut alors créer une nouvelle base issue de la diagonalisation de celle-ci. Cette base devra être orthogonale et composée de nouveaux modes Z^* issus de combinaisons linéaires des précédents modes de Zernike et des valeurs propres de la matrice diagonalisée.

Dans la Figure 3.2.4 sont présentés des exemples de séries de mesures pour trois modes différents. On constate l'existence de couplages entre les modes testés (Figure 3.2.4 (a) et (b)) car les mesures réalisées, une fois représentées, forment une ellipse orientée selon un angle d'environ quarante-cinq degrés. Cela se traduit également lorsqu'on représente la matrice de couplages entre ces trois modes. En effet, celle-ci possède des valeurs différentes de zéro sur les emplacements qui ne se trouvent pas sur la diagonale de la matrice.

Lorsqu'on définit la nouvelle base orthogonale (Figure 3.2.4 (c) et (d)), les mesures de la métrique forment des ellipses correctement orientées. De plus, la matrice de couplages est redevenue une matrice diagonale avec des valeurs différentes de zéro uniquement sur la diagonale. Ainsi, la réorthogonalisation des trois modes de Zernike a permis de définir de nouveaux modes de déformation totalement découplés les uns des autres.

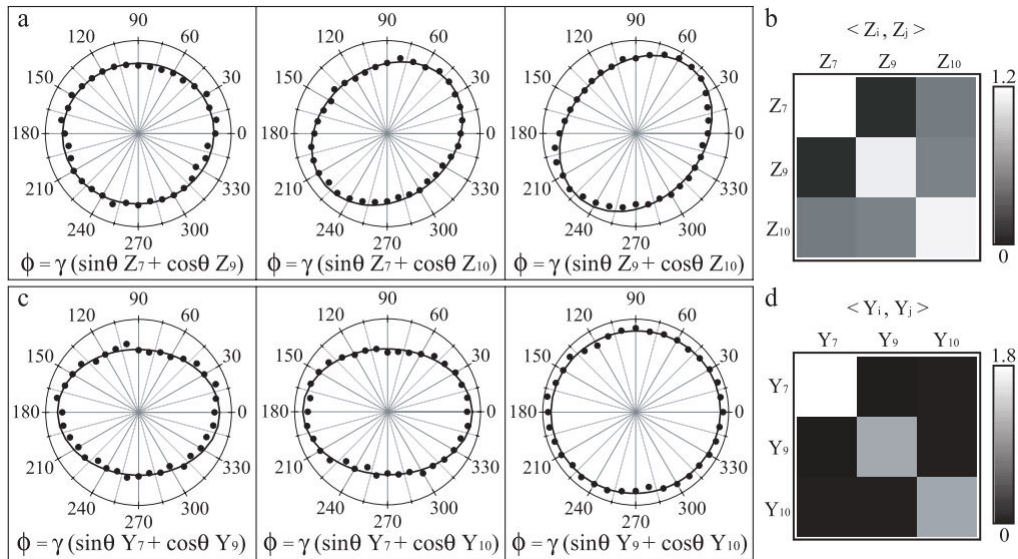


FIGURE 3.2.4 – (a) et (b) Tracés circulaires de la métrique en fonction des différents modes utilisés et représentation de la matrice de couplages entre ceux-ci avant réorthogonalisation. (c) et (d) Cas après réorthogonalisation [5]

Cette méthode est sûrement l'approche la plus précise et la plus efficace pour supprimer les couplages résiduels entre les différents modes de Zernike. Seulement, réorthogonaliser la base nécessite de quantifier proprement les couplages entre chaque mode que l'on souhaite utiliser. Cela implique donc de recalculer la nouvelle base dès lors que l'on modifie les modes

testés.

Afin de diminuer l'impact d'éventuels couplages entre les différents modes de la base des polynômes de Zernike, une méthode plus classique a été employée. Nous avons en effet choisi d'avoir recours à une approche itérative de la procédure d'optimisation de manière à réduire les couplages à chaque répétition [4]. Pour réaliser cela, la forme calculée durant l'itération précédente sera utilisée comme nouvelle forme de départ de la boucle et permettra ainsi de converger vers une solution optimale de correction des aberrations optiques.

La question restante est donc : combien d'itérations seront nécessaires pour atteindre une correction acceptable mais également quel est le nombre de mesures par mode le plus rentable dans nos conditions ?

A cet effet, nous avons réalisé sur un échantillon unique (microbilles de 1 μm de diamètre déposées sur une lamelle de verre) plusieurs cycles d'optimisation en modifiant le nombre de mesures réalisées pour chaque mode testé. Comme l'échantillon est peu aberrant (seules les aberrations introduites par le système optique et éventuellement par la lamelle interviennent), il est possible de quantifier celles-ci assez facilement.

Pour évaluer l'impact de notre correction, nous avons choisi de calculer la moyenne quadratique des amplitudes des différents modes utilisés. L'expression de cette grandeur est :

$$X = \sqrt{\frac{1}{N} \sum (x_{DM0} - x_i)^2} \quad (3.2.4)$$

où N est le nombre de modes testés durant les optimisations, x_i correspond à une amplitude d'un mode et x_{DM0} l'amplitude de référence du même mode.

Dans la Figure 3.2.5 sont illustrées les valeurs normalisées de la moyenne quadratique pour toutes les configurations en fonction du nombre d'itérations.

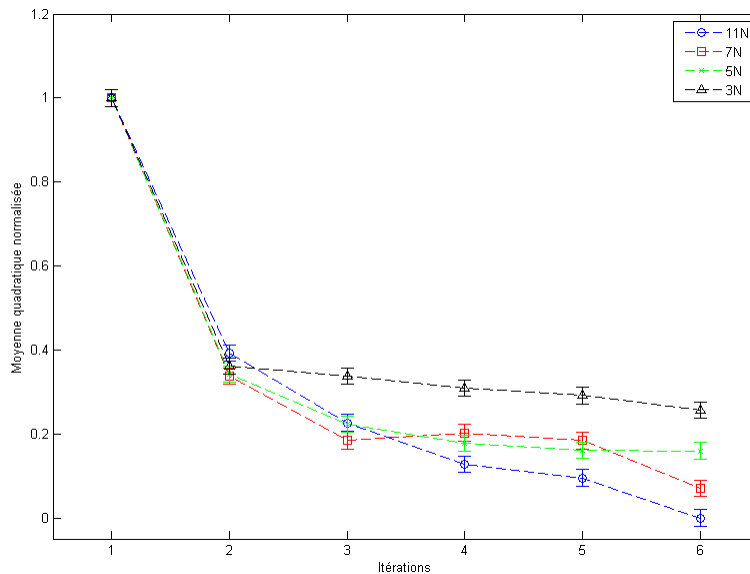


FIGURE 3.2.5 – Courbes de convergence de la moyenne quadratique normalisée des corrections pour différents nombres de mesures par mode : $11N$, $7N$, $5N$ et $3N$ en fonction du nombre d'itérations de celles-ci. L'état initial de chaque test est identique et correspond à une forme du miroir à plat. La référence avec laquelle a été calculée notre grandeur correspond aux amplitudes définies avec la méthode $11N$ au bout de six itérations. C'est pour cette raison que seule cette méthode atteint zéro

On peut noter que quelque soit le nombre de mesures effectuées, toutes les méthodes permettent un convergence d'environ 70% dès la première itération. C'est à partir de la seconde itération que les différences apparaissent entre les méthodes testées.

Pour le cas de $3N$ mesures, il y a peu d'évolution. En effet, on remarque qu'à chaque itération, cette méthode converge très lentement en comparaison des autres séries. Pour les cas où l'on effectue $11N$, $7N$ et $5N$ mesures, on observe un gain supplémentaire d'environ 10% à la seconde itération. Au bout de six itérations, un nombre élevé de mesures donne lieu à une valeur plus proche de celle de référence.

Cependant, pour ces expériences, nous ne pouvons pas nous permettre de faire autant de mesures ni d'itérations. Ainsi, au regard des résultats, nous avons choisi d'effectuer nos optimisations avec $5N$ mesures en réalisant systématiquement trois itérations. Néanmoins, si les contraintes expérimentales l'autorisent (durée de la phase d'optimisation non critique), le recours à $11N$ mesures aura lieu avec au moins trois itérations.

3.2.3 Impact de certains modes dans le volume, doit-on les garder ?

Lorsqu'on souhaite travailler à des profondeurs importantes dans des échantillons biologiques, l'utilisation des polynômes de Zernike engendre quelques inconvénients. En effet, certains modes de la base amènent à des modifications du champ d'imagerie. Ceux-ci sont le tip ($Z=2$), le tilt ($Z=3$) et le défocus ($Z=5$). Les deux premiers causent respectivement la translation du champ selon les axes x et y , quant au dernier il introduit une modification directe du plan d'imagerie (axe z). Ces modes ne doivent donc pas être utilisés dans le cadre d'une optimisation automatique.

Cependant, les couplages entre les différents modes peuvent entraîner l'introduction détournée de tip, tilt ou défocus et modifier ainsi le champ d'imagerie. Dans la Figure 3.2.6 est représenté un exemple de dérive du champ d'imagerie.

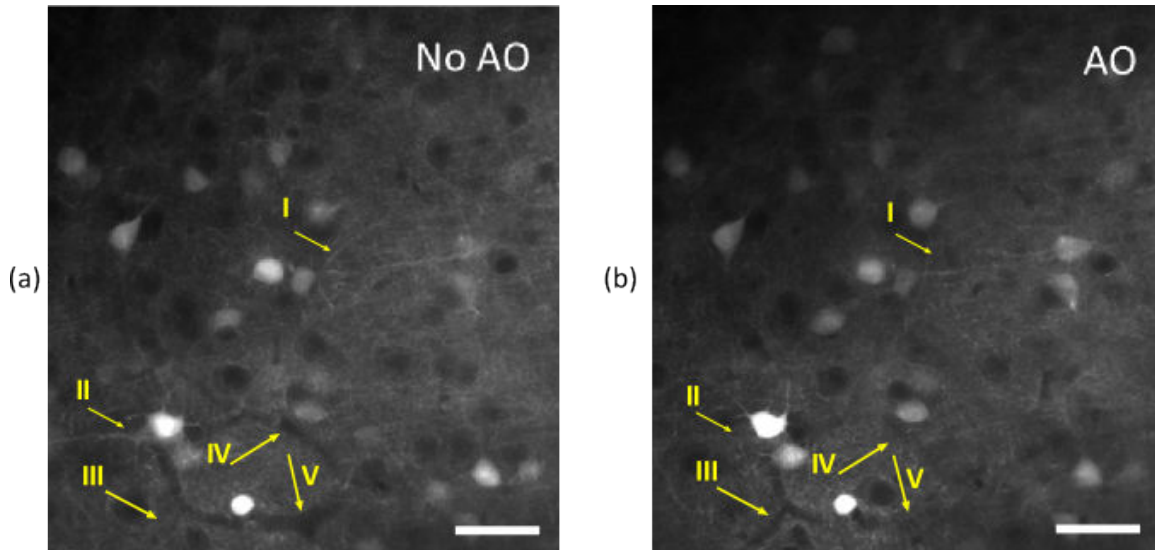


FIGURE 3.2.6 – Images d'un champ de $400 \mu\text{m}^2$ réalisées à $200 \mu\text{m}$ de profondeur dans une tranche de cerveau sans correction (a) et après optimisation des aberrations optiques (b). On peut remarquer que certains éléments diffèrent d'une image à l'autre. L'application de la correction a introduit une dérive du champ imagé entraînant l'apparition ou la disparition de structures comme des dendrites (I & II) ou des vaisseaux sanguins (III, IV & V). Echelle $40 \mu\text{m}$

Pour compenser cet effet, Facomprez et al [4] proposèrent une méthode basée sur une quantification précise de ces translations et la compensation de celles-ci par l'application de tip, de tilt et de défocus en quantité adaptée.

Dans la Figure 3.2.7 sont représentées les différentes étapes de la méthode. Pour quantifier ces translations, la méthode utilisée consiste à calculer la corrélation entre une image sans aberration et une autre avec une amplitude connue de l'aberration à tester (Figure 3.2.7 (a)). En appliquant plusieurs amplitudes différentes, il est possible de quantifier précisément la translation de l'image selon les deux axes en mesurant le maximum de la corrélation. En représentant la distance selon chaque axe en fonction de l'amplitude de déformation, on obtient des droites correspondant aux translations de l'image. En calibrant de la même manière les effets du tip et du tilt (Figure 3.2.7 (b) et (c)), on peut définir la quantité exacte de ces deux modes à appliquer pour que lors de l'utilisation de l'aberration testée, celle-ci n'introduise plus de translation dans le plan (Figure 3.2.7 (d)). De la même manière, il est possible d'avoir recours à cette méthode pour les déplacements selon l'axe z en testant cette fois-ci le défocus.

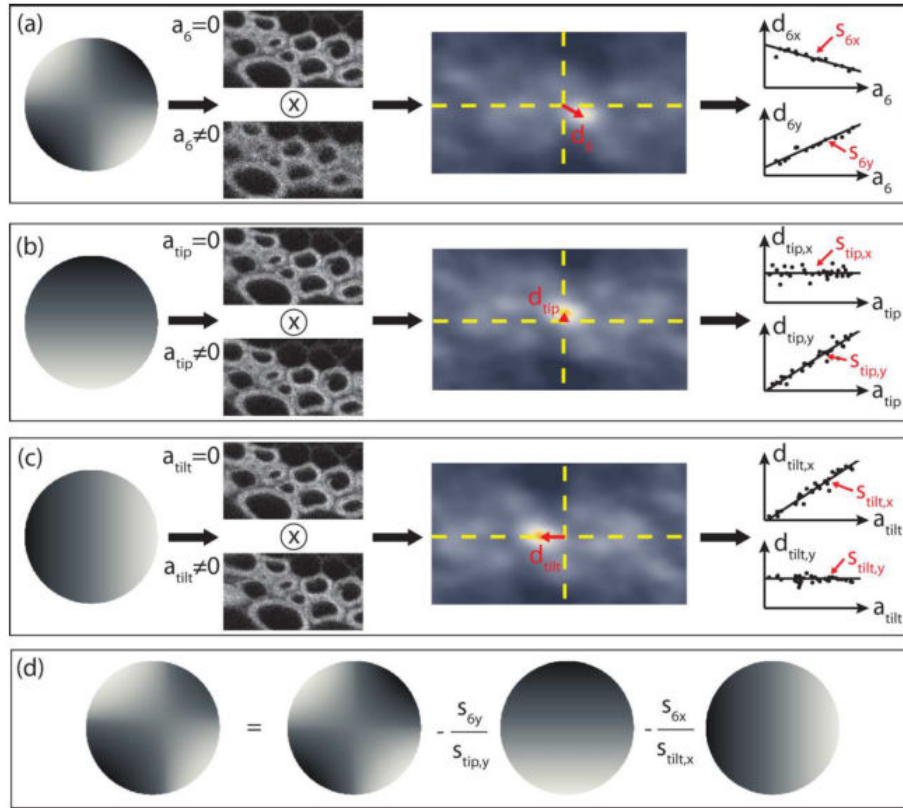


FIGURE 3.2.7 – Exemple de compensation des translations du champ d'imagerie introduites par l'ajout d'astigmatisme. (a) Détermination des déplacements introduits par différentes amplitudes de l'astigmatisme par calcul de la corrélation entre l'image sans aberration et les images aberrées permettant de définir les coefficients de translation s_{6x} et s_{6y} . (b) et (c) Réalisation du même protocole pour les aberrations tip et tilt donnant accès au coefficient $(s_{tip,x}, s_{tip,y})$ et $(s_{tilt,x}, s_{tilt,y})$. (d) Forme finale de l'astigmatisme corrigé correspondant à une association de l'astigmatisme original auquel est ajoutée une certaine quantité de tip et de tilt permettant de supprimer des translations du champ [4]

Cette méthode est très efficace pour empêcher une dérive "physique" du champ d'imagerie. Cependant, celle-ci ne prend pas en compte un dernier élément pouvant poser problème. Il s'agit d'un éventuel allongement axial de la PSF causé par certaines aberrations.

Dans la Figure 3.2.8 sont exposés différents exemples issus de simulations et d'expériences mettant en évidence ce problème d'agrandissement de la PSF. Dans le premier cas (Figure 3.2.8 (a)), une simulation d'une PSF (réalisée à l'aide du microscope numérique développé par l'équipe HRA) est effectuée en appliquant l'aberration sphérique du premier ordre et du second ordre avec des amplitudes différentes. On constate la présence de couplages entre les deux modes. On note enfin la translation selon l'axe z de la PSF lorsque les amplitudes augmentent s'accompagnant d'un agrandissement de la taille de celle-ci.

Ainsi, il est possible d'observer des objets éloignés du plan d'imagerie initial en effectuant une simulation (comme représenté dans la Figure 3.2.8 (b)) mais également de manière expérimentale (Figure 3.2.8 (c) et (d)). Pour les cas (b) et (c), l'application d'aberration sphérique (-1,7 radians pour (b) et -1,5 radians pour (c)) permet d'atteindre et d'imager une microbille située à environ 9 μm du champ d'imagerie initial. Dans le cas expérimental (d),

il s'agit d'un exemple mettant en évidence ce problème de dérive. En effet, si l'on positionne une microbille à environ $9 \mu\text{m}$ du plan d'imagerie (en pointillés sur la figure), il n'est pas possible d'observer celle-ci sans "optimisation". Cependant, après seulement trois cycles de correction, on arrive à imager notre bille sans avoir déplacé l'échantillon. On voit également dans l'exemple présenté que l'application des aberrations à complètement déformé la PSF entraînant ainsi une forte dégradation de la résolution axiale de celle-ci.

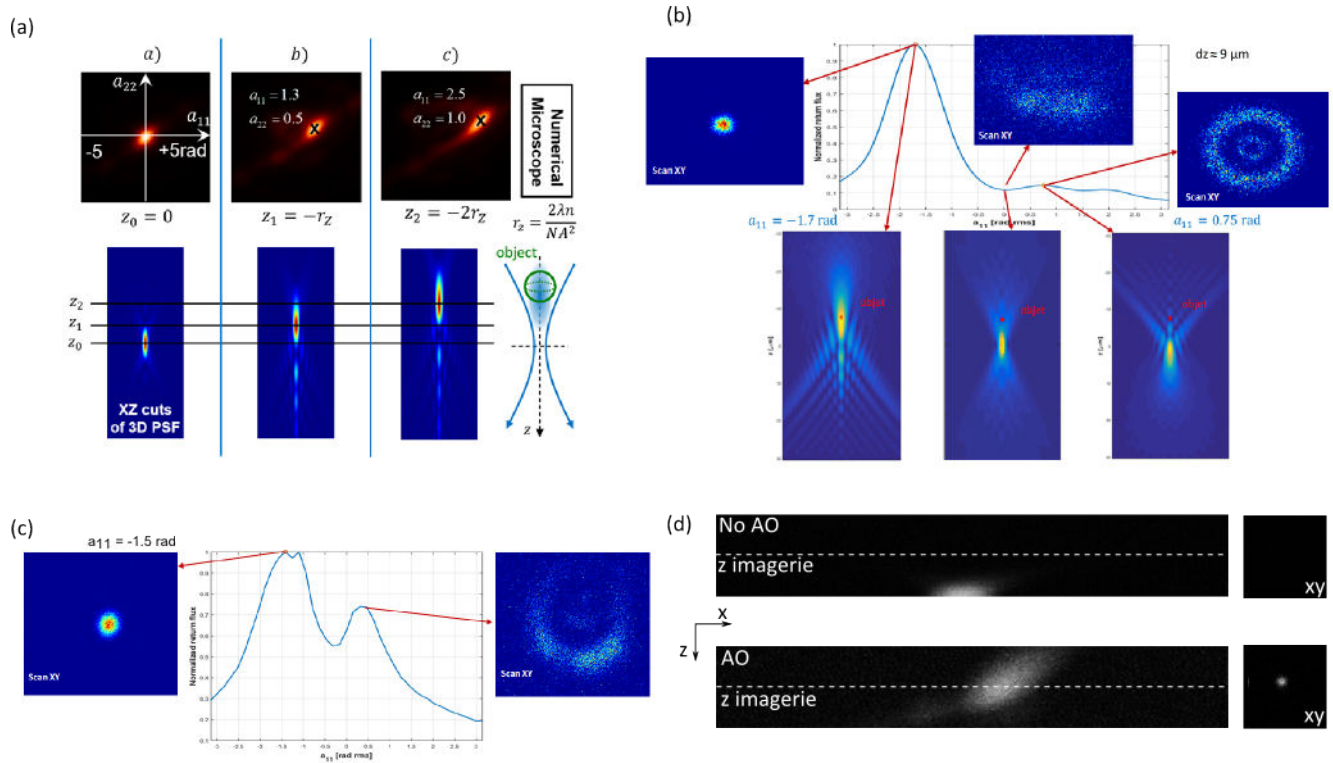


FIGURE 3.2.8 – Exemples numériques et expérimentaux mettant en évidence un allongement axial de la PSF. (a) et (b) Simulations montrant la translation et la déformation de la PSF le long de l'axe et dans le plan par l'ajout d'aberrations sphériques. (a) Ajout d'aberrations sphériques du premier et du second ordre. (b) Evolution du signal de fluorescence d'une bille située à $9 \mu\text{m}$ du plan d'imagerie en fonction de l'amplitude de l'aberration sphérique appliquée. (c) Reproduction expérimentale de la simulation (b), on arrive à détecter une microbille (diamètre $1 \mu\text{m}$) se trouvant à $9 \mu\text{m}$ du champ imagé. (d) Exemple de divergence d'une correction. Représentation de plans (x, z) de stacks d'images où une microbille a été positionnée à $9 \mu\text{m}$ du plan d'imagerie (défini par la ligne en pointillés) sans modification du front d'onde (No AO) et après trois cycles d'optimisation. On remarque que l'image de la bille est à nouveau dans le plan d'observation (x, y) néanmoins, son profil axial est totalement déformé par une application excessive d'aberrations avec le miroir

Pour contrecarrer ces problèmes liés à l'imagerie d'un échantillon 3D, il est possible d'imaginer une autre approche basée sur l'utilisation d'une métrique localement définie afin d'empêcher les dérives dues aux couplages et à l'allongement de la PSF. C'est dans ce but que nous avons développé notre méthode baptisée "locking".

3.2.4 Notre approche : la méthode locking

L'utilisation d'une métrique spatialement définie permet de compenser certains des désagrèments présentés précédemment. Effectivement, une telle métrique donne accès à une série de maxima locaux offrant des champs d'optimisation définis tout au long de l'échantillon. Ainsi, en se positionnant sur un de ces maxima locaux, on ne risque plus d'observer une dérive entraînant le déplacement du plan d'imagerie.

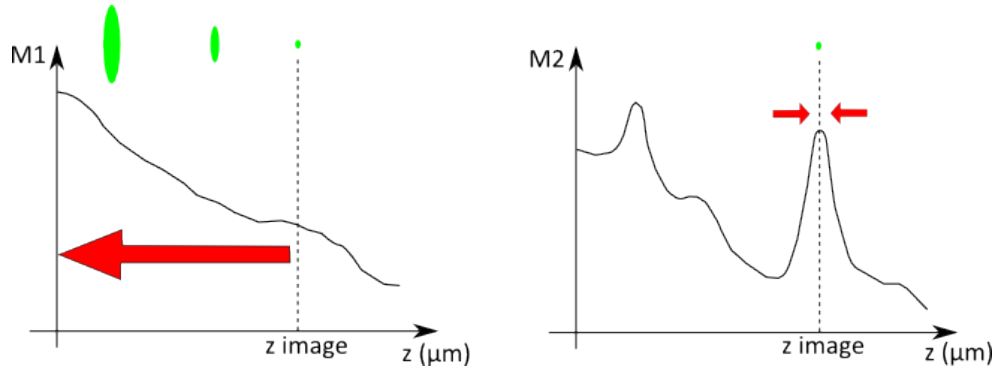


FIGURE 3.2.9 – L’emploi d’une métrique non résolue spatialement (M1), sans prise en compte de toutes les sources d’erreurs liées à la base des polynômes de Zernike, risque d’entraîner une translation du champ imagé (z image) vers des zones où cette métrique est naturellement plus intense. Cette translation est due à un déplacement physique et à un agrandissement de la PSF. L’utilisation d’une métrique spatialement résolue (M2) permet quant à elle de limiter tous ces problèmes du moment où l’on se positionne sur un maximum local. En effet, la valeur de M2 étant forcément plus petite autour de ce maximum, l’algorithme d’optimisation restera automatiquement verrouillé sur cette position. De cette propriété est issu le nom de notre méthode : "locking" soit "verrouiller" en français

En effet, sur un maximum local, nous empêchons toute dérive durant les optimisations car la valeur de la métrique est forcément plus faible de chaque côté et donc l’algorithme ne peut pas "diverger". Seulement, cette méthode ne supprime pas les inconvénients introduits par les couplages entre les différents modes utilisés.

C’est ainsi que nous avons choisi d’ajouter dans l’ensemble des modes testés le défocus (mode numéro 4) dont on ne devait normalement pas se servir. L’emploi de ce mode supplémentaire permet de réaliser des balayages autour du maximum de la métrique, de manière à compenser d’éventuelles translations du champ imagé le long de l’axe dues à des couplages résiduels entre les modes. Pour éviter que l’ajout d’un défocus supplémentaire (nécessitant une utilisation importante du stroke des segments) ne limite les possibilités dans l’application des autres modes, nous avons décidé d’introduire celui-ci dans le système non pas avec le miroir déformable mais avec la platine de translation en déplaçant directement l’échantillon.

Pour conclure, la méthode locking permet de réaliser la correction des aberrations optiques en profondeur dans des tissus biologiques. Basée sur l’utilisation de la méthode par reconstruction modale et d’une métrique spatialement résolue, elle permet d’obtenir des résultats rapides sans calibration et sans modification de la base des polynômes de Zernike. Cependant, pour cela, nous avons besoin d’une métrique possédant des maxima locaux pour

pouvoir appliquer notre méthode. Dans la partie suivante, nous aborderons donc les aspects liés à cette problématique et nous vous présenterons la métrique mise au point.

3.3 Les métriques

Un bon choix de métrique est indispensable lorsqu'on souhaite appliquer une approche modale de correction des aberrations optiques. On qualifie de métrique une grandeur pouvant être un signal physique ou encore un paramètre issu de l'analyse des images acquises. Celle-ci aide à la quantification des aberrations optiques présentes dans la portion d'échantillon étudiée.

Ainsi, il est clair qu'il existe autant de métriques que d'expériences. Néanmoins, certaines d'entre elles, très simples, peuvent être utilisées dans de nombreux cas et permettent une mise en place rapide d'outils de correction accessibles à tous. Dans cette section, nous allons aborder les différentes métriques que nous avons testées : nous commencerons par les métriques les plus élémentaires pour arriver à celle développée pour ce projet.

3.3.1 La moyenne

La première métrique employée consiste à optimiser l'intensité moyenne provenant de l'image. En effet, le contraste deux photons s'adapte particulièrement bien avec l'utilisation de cette métrique [6]. Pour rappel, l'intensité du signal de fluorescence I_f émis par effet deux photons est proportionnelle au carré de l'intensité d'excitation I_e , soit :

$$I_f \propto I_e^2 \quad (3.3.1)$$

Or, comme cela a été vu précédemment, l'intensité d'émission de fluorescence est dépendante de la qualité de focalisation. Une amélioration de la PSF, par le biais d'une diminution des aberrations optiques l'impactant, entraînera l'augmentation de l'intensité d'excitation et donc une amplification de l'intensité du signal de fluorescence généré.

De ce fait, utiliser l'intensité moyenne de l'image comme métrique d'optimisation semble être une approche valable en imagerie car une augmentation de celle-ci traduirait une diminution des aberrations optiques.

On va donc définir la métrique M_m correspondant à la moyenne de l'intensité d'une image acquise $I(i, j)$ composée de N pixels, comme étant :

$$M_m = \frac{1}{N} \sum_{i,j} I(i, j) \quad (3.3.2)$$

Cette métrique s'avère être très utile dans de nombreuses applications. Effectivement, celle-ci est très pratique lorsqu'on travaille avec des échantillons isolés et relativement fins tels que des cellules ou encore des billes de taille micrométrique.

Ainsi, dans la Figure 3.3.1 est représentée une séquence d'images d'une micro-bille soumise à une rampe d'amplitudes d'une déformation (aberration sphérique) générée via le miroir déformable. On peut voir que l'utilisation de la moyenne comme métrique d'optimisation est parfaitement adaptée à des échantillons comme les microbilles (Figure 3.3.1 (b)). Celle-ci rend facilement accessible les amplitudes optimales à appliquer par le biais de la méthode modale.

Elle est d'ailleurs la métrique que nous appliquerons lors de toutes les expériences basées sur l'utilisation de microbilles, comme notamment la calibration du système pour corriger les aberrations introduites par le système optique.

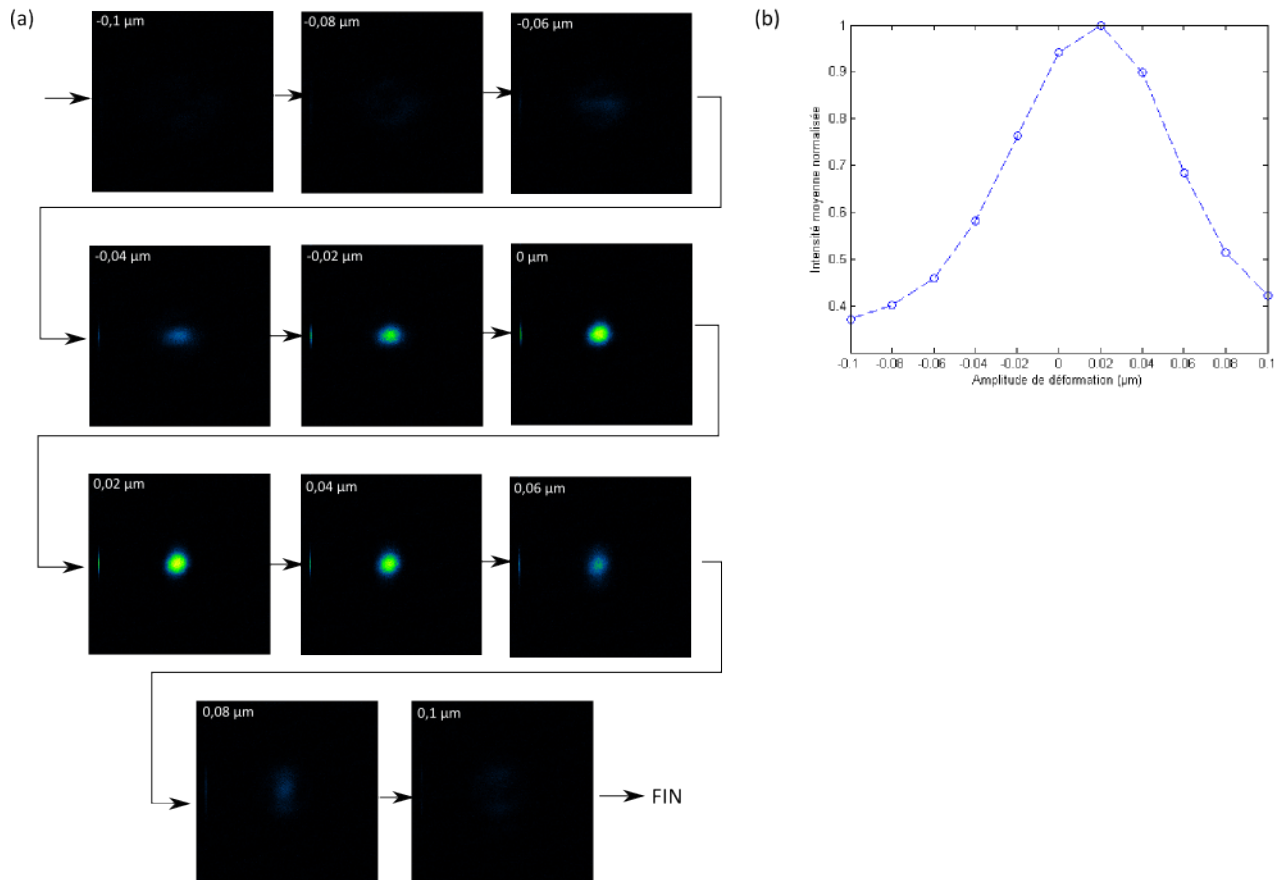


FIGURE 3.3.1 – (a) Séquence d’images acquises durant un cycle d’optimisation. Différentes valeurs d’amplitudes d’aberration sphérique sont appliquées au front d’onde. Echantillon : microbille de diamètre 1 μm , champ de 20 μm^2 . (b) Mesures de la valeur moyenne normalisée des images en (a). On peut observer l’évolution de cette métrique en fonction de l’amplitude de la perturbation appliquée (dans ce cas-ci de l’aberration sphérique) et voir que l’on passe bien par un maximum correspondant à une amplitude de 0,02 μm permettant d’améliorer la qualité de la PSF

Néanmoins, cette métrique possède des limitations majeures. Effectivement, en imagerie des tissus, la structure des échantillons fait que la qualité optique des images acquises se dégrade fortement lorsqu’on s’enfonce dans le tissu : la diffusion entraîne alors la génération d’un signal de fond venant s’ajouter au signal de fluorescence. Ainsi, le problème lié à l’utilisation de l’intensité moyenne comme métrique est la prise en compte de ce signal de fond dans le calcul de celle-ci. Cela risquerait de pousser l’algorithme à tenter d’optimiser le signal issu de la diffusion ou provenant de plans hors focus plutôt que la fluorescence provenant directement des cellules. En effet, comme nous avons pu le voir dans la partie précédente, certains modes introduisent de fortes déformations axiales. De plus, la qualité de focalisation (et donc de génération de fluorescence) est intrinsèquement liée à la position dans l’échantillon où est réalisée l’image. L’absorption impliquant une diminution constante

du signal moyen en fonction de la profondeur (Figure 3.3.2), le risque majeur est donc que l’algorithme d’optimisation dérive (nous appelons cela la divergence de la correction). Cette divergence entraîne une modification du plan d’imagerie par le biais d’une surdéformation (agrandissement axial) de la PSF.

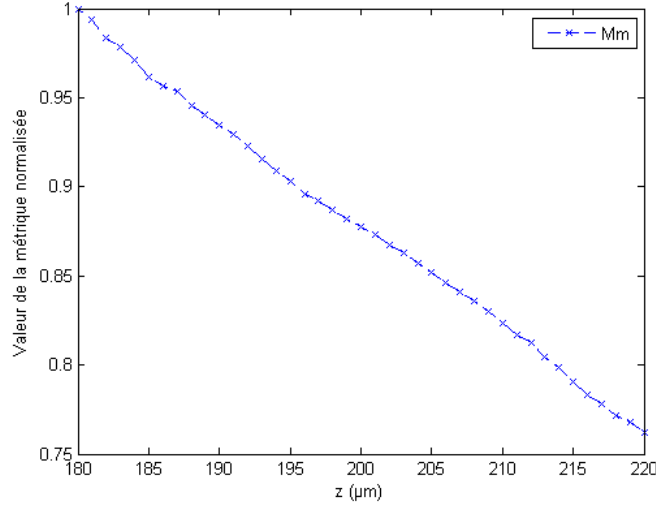


FIGURE 3.3.2 – Evolution de la valeur moyenne M_m des images d’un stack volumique de 40 μm d’épaisseur centré à 200 μm de profondeur

De ce fait, même si l’utilisation de l’intensité moyenne est clairement une approche valable en optique adaptative, celle-ci n’est pas adaptée à notre méthode locking dans des échantillons 3D car elle ne possède pas de maxima locaux. Elle demeurera néanmoins employée dans notre cas pour des applications liées à la calibration du système.

3.3.2 La variance

Comme la moyenne n’est pas applicable dans nos échantillons biologiques et pour notre méthode, nous nous sommes intéressés à un autre paramètre directement issu de l’analyse de l’image acquise : la variance. En effet, celle-ci n’étant pas liée au niveau de signal dans le champ imagé mais à son contraste, nous espérons observer des variations plus locales de la métrique étant donné que certaines zones sont moins peuplées en neurones que d’autres.

Nous avons donc défini la métrique M_v comme étant la variance de l’image enregistrée $I(i, j)$ et calculée comme :

$$M_v = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i,j} (I(i, j) - \langle I \rangle)^2}}{\sum_{i,j} I(i, j)} \quad (3.3.3)$$

où $\langle I \rangle$ correspond à la valeur moyenne de $I(i, j)$ et N est le nombre total de pixels qui composent l’image.

Dans la Figure 3.3.3 est représentée l’évolution de la variance dans le même stack d’images qui nous a servi précédemment à calculer la moyenne (celle-ci y est d’ailleurs également représentée). On remarque clairement qu’il y a une différence de comportement entre les deux métriques. En effet, là où la valeur moyenne décroît linéairement au fur et à mesure que

l'on s'enfonce dans le tissu, on observe une augmentation de la variance autour des 200 μm de profondeur. Cette augmentation traduit la présence d'objets plus fluorescents entraînant l'amélioration du contraste.

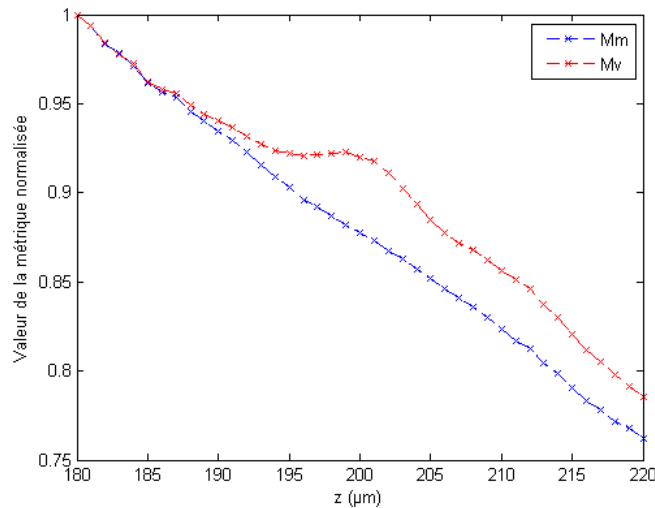


FIGURE 3.3.3 – Evolution de la valeur moyenne M_m ainsi que de la variance M_v des images du stack

Cependant, l'amplitude de cette variation est très faible et rend donc difficile l'utilisation de cette métrique dans nos conditions. En effet, en calculant la variance, nous prenons en compte la totalité des composantes fréquentielles de l'image. Nous donnons ainsi autant d'importance aux éléments qui n'apportent aucune information : comme le marquage global de l'échantillon et le signal hors focus (basses fréquences spatiales) ainsi que les dendrites et axones (hautes fréquences spatiales) qu'aux objets d'intérêt les neurones (et plus particulièrement leur soma c'est-à-dire le corps des neurones) ; ceci réduisant l'impact de l'utilisation de cette métrique.

Le calcul de la variance comme métrique semble donc bonne dès lors que le contraste des images est suffisant. Nous avons donc décidé de l'associer à une méthode de filtrage spatial afin d'améliorer son efficacité par l'obtention d'un contraste spécifique aux objets étudiés.

3.3.3 La wavelet

Comme nous avons pu le voir avec l'étude de la variance, la prise en compte de la totalité des composantes fréquentielles dans l'image réduit potentiellement l'efficacité de la métrique. Par conséquent, nous avons appliqué un filtrage fréquentiel sur les images acquises. Le but est de diminuer l'importance des éléments du champ qui ne nous intéressent pas et nous concentrer ainsi uniquement sur nos objets d'intérêt : le soma des neurones.

Pour arriver à cela, nous nous sommes servis d'une méthode employée lors de l'analyse des données des expériences *in vivo* réalisées par nos collaborateurs de l'INMED. Cette méthode, appelée reconnaissance de formes (de l'anglais pattern recognition technique), permet de mettre en évidence des objets présents dans les images acquises dont la dimension spatiale correspond à celle définie par l'utilisateur. Ainsi, grâce à cette méthode, il est possible de mettre en évidence tous les neurones présents dans le champ d'imagerie afin de pouvoir

facilement les suivre dans le temps.

Pour réaliser ce filtrage, la méthode consiste à convoluer l'image avec un anneau gaussien dont le rayon r_0 et la largeur σ seront choisis par l'utilisateur. On peut donc définir $I_{Wav}(i, j)$, l'image obtenue par le filtrage de l'image $I(i, j)$ avec la méthode wavelet, comme :

$$I_{Wav}(i, j) = FT^{-1} \left[FT [I(i, j)] \times e^{-\frac{(r-r_0)^2}{\sigma^2}} \right] \quad (3.3.4)$$

De manière plus synthétique, une représentation schématique de ce filtrage est présentée dans la Figure 3.3.4.

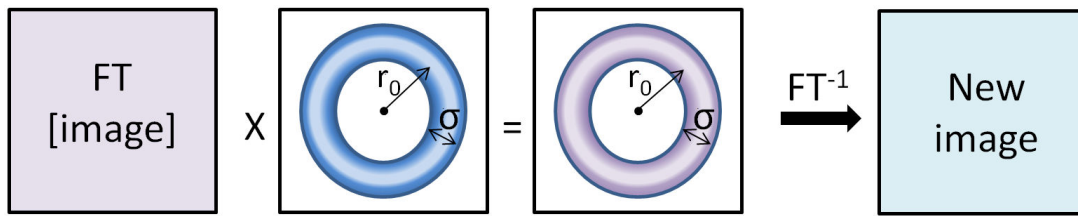


FIGURE 3.3.4 – Pour réaliser le filtrage de nos images, nous appliquons à la transformée de Fourier de celles-ci un filtre ayant la forme d’un anneau ayant un profil gaussien. Cela amène à l’obtention d’un nouveau spectre qui donnera notre image filtrée après la réalisation de la transformée inverse. Les dimensions de l’anneau définies par les paramètres (r_0, σ) permettent de sélectionner une plage de fréquences spatiales correspondant aux objets présents dans l’image

La dernière étape nécessaire pour utiliser cette méthode est le choix des paramètres (r_0, σ) entraînant la sélection de nos objets d’intérêt. Dans notre cas, le soma des neurones étant les éléments que nous souhaitons visualiser, nous avons défini nos valeurs de (r_0, σ) de manière à sélectionner les fréquences spatiales de ceux-ci. Pour cela, nous avons opéré de manière empirique en testant différents couples de valeurs afin d’obtenir une image filtrée avec un niveau de détail des somas suffisamment bon. Le couple $(10, 10)$ correspond ainsi aux valeurs permettant de distinguer clairement les somas tout en supprimant les détails plus petits dans l’image présents pour une valeur supérieure à $\sigma = 10$ (Figure 3.3.5 (a)). Il est enfin possible d’appliquer ce filtrage à de grandes profondeurs mettant en évidence les neurones présents dans le champ imagé, notamment à $400 \mu\text{m}$ de profondeur où l’image non filtrée était très bruitée à cause de la diffusion du tissu (Figure 3.3.5 (c)).

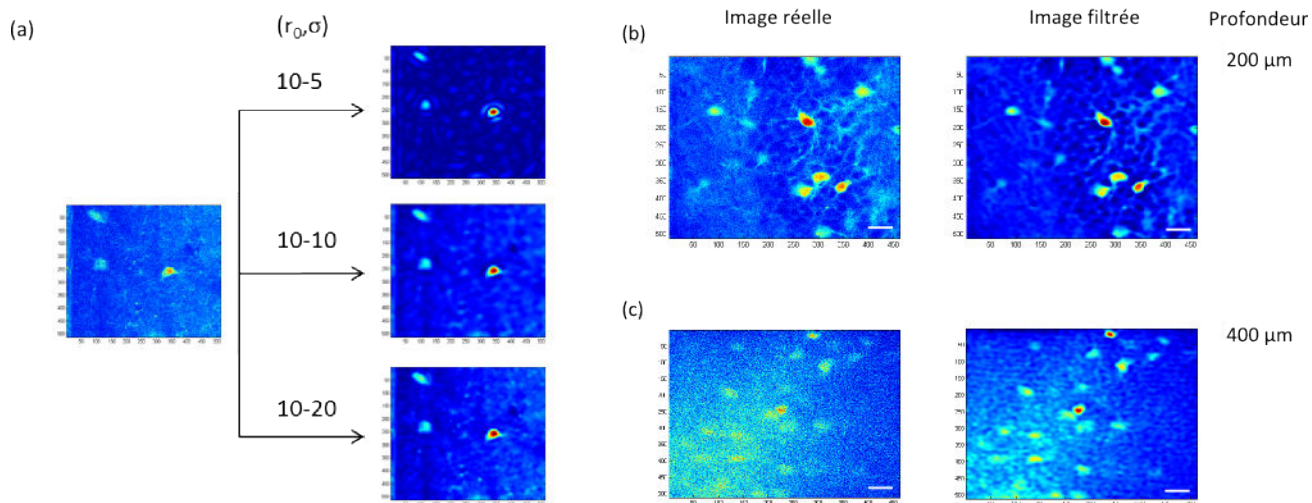


FIGURE 3.3.5 – (a) Représentation d’une série d’images filtrées pour différentes valeurs de (r_0, σ) . On peut remarquer que selon la valeur de σ , la résolution de l’image filtrée varie. Pour une grande valeur de σ ($\sigma = 20$), il est possible de distinguer l’apparition de petits détails alors que pour une valeur faible ($\sigma = 5$), cela entraîne la génération d’ondulations déformant l’image. C’est ainsi que le choix des paramètres (r_0, σ) a été fixé à $(10, 10)$ pour nos applications. (b) et (c) Exemples du filtrage sur des images prises à (b) $200 \mu\text{m}$ et (c) $400 \mu\text{m}$ de profondeur. Champs de $400 \mu\text{m}^2$, barre d’échelle = $40 \mu\text{m}$

Maintenant que nous avons réussi à mettre en place un filtrage efficace permettant la mise en évidence des neurones présents dans les images réalisées, nous allons étudier la variance de ces nouvelles images.

3.3.4 La métrique finale

Comme nous l’avons vu précédemment, l’utilisation de la variance semblait être une approche valable mais le contraste des images acquises limitait fortement son efficacité. C’est dans ce but que nous avons choisi de filtrer nos images de manière à mettre en avant les somas.

Dans cette section, nous allons donc voir si l’utilisation de la variance combinée à notre filtrage wavelet permet d’obtenir un meilleur contraste entre les zones peuplées et les autres, le tout indépendamment de la position dans l’échantillon.

Nous allons donc définir la nouvelle métrique M_{Wav} correspondant à la variance (équation 3.3.3) mais cette fois-ci appliquée aux images filtrées $I_{Wav}(i, j)$:

$$M_{Wav} = Var(I_{Wav}(i, j)) = \frac{\sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i,j} (I_{Wav}(i, j) - \langle I_{Wav} \rangle)^2}}{\sum_{i,j} I_{Wav}(i, j)} \quad (3.3.5)$$

Dans la Figure 3.3.6 (a) est présentée l’évolution de la nouvelle métrique M_{Wav} en fonction de la profondeur pour le même stack d’images utilisées pour les métriques précédentes.

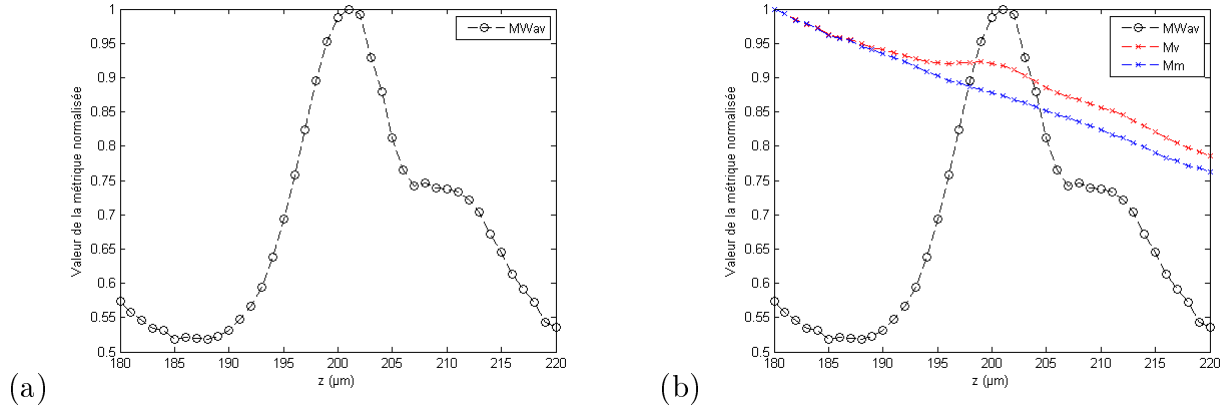


FIGURE 3.3.6 – (a) Evolution de la métrique wavelet M_{Wav} des images du stack et (b) comparaison de celle-ci avec les deux métriques M_m et M_v précédemment calculées

On peut noter que l'utilisation combinée de notre filtrage fréquentiel avec le calcul de la variance rend la détermination de la zone peuplée beaucoup plus facile avec un contraste très important (i.e la différence entre la valeur maximale de la métrique et sa base). Ceci est d'autant plus flagrant lorsqu'on compare le comportement de cette métrique avec les deux précédentes (Figure 3.3.6 (b)). Ainsi, on constate que la position du pic principal de M_{Wav} se situe à la même profondeur que M_v . Seulement, le contraste de celle-ci est d'à peine quelques pourcents alors que M_{Wav} atteint 50% de différence entre sa valeur maximale et minimale.

Il est enfin possible de comparer le comportement des trois métriques (décrites dans cette partie) en présence de différentes amplitudes d'aberrations optiques, comme c'est le cas durant une optimisation. Dans la Figure 3.3.7 sont décrits trois exemples d'évolution de la moyenne, de la variance et de la wavelet lorsqu'on applique du défocus (via la platine de translation), de l'astigmatisme et de l'aberration sphérique. Ainsi, on peut clairement constater que la moyenne est systématiquement moins contrastée que la variance et la wavelet. Pour le cas du défocus, on voit clairement le problème lié à l'utilisation de cette métrique dans des échantillons épais, celle-ci augmentant de manière monotone vers les couches les plus proches de l'interface. En ce qui concerne la variance des images et de notre nouvelle métrique, on peut noter qu'elles ont un comportement similaire si ce n'est que la wavelet à un contraste bien plus important comme cela était recherché .

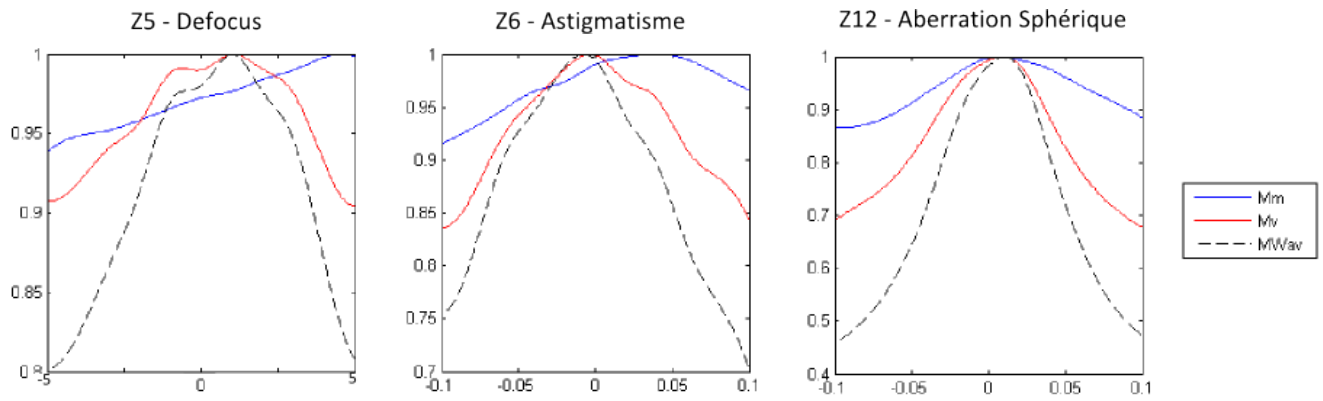


FIGURE 3.3.7 – Evolution des métriques normalisées (moyenne M_m , variance M_v et wavelet M_{Wav}) soumises à différentes amplitudes de trois aberrations : le défocus (à gauche), l’astigmatisme (au centre) et l’aberration sphérique (à droite). Les amplitudes appliquées sont pour le défocus des translations micrométriques de l’échantillon le long de l’axe optique avec la platine piézoélectrique. Pour l’astigmatisme et l’aberration sphérique, les commandes des amplitudes sont en micromètres ce qui revient à des amplitudes de $[-1,5 : 1,5]$ radians

Maintenant que nous avons vu la sensibilité et le contraste apportés par la nouvelle métrique d’optimisation, la dernière chose qui reste à vérifier est le comportement de celle-ci lorsqu’on applique des modifications au front d’onde. Nous avons en effet besoin d’une métrique sensible aux variations introduites pendant les boucles d’optimisation.

Ainsi, dans la Figure 3.3.8 sont représentées les courbes d’évolution de la métrique wavelet M_{Wav} pour le même stack d’images avant ($M_{Wav} \text{ uncorrected}$) et après ($M_{Wav} \text{ corrected}$) correction des aberrations optiques. On constate que le gain apporté par la correction a entraîné une amélioration d’environ 25% de la valeur maximale de la métrique à la profondeur où l’optimisation a été réalisée. Cela nous montre donc la sensibilité de notre métrique aux variations du front d’onde la rendant donc utilisable.

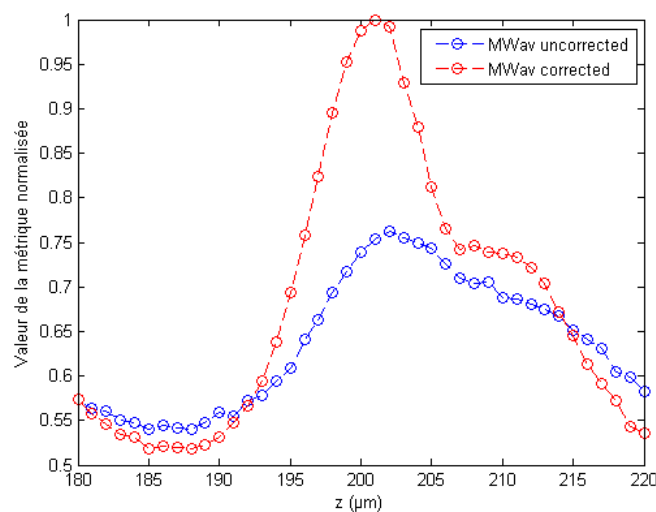


FIGURE 3.3.8 – Comparaison entre la métrique wavelet avant et après correction dans une tranche de cerveau à $200 \mu\text{m}$ de profondeur. Plan d’optimisation à environ $200 \mu\text{m}$

Pour conclure, nous avons mis au point une métrique basée sur la combinaison du calcul de la variance des images acquises sur lesquelles nous avons appliqué un filtre fréquentiel afin de sélectionner les objets d'intérêt dans le champ : les neurones. Cela nous a ainsi permis d'effectuer la sélection des champs à imager de manière plus précise.

De cette manière, cela nous garantit la présence de ces cellules et diminue le risque de dérives durant les cycles de corrections, le tout en gardant une sensibilité importante aux modifications apportées au front d'onde pour effectuer la correction de celui-ci à de grandes profondeurs.

3.4 Discussion sur la méthode locking

Nous avons donc mis au point une méthode de correction des aberrations optiques utilisant une métrique d'optimisation échantillon dépendante donnant accès à des maxima locaux dans les échantillons testés. Ainsi, en réalisant les différentes itérations de la séquence d'optimisation sur un de ces maxima, les risques de dérive du plan d'imagerie ou d'augmentation du volume focal sont minimisés.

De ce fait, quelque soit la taille du champ, il est toujours possible d'avoir un maximum local via l'ajustement de celui-ci autour des objets d'intérêt (en réajustant les paramètres du filtre). Néanmoins, cette métrique est limitée lorsque la population de ces objets est beaucoup trop dense comme dans la couche pyramidale de CA1 où les cellules collées les unes aux autres forment un continuum. Pour palier à cela, il sera possible de se positionner à un maximum se situant à la limite de la zone posant problème. Ainsi, après optimisation, il sera possible de revenir dans le plan d'intérêt initial. Seulement, pour que cela soit réalisable, il sera nécessaire de quantifier la plage d'efficacité volumique que possède une correction de manière à connaître les limites d'application de celle-ci.

Cette problématique sera abordée dans le chapitre suivant où une étude de l'efficacité de la méthode locking sera réalisée sur différents types d'échantillons.

Bibliographie

- [1] Zernike F., Beugungstheorie des Schneidenverfahrens und Seiner Verbesserten Form, der Phasenkontrastmethode, *Physica*, 1934, Vol. 1, Issue 8, 689–704
- [2] Neil M., Booth M. J. and Wilson T., New modal wave-front sensor : a theoretical analysis, *Journal of the Optical Society of America A-Optics Image Science and Vision*, 2000, Vol. 17, Issue 6, 1098–107
- [3] Booth M. J., Wave front sensor-less adaptive optics : a model-based approach using sphere packings, *Optics Express*, 2006, Vol. 14, Issue 4, 1339-1352
- [4] Facomprez A., Beaulrepaire E. and Débarre D., Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics, *Optics Express*, 2012, Vol. 20, Issue 3, 18209-18219
- [5] Débarre D., Botcherby E. J., Booth. M. J. and Wilson. T., Adaptive optics for structured illumination microscopy, *Optics Express*, 2008, Vol. 16, Issue 13, 9290-9305
- [6] Zeng J., Mahou P., Schanne-Klein M. C., Beaulrepaire E. and Débarre D., 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues, *Biomedical Optics Express*, 2012, Vol. 3, Issue 8, 1898-1913

Chapitre 4

Applications

4.1 Applications sur billes

Les microbilles fluorescentes ont été des échantillons très importants intervenant tout au long du développement et de la construction du microscope. Premier objet imagé avec le microscope, elles ont par la suite servi comme échantillons de référence dans nos études sur les effets des aberrations optiques mais également pour la calibration des aberrations optiques du système.

Les microbilles fluorescentes utilisées ont un diamètre d'un micromètre et génèrent des photons de fluorescence à une longueur d'onde de 510 nm (Fluorospheres sulfate microspheres, 1,0 μm yellow-green fluorescent 505/515 de chez Invitrogene). Disposées sur une lamelle de verre, elles peuvent ainsi être imagées très simplement en introduisant très peu d'aberrations optiques.

Dans cette section, nous présenterons la méthode employée pour réaliser la calibration du système dans le but de compenser les aberrations optiques introduites par celui-ci. Nous aborderons également les essais de diagonalisation de la base des polynômes de Zernike de manière à supprimer tous les couplages entre les différents modes.

4.1.1 Calibration du système

L'utilisation de microbilles fluorescentes a principalement permis d'effectuer la calibration du système optique. En effet, il est nécessaire de caractériser précisément les aberrations introduites par les différentes optiques du système de manière à les corriger en amont (aberrations système dépendantes). Ceci garantit une qualité d'imagerie optimale pour travailler sur d'autres échantillons mais donne également la possibilité d'avoir une information directe de la quantité d'aberrations présentes dans les échantillons après optimisation (aberrations échantillons dépendantes).

Pour calibrer notre système, nous avons eu recours à une méthode légèrement différente de la méthode locking présentée précédemment. Nous sommes partis d'une série de sept modes de Zernike pour réaliser des optimisations via la méthode classique avec comme métrique l'intensité moyenne des images acquises. Les modes employés pour cela sont récapitulés ci-dessous :

Noms	Astigmatisme oblique	Astigmatisme droit	Tréfoil 1	Coma vertical	Coma horizontal	Tréfoil 2	Aberration sphérique
N° dans la base	3	5	6	7	8	9	12

Nous avons choisi ces modes car ceux-ci, d'ordre assez faible, offrent une couverture acceptable des aberrations rencontrées dans les échantillons biologiques [1]. De plus, leur nombre limité permet de ne pas trop allonger la durée des phases d'optimisation.

Avec ces modes, nous nous servons d'un algorithme d'optimisation à $11N$ mesures pour avoir une bonne résolution de l'évolution de la métrique. Les amplitudes appliquées iront de $-0,1 \mu\text{m}$ (soit $-1,5$ radians) à $0,1 \mu\text{m}$ par pas de $0,02 \mu\text{m}$ (soit $0,3$ radians).

Pour commencer, après avoir sélectionné une bille isolée, une acquisition d'un volume est réalisée de manière à définir le plan correspondant au centre de la bille (i.e là où la métrique est la plus grande). Une fois ce plan défini, trois itérations de l'algorithme d'optimisation

sont effectuées. La première commence avec le miroir complètement à plat, la seconde avec les amplitudes obtenues durant la première itération et de même pour le troisième itération. Ainsi, les amplitudes calculées à l'issue de la troisième itération sont considérées comme étant la correction optimale permettant de compenser les aberrations introduites par le système optique et la lamelle de verre. Pour vérifier cela, un nouveau volume est acquis de manière à comparer le profil axial de la microbille avant et après la correction.

Par la suite, cette nouvelle forme que l'on appellera DM0 sera appliquée comme forme de départ dans toutes les expériences réalisées. Le système final évoluant peu, cette correction de base peut être conservée durant des périodes assez longues (plusieurs semaines) et sera recalibrée mensuellement ou après toute modification du système optique.

Dans les Figures 4.1.1 et 4.1.2 sont présentés deux exemples d'optimisation sur microbilles. Le premier correspond à une calibration réalisée sur la version la plus avancée du système optique. Sur l'image de la bille avant correction (Figure 4.1.1 (a)), le profil de celle-ci est légèrement asymétrique alors qu'après correction (Figure 4.1.1 (b)), on observe une amélioration de la symétrie de l'image de la bille. Enfin, on note que la taille de la bille a sensiblement diminué.

En réalisant trois itérations de la méthode $11N$, les amplitudes des différents modes testés sont définies de manière à compenser les aberrations optiques introduites par le système (Figure 4.1.1 (c)). Deux aberrations sont en proportion plus importantes par rapport aux cinq autres modes testés. Celles-ci sont l'astigmatisme à hauteur de $-0,6$ radians (soit $-0,041$ μm en commande miroir) et l'aberration sphérique avec $0,3$ radians (soit $0,02$ μm en commande miroir). Ainsi, avec ces différentes amplitudes, il est possible de créer une commande à appliquer au miroir déformable pour corriger notre système (Figure 4.1.1 (d)).

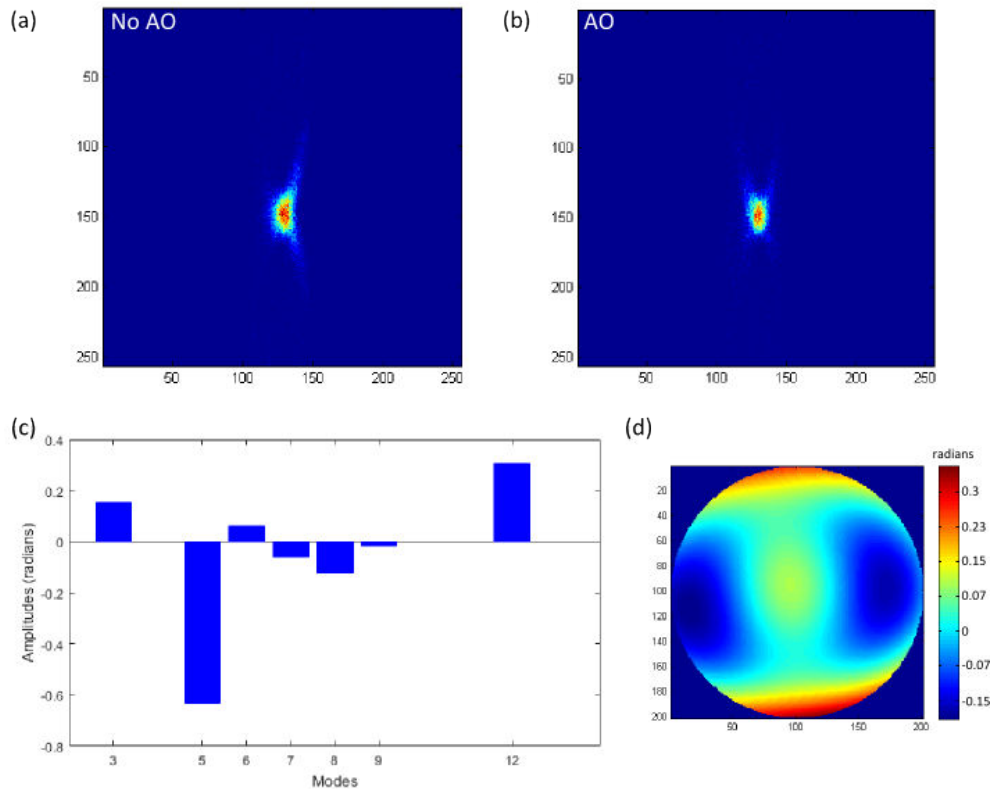


FIGURE 4.1.1 – (a) Image axiale d’une microbille de 1 μm de diamètre avant la réalisation de trois itérations de la méthode avec $11N$ mesures. (b) Môme image après trois itérations. (c) Les amplitudes des différents modes testés sont déterminées par l’algorithme. (d) Celles-ci permettent de définir la forme à appliquer avec le miroir déformable pour corriger les aberrations introduites par le système optique

Le second exemple provient d’un cas où le système optique était désaligné. De ce fait, les aberrations du système étaient beaucoup plus importantes, entraînant en plus d’une déformation de la PSF (Figure 4.1.2 (a)) une forte diminution du signal (Figure 4.1.2 (b)). La correction des aberrations a donc pour effet d’améliorer les deux paramètres suivants : la résolution (Figure 4.1.2 (c)) et l’intensité (Figure 4.1.2 (d)). Cela a ainsi permis de multiplier par trois le signal généré tout en améliorant la résolution axiale de l’image (Figure 4.1.2 (e)).

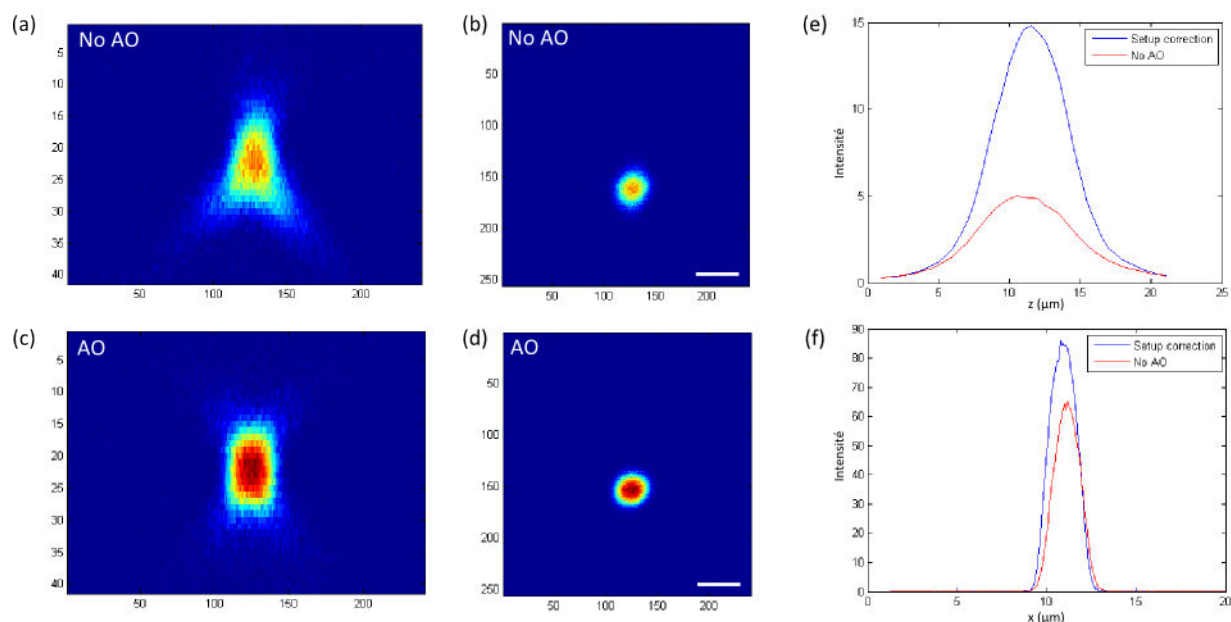


FIGURE 4.1.2 – (a) Image axiale d’une microbille de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre avant la réalisation de trois itérations de la méthode avec $11N$ mesures. (b) Image radiale de cette microbille dans les mêmes conditions. (c) Image axiale d’une microbille de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre après la réalisation de trois itérations de la méthode avec $11N$ mesures. (d) Image radiale de cette microbille dans les mêmes conditions. (e) Profil d’intensité axial avant (No AO) et après optimisation (Setup correction). (f) Profil d’intensité radial avant et après optimisation. Barre d’échelle $3\ \mu\text{m}$

Enfin, nous pouvons comparer les résultats obtenus après optimisation de notre système avec ceux du microscope *in vivo* commercial présent dans les locaux de l’INMED. Ainsi, les résolutions axiales et radiales pour des billes de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre (largeur mesurée à $1/e^2$) sont :

	Résolution radiale	Résolution axiale
INMED	$1,6\ \mu\text{m}$	$9\ \mu\text{m}$
Institut Fresnel	$1,92\ \mu\text{m}$	$7,6\ \mu\text{m}$

Nous pouvons donc constater que la résolution axiale est meilleure avec notre système tandis que la résolution radiale est un peu moins bonne mais reste néanmoins du même ordre de grandeur que celle de l’INMED. Ainsi, en prenant en compte la réalisation ”maison” du microscope, les résultats constatés sont satisfaisants.

Pour conclure, nous pouvons également discuter du temps nécessaire pour réaliser la calibration du système. Effectivement, les images acquises faisant $20\ \mu\text{m}^2$ et $256\ \text{pixels}^2$, le temps pour acquérir une image est de $0,65$ secondes. En prenant en compte les deux stacks acquis avant et après l’utilisation de la méthode, cela porte le temps total de l’expérience à 203 secondes soit 3 minutes et 23 secondes. La durée de la calibration étant courte, cela sera donc un avantage lors de la réalisation mensuelle de celle-ci ou lors de la modification du système.

4.1.2 Essais de réorthogonalisation de la base

Les microbilles nous ont également servi à tester la méthode de suppression des couplages dans la base des polynômes de Zernike via la réorthogonalisation de celle-ci. Pour cela, nous avons généré des perturbations Z correspondant à une combinaison de deux modes $[Z_a, Z_b]$.

$$Z = \alpha Z_a + \beta Z_b \quad (4.1.1)$$

où α et β sont des amplitudes variables exprimées comme :

$$\alpha = A \cos \theta \quad (4.1.2)$$

$$\beta = A \sin \theta \quad (4.1.3)$$

où θ est une variable comprise entre $[0; 2\pi]$ et A une constante permettant d'ajuster les amplitudes maximales appliquées.

Le nombre de couples P à tester suit la relation :

$$P = \frac{N(N-1)}{2} \quad (4.1.4)$$

où N correspond au nombre de polynômes utilisés dans la méthode locking.

Dans notre cas, souhaitant employer sept modes (sans le défocus), cela revient à tester vingt-et-une paires différentes. Dans la Figure 4.1.3 est représenté un exemple de mesures réalisées sur des microbilles. Il est possible de constater qu'une majorité des paires testées présentent un couplage entre les deux modes représenté par l'inclinaison du grand axe de l'ellipse.

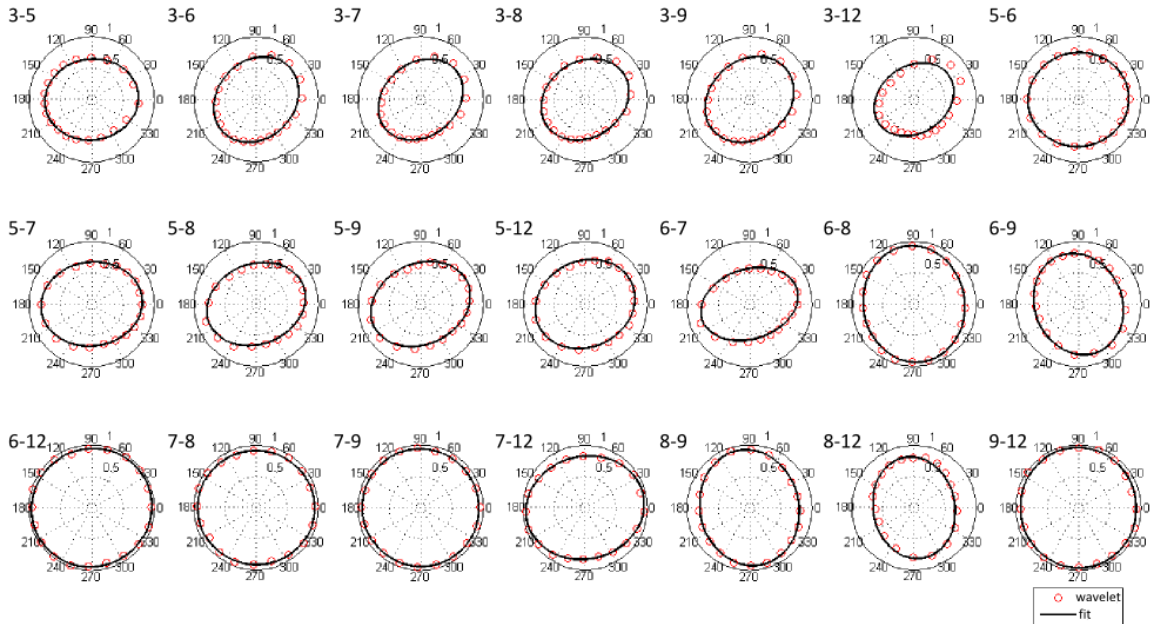


FIGURE 4.1.3 – Tracés de l'évolution de la métrique en fonction des amplitudes appliquées pour les différentes paires de modes testées

Par la suite, grâce à ces tracés, il est possible de retrouver les différents coefficients de couplages. Pour cela, nous sommes partis d'une expression de la métrique M en présence d'une faible quantité d'aberrations [2] :

$$M = M_0 - \sum_{i,j} \alpha_{i,j} a_i a_j \quad (4.1.5)$$

où M_0 correspond à la valeur de la métrique sans aberration, a_i, a_j à l'amplitude des modes de Zernike testés et $\alpha_{i,j}$ au coefficient de couplage entre les deux modes.

Lorsqu'on souhaite retrouver les couplages entre les modes 1 et 2 par exemple, la méthode employée revient donc à appliquer :

$$a_1 = A_0 \cos\theta \quad (4.1.6)$$

$$a_2 = A_0 \sin\theta \quad (4.1.7)$$

$$a_{n>2} = 0 \quad (4.1.8)$$

Ainsi en remplaçant les termes, on obtient l'équation de la métrique en fonction de l'angle pour les deux modes testés $M(\theta)$:

$$M(\theta) = M_0 - A_0^2 (\alpha_{11} \cos^2\theta + \alpha_{22} \sin^2\theta + \alpha_{12} \cos\theta \sin\theta) \quad (4.1.9)$$

Dans le cas où les deux modes testés ne présentent aucun couplage, on a $\alpha_{12} = 0$.

En pratique, on observe des ellipses (Figure 4.1.3) que l'on peut ajuster via une fonction paramétrique :

$$M(\theta) = \frac{\beta}{\sqrt{1 - e^2 \cos^2(\theta - \theta_0)}} \quad (4.1.10)$$

où β correspond au demi-grand axe de l'ellipse, e son excentricité et θ_0 son angle d'orientation.

En évaluant la métrique à $M(0)$ et $M(\frac{\pi}{2})$, il est possible d'extraire les différents coefficients de couplages :

$$\alpha_{11} = \frac{1}{A_0^2} \left(M_0 - \sqrt{\frac{\beta^2}{1 - e^2 \cos^2\theta_0}} \right) \quad (4.1.11)$$

$$\alpha_{22} = \frac{1}{A_0^2} \left(M_0 - \sqrt{\frac{\beta^2}{1 - e^2 \sin^2\theta_0}} \right) \quad (4.1.12)$$

et pour le coefficient croisé α_{12} , on évalue la métrique à $M(\frac{\pi}{4})$ et $M(\frac{3\pi}{4})$. On obtient alors :

$$\alpha_{12} = \frac{\beta}{2} \left(\sqrt{\frac{1}{1 - e^2 \cos^2(\frac{\pi}{4} - \theta_0)}} - \sqrt{\frac{1}{1 - e^2 \cos^2(\frac{3\pi}{4} - \theta_0)}} \right) \quad (4.1.13)$$

Il est donc possible de voir qu'en présence d'un angle d'orientation (θ_0) égal à 0 ou $\frac{\pi}{2}$, le terme de couplage croisé $\alpha_{12} = 0$, ce qui montre l'absence de couplages entre les deux modes testés. De plus, une excentricité nulle ($e = 0$), correspondant au cas où l'on observe un cercle, entraîne $\alpha_{11} = \alpha_{22}$ mais également $\alpha_{12} = 0$.

Comme nous avons pu le voir, ceci est parfaitement applicable sur des échantillons simples comme des billes car des ellipses sont bien observées. Seulement, lorsque cette approche est testée sur des échantillons plus complexes et aberrants comme des tranches de cerveau, l'évolution de la métrique n'est plus représentée sous la forme d'ellipses. Cela traduit la présence de couplages non linéaires rendant l'hypothèse de l'équation 4.1.5 fautive (Figure 4.1.4).

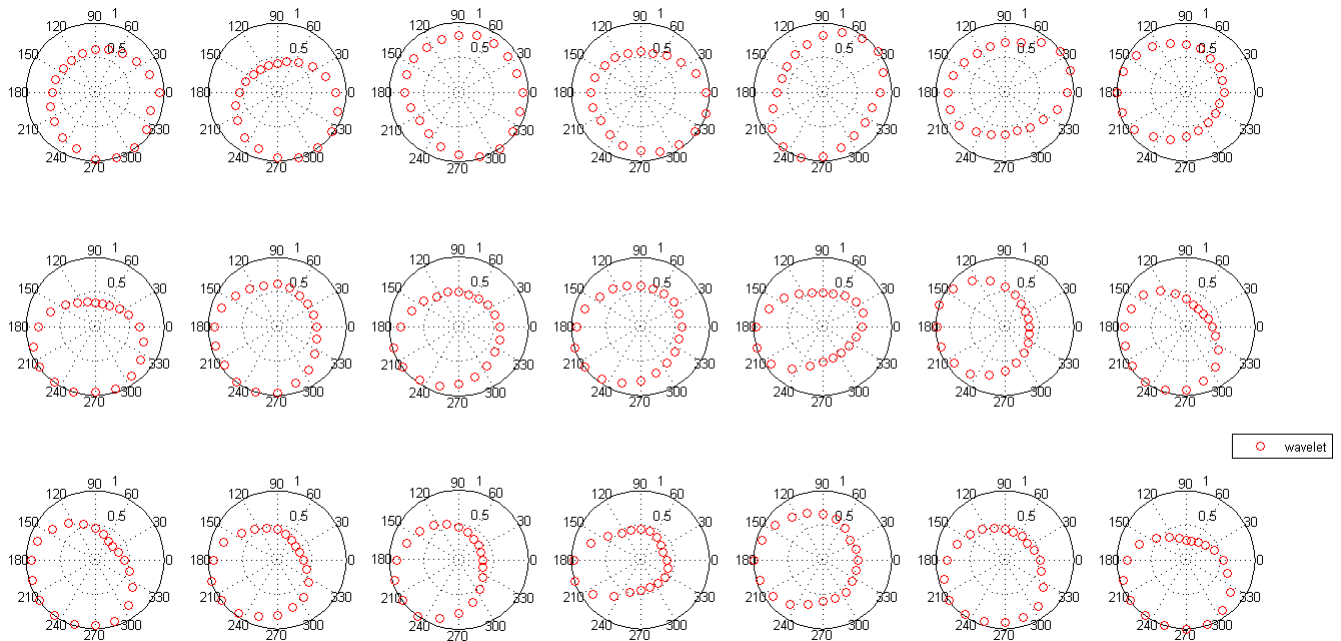


FIGURE 4.1.4 – Tracés de l'évolution de la métrique en fonction des amplitudes appliquées pour les différentes paires de modes testées dans un échantillon biologique

Dans le cas d'un échantillon biologique, l'hypothèse de couplages linéaires n'est plus valable. Il n'est donc pas judicieux de définir une nouvelle base dans cette situation. Cela justifie alors l'approche par itération. Ainsi, de manière générale, cette mesure de couplages peut être utilisée pour évaluer la pertinence de la réorthogonalisation de la base de Zernike en fonction de l'échantillon.

4.2 Applications *in vitro* sur des tranches de cerveau

Le principal échantillon que nous avons utilisé pour développer la méthode locking a été des tranches de cerveau de six cent micromètres d'épaisseur. En effet, nous avons besoin d'un échantillon qui puisse être comparable (d'un point de vue épaisseur et structure) à l'échantillon final : le cerveau entier. De plus, la conception de ces tranches permettait un

approvisionnement régulier et donc une avancée constante de nos travaux. Ainsi, avec celles-ci, nous avons pu développer la métrique wavelet mais également tester la méthode locking.

4.2.1 Conception des échantillons

Les tranches sont réalisées à partir de cerveau GAD-GFP, c'est-à-dire que les cellules générant la protéine GAD (principalement les interneurons) sont marquées par la GFP. Après avoir été extrait, le cerveau est plongé dans une solution normale d'ACSF (liquide céphalorachidien artificiel) composée en mM de : 126 $NaCl$, 3.5 KCl , 1.2 NaH_2PO_4 , 26 $NaHCO_3$, 1.3 $MgCl_2$, 2.0 $CaCl_2$, et 10 $D - glucose$, pH 7.4 permettant la conservation de celui-ci. Par la suite, le cerveau est collé sur la plateforme porte-échantillon du vibratome. Le vibratome est un instrument effectuant des découpes précises d'un objet grâce à une lame de rasoir ou en diamant venant effectuer des mouvements de va et vient sur l'échantillon. Ainsi, il est possible d'obtenir des tranches très fines (pouvant atteindre les 80 μm d'épaisseur) avec une surface optique de très bonne qualité, réduisant fortement les aberrations optiques de surface. Par la suite, les tranches obtenues sont récupérées et disposées dans des puits remplis de la même solution de manière à être conservées.

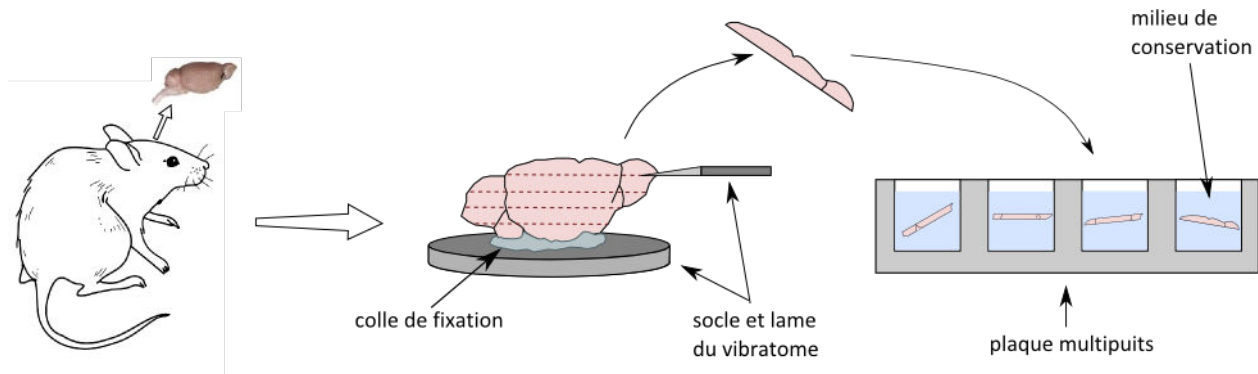


FIGURE 4.2.1 – Après avoir extrait le cerveau, celui-ci est fixé sur la platine du vibratome où une lame effectue des va et vient venant trancher le cerveau en tranches d'épaisseur constante. Les tranches sont alors immédiatement immergées dans une solution de conservation puis stockées dans une plaque multi-puits

Dans notre cas, l'épaisseur des tranches est fixée à 600 μm de manière à avoir un échantillon suffisamment épais pour pouvoir tester la méthode locking à des profondeurs proches de celles où l'on souhaite travailler lors des expériences *in vivo*. Pour pouvoir être utilisées sur le microscope, les tranches sont montées entre une lame de verre et une lamelle via l'utilisation d'un espaceur adhésif. Un milieu de montage (EMS Fluoro-Gel 17985-10) est ajouté pour réaliser l'homogénéisation de l'indice optique mais également pour protéger la tranche afin de pouvoir la conserver durant une longue durée.

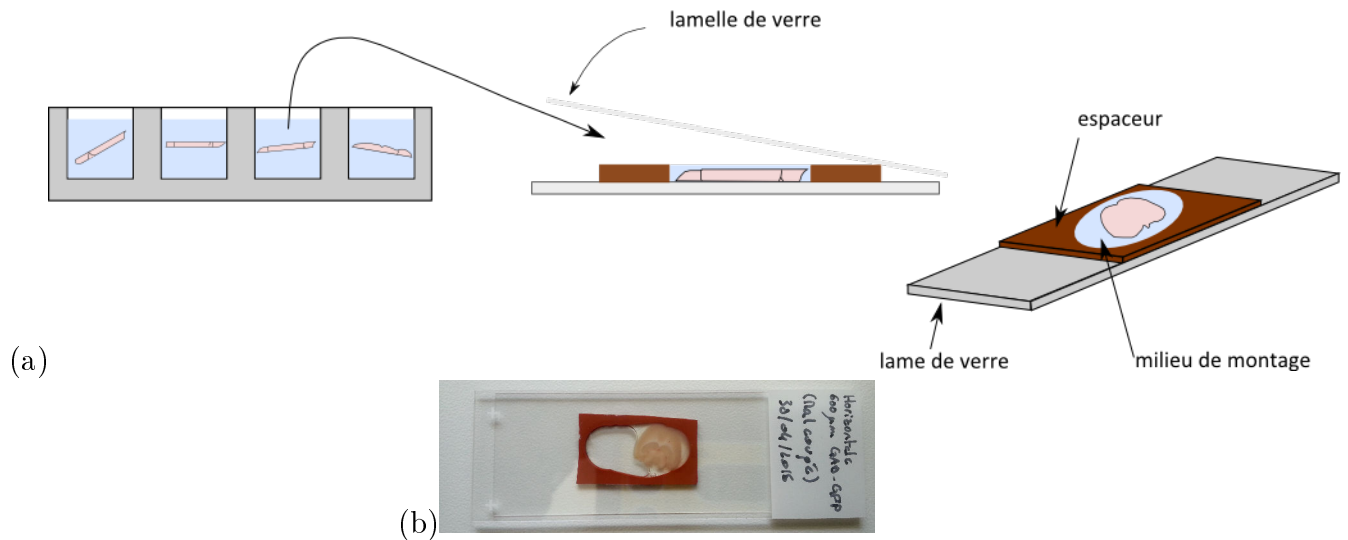


FIGURE 4.2.2 – (a) Dans le but d’être imagées, les tranches sont disposées entre une lame de verre et une lamelle de microscope. L’épaisseur des tranches ($600\ \mu\text{m}$) étant très importante, un espaceur adhésif est posé de façon à former un puits où la tranche sera placée dans le milieu de montage. (b) Ainsi, il sera possible de conserver pendant plusieurs semaines une tranche avant que le milieu de montage soit totalement évaporé

4.2.2 Application de la méthode locking

4.2.2.1 Nos premiers échantillons : des tranches trop ”parfaites”

Les premières tranches dont nous nous sommes servis n’étaient pas des plus adaptées. Effectivement, après plusieurs tentatives d’optimisation des images dans les tranches, nous ne constatons pas d’amélioration significative. La raison était principalement liée aux tranches elles-mêmes et cela à cause du matériel employé pour les faire.

En effet, les vibratomes utilisés sont des systèmes dédiés à la création d’échantillons pour les biologistes. La qualité de l’interface optique de ceux-ci était donc ”trop bonne”, n’introduisant que très peu d’aberrations. Ainsi, lors des tentatives d’optimisation sur ces tranches, nous n’obtenions que des amplitudes correspondant à la correction des aberrations du système optique.

Nous avons donc dû trouver un moyen d’avoir des échantillons plus proches des conditions optiques s’appliquant durant les expériences *in vivo*. Pour cela, la méthode a consisté à réaliser nos tranches avec une machine plus ancienne que les derniers modèles présents dans les laboratoires de l’INMED avec une vitesse de découpe plus importante que la moyenne. Au final, nous avons obtenu des tranches de cerveau avec une surface irrégulière introduisant suffisamment d’aberrations optiques pour pouvoir étudier l’efficacité des différentes méthodes de correction des aberrations.

4.2.2.2 Mise en place et test des échantillons adaptés à nos problématiques

Sur les nouvelles tranches ”mal coupées”, nous avons appliqué la méthode locking à différentes profondeurs :

- 200 μm : correspondant à une profondeur équivalente à celle où se trouve la couche pyramidale de CA1
- 400 μm : correspondant à la profondeur maximum qu'il nous est possible d'atteindre dans les tranches (limitée par la diffusion optique)

A chacune de ces profondeurs, toutes les expériences ont respecté la même procédure :

- Première phase : Après avoir trouvé un champ d'intérêt (position x , y et z), on réalise l'acquisition rapide d'un stack volumique (série d'images 2D à différentes profondeurs) autour du plan correspondant au champ imagé. Après l'obtention de celui-ci, un algorithme calcule la métrique dans chaque image du stack. Pour rappel, dans notre cas, la métrique est la wavelet qui correspond à la variance des images filtrées. Cela nous permettra de suivre son évolution tout au long du volume et ainsi sélectionner un plan correspondant à un maximum local de la wavelet proche de notre champ imagé.
- Seconde phase : Une fois le plan d'optimisation défini, on réalise différentes itérations (dont le nombre est déterminé par l'utilisateur) de la méthode locking et cela indépendamment du nombre de mesures choisies (i.e 3, 5, 7 ou $11N$ mesures). A chaque fin d'itération, les amplitudes maximisant la métrique sont calculées, définissant ainsi la correction à appliquer (ou la forme de départ pour le cycle suivant).
- Troisième phase : Elle permet de quantifier l'impact de l'optimisation et consiste à acquérir successivement cinq stacks volumiques d'images centrés sur le plan où la méthode d'optique adaptative a été appliquée. Ceux-ci sont réalisés dans un ordre précis : le premier avec le miroir à plat (No AO), le second avec la commande permettant la correction des aberrations du système (DM0 ou Setup correction), vient ensuite le stack avec la commande définie par la seconde phase (Sample correction) et pour finir, les deux derniers sont à nouveau un stack volumique avec la correction du système puis un stack avec le miroir à plat.

La nécessité d'acquérir tous ces stacks est importante dans la prise en compte de la diminution globale du signal dû au photoblanchiment des fluorophores présents dans le champ imagé. Cette étape sera présentée dans la sous-section suivante.

La méthode que nous avons employée ici a été une approche à $11N$ mesures avec trois itérations. Les modes de Zernike utilisés sont ceux que nous avons présentés précédemment à l'exception du défocus ($Z=4$) qui est ajouté aux autres modes. Celui-ci sera réalisé grâce à la platine de translation. Les amplitudes appliquées sont également identiques soit : $-0,1 \mu\text{m}$ (soit $-1,5$ radians) à $0,1 \mu\text{m}$ par pas de $0,02 \mu\text{m}$ (soit $0,3$ radians) alors que le défocus effectuera des pas de $1 \mu\text{m}$ entre $-5 \mu\text{m}$ et $5 \mu\text{m}$ autour du champ optimisé. De manière générale, la totalité des champs et des stacks acquis durant ces expériences possèdent tous les mêmes caractéristiques :

- Une taille de champ de $400 \mu\text{m}^2$ permettant l'observation d'une grande population de cellules
- Un temps de pause par pixel de $10 \mu\text{s}$

- Une épaisseur de $\pm 20 \mu\text{m}$ autour du champ d'intérêt avec un pas entre chaque image de $1 \mu\text{m}$
- Le nombre de pixels par image change en fonction de la phase active de la procédure d'optimisation. Pour les images acquises au cours des deux premières phases, un nombre de pixels assez faible permettra de passer moins de temps sur le même champ réduisant ainsi le photoblanchiment alors que pour la dernière phase, un nombre de pixels important offrira une meilleure résolution à nos images. Ainsi, les images enregistrées pendant l'optimisation sont des images de 256×256 pixels alors que celles obtenues lors de la troisième phase sont des images de 512×512 pixels

Nous avons donc appliqué la méthode locking sur différents échantillons de manière à tester son efficacité. Dans les Figures 4.2.3, 4.2.4 et 4.2.5 sont présentés des résultats d'optimisation appliqués à $200 \mu\text{m}$ (Figure 4.2.3 et Figure 4.2.5) et à $400 \mu\text{m}$ (Figure 4.2.4) de profondeur.

La Figure 4.2.3 montre un exemple obtenu à $200\mu\text{m}$ de profondeur. Pour réaliser nos expériences à cette profondeur, nous avons utilisé une puissance laser de 200 mW permettant un taux de comptage proche de la saturation du détecteur. On observe dans ce champ plusieurs corps cellulaires dont un est notamment situé exactement dans le plan imagé. Il est possible de voir l'effet de notre correction sur ce neurone encadré en pointillés.

On constate une amélioration significative du signal de fluorescence lorsqu'on passe du cas sans correction (No AO) à celui avec les corrections du système appliquées (Setup correction). Il en est de même pour le cas où l'on corrige les aberrations introduites par l'échantillon (Sample correction). Il nous est possible de quantifier ces gains en représentant les profils d'intensité (en-dessous de la figure). On observe ainsi un gain en signal de 10% lorsqu'on applique seulement la correction du système, celui-ci atteignant 35% une fois les aberrations de l'échantillon corrigées.

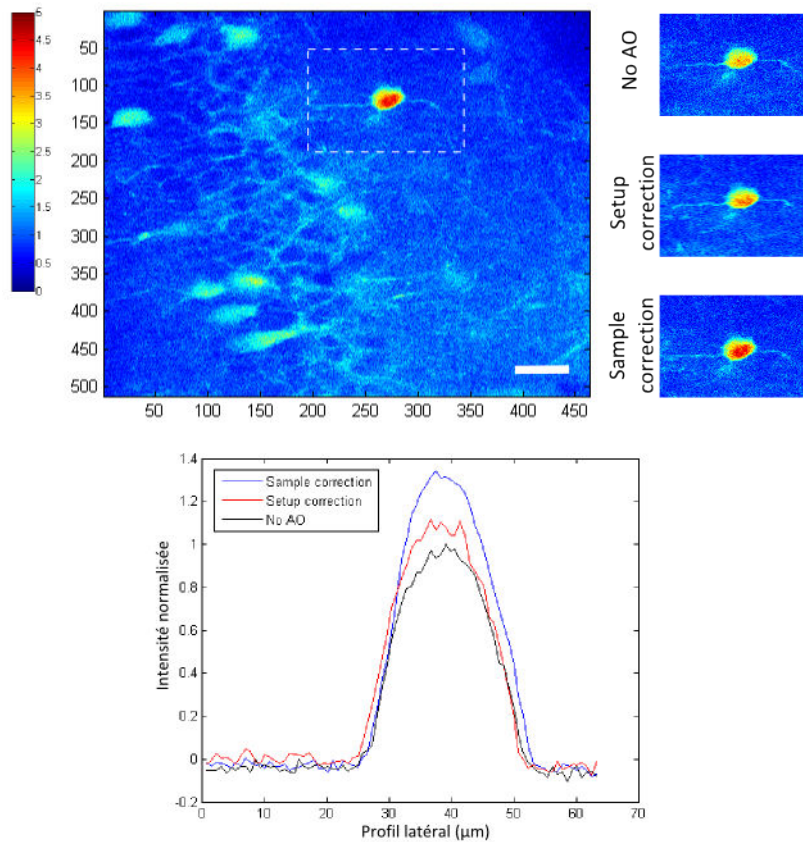


FIGURE 4.2.3 – Image d’une tranche GAD-GFP à 200 μm de profondeur. Le champ de 400 μm^2 permet la visualisation d’un grand nombre de cellules dont une (encadrée en pointillés) se trouvant exactement dans notre plan d’imagerie. A droite sont représentés des zooms sur cette cellule lors des trois étapes de correction : miroir à plat (No AO), correction du système et correction complète (Setup + Sample correction). En-dessous, le profil d’intensité normalisé de la cellule est représenté selon les trois étapes permettant de quantifier les gains apportés par la correction à cette profondeur. Echelle 40 μm

De la même manière, nous avons appliqué dans le même échantillon la méthode locking à une profondeur de 400 μm (Figure 4.2.4). Pour cela, une puissance de 400 mW a été utilisée dans le but d’avoir un niveau de détection suffisamment bon. Comme dans le cas à 200 μm de profondeur, une amélioration du signal de fluorescence est constatée entre le cas sans correction et avec les corrections du système, de même pour le cas où l’on corrige les aberrations introduites par l’échantillon (images à droite de la figure).

En quantifiant ces gains (représentés par les profils d’intensité en-dessous de la figure), on observe un gain de 20% lorsqu’on applique seulement la correction du système, celui-ci atteignant 25% une fois les aberrations de l’échantillon corrigées.

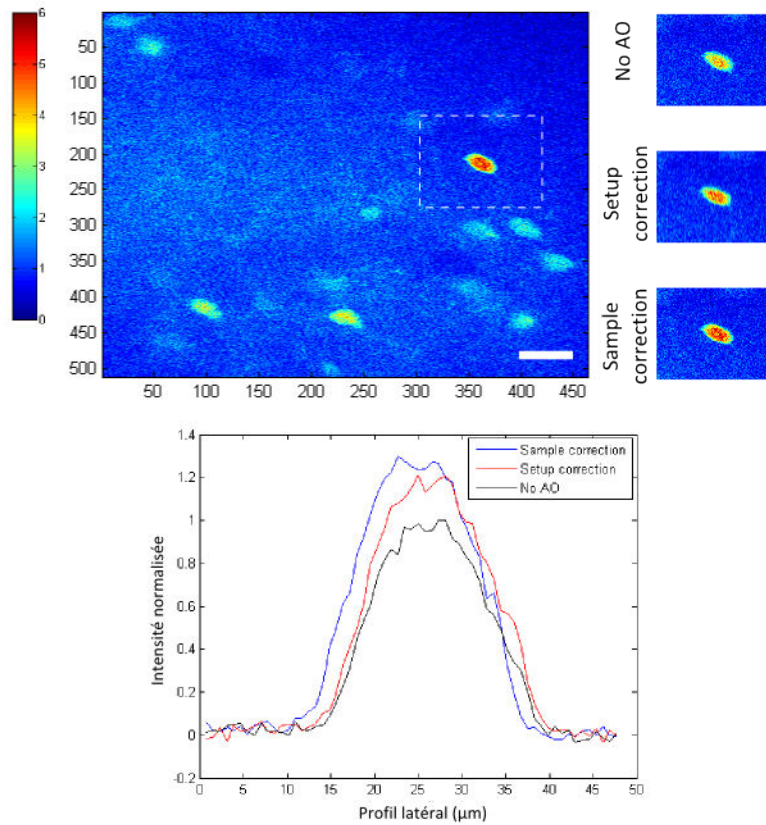


FIGURE 4.2.4 – Image d’une tranche GAD-GFP à 400 μm de profondeur. A droite (comme pour la Figure 4.2.3) : miroir à plat (No AO), correction du système et correction complète (système + échantillon). En-dessous : profil d’intensité normalisée de la cellule. Echelle 40 μm

Ainsi, sur un même échantillon, les résultats obtenus lors de l’utilisation de la méthode sont clairement différents lorsqu’on met en pratique celle-ci à de faibles profondeurs (200 μm) et à des profondeurs plus importantes (400 μm). Enfin, dans le cas à 400 μm de profondeur, l’apport en gain est majoritairement dû à la correction des aberrations du système optique. Ceci peut être expliqué par l’impact de la variation spatiale des aberrations qui sont plus fortes à 400 μm . On se retrouve donc au final à moyenner les aberrations en prenant en compte tout le champ. La variabilité des aberrations optiques dans le plan sera abordée plus tard dans ce chapitre.

Un dernier exemple réalisé à 200 μm de profondeur montre un champ avec une population plus importante de cellules (Figure 4.2.5). Une modification de l’intensité sur plusieurs cellules présentes dans le champ est notamment constatée. Celles-ci, encadrées en pointillés, présentent en effet une amélioration du signal mesuré allant de 10% du signal pour la cellule B jusqu’à quasiment 40% pour la cellule A. Il en est de même pour les cellules C et D avec des gains de 30% pour la cellule C et 25% pour la cellule D. Ainsi, avec cet exemple, il est possible d’avoir une idée sur le gain moyen apporté par la méthode locking à 200 μm de profondeur.

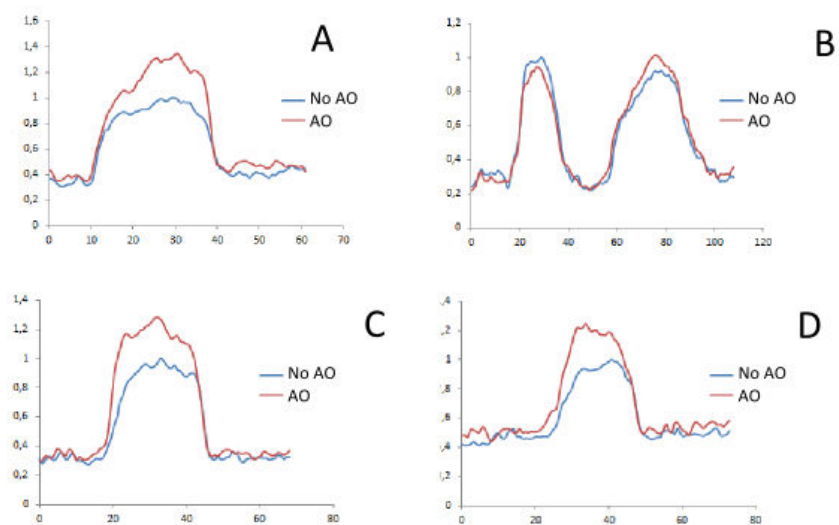
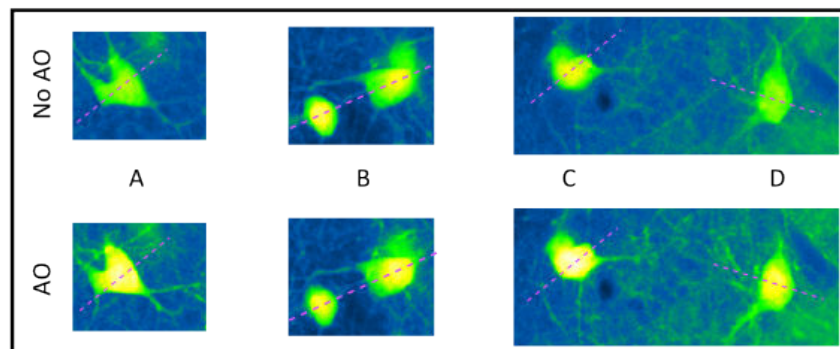
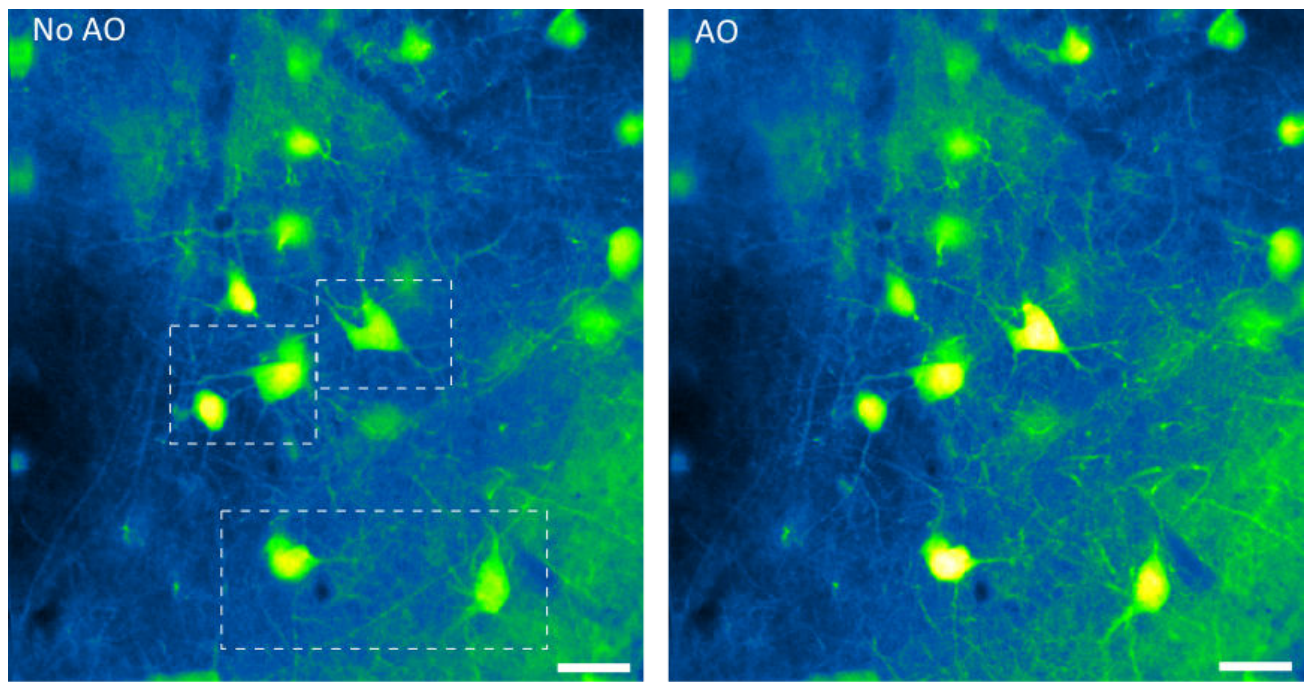


FIGURE 4.2.5 – Images d'une tranche GAD-GFP à 200 μm de profondeur avant (No AO) et après correction (AO). En-dessous, une sélection de quelques cellules est présentée avant et après correction. Des profils d'intensité normalisée correspondant à la ligne en pointillés mauve sont également représentés pour chaque cellule (A à D). Echelle 40 μm

Néanmoins, dans la Figure 4.2.5, certaines cellules subissent une détérioration de leur signal. Ce phénomène est lié à la taille des champs que l'on essaie d'imager. En effet, les aberrations optiques étant dépendantes du milieu dans lequel l'onde se propage, celles-ci présentent une grande variabilité dans l'espace. Nos champs imagés étant très grands, nous sommes donc soumis à ces variations. Or, notre correction n'étant pas locale (on viendrait corriger alors les aberrations dans des sous-zones du champ) [3] mais globale, il se peut que celle-ci ne soit pas adaptée en certains points du champ imagé entraînant une dégradation locale de celui-ci. Ce point sera d'ailleurs traité plus tard dans ce chapitre.

4.2.2.3 Prise en compte du photoblanchiment dans l'analyse des données

Lors de nos expériences, nous avons été confrontés au photoblanchiment. En effet, nous nous sommes rendus compte qu'avec le grand nombre d'acquisitions nécessaires pour réaliser nos optimisations, le signal baissait significativement entre les différentes étapes de la mesure indirecte des aberrations. L'application de la méthode locking se faisant sur un champ unique et à des puissances assez grandes, un fort photoblanchiment vient effectivement dégrader le signal de fluorescence. Il est ainsi nécessaire de quantifier cette diminution et de normaliser les différentes mesures avant toute étude quantitative de l'amélioration du signal par l'optique adaptative.

Afin de calculer l'impact du photoblanchiment lors de nos expériences, nous avons modifié la précédente procédure. Initialement, celle-ci comprenait l'acquisition de trois stacks d'images mais cela n'était pas suffisant pour quantifier le photoblanchiment. Aussi, nous avons ajouté deux stacks supplémentaires portant le nombre total de stacks à cinq et mis en place la procédure présentée dans la section 4.2.2.2 avec différentes configurations du miroir lors de la troisième phase.

Par la suite, nous calculons pour chaque stack l'intensité moyenne de l'image du champ d'intérêt. Ainsi, en représentant ces intensités en fonction de l'ordre d'acquisition des images, il est possible d'obtenir le coefficient de photoblanchiment en appliquant une régression linéaire (approximation linéaire) sur ces valeurs (Figure 4.2.6).

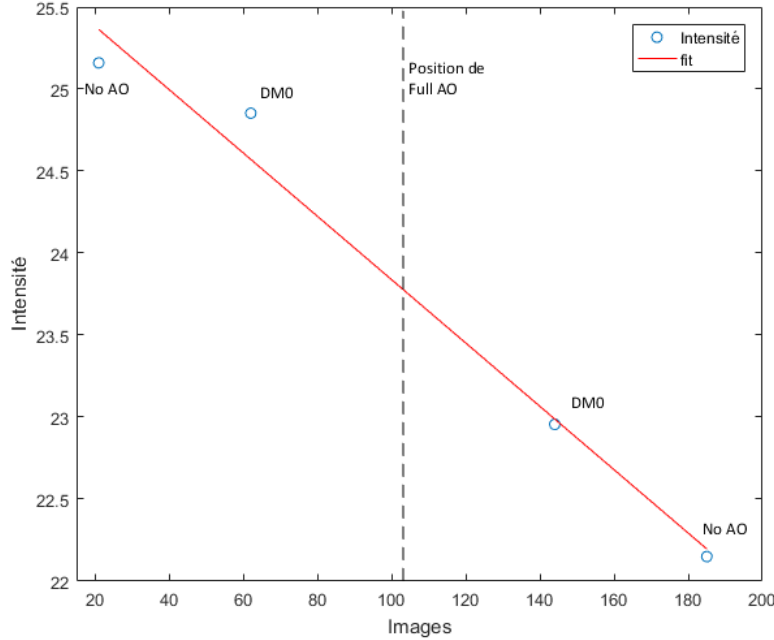


FIGURE 4.2.6 – Exemple d’évolution de l’intensité du signal de fluorescence du plan optimisé des différents stacks en fonction de leur ordre d’acquisition. Une régression linéaire permet de définir le coefficient de photoblanchiment

Enfin, chaque image est normalisée par la valeur moyenne du signal prédite par la droite de photoblanchiment.

4.2.3 Etude de l’efficacité de la méthode

Nous avons pu voir dans la section précédente que la méthode locking permet d’obtenir des résultats concrets dans des tranches de cerveaux. Cependant, il est nécessaire de quantifier les limites de cette méthode. Pour cela, nous allons nous intéresser à trois aspects distincts :

- Le gain global qu’apporte notre technique étudié sur une grande population de cellules
- La plage d’application effective d’une correction dans le volume
- La zone d’efficacité d’une correction dans le plan liée aux variations des aberrations optiques dans celui-ci

Pour répondre à ces trois questions, nous nous sommes intéressés à deux grandeurs précises : l’intensité de fluorescence des neurones imagés et la résolution axiale de ceux-ci.

Nous sommes partis du principe qu’en mesurant l’intensité de fluorescence d’un neurone selon l’axe d’acquisition, on obtient un profil de type gaussien avec une intensité maximale I et de largeur d_Z (la résolution axiale). Dans le cas où les aberrations optiques ne sont pas corrigées, ces deux grandeurs $[I_{NoAO}, d_{Z,NoAO}]$ seront fixes. Normalement, après application de l’optique adaptative, le profil axial d’un même neurone sera également gaussien mais avec cette fois-ci une intensité maximale supérieure à celle sans correction $I_{AO} > I_{NoAO}$ et une résolution axiale plus grande $d_{Z,AO} < d_{Z,NoAO}$ (Figure 4.2.7).

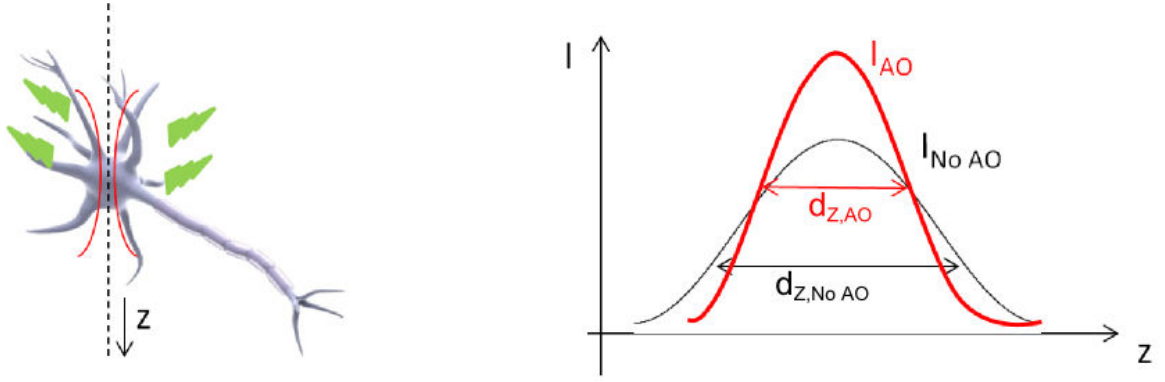


FIGURE 4.2.7 – Lors de la réalisation d’un stack d’images, il est possible de mesurer le profil d’intensité d’un neurone le long de l’axe optique. Ainsi, on peut observer sur ce profil l’impact apporté par la correction des aberrations optiques par le biais de l’étude de l’intensité maximale et de la largeur de celui-ci

Un moyen de quantifier alors les différentes tentatives de correction serait d’étudier le comportement de ces deux grandeurs. En effet, lorsque l’intensité augmente, la résolution axiale doit augmenter car en corrigeant les aberrations optiques, on ”condense” notre PSF. De manière qualitative, il serait donc intéressant d’essayer de comprendre comment évoluent ces deux grandeurs.

En première approximation, on peut ainsi écrire que l’intensité d’excitation I_{exc} est proportionnelle à l’inverse de la résolution de la PSF soit :

$$I_{exc} \propto \frac{1}{d_Z} \quad (4.2.1)$$

Or, comme nous utilisons l’effet deux photons, l’intensité de fluorescence est proportionnelle au carré de l’intensité d’excitation, ce qui donne :

$$I_{fluor} \propto \left(\frac{1}{d_Z} \right)^2 \quad (4.2.2)$$

Ainsi, une relation qualitative entre la résolution axiale et l’intensité de fluorescence mesurée peut être définie comme :

$$d_Z \propto \frac{1}{\sqrt{I_{fluor}}} \quad (4.2.3)$$

En définissant les gains apportés par l’utilisation de l’optique adaptative sur l’intensité G_I et la résolution G_{d_Z} comme :

$$G_I = \frac{I_{AO}}{I_{NoAO}} \quad (4.2.4)$$

$$G_{d_Z} = \frac{d_{Z,AO}}{d_{Z,NoAO}} \quad (4.2.5)$$

On obtient alors une relation de la forme :

$$G_{d_R} = G_I^{-0,5} \quad (4.2.6)$$

Pour conclure, il nous reste plus qu'à trouver un moyen de quantifier de manière systématique l'intensité maximale et la résolution axiale de plusieurs cellules de manière à vérifier la relation prédite par notre raisonnement approximatif.

4.2.3.1 Comparaison avec les mesures *in vitro*

Pour pouvoir déterminer la résolution axiale et l'intensité maximale mesurées, nous avons développé un programme permettant une analyse rapide et automatique des différentes données acquises. Pour cela, après avoir acquis et normalisés (pour corriger l'impact dû au photoblanchiment) les différents stacks d'images, ceux-ci sont importés dans le programme. Le programme va alors afficher l'image correspondant au champ optimisé issu du stack correspondant à l'échantillon corrigé. Ainsi, il est possible de sélectionner les différents neurones d'intérêt se trouvant dans le champ (Figure 4.2.9).

Par la suite, sur chaque neurone sélectionné, le programme trace le profil d'intensité intégré en fonction de l'axe z . Une fois ce profil obtenu, un ajustement est réalisé avec la fonction suivante (qui correspond au profil axial d'un faisceau gaussien sans aberration) :

$$f(z) = a + \frac{b}{\left(1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2\right)^2} \quad (4.2.7)$$

où (a, b, c, d) sont différents paramètres ajustables ; a correspondant à l'offset de la fonction, b l'amplitude maximale, c la position du maximum et d la largeur à mi-hauteur du profil.

Ainsi, grâce à ces différents paramètres, il est possible de remonter aux variables d'intérêt :

$$\begin{cases} I = SNR = \frac{b}{a} \\ d_Z = d \end{cases} \quad (4.2.8)$$

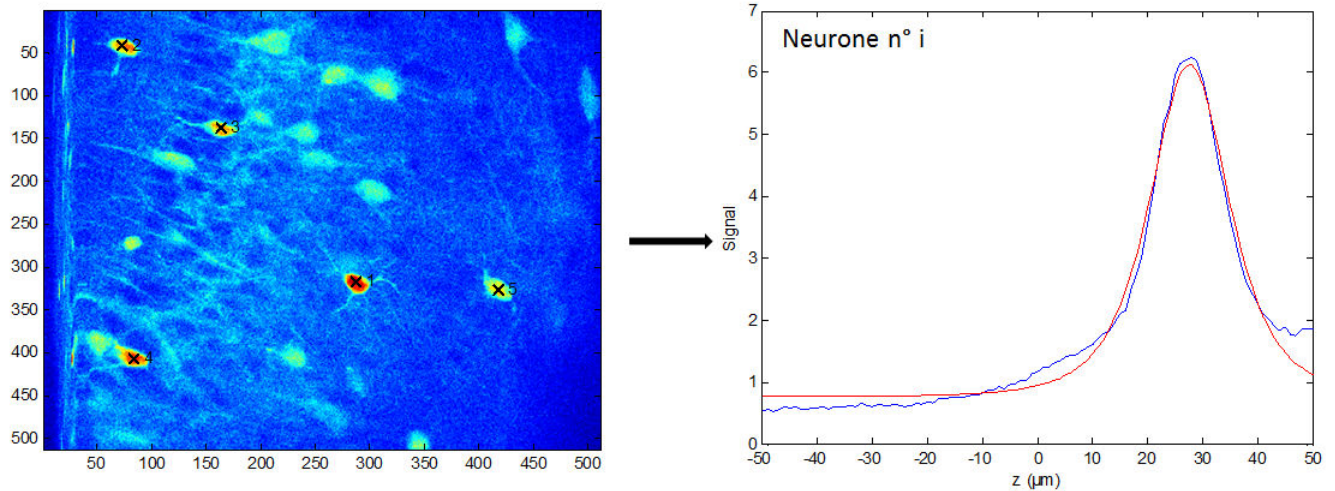


FIGURE 4.2.8 – Exemple d’un champ d’imagerie tel qu’il est affiché par le programme. En sélectionnant différents neurones dans ce champ (marqués de 1 à 5), on obtient le profil d’intensité passant par ce neurone tout au long du stack d’images (courbe bleue). Par la suite, ce profil est ajusté par une fonction paramétrique (courbe rouge) permettant de quantifier les différentes grandeurs d’intérêt

En appliquant cette analyse sur les données optimisées et non optimisées, il est donc possible de définir nos gains en intensité et en résolution axiale comme définis par les équations 4.2.4 et 4.2.5.

Dans la Figure 4.2.9 sont ainsi représentées des mesures réalisées sur une population de trente six cellules. En bleu sont présentés les gains apportés par la correction globale (i.e la correction du système optique plus celle de l’échantillon) et en rouge les gains apportés par la correction de l’échantillon uniquement.

Il est possible de constater une dispersion importante des mesures. Néanmoins, une majorité des neurones testés se trouve dans la zone où le gain en signal (G_I) est supérieur à un et où le gain en résolution (G_{dz}) est inférieur à un. On observe également sur ces neurones une réelle amélioration globale de leur résolution et de leur signal. On arrive ainsi à atteindre des améliorations allant jusqu’à 50% du signal de fluorescence mesuré. Enfin, en s’intéressant aux gains apportés uniquement avec la correction de l’échantillon (cercle rouge - AO/DM0), on constate une amélioration située entre 0% et environ 20% du signal de fluorescence.

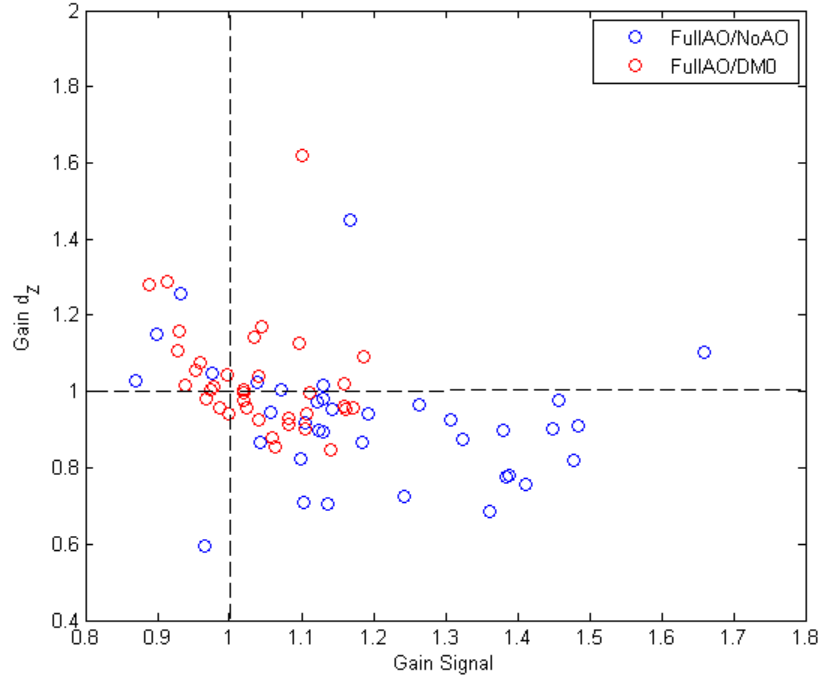


FIGURE 4.2.9 – Représentation des mesures du gain en résolution axiale et en intensité réalisées sur 36 cellules dans trois tranches différentes. En bleu est représenté le gain global correspondant à la correction des aberrations du système optique et de l'échantillon. Quant aux données en rouge, elles correspondent au gain apporté uniquement par la correction des aberrations optiques introduites par l'échantillon

Néanmoins, on peut constater que pour quelques cellules, la correction des aberrations optiques n'a pas été efficace. En effet, quelques points se situant dans la région où $G_I < 1$ et $G_{dz} > 1$ sont dans ce cas et traduisent une augmentation de la taille du volume d'excitation ainsi qu'une diminution du signal de fluorescence mesuré. Il y a également quelques points dans la région où $G_I > 1$ et $G_{dz} > 1$. Ceux-ci indiquent une augmentation du volume focal générant plus de signal. Les cellules testées étant réparties dans tous les champs imagés, il se peut que cette inefficacité de la correction soit due aux variations spatiales des aberrations dans les plans observés.

De manière à savoir si ces mesures sont comme prédit par la relation obtenue précédemment, nous avons effectué un test de corrélation de celles-ci (test de Spearman). Nous avons alors obtenu les paramètres suivants :

	Coefficient de corrélation (R)	Pvalue (P)
AO/NoAO	0,7140	$2,45.10^{-6}$
AO/DM0	0,7707	$4,40.10^{-7}$

Ainsi, nous pouvons clairement affirmer que les mesures que nous avons réalisées reliant le gain en intensité et celui en résolution sont bien corrélées. En effet, les très faibles valeurs de P montrent une forte corrélation prouvant donc que l'optimisation du signal est associée

à une optimisation de la résolution, ce qui confirme l'efficacité de la méthode de correction des aberrations.

Nous pouvons enfin comparer nos données avec le résultat de notre raisonnement (approximatif) que nous avons présenté dans la section précédente . On constate un très bon accord entre les données et la courbe validant une fois de plus l'efficacité de notre méthode (Figure 4.2.10).

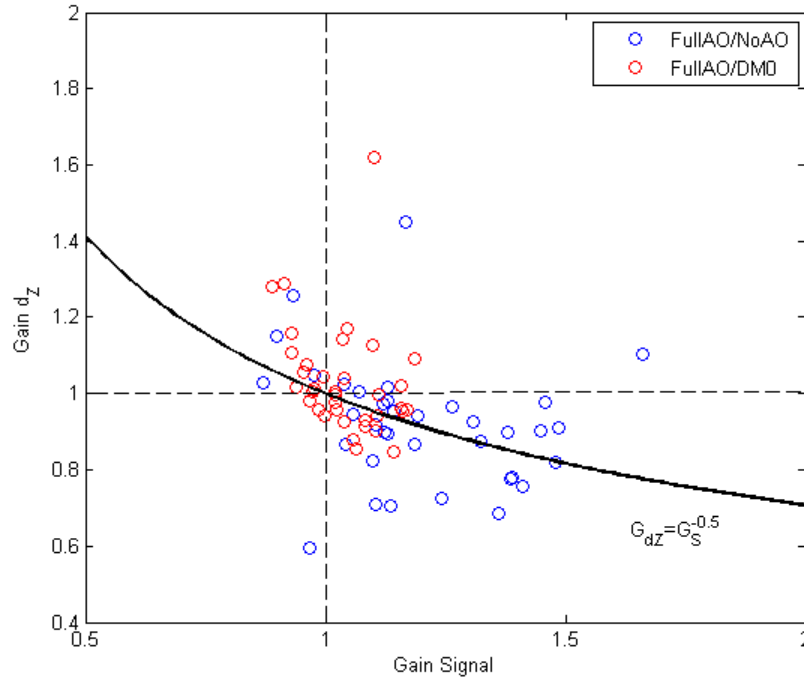


FIGURE 4.2.10 – Superposition de nos données expérimentales avec la relation théorique correspondant à l'évolution du gain de la résolution axiale par rapport au gain en intensité définie par l'équation 4.2.6

Pour conclure sur les aspects d'efficacité de notre méthode, on peut dire que celle-ci permet d'améliorer le signal de fluorescence généré par les neurones par le biais d'une réduction des aberrations optiques introduites par l'échantillon et le système optique. De manière générale, la correction des aberrations dans les tranches permet d'obtenir un gain maximal en génération d'intensité de 20% sur des champs optimisés faisant $400 \mu\text{m}^2$. Enfin, on peut également affirmer qu'une bonne calibration des aberrations optiques introduites par le système optique est indispensable car cela permet un gain relatif de près de 40%.

Dans les sections suivantes, nous allons nous intéresser plus spécifiquement à la plage d'efficacité de notre méthode et tenter de définir les limites de celle-ci tant dans le volume que dans le plan.

4.2.3.2 Etude de l'efficacité axiale des corrections - définition de la plage d'utilisation de la méthode

Définir la plage d'efficacité de nos corrections est essentiel, tout particulièrement pour notre méthode qui consiste à choisir un champ adapté pour l'optimisation pouvant ne pas être un champ d'intérêt pour l'expérience. Il nous faut donc savoir si la correction que l'on aura définie sera toujours efficace lorsqu'on reviendra sur le champ d'intérêt mais également à quelle distance peut se trouver notre champ d'optimisation du champ d'intérêt.

Afin de déterminer cela, nous avons réalisé une optimisation classique avec la méthode locking et effectué l'acquisition de stacks d'images balayant un volume de 100 μm d'épaisseur. Ainsi, il nous est possible de venir quantifier le gain en intensité apporté par notre méthode (de la même façon que présenté dans la section précédente) à différentes profondeurs pour comparer celui-ci avec le gain apporté par la correction du système optique.

Dans la Figure 4.2.11 sont représentés les résultats de ces mesures. De manière à faciliter la lecture, nous avons calculé la moyenne des gains obtenus sur les différents neurones. Les barres d'erreurs correspondent à l'écart type de l'ensemble des mesures aux différentes profondeurs. On peut donc constater dans le plan correspondant au champ optimisé (situé à -10 μm), un gain global d'environ 25% de l'intensité de fluorescence mesurée, dont 10% de ce signal correspond à la correction des aberrations introduites par l'échantillon. On note enfin (comme cela était attendu) une diminution de ce gain lorsque l'on s'éloigne du plan optimisé.

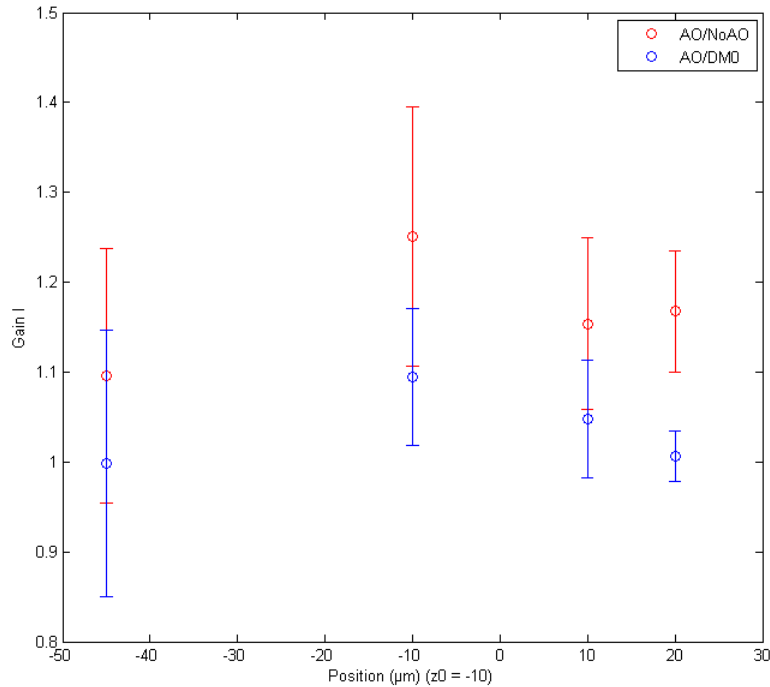


FIGURE 4.2.11 – Evolution du gain moyen en intensité de fluorescence mesurée en fonction de la profondeur. En rouge est représenté le gain global moyen et en bleu le gain moyen apporté par la correction des aberrations de l'échantillon. Les points correspondent à la moyenne de mesures réalisées sur plusieurs neurones dans les différents plans testés. Les barres représentent la dispersion des mesures de la population de cellules dans chaque plan. Le plan où l'optimisation a été réalisée est celui se trouvant à $z = -10 \mu\text{m}$

Pour terminer, il nous est possible de définir une plage autour de notre plan optimisé où le gain global apporté par la correction serait supérieur à 15% avec un gain réel (apport de la correction de l'échantillon seulement) d'au moins 5%. Ainsi, comme représenté dans la Figure 4.2.12, on peut estimer une plage acceptable d'efficacité de la correction dans le volume à environ $40 \mu\text{m}$ (soit $\pm 20 \mu\text{m}$ autour d'un plan optimisé).

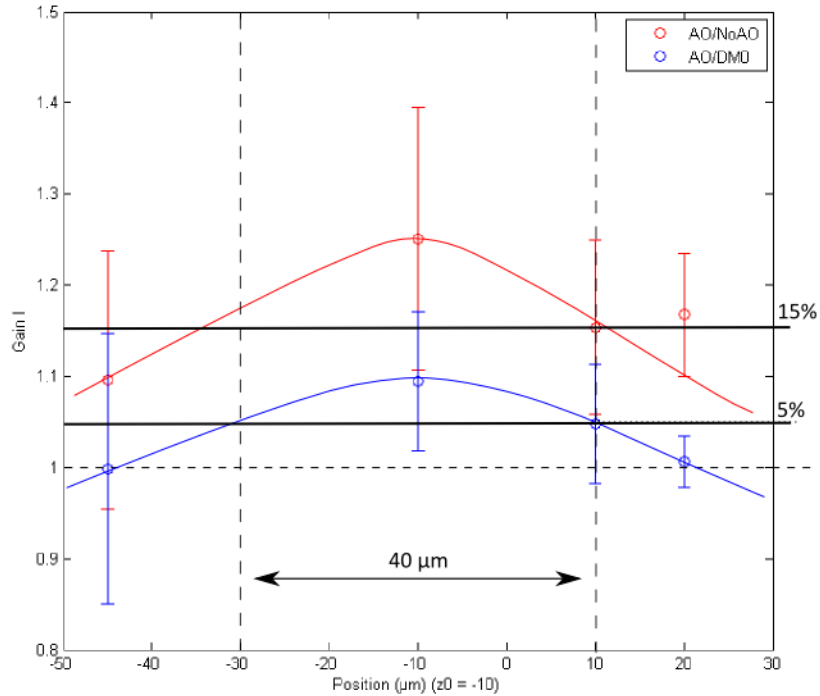


FIGURE 4.2.12 – Si on fixe comme contraintes d’avoir au minimum un gain global de 15% avec un gain réel d’au moins 5% (représentés par les lignes pleines), on obtient une plage d’efficacité de notre méthode de $\pm 20 \mu\text{m}$ autour de notre plan optimisé soit un total de $40 \mu\text{m}$ (représenté par les lignes verticales en pointillés)

On peut noter que cette plage est largement suffisante pour nos applications. En effet, de manière générale, le champ servant à l’optimisation est rarement plus éloigné qu’une dizaine de micromètres du plan d’intérêt. De plus, lorsqu’on considère l’hippocampe dans sa totalité, les couches qui nous intéressent (la couche pyramidale de CA1 et la couche granulaire du gyrus denté) ne mesurent que quelques dizaines de micromètres d’épaisseur. Ainsi, quelque soit le plan choisi dans ces couches pour réaliser l’optimisation, celle-ci sera applicable dans toute la couche.

4.2.3.3 Etude de l’efficacité des corrections dans le plan - mise en évidence de la variation spatiale des aberrations

Une autre limitation possible de notre méthode est liée à la taille des champs que nous souhaitons acquérir. En effet ceux-ci, très grands, limitent l’efficacité de nos corrections du fait des variations spatiales des aberrations optiques dans l’échantillon.

Pour mettre cela en évidence, dans la Figure 4.2.13 est présenté un exemple d’un champ imagé sur lequel nous avons appliqué notre méthode avec au centre l’image filtrée d’un champ. A l’issue d’un cycle d’optimisation, nous avons obtenu la correction correspondant à la forme située en bas à gauche de la figure (champ complet).

Le problème est que, si l’on définit les amplitudes optimales de correction sur des zones plus restreintes (ROI 1, 2 et 3), on se rend compte que celles-ci sont très différentes les unes

des autres, comme le montrent les formes associées à chacune d'entre elles. De ce fait, on constate bien que la taille de nos champs entraîne une forte variation spatiale des aberrations optiques dans celui-ci, limitant ainsi l'efficacité qu'une correction globale peut apporter à nos images.

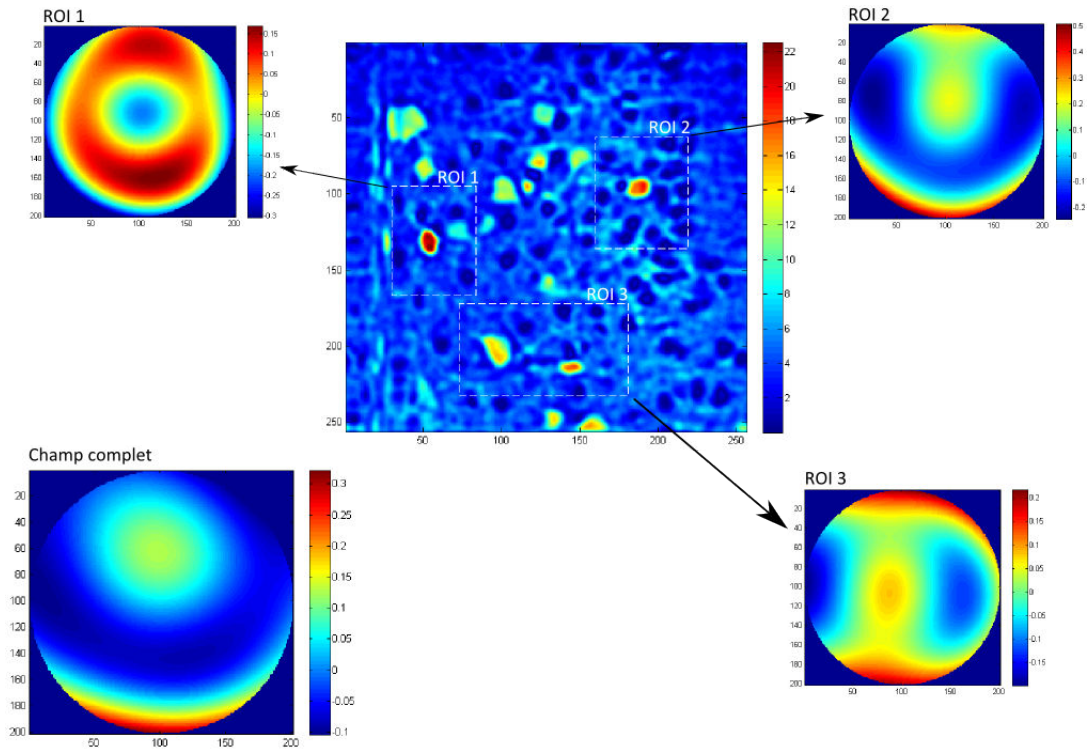


FIGURE 4.2.13 – Image filtrée d'un champ de $400 \mu\text{m}^2$. La correction obtenue après l'application d'une seule itération de la méthode locking est représentée en bas à gauche de la figure (échelle en radians). Trois autres corrections sont également représentées et correspondent aux amplitudes optimales obtenues après l'analyse de la métrique dans les trois zones d'intérêt ROI1, ROI2 et ROI3

Malheureusement, il n'est pas envisageable de diminuer la taille de nos champs, ceux-ci étant un point clé de nos expériences. Nous devons donc dans un premier temps nous accorder des gains apportés dans ces conditions. Néanmoins, il existe une méthode permettant la prise en compte de ces variations spatiales. Celle-ci n'ayant pas été appliquée durant ma thèse, elle sera présentée et discutée dans le chapitre suivant.

4.3 Applications *in vivo*

La dernière phase dans l'étude de la méthode locking a été d'appliquer celle-ci au cas *in vivo*. Cette ultime étape est essentielle car elle nous permettra de statuer sur l'efficacité ainsi que sur l'applicabilité de notre méthode dans une situation proche des conditions expérimentales finales.

Dans cette partie, nous décrirons dans un premier temps le processus permettant d'avoir des souris "équipées" d'une fenêtre d'observation (obligatoire pour pouvoir imager correc-

tement l'hippocampe). Puis, nous présenterons les résultats obtenus en testant la méthode locking sur un animal anesthésié.

4.3.1 Conception des échantillons

Les souris, utilisées pour de nombreuses applications dans l'équipe [4, 5, 6], suivent un long processus nécessitant la réalisation d'actes chirurgicaux complexes pour permettre la création d'une fenêtre d'observation au plus proche de l'hippocampe.

Pour cela, un protocole précis doit être respecté entre le jour de la naissance du souriceau jusqu'au premier jour d'expérimentation (Figure 4.3.1). Ainsi, deux mois après la naissance de la souris, une injection virale est réalisée. Il s'agit d'une l'injection permettant d'introduire le virus transportant le fluorophore dans les cellules composant la couche pyramidale de l'hippocampe. Après une semaine d'incubation, l'acte chirurgical est réalisé puis une phase d'"habitation" de la souris au dispositif optique est réalisé de manière à rendre inoffensif celui-ci pour la souris réduisant ainsi le stress de celle-ci durant les expériences. Ces expériences pourront donc débuter deux mois et demi après la naissance de la souris et s'étaleront sur plusieurs semaines.

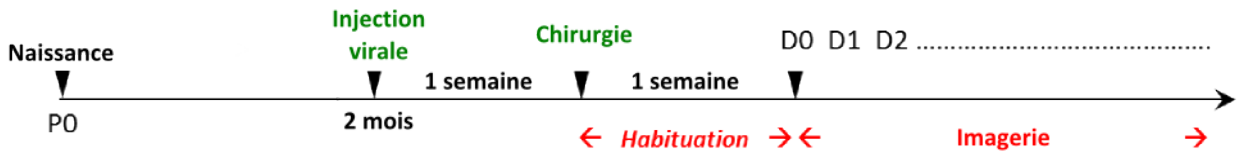


FIGURE 4.3.1 – Frise chronologique des différents actes réalisés sur une souris entre le jour de sa naissance jusqu'au début des expérimentations

La chirurgie, réalisée pour mettre en place une fenêtre d'observation au-dessus de l'hippocampe, est une méthode dérivée de celle utilisée par Dombeck et al [7] mais adaptée pour l'observation de champs. Celle-ci, représentée de manière schématique dans la Figure 4.3.2, repose sur la réalisation d'une craniotomie et d'une ablation corticale c'est-à-dire la suppression d'un bout de crâne ainsi que le retrait d'un petit volume de cortex. Par la suite, après avoir appliqué un gel d'agarose sur le tissu, la fenêtre composée d'un cône métallique dont la partie inférieure est constituée d'une lamelle de verre, est installée et scellée au crâne à l'aide de ciment dentaire. Ainsi, il sera possible d'observer les différentes couches composant l'hippocampe en illuminant celles-ci par l'ouverture en verre installée.

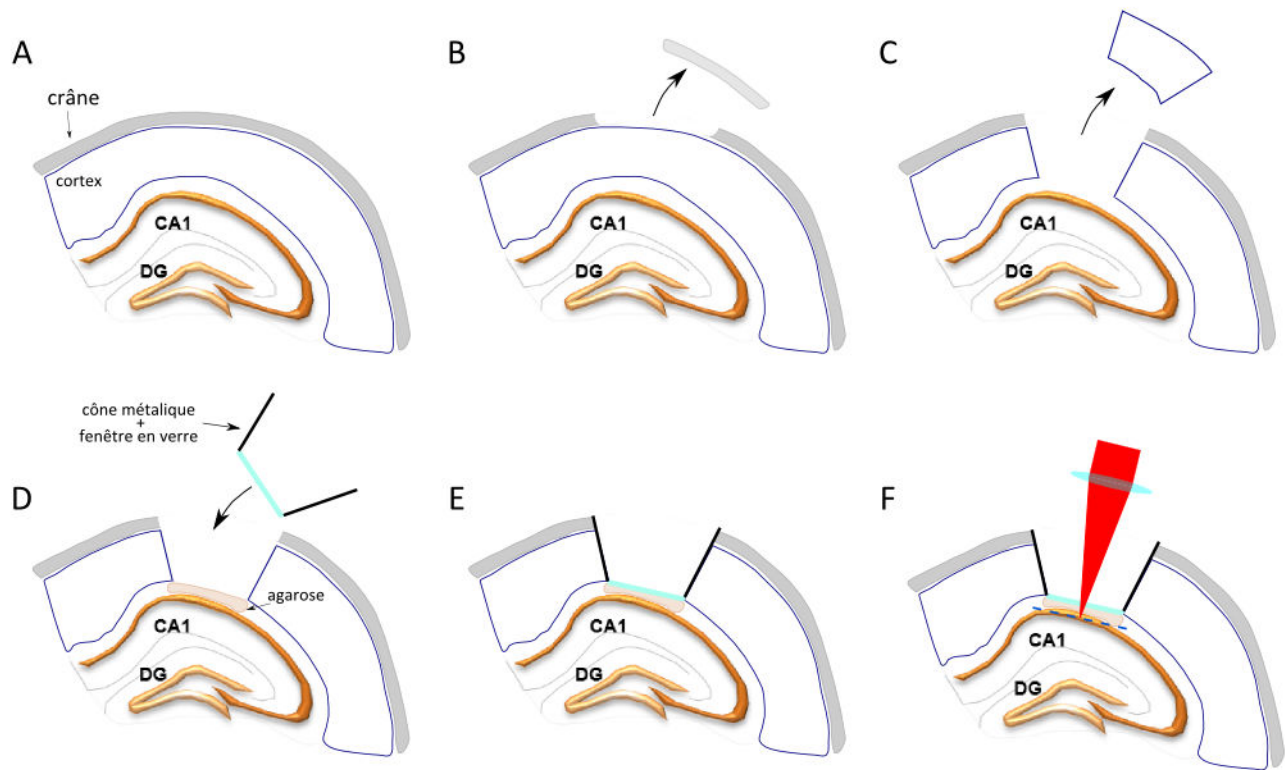


FIGURE 4.3.2 – Représentation schématique des différentes étapes de la chirurgie pour créer la fenêtre d’observation. L’hippocampe est à presque 1 mm de profondeur sous la surface du crâne. B - La première étape, après l’anesthésie de la souris, consiste à retirer un petit bout de crâne pour pouvoir atteindre le cerveau. C - Vient l’acte le plus délicat de toute la chirurgie, l’ablation d’un petit volume de cortex cérébral d’environ 1 mm^3 rendant visible la couche fibreuse présente juste au-dessus de l’hippocampe. D - E - Après avoir déposé une fine couche d’un gel d’agarose permettant de réaliser ”l’isolation” du cerveau avec l’extérieur, la fenêtre d’observation composée d’un cône métallique où dans le fond est disposé un bout de lamelle de verre circulaire, est insérée dans l’espace créé dans le cortex. Le tout sera soudé au crâne par l’application d’un ciment dentaire dans lequel une tige métallique sera insérée aidant à la fixation de la tête de la souris durant les expériences. F - Ainsi, après une période où la souris pourra reprendre des forces et s’habituer au système d’imagerie, les expériences pourront être réalisées sans intervention supplémentaire sur l’animal

4.3.2 Application de la méthode locking

Nous avons donc eu la possibilité de tester la méthode locking dans une configuration expérimentale proche du cas réel (souris éveillée). Pour cela, nous avons choisi de travailler avec un animal anesthésié de manière à limiter toutes perturbations liées au déplacement de la souris sur le tapis de course. A cet effet, l’anesthésie a été réalisée par le biais d’une injection d’une solution composée en proportion de 100 mg/kg de kétamine et 10 mg/kg de xylazine avec une posologie de $0,1\text{ mL}$ pour 10 g . Ainsi pour l’expérience, la souris pesant 42 g , celle-ci fût endormie avec l’injection d’un volume de $0,42\text{ mL}$ d’anesthésiant.

Une fois l’animal endormi, nous l’avons installé sur le microscope en fixant sa tête grâce

à la barre de fer installée lors de la chirurgie. Après avoir trouvé l'interface correspondant à la fenêtre d'observation et vérifier la bonne qualité du champ d'observation, nous avons positionné le champ d'imagerie à 180 μm de profondeur dans la couche pyramidale de CA1. Avec une puissance de 250 mW, nous avons appliqué le protocole expérimental décrit dans la sous-section 4.2.2.2.

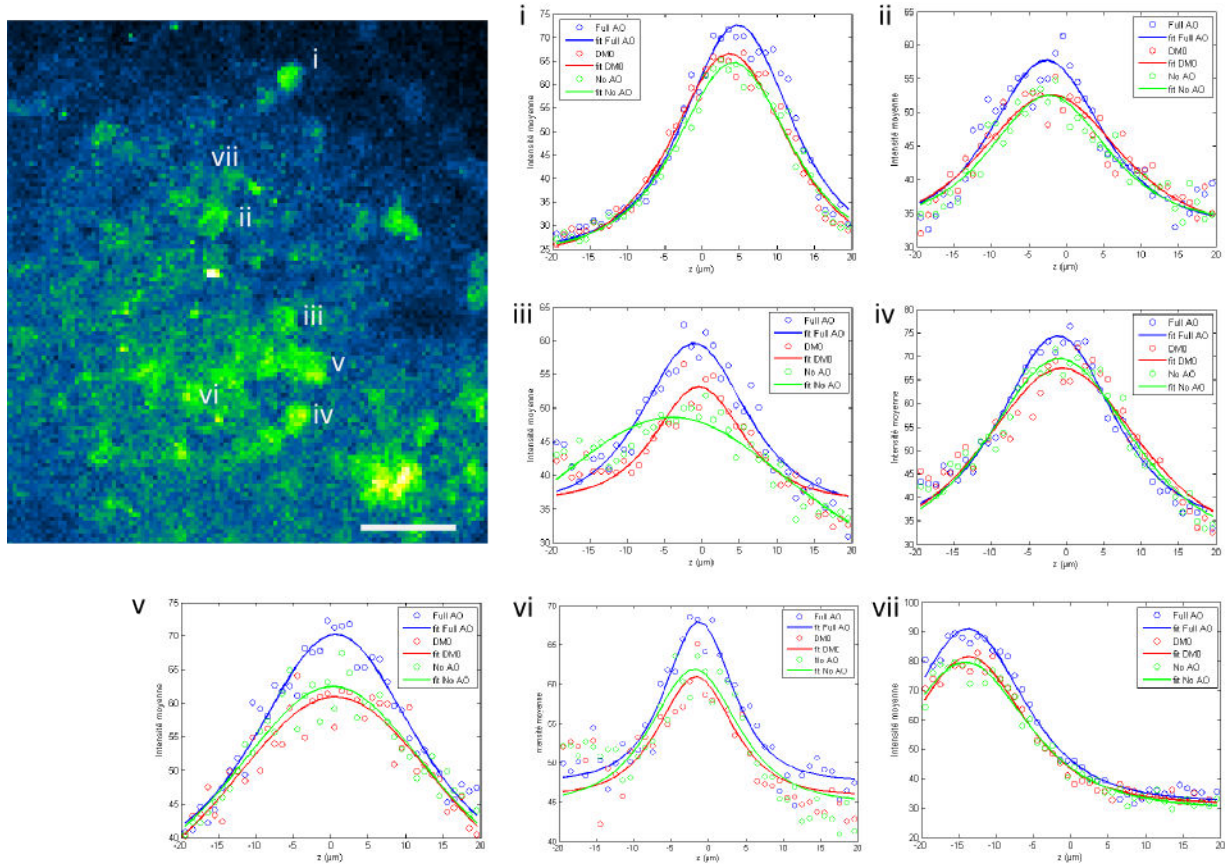


FIGURE 4.3.3 – Image de 400 μm^2 et de 128 px² provenant d'un stack de 40 μm d'épaisseur centré à $z = 180 \mu\text{m}$. Sur celle-ci, sept cellules sont identifiées (notées i à vii) dont les profils d'intensité de chacune d'entre elles sont présentés à côté. Sur chaque graphique, les valeurs de l'intensité moyennée d'une petite région centrée sur la cellule sont tracées et ce pour toutes les images du stack ainsi que pour toutes les configurations du miroir déformable. Ainsi, en bleu les données correspondantes à la correction complète obtenue sont représentées (Full AO), en rouge les données pour le cas où la correction appliquée est celle du système optique (DM0) et en vert le cas où le miroir déformable est à plat (No AO). Barre d'échelle 40 μm

Nous avons donc obtenu à l'issue de trois itérations de la méthode locking (utilisant 5N mesures par cycle) les résultats présentés dans la Figure 4.3.3. Comme on peut le constater, l'application de la méthode a permis d'améliorer le signal ainsi que la résolution de nombreuses cellules réparties dans le plan mais également dans le volume. Ainsi, les gains en intensité enregistrés sur onze neurones vont de 1% à 60% comme décrit dans la Figure 4.3.4. En regroupant l'ensemble des résultats, on obtient un gain moyen de 20,6% sur la totalité des 40 μm d'épaisseur du stack volumique enregistré.

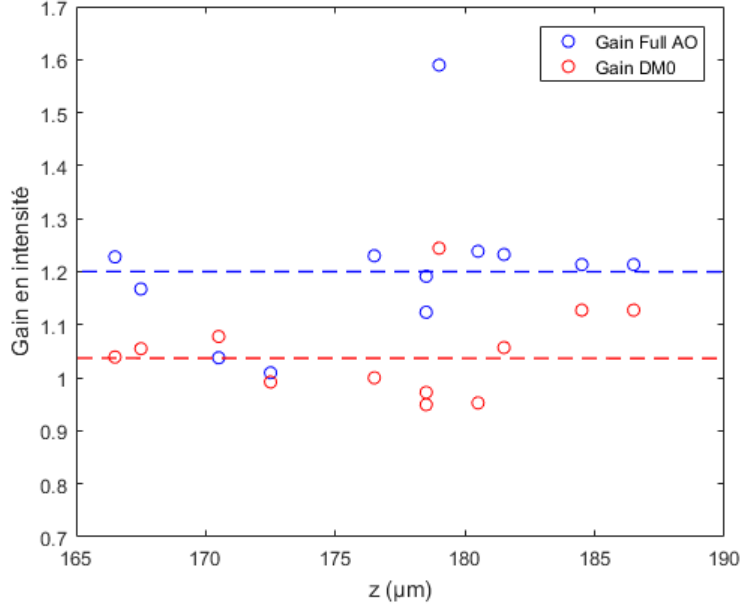


FIGURE 4.3.4 – Représentation du gain en intensité normalisé quantifié sur plusieurs neurones sélectionnés à différentes profondeurs. En bleu, les gains correspondent à la correction complète des aberrations et en rouge ceux obtenus uniquement en corrigeant les aberrations du système optique. Les lignes en pointillés bleu et rouge correspondent aux gains moyens calculés

En ce qui concerne le gain apporté par la correction des aberrations du système optique seul, on constate que la correction n’entraîne que très peu d’amélioration du signal de fluorescence à cette profondeur. Cette amélioration est d’ailleurs, sur certaines cellules testées, moins bonne que lorsque le miroir déformable est à plat. En effet, ce phénomène est d’ailleurs parfaitement visible sur les graphiques (iv), (v) et (vi) de la Figure 4.3.3 où le profil No AO est supérieur à celui de DM0. Ainsi, en prenant en compte de la même manière les mesures effectuées, on n’obtient qu’un gain moyen de 4% sur le volume en utilisant uniquement la correction du système optique.

En étudiant les fibres se trouvant dans des zones proches de l’interface et donc très éloignées du plan dans lequel nous avons défini la correction (Figure 4.3.5), on constate que la correction du système optique améliore grandement le signal comme prévu. Cependant, au-delà d’une centaine de micromètres de tissu, on observe une inversion des données (Figure 4.3.5 (a)). Malgré cela, même si la correction des aberrations du système optique perd rapidement de son efficacité après quelques dizaines de micromètres de tissu vivant, il est possible de constater que la correction des aberrations induites par l’échantillon réalisée à 180 μm entraîne encore un léger gain du signal de fluorescence mesuré à plus de 100 μm au-dessus du plan d’origine.

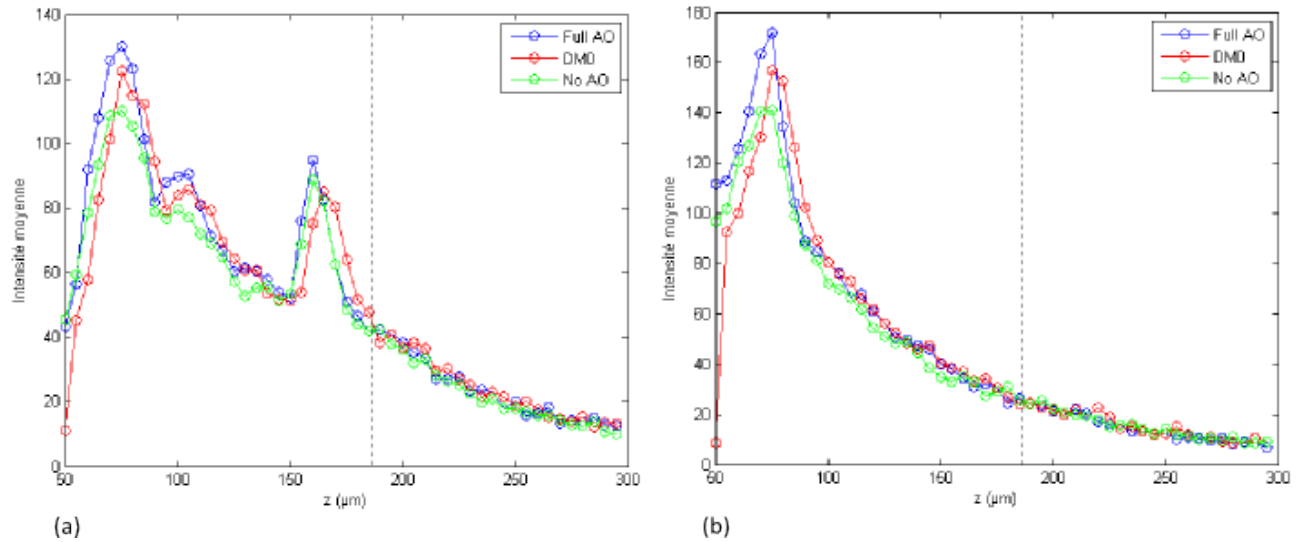


FIGURE 4.3.5 – Evolution du signal de fluorescence moyenné sur deux régions le long d’un stack d’images parcourant 250 μm d’épaisseur. En bleu les données correspondant à la correction complète obtenue sont représentées (Full AO), en rouge les données pour le cas où la correction appliquée est celle du système optique (DM0) et en vert le cas où le miroir déformable est à plat (No AO). La ligne en pointillés correspond au plan sur lequel l’optimisation a été réalisée

Ainsi l’application de la méthode locking aura permis d’enregistrer des améliorations en profondeur dans le cerveau d’une souris anesthésiée. Seul ombre au tableau, la forte limitation de la correction du système optique rendant celle-ci inefficace après quelques micromètres. L’inclinaison ainsi que l’état optique de la fenêtre d’observation pouvant être la source de cette limitation et étant différents pour chaque souris testée, ce problème pourrait s’avérer récurrent.

Pour pallier à cela, une option pourrait être de réaliser une optimisation rapide des aberrations juste après la fenêtre de manière à la prendre en compte avec les aberrations du système optique. Pour cela, il serait intéressant d’utiliser la couche de fibres (Figure 4.3.6), première zone que l’on traverse lorsqu’on pénètre dans le cerveau. En effet, cette couche très fluorescente offre la possibilité d’utiliser une méthode d’optimisation rapide et plus classique en sélectionnant comme métrique le signal moyen de l’image. Les problèmes de dérive présentés dans les chapitres précédents ne s’appliqueraient alors plus car la localisation de la zone se trouve déjà à la hauteur maximum.

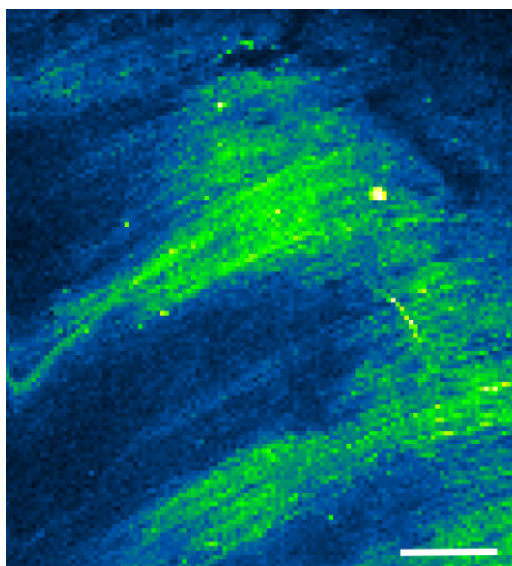


FIGURE 4.3.6 – Image de $400\ \mu\text{m}^2$ des fibres présentes à l'interface avec la fenêtre d'observation. Barre d'échelle $40\ \mu\text{m}$

Ainsi en mettant en oeuvre cette idée, nous serons en mesure de travailler librement dans n'importe quel animal et cela avec des conditions optiques initiales optimales s'affranchissant de toute variabilité liée à l'inclinaison et à la qualité de la fenêtre d'observation.

Bibliographie

- [1] Schwertner M., Aberrations and the Benefit of Their Correction in Confocal Microscopy, Adaptive Optics for Biological Imaging, p51-74, CRC Press (2013)
- [2] Débarre D., Botcherby E. J., Booth M. J. and Wilson. T., Adaptive optics for structured illumination microscopy, Optics Express, 2008, Vol. 16, Issue 13, 9290-9305
- [3] Zeng J., Mahou P., Schanne-Klein M.-C., Beaurepaire E. and Débarre D., 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues, Biomedical Optics Express, 2012, Vol. 3, Issue 8, 1898–913
- [4] Muldoon S. F., Villette V., Tressard T., Malvache A., Reichinnek S., Bartolomei F. and Cossart R., GABAergic inhibition shapes interictal dynamics in awake epileptic mice, Brain, 2015, Vol. 138, 2875-2890
- [5] Villette V., Malvache A., Tressard T., Dupuy N. and Cossart R., Internally Recurring Hippocampal Sequences as a Population Template of Spatiotemporal Information, Neuron, 2015, Vol. 88, Issue 2, 357-66
- [6] Malvache A., Reichinnek S., Villette V., Haimerl C. and Cossart R., Awake Hippocampal Reactivations Project onto Orthogonal Neuronal Assemblies, Science (2016)
- [7] Dombeck D. A., Harvey C. D., Tian L., Looger L. L., and Tank D. W., Functional imaging of hippocampal place cells at cellular resolution during virtual navigation, Nature Neurosciences, 2010, Vol. 13, 1433–1440

Chapitre 5

Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous allons essayer de porter un regard critique sur la méthode et sur les travaux menés pendant ces trois années. Nous commencerons par établir un récapitulatif global de cette thèse en évoquant les différentes étapes d'évolution de celle-ci. Puis, nous allons effectuer une comparaison de notre méthode avec les autres techniques développées par la communauté scientifique internationale durant la période de fin de ce projet (c'est-à-dire entre 2015 et 2016). Pour finir, nous aborderons différentes perspectives pouvant potentiellement améliorer les résultats obtenus avec la méthode locking.

5.1 Conclusions

Tout au long de ces trois ans, j'ai eu l'occasion de travailler sur le développement d'un microscope bi-photon disposant d'un système d'optique adaptative pour l'imagerie de l'activité des réseaux neuronaux en profondeur dans le cerveau de souris.

A cet effet, j'ai conçu le système optique dans sa totalité en prenant en compte certaines caractéristiques liées aux contraintes expérimentales mais également en considérant les obligations apportées par l'utilisation de l'optique adaptative. J'ai ainsi mis au point un microscope permettant l'acquisition d'images de $400 \mu\text{m}^2$ avec un taux d'acquisition pouvant aller jusqu'à 5 Hz. En parallèle, de manière à contrôler celui-ci ainsi que le miroir déformable, j'ai développé l'interface informatique. Cela donne la possibilité à l'utilisateur d'effectuer différents types d'acquisitions (images simples, timelapses, stacks volumiques) mais également d'utiliser la méthode d'optimisation des aberrations optiques mise en place au cours de ma thèse ainsi que la méthode initiale (optimisation modale) sur laquelle je me suis basé pour développer la méthode locking.

En ce qui concerne la partie liée à l'optique adaptative, de manière à compenser les problématiques liées à l'imagerie non linéaire en profondeur dans des échantillons biologiques, nous avons mis au point une méthode basée sur une métrique adaptée permettant l'optimisation des aberrations optiques. Cette métrique, appelée dans ce manuscrit la wavelet, est une métrique "objet dépendante". Elle nécessite de sélectionner un type d'objet présent dans les échantillons par le biais de l'application d'un filtre fréquentiel ajustable et opérant sur les images acquises. C'est le contraste de ces images filtrées qui est alors utilisé comme métrique. Ainsi, l'avantage de cette métrique (filtrage puis calcul du contraste) permet d'avoir une valeur maximale de celle-ci dans le plan d'observation des objets d'intérêt.

Cette propriété est essentielle pour la méthode mise en place. Baptisée "locking", celle-ci est basée sur l'optimisation des aberrations optiques dans des plans présentant un maximum local de la métrique. En faisant cela, nous limitons fortement les perturbations introduites par certains modes de déformation de la base des polynômes de Zernike entraînant des translations du champ d'imagerie mais également une augmentation non souhaitée de la PSF.

Ainsi comme nous avons pu le voir, la méthode locking donne lieu à des gains conséquents sur les champs testés. Celle-ci entraîne en effet des gains de l'intensité du signal de fluorescence mesuré allant jusqu'à 50% à 200 μm de profondeur et près de 25% à 400 μm . Ces 50% correspondent à ce que l'on a appelé la correction globale comprenant la correction des aberrations introduites par le système optique et celle des aberrations introduites par l'échantillon. Nous avons ainsi pu montrer que la correction des aberrations induites par

l'échantillon intervenait au maximum à 20% du gain global. Pour conclure, grâce à cette méthode, nous sommes capables d'obtenir en moyenne des gains en intensité du signal de fluorescence mesuré de 20% sur des champs imagés de $400 \mu\text{m}^2$.

Nous avons également démontré l'applicabilité de la méthode locking en déterminant la plage d'efficacité de celle-ci. En effet, comme nous l'avons expliqué dans le troisième chapitre, le concept de cette méthode consiste à sélectionner un maximum local de la métrique d'optimisation pour corriger les aberrations optiques. Seulement, si la zone d'intérêt ne présente pas de tels maxima, il est envisageable de s'éloigner volontairement pour aller corriger les aberrations dans un plan proche présentant un maximum local de la métrique. Or, une faible plage d'action limiterait grandement l'efficacité de la méthode. Ainsi, nous avons montré que cette plage était de $\pm 20 \mu\text{m}$ autour du plan optimisé (soit un volume total de $40 \mu\text{m}$ d'épaisseur), ce qui offre la possibilité de venir appliquer la méthode locking à des distances conséquentes des plans d'intérêt.

Pour finir, nous avons testé la méthode locking lors d'expériences *in vivo* sur animal anesthésié. Nous avons ainsi obtenu à $180 \mu\text{m}$ des gains en intensité de fluorescence mesuré allant jusqu'à 25% (avec une moyenne sur un volume de $40 \mu\text{m}$ d'épaisseur de 20%).

Pour conclure sur l'application *in vivo*, nous pouvons craindre que le gain moyen apporté par la correction des aberrations avec notre méthode risque de limiter l'accès à des structures profondes comme le gyrus denté. Néanmoins, ce gain pourrait être suffisant pour rendre visible l'activation de certaines cellules dont le signal trop faible est caché par le bruit dans l'image. Cela permettrait potentiellement l'observation de nouvelles formes d'activités. Ainsi, par exemple dans le cas de l'imagerie de l'activité synchrone associée aux "ripples" [1], 50% de l'activité détectée a un signal calcique 20% en-dessous du niveau de détectabilité (niveau de bruit). On peut donc s'attendre à une augmentation significative du nombre d'activités détectées grâce à l'apport de l'optique adaptative.

5.2 Regard critique sur la méthode locking

L'optique adaptative en microscopie est apparue depuis une dizaine d'années et est maintenant une discipline en pleine expansion. De nombreuses techniques et méthodes visant à réduire l'impact des aberrations optiques en imagerie ont ainsi vu le jour au cours de ma thèse. Dans cette section, nous allons réaliser la revue de quelques publications importantes parues entre 2015 et 2016, ce qui nous permettra d'effectuer la comparaison de nos travaux avec ceux de la communauté.

Pour commencer, nous allons parler de la méthode WSAO (pour Wavefront Sensorless Adaptive Optics) développée par Wahl et al [2]. Cette méthode est basée sur un algorithme d'optimisation utilisant une approche par hill-climbing et se servant de la base des polynômes de Zernike comme biais d'optimisation et de l'intensité totale (somme de l'intensité de tous les pixels composant l'image) comme métrique d'optimisation. Nous nous sommes intéressés en particulier à cet article car Wahl et al ont eu recours au même modèle de miroir déformable que le nôtre, soit un PTT-111-5 de Iris AO. Dans leurs expériences, le miroir PTT-111-5 a été utilisé au maximum de ses possibilités en testant les vingt modes de la base des polynômes de Zernike que celui-ci est capable de générer.

Dans la Figure 5.2.1 sont représentés les résultats d'une optimisation réalisée sur une cellule ganglionnaire située dans le fond de l'oeil d'une souris. Ainsi, nous pouvons noter en (A)

que l'amplitude des bas ordres de la base est beaucoup plus importante que celle des ordres plus hauts. Cela justifie donc notre approche qui ne prend en compte que les sept premiers ordres de la base des polynômes de Zernike. En effet, en regardant l'évolution de l'intensité normalisée représentée en (B), nous constatons que les modes d'ordre supérieur à celui de l'aberration sphérique (mode numéro 12) n'apportent que 20% de l'amélioration globale en intensité. Pour finir, la correction apportée offre une meilleure observation des cellules ganglionnaires et notamment des structures plus petites comme les dendrites indiquées par la flèche rouge (Figure 5.2.1 (C-a) et (C-b)).

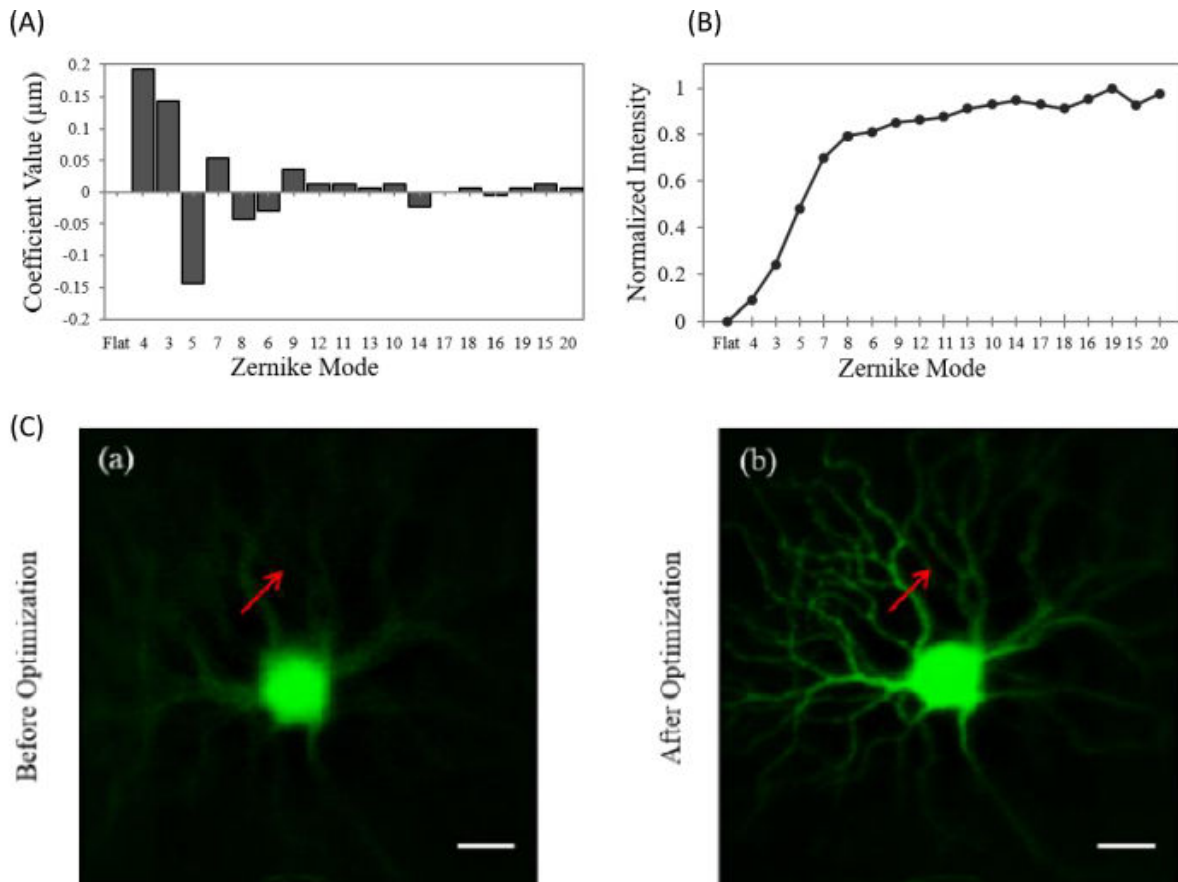


FIGURE 5.2.1 – Exemple d'application de la méthode WSAO sur une cellule ganglionnaire présente dans le fond de l'oeil de souris. (A) En utilisant tous les modes que le miroir déformable est capable de générer, les premiers ordres de la base correspondent à la plus grosse partie des aberrations introduites par cet échantillon. (B) La correction de ces mêmes modes apporte 80% de l'amélioration globale en intensité. (C a-b) Ainsi, il est possible après optimisation de visualiser les dendrites provenant de cette cellule. Echelle 20 μm [2]

Une autre approche est celle développée par Gawalduge et al [3]. Il s'agit d'une méthode basée sur le marquage spécifique de structures qui vont servir "d'étoiles guides" pour l'optimisation. Les astrocytes, cellules gliales du système nerveux central, ont en effet été marqués avec de la sulforhodamine (SR101), un fluorophore différent des autres utilisés dans l'échantillon. Ainsi, lors de la phase dédiée à l'optimisation, ces structures seront imagées pour corriger les aberrations optiques. De cette manière, les autres éléments d'intérêt ne subiront pas une illumination inutile limitant le photoblanchiment de ceux-ci.

Pour corriger les aberrations, la méthode utilise le signal de fluorescence deux photons directement comme métrique d'optimisation se positionnant sur les astrocytes et enregistrant directement le signal (sans imager ceux-ci). De cette façon, il est possible de grandement accélérer la durée des phases d'optimisation atteignant par exemple 18 secondes pour la correction présentée dans la Figure 5.2.2 (D). En ayant recourt à un SLM, il a d'ailleurs été possible de tester différents types d'algorithmes d'optimisation basés sur l'utilisation de la base des polynômes de Zernike mais également par le biais d'une génération d'une base d'Hadamar.

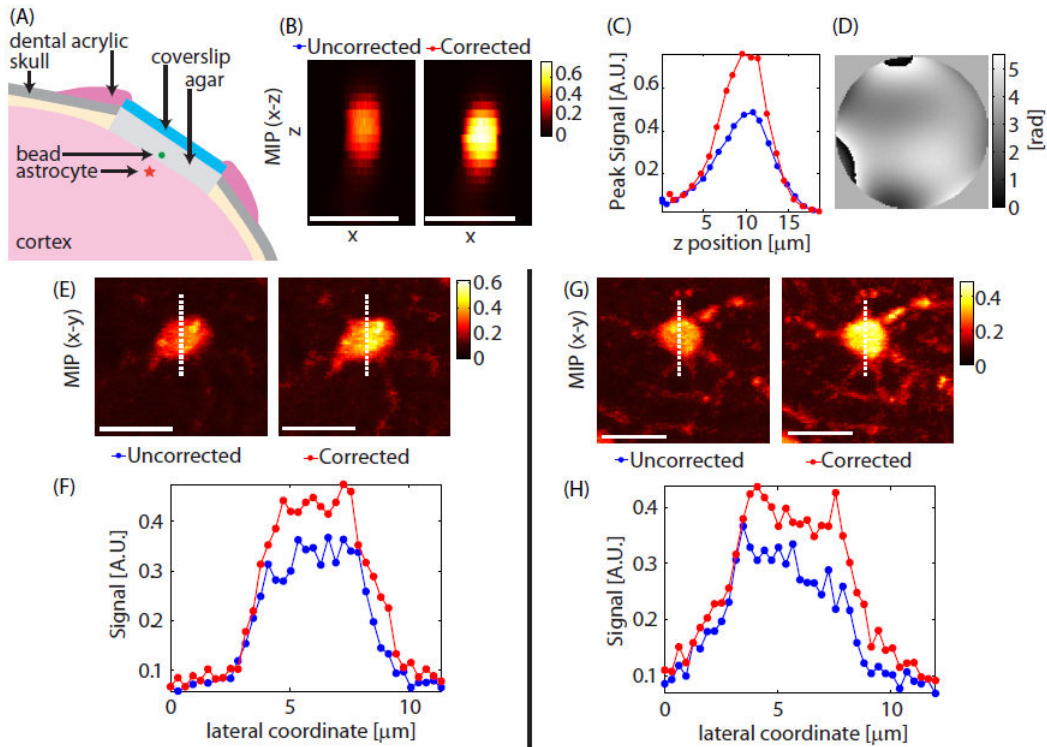


FIGURE 5.2.2 – (A) Pour corriger les aberrations introduites par l'installation d'une fenêtre d'observation, l'introduction de microbilles dans l'agar présent entre la fenêtre de verre et le cerveau est réalisée. (B-C-D) Par la suite, l'utilisation d'astrocytes marqués avec de la sulforhodamine permet d'optimiser les aberrations optiques après avoir pénétré le cortex. (E-G) Exemples d'images d'astrocytes avant et après optimisation à 65 μm de profondeur. (F-H) Evolution de l'intensité enregistrée le long de la ligne en pointillés. Echelle 10 μm [3]

Ensuite, nous allons présenter un article remettant en cause les pratiques de l'optique adaptative en imagerie. Dans celui-ci, Wang et al [4] décrivent en effet une approche permettant de réaliser des optimisations directes via l'utilisation d'un détecteur de front d'onde Shack Hartmann jusqu'à plusieurs centaines de micromètres de profondeur. Ce qui a longtemps été cru impossible a été réussi : Wang et al ont pu optimiser directement les aberrations optiques dans le cortex de souris en utilisant des étoiles guides excitant par effet deux photons des fluorophores émettant dans le proche infrarouge. Ce signal moins impacté par l'absorption et la diffusion de l'échantillon est alors détecté et envoyé directement sur le détecteur de front d'onde permettant une quantification directe des aberrations optiques impactant le front d'onde. Ainsi, il est possible de venir effectuer des optimisations à des profondeurs

beaucoup plus importantes que d'habitude atteignant $600\ \mu\text{m}$ de profondeur.

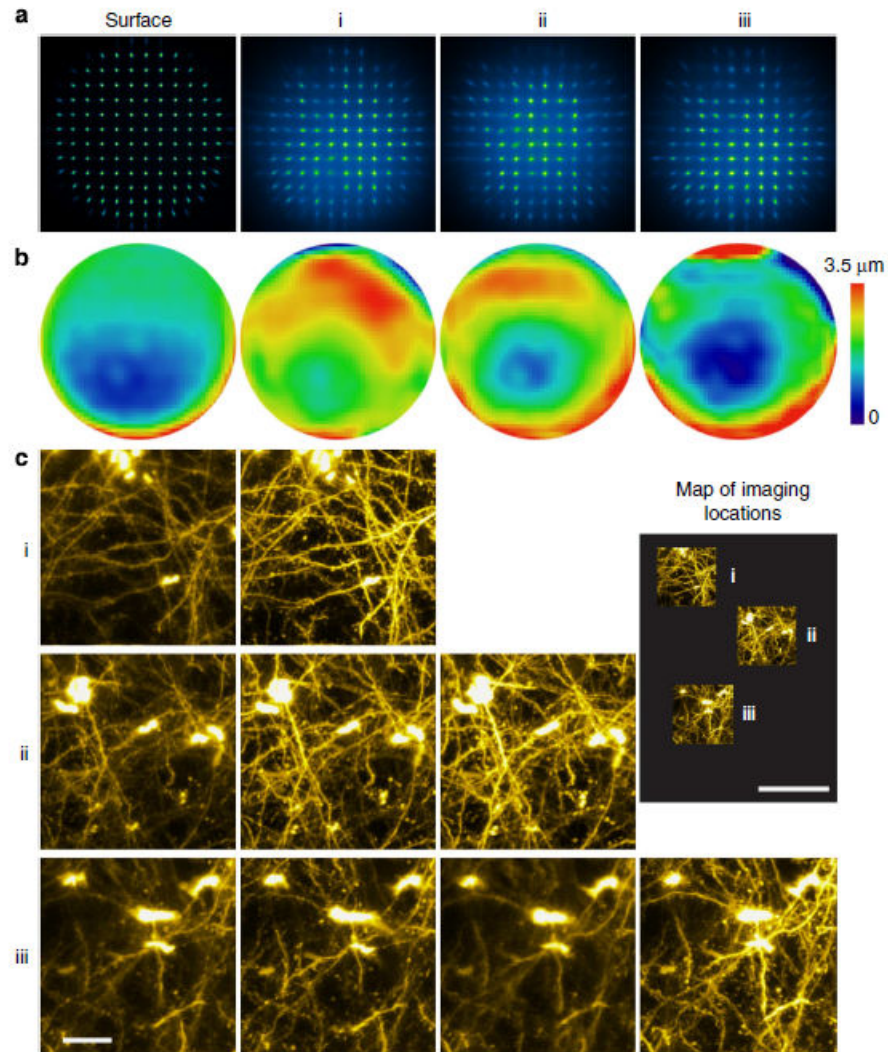
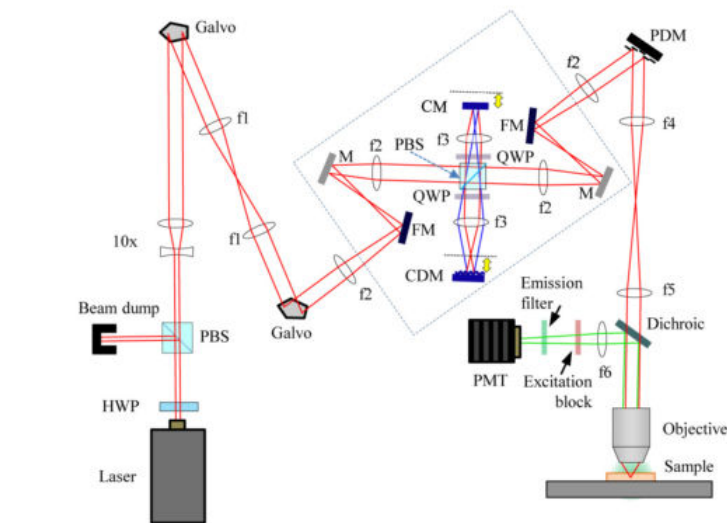


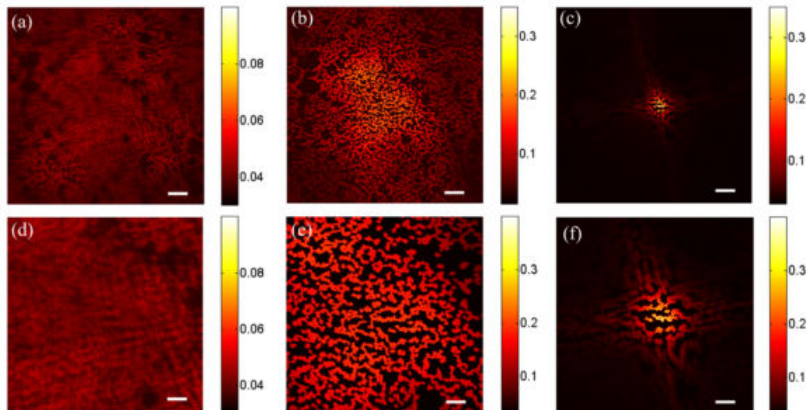
FIGURE 5.2.3 – Exemple d'application de la méthode d'optimisation directe à trois profondeurs différentes (i, ii et iii) sur un volume total de $400\ \mu\text{m}$ d'épaisseur. (a) Images de la surface du détecteur de front d'onde Shack Hartmann à l'interface avec l'échantillon et les trois zones testées. (b) Représentation des corrections appliquées ayant été calculées par le biais du détecteur de front d'onde. (c) Images des plans testés (i, ii et iii) avec la correction optimale ainsi que de celles des positions précédentes appliquées. Echelle des images $20\ \mu\text{m}$. Echelle de la carte de localisation $100\ \mu\text{m}$ [4]

Une autre méthode décrite par Paudel et al [5] ainsi que Mertz et al [6], appelée optique adaptative conjuguée, pourrait être une alternative intéressante pour la correction de nos grands champs d'imagerie. Cette méthode consiste à employer deux miroirs déformables, le premier nommé CDM (pour Conjugated Deformable Mirror) et le second PDM (pour Pupill Deformable Mirror). La particularité de cette approche est de réaliser la conjugaison de ces deux miroirs sur deux plans différents. Ainsi, le miroir PDM est conjugué avec la pupille arrière de l'objectif du microscope comme il est habituel de le faire. Le second miroir CDM est, quant à lui, conjugué avec le plan d'imagerie de l'objectif (c'est-à-dire le plan imagé dans

l'échantillon). L'idée de cette méthode est donc d'effectuer une correction dépendante du champ sans avoir à changer la forme du miroir. Le miroir PDM effectue une correction classique (moyenne sur tout le champ) en prenant en compte le système, l'interface et le volume d'échantillon. Quant au miroir CDM, conjugué avec un plan à l'intérieur de l'échantillon, il sera scanné en même temps et de la même façon que l'échantillon. Ce scan sur le CDM induit de ce fait un changement de la correction en fonction de la position du laser dans le champ permettant une correction plus précise des variations spatiales des aberrations optiques dans le plan d'imagerie. De cette manière, Paudel et al montre qu'en appliquant cette approche, il est possible d'obtenir une correction des aberrations optiques dans le champ beaucoup plus large.



A-



B-

FIGURE 5.2.4 – A - Schéma du système d'optique adaptative conjugué. Le miroir déformable conjugué avec le plan d'imagerie (CDM) ainsi que le miroir de compensation (CM) sont montés sur une platine de translation permettant d'adapter la position de CDM avec le plan d'imagerie. B - Images de microbilles de $1 \mu\text{m}$ de diamètre au travers d'un masque de phase aberrant. (a-b-c) Champs de $250 \mu\text{m}^2$, (a) sans optique adaptative, (b) avec optique adaptative conjuguée, (c) avec correction de la pupille arrière uniquement. Barre d'échelle $25 \mu\text{m}$ (d-e-f) Champs de $100 \mu\text{m}^2$ avec, (d) sans optique adaptative, (e) avec optique adaptative conjuguée, (f) avec correction de la pupille arrière uniquement. Barre d'échelle $10 \mu\text{m}$ [5]

Pour finir, j'aimerais présenter une dernière technique qui pourrait dans un futur plus ou moins proche permettre d'imager des zones très profondes sans avoir recours à l'optique adaptative. Horton et al [7] propose en effet de délaissier le contraste à deux photons pour l'imagerie à trois photons. Effectivement, l'excitation à trois photons requiert l'utilisation d'une source de lumière émettant à des longueurs d'onde beaucoup plus grandes que celles utilisées en contraste biphotonique. Ainsi, en plus de grandement diminuer la création de signal généré hors du plan d'imagerie, l'utilisation de ce contraste améliore fortement la résolution en rendant la localisation de l'excitation beaucoup plus précise. Pour finir, la fenêtre d'excitation étant autour de 1700 nm, celle-ci permet de diminuer grandement l'impact de l'absorption du tissu et de la diffusion de celui-ci. Il est donc possible d'acquérir des images à plus de 1 mm de profondeur dans le cerveau (au travers du cortex suivi de l'hippocampe) de souris lors d'expériences *in vivo*. La principale difficulté de cette technique reste néanmoins d'acquérir un laser pouvant émettre à de telles longueurs d'ondes.

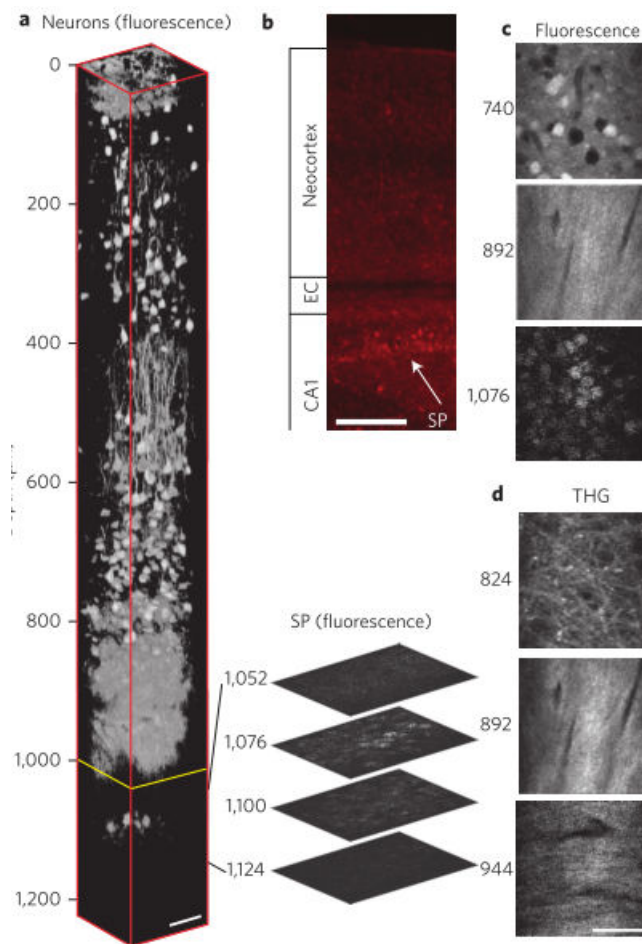


FIGURE 5.2.5 – (a) Images d'un volume de cerveau partant de l'interface entre le cerveau et le crâne jusqu'à 1,2 mm de profondeur. Barre d'échelle 50 μm (b) Image en épifluorescence d'une section d'un cerveau de souris correspondant approximativement à la zone imagée en (a). Il est possible d'y voir la couche correspondant au néocortex puis la couche CA1 de l'hippocampe avec notamment la couche de cellules pyramidales (SP). Barre d'échelle 250 μm (c) Images de fluorescence et (d) images de génération de troisième harmonique réalisées à différentes profondeurs. Barre d'échelle 50 μm [7]

Comme nous avons pu le voir, le domaine de l’optique adaptative appliqué à l’imagerie biologique est en plein essor développant des méthodes innovantes afin d’aider les biologistes à répondre à leurs questions. Néanmoins, aussi puissantes soient-elles, beaucoup de ces méthodes sont difficilement applicables directement car elles nécessitent l’utilisation de fluorophores spécifiques pouvant être délicats à mettre en place dans les échantillons.

Notre méthode se distingue ainsi par son adaptabilité et sa capacité d’application à tout type d’échantillons et de contrastes. De plus, de manière générale, les techniques précédemment présentées ont toutes des gains importants mais sur des champs assez petits ($100\ \mu\text{m}^2$ voire moins), ceux-ci étant en effet suffisants pour étudier des petites structures. Or, dans notre cas où le champ imagé doit être très grand, ces méthodes risquent de perdre en efficacité. Ainsi, en utilisant la méthode locking, nous avons obtenu des gains moyens de 20% sur des champs de $400\ \mu\text{m}^2$ soit seize fois plus grands que ceux décrits dans la littérature.

Néanmoins, notre approche étant limitée par la taille de correction du champ, l’approche par conjugaison de Paudel et al pourrait, combinée à notre méthode d’optimisation, s’avérer très efficace. Enfin, le contraste à trois photons donne des résultats très intéressants. Seulement, le temps nécessaire pour réaliser une image et surtout le matériel (sources laser) nécessaire pour le réaliser rendent à l’heure actuelle celui-ci impossible à appliquer dans nos conditions expérimentales. Cependant, le jour où cette technique sera plus répandue dans les laboratoires, il sera très intéressant de voir ce que l’optique adaptative pourra apporter car même si la profondeur de pénétration à trois photons est très grande, cela n’enlève pas le fait que le front d’onde est soumis à des aberrations optiques.

5.3 Perspectives

Maintenant que nous avons mis en place les premières pierres de l’édifice, il est temps de nous poser la question sur le futur du système. Tout d’abord, nous aborderons l’avenir direct de notre technique en discutant des améliorations qui pourraient lui être apportée. Puis, nous terminerons cette partie en discutant sur l’application de notre méthode à d’éventuelles techniques au sein de l’équipe.

En ce qui concerne le système ainsi que la méthode, de nombreux points restent à améliorer. Nous pouvons classer ceux-ci en deux catégories :

- Amélioration technique du système
- Amélioration de la méthode

Amélioration technique du système

D’un point de vue technique, plusieurs points spécifiques doivent être perfectionnés. La partie du système à améliorer est principalement liée au dispositif de balayage. En effet, les VI (nom des logiciels développés via LabView) utilisés sont soumis à un défaut introduisant des artéfacts de balayage. Lorsque le miroir réalise un mouvement d’aller (mouvement de gauche à droite), le programme effectue l’acquisition du signal. Cependant, le programme continue l’enregistrement lors du retour du miroir. Si le temps de retour est trop long, cela

génère alors un décalage d'un nombre de pixels constant sur toute l'image. Ce décalage est d'autant plus grand que la vitesse de balayage est élevée.

Ce problème n'était jusqu'à présent pas forcément critique au sein de l'équipe MOSAIC car les expériences utilisant ces programmes d'imagerie étaient principalement des techniques d'imagerie non linéaires où les signaux nécessitaient des temps de pause importants pour avoir des images suffisamment contrastées. Ainsi, l'artefact ne représentait sur ces images que quelques pixels n'impactant pas celles-ci. Néanmoins, mon arrivée dans l'équipe ainsi que celle de nouveaux membres réalisant de l'imagerie du développement de la drosophile a très largement créé le besoin de trouver une solution à cet artefact. Cette solution, développée lors d'un stage de Master, a alors consisté à réaliser l'acquisition des images en mode aller-retour enregistrant de ce fait les données et recréant les images après coup. Il faudrait donc implémenter celle-ci dans le programme d'imagerie afin d'atteindre la vitesse d'acquisition que nous nous étions fixés (dans l'état actuel, ce n'est pas réalisable à cause de ces artefacts).

Un autre problème rencontré est dû à des défauts de synchronisation entre le programme d'imagerie et le driver du miroir déformable. En effet, le driver étant contrôlé avec des fonctions Matlab appelées dans un environnement et un programme LabView, il est fréquent que lors de l'appel de celui-ci par le programme principal (durant les phases d'optimisation ou d'imagerie), le driver ne réponde pas obligeant l'arrêt manuel de la séquence. Pour le moment, aucune solution ne semble résoudre ce problème car il n'y a pas de fonction de contrôle du miroir déformable existante sous LabView. L'unique issue semble être le transfert complet du programme sous Matlab (ou éventuellement un autre langage) afin d'homogénéiser l'environnement de celui-ci.

Amélioration de la méthode

En ce qui concerne la méthode, le principal objectif serait de modifier celle-ci pour prendre en compte les variations spatiales des aberrations dans le champ. La méthode la plus adaptée consisterait à utiliser une approche par optimisation de sous-régions proposée par Zeng et al [8]. En effet, en quantifiant les aberrations dans des zones correspondant à des sous-régions du champ total, il est possible de définir des corrections adaptées à chacune d'entre elles permettant une correction complète des aberrations optiques dans le champ.

Néanmoins, cette approche soulève de nombreuses questions. La première est liée à la dynamique du miroir. En effet, sachant que l'on souhaite effectuer des acquisitions allant jusqu'à 10 Hz, cela signifie que notre miroir déformable devra pouvoir changer de forme à des vitesses supérieures à 10 Hz, cela étant multiplié par le nombre de sous-régions testées.

Enfin, les champs observés ne possédant pas une population de cellules homogène, l'utilisation d'une métrique "objet-dépendant" telle que la nôtre serait inopérante dans des sous-régions ne présentant aucune cellule. Il serait donc intéressant d'élaborer une métrique plus en phase avec une approche par sous-régions.

Etudes manquantes et expériences futures

Même si de nombreuses expériences et études ont été réalisées durant cette thèse, beaucoup d'autres seraient nécessaires. Celles-ci, concernant le cas *in vivo*, permettraient dans un premier temps d'augmenter le volume de données à notre disposition et rendraient possible une quantification plus précise de l'apport de la méthode locking dans ces conditions. L'étude des aberrations optiques serait dans un second temps très intéressante car lors de l'expérience *in vivo* réalisée, nous avons pu constater que l'apport des aberrations de surface et celles du volume était complètement différent par rapport aux expériences *in vitro*. De ce fait, une étude du gain dans l'échantillon par la correction de la fenêtre d'observation pourrait être réalisée afin de mieux comprendre l'impact de celle-ci. De plus, l'étude de l'introduction d'aberrations par certaines structures corticales comme la couche pyramidale de CA1 ainsi que l'évolution des aberrations lorsque l'on s'enfonce de plus en plus dans le tissu pourrait être menée. Pour finir, une nouvelle quantification de la plage d'efficacité de la correction sera indispensable dans le tissu vivant pour déterminer la distance maximale envisageable entre un plan d'optimisation et le plan d'intérêt. Une dernière expérience intéressante serait d'observer l'apport de la correction sur le signal d'activité lorsque la souris effectue des actions types (notamment par exemple lors d'un mouvement de course sur tapis roulant).

Avenir de la méthode locking

Notre méthode ainsi que les travaux effectués seront par la suite valorisés dans plusieurs projets au sein de l'Institut Fresnel et de l'INMED.

Tout d'abord, la méthode va être implémentée dans un système d'imagerie *in vivo* complet à l'INMED permettant de réaliser l'enregistrement de données *in vivo* de l'activité cérébrale combinée à plusieurs autres méthodes optiques et neurobiologiques d'acquisition.

Par la suite, le projet MyDeepCARS, actuellement commencé au sein de l'équipe MO-SAIC, va utiliser les connaissances en optique adaptative acquises durant cette thèse. Ce projet a pour objectif d'améliorer l'imagerie par contraste non-linéaire de la gaine myéline autour de la moelle épinière de souris. En effet, certaines pathologies (comme des lésions de la moelle épinière ou encore la sclérose en plaques) sont caractérisées par une perte de matière blanche entraînée par une démyélinisation [9,10]. Des travaux menés au sein de l'équipe [11] ont notamment mis en évidence la démyélinisation des axones au cours de l'évolution d'une encéphalomyélite auto-immune créée expérimentalement grâce à l'utilisation de l'imagerie bi-photonique et du CARS (Figure 5.3.1). En considérant ces perspectives, l'optique adaptative permettrait d'améliorer la qualité d'imagerie offrant une meilleure pénétration dans ces échantillons soumis à de nombreuses aberrations optiques et très diffusants. Ceci donnerait alors la possibilité d'étudier les processus de démyélinisation associés à différentes pathologies neurologiques et ce à des profondeurs plus importantes dans la moelle épinière.

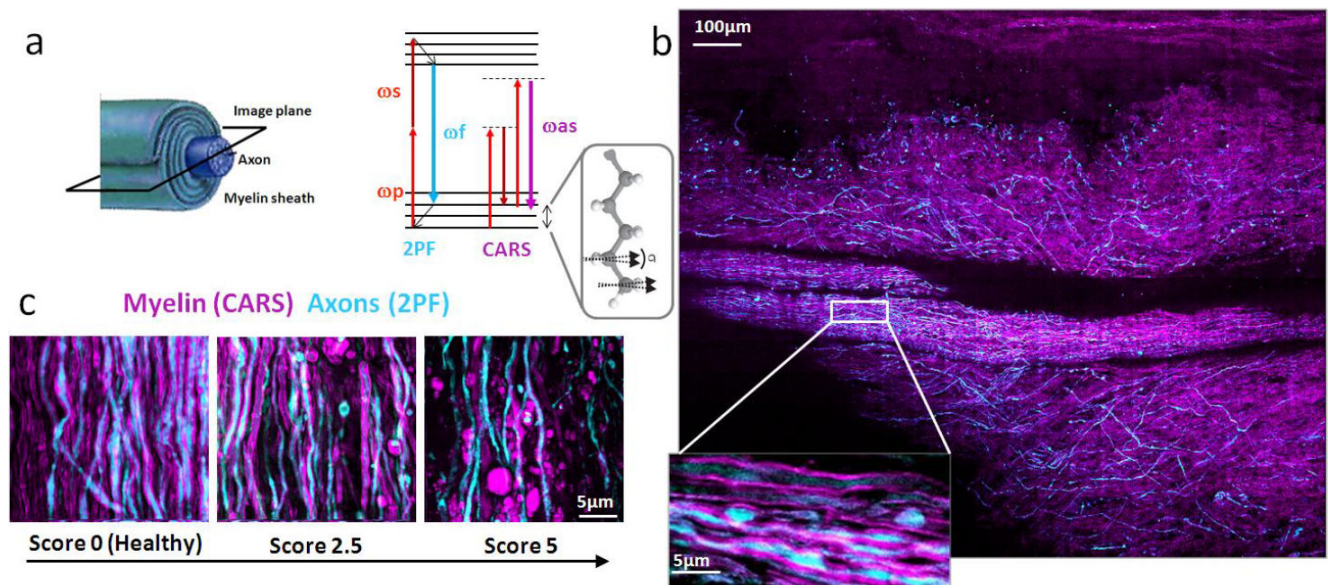


FIGURE 5.3.1 – Images CARS et deux photons dans un échantillon de moelle épinière fixé. b) Grande image correspondant à une projection d'intensité sur une profondeur de $80\mu m$. En bleu est représenté le signal deux photons provenant des axones et en violet le signal CARS ciblant la myéline. c) Zooms à différentes étapes d'évolution (score) de l'encéphalomyélite auto-immune (mesurés à $30\mu m$ en-dessous de la surface de la moelle épinière). On observe une modification de la gaine de myéline entraînant la création d'agrégats dans les étapes les plus avancées de la pathologie [11]

Ainsi, comme il est possible de le voir, l'optique adaptative a de beaux jours devant elle au sein de l'équipe MOSAIC ainsi qu'à l'INMED et je suis très heureux d'avoir permis d'initier ceci grâce à mon travail.

Bibliographie

- [1] Malvache A., Reichinnek S., Villette V., Haimerl C. and Cossart R., Awake Hippocampal Reactivations Project onto Orthogonal Neuronal Assemblies, *Science* (2016)
- [2] Wahl D. J., Jian Y., Bonora S., Zawadzki R. J. and Sarunic M. V., Wavefront sensorless adaptive optics fluorescence biomicroscope for in vivo retinal imaging in mice, *Biomedical Optics Express*, 2016, Vol. 7, Issue 1
- [3] Galwaduge P. T., Kim S. H., Grosberg L. E. and Hillman E. M. C., Simple wavefront correction framework for two-photon microscopy of in-vivo brain, *Biomedical Optics Express*, 2015, Vol. 6, Issue 8
- [4] Wang K., Sun W., Richie C. T., Harvey B. K., Betzig E. and Ji N., Direct wavefront sensing for high-resolution in vivo imaging in scattering tissue, *Nature Communications*, 2015, Vol. 6, 7276
- [5] Paudel H. P., Taranto J., Mertz J. and Bifano T., Axial range of conjugate adaptive optics in two-photon microscopy, *Optics Express*, 2015, Vol. 23, Issue 16, 20849
- [6] Mertz J., Paudel H. and Bifano T., Field of view advantage of conjugate adaptive optics in microscopy applications, *Applied Optics*, 2015, Vol. 54, Issue 11, 3498
- [7] Horton N. G., Wang K., Kobat D., Clark C. G., Wise F. W., Schaffer C. B. and Xu C., *In vivo* three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain, *Nature Photonics*, 2013, Vol. 7, 205-209
- [8] Zeng J., Mahou P., Schanne-Klein M.-C., Beaurepaire E. and Débarre D., 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues, *Biomedical Optics Express*, 2012, Vol. 3, Issue 8, 1898–913
- [9] Totoiu M. O. and Keirstead H. S., Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination, *Journal of Comparative Neurology*, 2005, Vol. 486, 373–383
- [10] Stangel M. and Hartung H. P., Remyelinating strategies for the treatment of multiple sclerosis, *Progress in Neurobiology*, 2002, Vol. 68, 361–376
- [11] GASECKA Paulina, Microscopie multimodale non-linéaire résolue en polarisation pour l'étude des lipides : modèles membranes à la myéline dans les tissus, 196 p, Thèse : Optique : Marseille : 2015

Résumé

L'hippocampe, structure cérébrale située dans le lobe temporal, est au cœur de la gestion de nombreuses fonctions cognitives comme l'encodage des informations spatiotemporelles ou encore la mémoire épisodique. A l'heure actuelle, l'hippocampe est étudié via de nombreuses méthodes notamment l'imagerie de fluorescence qui, utilisée sur des animaux éveillés, permet d'accéder au fonctionnement du réseau neuronal. Malgré cela, une sous-région : le gyrus denté a encore un rôle mal élucidé car profondément enfoui dans le cerveau. Porte d'entrée de l'hippocampe et zone de forts remaniements neuronaux, son étude permettrait d'apporter de nouveaux éléments sur le fonctionnement de l'hippocampe mais aussi d'expliquer les processus mis en cause dans certaines pathologies comme l'épilepsie du lobe temporal. De part sa position (~ 1 mm de profondeur), l'imagerie de celui-ci demeure très difficile. En effet, la diffusion ainsi que les aberrations optiques introduites par les couches successives de matière dégradent fortement la qualité d'imagerie. Pourtant l'optique adaptative, une technique héritée de l'astronomie, pourrait changer cela. En l'intégrant à un microscope bi-photon, il serait possible de compenser les aberrations optiques introduites par le cerveau et ainsi d'arriver à effectuer l'imagerie *in vivo* du gyrus denté. Durant ma thèse, j'ai donc travaillé à la conception complète tant du point de vue matériel que logiciel d'un microscope bi-photon adapté à l'imagerie *in vivo* et équipé d'un dispositif de correction de front d'onde. J'ai également développé une méthode d'optimisation prometteuse basée sur l'approche modale de la correction des aberrations optiques couplée à l'utilisation d'une métrique adaptée à l'imagerie non-linéaire en profondeur. Enfin, j'ai pu appliquer cette méthode à la fois dans des conditions *in vitro* et *in vivo* permettant de montrer son efficacité.

Mots-clés : microscopie non-linéaire, optique adaptative, imagerie *in vivo*, réseaux neuronaux, hippocampe

Summary

The hippocampus, a cortical structure located in the temporal lobe, is at the heart of the management of many cognitive functions such as spatiotemporal information encoding or episodic memory. At present, the hippocampus is studied through many methods including fluorescence imaging and its use on awake animals allows for the study of the neural network function. Despite this, a sub-region : the dentate gyrus has still a poorly understood role because it is deep buried in the brain. Entrance gate of the hippocampus and area of strong neuronal reshuffle, its study would provide new evidence on the functioning of the hippocampus but also to explain the processes involved in some pathologies such as lobe temporal epilepsy. Due to its position (~ 1 mm depth), dentate gyrus imaging remains very challenging. Indeed, scattering and optical aberrations introduced by the successive layers of material strongly degrade the imaging quality. Yet adaptive optics, a technique inherited from astronomy, could change that. By integrating it in a two-photon microscope, it would be possible to compensate optical aberrations introduced by the brain and thus be able to perform *in vivo* imaging of the dentate gyrus. During my PhD, I worked to the complete hardware and software design of a two-photon microscope suitable for *in vivo* imaging and equipped with a wavefront correction device. I have also developed a promising optimization method based on the modal approach of the optical aberrations correction coupled with the use of a metric suitable for nonlinear imaging in depth. Finally, I applied this method in both *in vitro* and *in vivo* conditions to demonstrate its effectiveness.

Key-words : non linear microscopy, adaptive optics, *in vivo* imaging, neural network, hippocampus