

Façonnage rapide de front d'onde pour la microscopie non linéaire en profondeur

Baptiste Blochet

► To cite this version:

Baptiste Blochet. Façonnage rapide de front d'onde pour la microscopie non linéaire en profondeur. Optique [physics.optics]. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT: 2018SORUS212. tel-02492657

HAL Id: tel-02492657 https://theses.hal.science/tel-02492657

Submitted on 27 Feb 2020 $\,$

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



Sorbonne Université

Ecole doctorale : « Physique en Ile-de-France » Laboratoire Kastler Brossel Institut de Biologie de l'ENS

Façonnage rapide de front d'onde pour la microscopie non linéaire en profondeur

Par Baptiste Blochet

Thèse de doctorat de Physique

Dirigée par Laurent Bourdieu et Sylvain Gigan

Présentée et soutenue publiquement le 14 Décembre 2018

Devant un jury composé de :

| M. | Barthelemy | Alain | Directeur de recherche | Rapporteur |
|------|-------------|-----------|-------------------------|-----------------------------|
| M. | Beaurepaire | Emmanuel | Directeur de recherche | Rapporteur |
| Mme. | Brasselet | Sophie | Directrice de recherche | Examinatrice |
| Mme. | Fragola | Alexandra | Assistante professeur | Examinatrice |
| M. | Gigan | Sylvain | Professeur | Directeur de thèse |
| M. | Bourdieu | Laurent | Directeur de recherche | Invité (Directeur de thèse) |

Sommaire

| Sommaire | 2 |
|---|------|
| Introduction générale | 5 |
| I La microscopie à deux photons | . 10 |
| 1.1 Principes de la microscopie de fluorescence | . 10 |
| 1.1.1 La microscopie de fluorescence plein champ | . 10 |
| 1.1.2 Le sectionnement optique | . 12 |
| 1.1.3 La microscopie à deux photons | . 13 |
| 1.1.4 Applications en Neurosciences | . 16 |
| 1.2 Profondeur d'imagerie en microscopie de fluorescence | . 17 |
| 1.2.1 Diffusion et absorption | .17 |
| 1.2.2 Profondeur d'imagerie en microscopie à deux photons | . 19 |
| 1.2.3 Comment aller encore plus loin ? | . 21 |
| 1.3 Conclusion | . 23 |
| II Optique adaptative et faconnage de front d'onde | . 24 |
| 2.1 Propagation de la lumière en milieu inhomogène | . 24 |
| 2.1.1 Diffusion de la lumière | . 25 |
| 2.1.2 Régime balistique et aberrations | . 28 |
| 2.1.3 Régime de diffusion multiple | . 30 |
| 2.1.4 Régime de diffusion vers l'avant : propagation à travers un tissu de cortex | . 34 |
| 2.1.5 Conclusion | .40 |
| 2.2 Optique de Fourier et conjugaison de phase | .41 |
| 2.2.1 Optique de Fourier et diffusion | .41 |
| 2.2.2 Focalisation par conjugaison de phase | . 43 |
| 2.2.3 Conclusion | .46 |
| 2.3 Modulateurs spatiaux de lumière et miroirs déformables | .46 |
| 2.3.1 Miroirs déformables | .47 |
| 2.3.1 Modulateurs spatiaux de lumière à cristaux liquides | .47 |
| 2.3.3 Autres technologies | .48 |
| 2.4 Méthodes de correction du front d'onde | .48 |
| 2.4.1 Correction du front d'onde en transmission | . 49 |
| 2.4.2 Correction du front d'onde en épi-détection | . 52 |
| 2.4.3 Conclusion : Correction du front d'onde en microscopie à deux photons | . 56 |
| III Faconnage du front d'onde avec un MEMS | . 58 |
| 3.1 Algorithmes d'optimisation | . 58 |
| 3.1.1 Algorithmes par décalage de phase | . 59 |
| 3.1.2 Autres algorithmes | . 61 |
| 3.1.3 Efficacité de focalisation | . 61 |
| 3.2 Implémentation de la technologie MEMS | . 62 |
| 3.2.1 Choix de l'algorithme | . 63 |
| 3.2.2 Montage expérimental | . 63 |
| 3.2.3 Algorithme utilisé | . 64 |
| 3.2.4 Implémentation FPGA | . 65 |
| 3.3 Optimisation rapide à travers un milieu diffusant statique | . 66 |
| 3.3.1 Validation de l'implémentation | . 66 |
| 3.3.2 Comment aller plus vite | . 67 |
| 3.4 Optimisation rapide à travers un milieu diffusant dynamique | . 68 |

| 3.4.1 Diffusion dynamique de la lumière | 68 |
|---|-----------|
| 3.4.2 Echantillons diffusants dynamiques | 69 |
| 3.4.3 Optimisation à travers un milieu dynamique | 70 |
| 3.4.4 Gain d'optimisation par focalisation à travers un milieu dynamique | 71 |
| 3.5 Conclusion | 72 |
| IV Stabilité du focus après correction du front d'onde | 74 |
| 4.1 Diffusion dynamique de la lumière | 74 |
| 4.1.1 Diffusion dynamique par une solution colloïdale monodisperse | 74 |
| 4.1.2 Diffusion dynamique de la lumière par un milieu diffusant quelconque | 76 |
| 4.2 Principe de l'expérience | 77 |
| 4.2.1 Cas de la conjugaison de phase optique digitale | 78 |
| 4.2.2 Cas de l'optimisation | 79 |
| 4.2.3 Motivation | 80 |
| 4.3 Expériences | 80 |
| 4.3.1 Montage expérimental | 80 |
| 4.3.2 Protocole expérimental | |
| 4.4 Milieux diffusants dynamiques homogènes | |
| 4.5 Milieux diffusants dynamiques inhomogènes | |
| 4.5.1 Sous quelles conditions peut-on observer un focus plus stable que le speckle? | |
| 4.5.2 Décorrélation sub-milliseconde d'une partie du speckle | |
| 4 5 3 Décorrélation sub-seconde d'une partie du speckle | 89 |
| 4 5 4 Tranches aigues de cerveaux de souris | |
| 4.5.4 Trainines argues de corveaux de souris | |
| V Correction du front d'onde avec des déflecteurs acousto-ontiques | -27 96 |
| 5 1 Déflecteurs acousto-optiques | 06 |
| 5.1 Deficercuis acousto-optiques | 06 |
| 5.1.2 Déflecteurs acousto optiques | 100 |
| 5.1.2 Déflecteurs acouste optiques et pulsation laser | 100 |
| 5.1.5 Deficiteurs acousto-optiques et puisation faser | 103 |
| 5.2 Déflecteurs acouste entiques comme SI M | 104 |
| 5.2 Deficieurs acousto-optiques confine SLM | 105 |
| 5.2.1 Modulation de phase en une dimension par un denecteur acousto-optique | 100 |
| 5.2.2 Modulation du front d'onde en 2 dimensions | 100 |
| 5.2.5 Resolution spatiale et bruit de phase | 109 |
| 5.2.4 Conclusion | 110 |
| 5.3 Implementation du façonnage de front d'onde | 110 |
| 5.3.1 Montage experimental de laçonnage du front d'onde | 111 |
| 5.3.2 Implementation electronique | 112 |
| 5.4 Optimisation en transmission | 113 |
| 5.4.1 Montage en transmission | 113 |
| 5.4.2 Algorithme d'optimisation | 114 |
| 5.4.3 Optimisation du front d'onde avec 2 AODs | 116 |
| 5.4.2 Optimisation rapide du front d'onde | 117 |
| 5.5 Conclusions et perspectives | 119 |
| VI Correction du front d'onde en épi-détection | 121 |
| 6.1 L'optimisation en épi-détection | 121 |
| 6.1.1 Principe de l'optimisation en épi-détection | 121 |
| 6.1.2 Montage en épi-détection | 122 |
| 6.1.3 Algorithme d'optimisation en épi-détection | 124 |
| 6.2 Correction du front d'onde sur des échantillons contrôlés | 125 |
| 6.2.1 Système correction | 126 |

| 6.2.2 Correction rapide du front d'onde avec une bille fluorescente | |
|---|-----|
| 6.2.3 Correction du front d'onde sur un objet fluorescent étendu | |
| 6.2.4 Correction en profondeur | |
| 6.2.5 Comparaison des sets de modes | |
| 6.2.6 Conclusion | |
| 6.3 Correction du front d'onde pour des échantillons biologiques | |
| 6.3.1 Crâne de souris ex vivo | |
| 6.3.2 Souris In vivo | |
| 6.3.3 Conclusion | |
| 6.4 Conclusion et perspectives | |
| Conclusion générale | |
| Bibliographie | 146 |
| | |

Introduction générale

L'utilisation des microscopes optiques pour la biologie, apparus au 17ème siècle, se développa avec les observations d'Antoni van Leeuwenhoek [1]. Il fut, par exemple, le premier, à l'aide de microscopes simples, à observer des bactéries. Les éléments principaux d'un microscope étaient déjà présents à cette époque, à savoir un système de lentilles grossissantes et une source lumineuse. Le montage optique, selon les principes de l'optique ondulatoire, forme une image agrandie de l'objet d'intérêt. Depuis, de nombreux microscopes ont été développés donnant accès à différents contrastes optiques en jouant sur l'illumination ou la détection [2] : polarisation, phase, absorption, réflectivité ... Parmi elles, les techniques de microscopie de fluorescence couplées à des techniques de marquages de tissus par des fluorophores spécifiques ont offert de nouveaux outils aux biologistes. Par exemple, le développement de fluorophores dont l'émission est modulée par l'activité calcique et électrique des neurones (GCaMP [3], voltage dye [4], ...) a permis l'étude par voie optique du fonctionnement du cerveau.

Depuis, de nombreuses techniques de microscopie de fluorescence ont été développées répondant chacune à un défi particulier. La microscopie de super résolution [5] (PALM, STORM, STED) a permis d'obtenir une résolution bien inférieure à la longueur d'onde révélant des structures jusqu'alors jamais vues. Des techniques de microscopie rapides présentant de très grands champs de vue ont été développées [6] permettant d'imager des processus biologiques rapides à grande échelle. Un autre défi important est l'imagerie en profondeur en gardant une résolution optique. Les expériences de microscopie sont généralement limitées à l'étude d'objets fins et transparents [2]. Pour des objets opaques et épais, la diffusion de la lumière par la structure complexe de l'objet lui-même brouille l'image formée.

Par la suite, des techniques plus avancées de microscopie ont réussi à extraire l'information portée par les photons, dits balistiques, n'ayant pas été diffusés avec le milieu pour former une image résolue en profondeur [2]. Parmi ces techniques, la microscopie non linéaire a permis d'imager à grande profondeur dans des tissus biologiques opaques : jusqu'au millimètre dans un cortex de souris par exemple [7]. Cette technique focalise la lumière en un point pour exciter de la fluorescence non linéaire. Balayer le focus dans l'échantillon tout en

collectant la fluorescence émise permet de former une image de fluorescence. L'optique non linéaire assure la génération de fluorescence seulement au focus, la microscopie non linéaire est donc insensible à la diffusion à la collection [8]. Cette technique nécessite l'utilisation de longueurs d'onde élevées moins sensibles à la diffusion. Pour ces deux raisons, l'imagerie non-linéaire permet d'obtenir des images en profondeur dans des tissus marqués en volume, contrairement aux techniques linéaires. Cependant le nombre de photons balistiques permettant d'exciter la fluorescence diminue exponentiellement avec l'épaisseur du tissu considéré. Toutes les techniques de microscopie échouent donc, en profondeur, en raison d'un nombre insuffisant de photons balistiques pour extraire une information utile.

D'autres techniques optiques sont capables d'imager plus en profondeur mais elles perdent alors en résolution [9]. Une imagerie optique couplée à de l'acoustique (acousto-optique [10] ou photo-acoustique [11]) permet d'imager avec une résolution acoustique (~mm) à plusieurs centimètres de profondeur. La tomographie optique diffuse [12] image en profondeur avec une résolution proportionnelle à la profondeur.

L'imagerie en grande profondeur avec une résolution limitée par la diffraction semblait impossible il y a encore quelques années. Mais récemment, les expériences de Vellekoop et al en 2007 [13] et Popoff et al en 2010 [14] ont démontré que la propagation des photons diffusés pouvait être caractérisée et contrôlée à l'aide de modulateurs spatiaux de lumière. Ces dispositifs sont capables de moduler localement le front d'onde avant un milieu, ce qui permet de manipuler la propagation de la lumière à l'intérieur de celui-ci. Notamment, ces techniques sont capables de refocaliser la lumière en créant localement une interférence constructive entre les photons diffusés. Une méthode permettant d'obtenir une telle focalisation à travers ou à l'intérieur d'un milieu diffusant est l'optimisation itérative du front d'onde incident. En rétroagissant itérativement sur le modulateur de lumière, il est possible, en maximisant une métrique, de focaliser les photons diffusés. Pour une géométrie en transmission la métrique peut être l'intensité mesurée en un point en sortie du milieu [13]. En épi-détection, optimiser la fluorescence non linéaire totale émise permet de former un focus à l'intérieur du milieu [15]. Combiner cette approche à la microscopie non linéaire permettrait alors d'imager avec une bonne résolution à des profondeurs jamais atteintes jusque-là.

Mais de nombreux obstacles restent présents avant d'appliquer ces techniques de refocalisation de la lumière diffusée à l'imagerie en profondeur dans des tissus biologiques. En particulier, les inhomogénéités d'indice optique responsables de la diffusion sont dynamiques à l'intérieur des tissus biologiques. Il est donc nécessaire de corriger le front d'onde avant que le milieu n'ait été significativement modifié. Le temps de stabilité d'un milieu biologique varie de la milliseconde à la minute selon la profondeur imagée [16]. De plus, les champs de vue obtenues restent très limités. Un isoplanétisme local est conservé dans la gamme d'effet mémoire [17]. Mais l'effet mémoire diminue avec l'épaisseur du milieu. En profondeur, il sera donc nécessaire de changer régulièrement la correction appliquée pour imager sur des champs de vue plus grands que la gamme d'effet mémoire.

L'objectif de cette thèse est d'étudier la faisabilité d'imager à grande profondeur en microscopie non linéaire, potentiellement dans un régime où l'intégralité des photons balistiques ont disparu. Pour cela, nous avons choisi de tester l'optimisation d'un signal non linéaire en profondeur pour reformer un focus en épi-détection; puis de le coupler à l'effet mémoire pour former une image de fluorescence.

L'utilisation de modulateurs rapides de lumière est donc primordiale : à la fois, pour être capable de corriger le front d'onde avant le temps de décorrélation du milieu ; et pour être capable de rafraichir la correction pendant la formation d'une image pour maximiser le champ de vue. Par conséquent, ma thèse a porté sur le développement de systèmes d'optimisation de front d'onde très rapides, incluant à la fois le modulateur de phase, l'électronique et l'algorithmique de contrôle. Pour aborder ces questions, j'ai mis au point deux systèmes rapides de contrôle de front d'onde reposant sur deux technologies différentes.

- Le premier système repose sur l'utilisation d'un modulateur spatial de lumière basé sur une technologie MEMS couplée à une électronique rapide FPGA capable de rafraichir le front d'onde à une dizaine de kilohertz. Ce système, reposant sur un miroir, peut être utilisé avec des sources lasers continues ou impulsionnelles, du visible au proche infrarouge.
- Le deuxième système repose sur la modulation spatiale du front d'onde d'une impulsion laser provenant d'un laser à bas taux de répétition par des déflecteurs acousto-optiques (AOD). Couplé à une électronique FPGA, le système est capable de rafraichir le front d'onde pendant une boucle d'optimisation à 40 kHz. Ce système est donc spécifique de lasers impulsionnels à bas taux de répétition, et présente l'avantage de permettre simultanément la mise en forme du front d'onde et son balayage 3D pour former une image.

Dans le premier chapitre, nous décrirons les techniques de microscopie et notamment la microscopie non linéaire de fluorescence. Nous verrons qu'elles sont fortement limitées par la diffusion pour imager en profondeur dans des tissus inhomogènes voir opaques comme les tissus biologiques.

Au chapitre 2, nous regarderons en détail la propagation de la lumière à travers un milieu diffusant. Nous présenterons ensuite différentes techniques de contrôle du front d'onde capables de refocaliser les photons diffusés ou aberrés à l'intérieur d'un milieu.

Au chapitre 3, le système de contrôle du front d'onde basé sur une technologie MEMS sera décrit et testé en transmission. Nous démontrerons notamment qu'il est suffisamment rapide, comme nous le souhaitions, pour focaliser la lumière à travers des milieux diffusants dynamiques modèles, présentant des stabilités similaires à celles des tissus biologiques.

Au chapitre 4, la physique de la focalisation à travers un milieu dynamique sera étudiée. Nous montrerons, en utilisant toujours la technologie MEMS, un effet surprenant où le focus formé par correction du front d'onde peut être plus stable que le speckle environnant dans certains milieux complexes.

Au chapitre 5, nous expliquerons comment utiliser des déflecteurs acousto-optiques, qui sont a priori des systèmes permettant la déflexion de faisceaux, comme des modulateurs spatiaux de lumière ultra-rapides, permettant donc combiner en un seul système modulation de phase et balayage. Nous utiliserons ensuite ce système pour focaliser rapidement à travers un milieu diffusant, à des échelles de temps similaires à celles obtenues avec le système MEMS. Nous étudierons ensuite les spécificités du contrôle du front d'onde avec un tel système.

Finalement, au chapitre 6, nous appliquerons le système d'AODs à l'imagerie non linéaire de systèmes contrôlés et d'échantillons biologiques ex vivo et in vivo. Nous nous intéressons aux paramètres physiques régissant la focalisation en épi-détection. Nous montrerons finalement la capacité de ce système de combiner la mise en forme de front d'onde et le balayage pour former des images corrigées des effets de diffusion ou d'aberration dans le cas de différents systèmes biologiques. En particulier, nous montrerons la possibilité de réaliser de l'imagerie trans-crânienne chez la souris. Pour finir nous discuterons des possibilités d'utilisation de ce système pour de l'imagerie à grande profondeur sur des grands champs.

I La microscopie à deux photons

Nous allons voir dans ce chapitre le principe de la microscopie de fluorescence et plus spécifiquement la microscopie à 2 photons couramment utilisée en neuroscience. En particulier, nous mettrons en avant les qualités et défauts de cette technique pour faire de l'imagerie en profondeur dans les tissus (au-delà de 100 μ m). Les techniques de microscopie et d'imagerie en général reposent sur la propagation en espace libre des photons. Elles sont donc bien adaptées à l'imagerie à travers des milieux transparents et homogènes. Nous verrons qu'elles sont fortement limitées par la diffusion pour imager en profondeur dans des tissus inhomogènes voir opaques comme les tissus biologiques.

1.1 Principes de la microscopie de fluorescence

De nombreuses techniques de microscopie ont été développées au cours du temps [2] chacune apportant un contraste donné (absorption, phase, fluorescence, ...) et répondant à une problématique donnée (besoin d'un grand champ de vue, imagerie en profondeur, vitesse, ...). Dans ce chapitre et cette thèse nous allons nous intéresser plus particulièrement à l'imagerie de fluorescence.

1.1.1 La microscopie de fluorescence plein champ

La microscopie de fluorescence est obtenue en imageant la fluorescence émise au sein d'un milieu. Cette fluorescence peut être soit intrinsèque au milieu (auto-fluorescence) ou obtenue en marquant l'échantillon avec des molécules fluorescentes. Des marqueurs fluorescents s'attachant spécifiquement à certaines molécules de l'échantillon ont été développés donnant accès à un contraste moléculaire spécifique. Pour la microscopie plein champ, les fluorophores sont alors excités par la lumière incidente (cohérente ou incohérente), la fluorescence générée est collectée par le système optique alors que la lumière d'excitation est filtrée, voir figure 1 pour un exemple de microscope plein champ. L'image formée par un système optique grossissant (généralement constitué d'un objectif de microscope et une lentille de tube) permet alors d'imager des structures micrométriques.



Figure 1. Principe d'un microscope plein champ en transmission. Une lumière blanche excite les fluorophores marquant l'échantillon au plan focal. La fluorescence générée est filtrée puis imagée par un objectif de microscope et une lentille de tube sur une caméra. Selon la position de la source d'excitation, nous parlons de microscope en transmission (excitation et détection de part et d'autre de l'échantillon) ou de microscope en réflexion (excitation et détection du même côté de l'échantillon).

Cette technique d'imagerie est régie par les règles de l'optique ondulatoire. Nous pouvons définir la réponse impulsionnelle du système d'imagerie (PSF) comme la tache étendue formée par un point source dans le plan focal de l'objectif de microscope se propageant à travers le système optique. Pour une lumière incohérente telle que la fluorescence, l'intensité optique mesurée (W/cm²) est alors la convolution de la structure en intensité de l'échantillon par la PSF :

$$I = I_{objet} \otimes PSF \tag{1.1}$$

Cette technique de microscopie est efficace pour imager des échantillons fins mais elle échoue pour imager en volume. Les fluorophores en dehors du plan focal ne vont pas former d'image mais vont générer une fluorescence de fond qui va diminuer le contraste et qui va en fin de compte s'opposer à la formation d'une image exploitable.



Figure 2. Point source imagé par un système optique. A. Point source au focus. B. et C. Point source hors focus. Plus la tâche est étendue plus la source est loin du plan focal.

Pour des optiques d'ouverture sphérique, la PSF est une tache d'Airy, voir figure 2 .A. Sa largeur à mi-hauteur : $\lambda/_{2NA}$ avec λ la longueur d'onde de la lumière et NA l'ouverture numérique du système optique ; définie la résolution latérale. La résolution longitudinale est : $\lambda n/_{NA^2}$, avec n l'indice optique du milieu.

1.1.2 Le sectionnement optique

Par la suite, des techniques de microscopie capables de rejeter la fluorescence de fond ont été développées. Cette caractéristique est appelée le sectionnement optique. Il est obtenu en complexifiant le montage optique. Les trois principales techniques de fluorescence présentant un sectionnement optique sont la microscopie à feuille de lumière, la microscopie confocale et la microscopie non linéaire [2]. Cette dernière sera traitée en détail par la suite.

La microscopie à feuille de lumière consiste à illuminer l'échantillon avec une nappe de lumière et d'imager la fluorescence à 90° de cette nappe. De cette manière aucune fluorescence hors focus n'est générée assurant le sectionnement optique. La résolution latérale est similaire à celle d'un microscope plein champ et celle axiale est donnée par l'épaisseur de la feuille de lumière utilisée.

La microscopie confocale quant à elle illumine l'échantillon avec un faisceau laser focalisé pour exciter de la fluorescence. La fluorescence émise dans le plan focal est ensuite imagée sur un pinhole de la taille de la tache focale qui rejette la fluorescence générée hors du focus, voir figure 3. La fluorescence est finalement mesurée par un détecteur unique et une image est formée en balayant le focus sur l'échantillon. La résolution axiale est alors meilleure que celle d'un microscope plein champ. La résolution est donnée par le produit de la PSF d'excitation par la PSF de détection. De plus la résolution axiale vaut $n\lambda/2NA^2$; avec n l'indice de réfraction du milieu.



Figure 3. Principe de la microscopie confocale. Un faisceau laser est focalisé sur l'échantillon pour exciter de la fluorescence. La fluorescence est ensuite imagée sur un pinhole pour filtrer la fluorescence émise en dehors du focus. Un mono-détecteur mesure finalement la fluorescence et une image est formée en scannant le focus.

D'autres techniques moins répandues permettent d'obtenir un sectionnement optique [18]. Par exemple, les techniques d'illumination structurée (avec une grille sinusoïdale [19] ou un speckle [20]) permettent d'imposer une illumination fortement contrastée au focus et plus faiblement hors focus. En prenant plusieurs images avec des illuminations différentes, il est alors possible, après reconstruction, d'obtenir un sectionnement optique.

1.1.3 La microscopie à deux photons

La microscopie biphotonique est une extension de la microscopie de fluorescence. Dans ce cas, deux photons sont absorbés pour exciter la même molécule fluorescente. Pour compenser la faible efficacité de l'absorption non linéaire, des sources à forte densité d'énergie sont nécessaires. Le développement des lasers pulsés et notamment des lasers Ti:Sapphire a donc permis l'émergence en 1990 [21] de cette technique de microscopie prédite théoriquement en 1931 par Göppert-Mayer [22].



Figure 4. Absorption linéaire et non linéaire d'un fluorophore. L'excitation linéaire d'un fluorophore nécessite l'absorption d'un photon incident pour émettre un photon fluorescent de longueur d'onde plus élevée. L'absorption non linéaire nécessite que le fluorophore absorbe deux photons via un état virtuel. Le faible temps de vie de cet état virtuel impose l'utilisation de forte densité de photons.

Alors que la fluorescence classique utilise généralement de la lumière visible, l'absorption à deux photons nécessite des longueurs d'ondes plus élevées (dans le proche infrarouge) pour exciter les mêmes fluorophores via l'excitation d'un niveau virtuel (cf figure 4). Cependant l'efficacité d'absorption à deux photons est très faible. Les sections efficaces d'absorption à 2 photons sont de l'ordre de 10^{-50} cm⁴s. Pour la favoriser, il est nécessaire non seulement de focaliser la lumière sur l'échantillon spatialement avec un objectif de microscope mais aussi temporellement par l'utilisation de lasers pulsés, comme illustré sur la figure 5. L'intensité de fluorescence I_{2ph} émise est proportionnelle à la moyenne du carré de l'intensité incidente I_{inc} :

$$I_{2ph} \propto \langle I_{inc}^2 \rangle = \frac{g_{p} \langle I_{inc} \rangle^2}{T.\tau}$$
(1.2)

Avec g_p facteur sans unité dépendant de la forme du pulse ; T le taux de répétition du laser et τ la durée du pulse. Généralement des lasers pulsés d'une centaine de femtosecondes sont utilisés à un taux de répétition proche de cent mégahertz (ordre de grandeur de l'inverse du temps de vie de fluorescence). La puissance incidente (en Watt) est ajustée pour ne pas saturer le fluorophore.



Figure 5. Exemple de fluorescence à 1 et 2 photons (tiré [23]). **A.** Illustration de la focalisation spatiale et temporelle nécessaire pour exciter de la fluorescence non linéaire. **B.** Illustration du sectionnement optique absent en 1 photon et présent en 2. Aucune fluorescence n'est émise en dehors du volume focal pour une excitation non linéaire.

La fluorescence générée provient alors seulement du focus (cf Figure 5), ce qui permet d'obtenir un effet de sectionnement optique directement par le faisceau d'excitation. Malgré l'utilisation de longueur d'onde plus élevée, la microscopie à deux photons conserve une résolution proche de la fluorescence linéaire car la résolution du système n'est plus donnée par la PSF mais par son carré (2 photons sont absorbés).

Pour former une image de fluorescence il est alors nécessaire de balayer le focus par rapport à l'échantillon et pour chaque point de collecter la fluorescence totale émise. Malgré le développement de scanners rapides (miroirs galvanométriques résonants [24], déflecteurs acousto-optiques (AODs) [25]) et de stratégies de balayages multiplexés (multipoints [26], linescan...), cette technique reste relativement lente par rapport aux techniques d'imagerie plein champ mais permet néanmoins des acquisitions à la cadence vidéo d'un champ entier. Des cadences plus rapides sont obtenues dans un échantillonnage appelé « random access », d'un sous ensemble de points du champ, en particulier grâce aux AODs, à des cadences de plusieurs centaines de Hz jusqu'au kHz [25].



Figure 6. Principe de la microscopie non linéaire. Un faisceau laser pulsé dans l'infrarouge est focalisé sur l'échantillon pour exciter de la fluorescence non linéaire. La fluorescence est ensuite mesurée par un mono-détecteur. Une image est formée en scannant le focus.

La microscopie non linéaire permet de résoudre les deux grandes limitations de la microscopie de la fluorescence :

- Comme la fluorescence est générée seulement au focus, la technique possède naturellement un sectionnement optique.
- Elle fournit un gain réel en profondeur d'imagerie (qui sera traité section 1.2.2)

A noter qu'il existe bien d'autres non linéarités optiques endogènes ou exogènes qui peuvent être utilisées comme contraste : SHG, THG, CARS, 3 photons [2] ... Nous nous attardons ici seulement sur la microscopie à 2 photons (en évoquant parfois son extension à l'absorption à 3 photons) car cette technique est la plus couramment utilisée en neuroscience pour étudier en profondeur le fonctionnement du cerveau.

1.1.4 Applications en Neurosciences

En plus de donner un contraste structurel spécifique, la microscopie de fluorescence a trouvé un champ d'application important en neurosciences après le développement de marqueurs fluorescents sensibles à l'activité des neurones [27], ouvrant ainsi la porte à l'étude optique du fonctionnement du cerveau.. Les premiers marqueurs fonctionnels furent les indicateurs calciques [3]. Ces derniers ont la particularité d'émettre un signal fluorescent dépendant de la concentration locale en ions Ca^{2+} . Dans les neurones, une entrée d'ions calciques via des canaux voltage-dépendants se produit après à un potentiel d'action ; par

conséquent, le signal fluorescent émis traduit directement l'activité neuronale. Par la suite des indicateurs directement sensibles au potentiel des membranes des neurones ont été développés : les colorants sensibles au potentiel [28].



Figure 7. Principe de l'imagerie fonctionnelle. Une population de neurones est marquée à l'aide de fluorophores fonctionnels. Le signal d'activité des neurones est extrait au cours du temps. Adapté de [29]

L'imagerie fonctionnelle du cerveau nécessite donc d'imager au cours du temps les variations relatives de la fluorescence des neurones d'intérêts. Cette imagerie requière une vitesse d'imagerie rapide. En effet, le signal de fluorescence associé à un potentiel d'action qui dure environ 1ms est très rapide et dépend de la sonde elle-même : Il a une durée typique qui est de l'ordre de la seconde pour un indicateur calcique (avec un temps de montée de quelques dizaines de ms) et de la milliseconde pour un colorant sensible au potentiel.

1.2 Profondeur d'imagerie en microscopie de fluorescence

1.2.1 Diffusion et absorption

La formation d'image en microscopie considère que les photons se propagent en espace libre sans interagir avec le milieu. La profondeur d'imagerie est alors intrinsèquement liée à la capacité du faisceau optique à traverser un échantillon sans en être altérée. Malheureusement tous les échantillons biologiques diffusent et absorbent les photons incidents ce qui limite drastiquement la quantité de photons balistiques (ie les photons n'ayant pas interagi avec le milieu) en profondeur. L'absorption dans les tissus est essentiellement due à l'eau, à l'hémoglobine et à la mélanine (voir figure 8). Dans la fenêtre thérapeutique optique (600 à 1100 nm), l'absorption est généralement négligée : les photons sont absorbés après plusieurs centimètres de propagation. Alors que l'absorption est négligeable aux longueurs d'ondes utilisées, la diffusion est prédominante. Elle provient de l'inhomogénéité des indices

optiques dans les tissus. Une étude plus poussée de ce phénomène sera présentée dans le chapitre 2.



Figure 8. A. Spectre d'absorption des principaux composants d'un cerveau. L'absorption est faible dans la fenêtre thérapeutique (600nm - 1100nm) et est dominée par l'eau. Tiré de [30]

B. Absorption et diffusion aux longueurs d'ondes utilisées en microscopie à 2 photons. En rouge l_s ; en noir l_a et en vert la longueur de pénétration caractéristique résultante. Tiré de [31]

Nous pouvons cependant quantifier l'atténuation de l'intensité I des photons balistiques se propageant à travers un milieu absorbant et diffusant en fonction de la profondeur z. L'intensité I suit la loi de Beer-Lambert :

$$I(z) = I_0 \exp\left[-z(\frac{1}{l_s} + \frac{1}{l_a})\right]$$
(1.3)

Avec I_0 l'intensité incidente, l_s et l_a respectivement les libres parcours moyens de diffusion et d'absorption qui représentent respectivement la distance moyenne entre deux évènements de diffusion ou d'absorption.

Sur la figure 8, on peut observer les libres parcours moyen d'absorption (en noir) et de diffusion (en rouge) pour un milieu ayant des propriétés optiques similaires à ceux des tissus. L'absorption a été modélisée par l'absorption de l'eau, la diffusion a été prédite par un modèle de Mie prenant en compte les caractéristiques optiques du cortex de souris. La longueur caractéristique d'atténuation l_{att} ($1/l_{att}=1/l_a+1/l_s$) de la loi de Beer-Lambert est représentée en vert. Les deux étoiles rouges correspondent à des mesures expérimentales de l_{att} issues de papiers antérieurs [32]. Récemment une étude expérimentale des longueurs d'atténuation dans les cerveaux de souris a confirmé les modèles utilisés [33].

La microscopie non linéaire est à ce jour la technique de microscopie de fluorescence la plus efficace pour imager en profondeur. L'excitation nécessite des longueurs d'ondes plus élevées pour exciter les même fluorophores. Comme la diffusion est principalement de la diffusion de Mie, les libres parcours moyen de diffusion sont plus élevés passant de $l_s \approx 70$ µm pour une excitation linéaire autour de 500 nm à $l_s \approx 200$ µm pour une excitation dans le proche infrarouge. Deuxièmement la fluorescence est essentiellement générée au focus, il est possible de collecter toute la fluorescence, la microscopie biphotonique est donc insensible à la diffusion de la lumière collectée (mais sensible à son absorption). Ces deux points expliquent pourquoi la microscopie à deux photons permet d'imager bien plus profond que la microscopie confocale dans un tissu biologique diffusant. Typiquement, en microscopie biphotonique, il est possible d'imager jusqu'à 2 à 5 fois le libre parcours moyen de diffusion l_s (en négligeant l'absorption) soit une profondeur d'imagerie autour de 600 µm. De son côté la microscopie confocale est capable d'imager à une profondeur de l'ordre de l_s soit autour de 100-200 µm. La microscopie à deux photons est donc une technique de choix pour imager en profondeur.

1.2.2 Profondeur d'imagerie en microscopie à deux photons

En microscopie à deux photons, la profondeur limite d'imagerie est atteinte quand le nombre de photons balistiques devient trop faible pour générer de la fluorescence non linéaire détectable. Dans cette situation, la profondeur d'imagerie maximum z_{max} est (en considérant l'atténuation comme due uniquement à la diffusion) :

$$z_{max} \approx l_s \ln\left(\alpha P_0 \sqrt{\frac{T\Phi}{\tau}}\right)$$
 (1.4)

Avec l_s le libre parcours moyen de diffusion à longueur d'onde d'excitation, α un paramètre prenant en compte l'efficacité quantique du fluorophores et le bruit du détecteur, Φ la fraction de fluorescence émise collectée, P_0 , τ et T respectivement la puissance moyenne du laser, la durée du pulse et le taux de répétition du laser [34]. Améliorer la collection de fluorescence, l'efficacité quantique des fluorophores [35] ou du détecteur permet donc d'imager à plus grande profondeur.

Pour un laser pulsé classique à 920 nm, nous avons $P_0 = 1W$, T = 80 Mhz, $\tau = 100$ fs. La profondeur maximum d'imagerie typique est alors de 2-3 l_s . Pour continuer à observer le phénomène d'absorption à 2 photons en profondeur, il convient d'augmenter la puissance d'excitation incidente et/ou à puissance constante de diminuer le taux de répétition du laser. Le développement de nouvelles sources laser a permis de diminuer le taux de répétition du laser incident à puissance constante pour, en profondeur, maximiser l'excitation des fluorophores sans les saturer [36]. L'utilisation d'amplificateur régénératif [37] en est un exemple : à puissance constante, l'amplificateur régénératif diminue le taux de répétition du laser à une centaine de kilohertz pour concentrer l'énergie dans des pulses très rares.

A noter que diminuer le taux de répétition d'un laser diminue aussi la vitesse d'acquisition. Un laser à 80 MHz forme une image de 1000x1000 pixels avec un pulse par pixel en 12 ms alors qu'un laser à 100 kHz l'image en 10s. Cette vitesse est rédhibitoire pour l'imagerie fonctionnelle où la variation de fluorescence mesurée s'étale de 1ms à 1s. Nous développerons dans le chapitre 5 la stratégie dite de random access avec des déflecteurs acousto-optiques pour palier à ce problème.

On s'attendrait finalement à pouvoir imager aussi profond que le prédit l'équation 1.4. Prenons l'exemple de l'utilisation d'un amplificateur régénératif avec un taux de répétition de 100 kHz contre un laser classique à 80 MHz à puissance égale, le gain en profondeur Δz devrait être de :

$$\Delta z = l_s \ln(\sqrt{\frac{80 Mhz}{100 kHz}}) \sim 3.3 l_s$$
(1.5)

Cependant ce gain n'est en général pas atteint. En effet, lorsqu'on focalise en grande profondeur en utilisant une puissance laser élevée, de la fluorescence est excitée par absorption non linéaire en dehors du volume focal, en particulier à la surface du tissu où la puissance est très élevée : pour un tissu marqué en volume, une fluorescence de surface est générée et va surpasser la fluorescence générée au focus quand il est positionné en profondeur dans le tissu . Pour un échantillon non marqué en surface, la fluorescence parasite sera excitée par le halo de lumière diffus. Dans cette situation, la profondeur maximum d'imagerie est atteinte quand la fluorescence générée hors du focus devient supérieur à celle générée au focus [38]. Finalement, le sectionnement optique est perdu en profondeur.

Cet effet est illustré sur la figure 9 pour un laser d'excitation à 909 nm avec une puissance moyenne de 600mW et un taux de répétition de 200kHz focalisé à 51_s [39]. La

composante balistique (en vert) excite de la fluorescence au focus et proche de la surface alors que les photons diffusés (bleu et violet) excitent de la fluorescence sur l'ensemble du volume.



Figure 9. Fluorescence non linéaire émise selon la profondeur. La fluorescence totale $[I_{diff} + I_{bal}]^2$ est tracée en rouge et les composantes dues à la lumière balistique en vert, diffusée en bleu et le terme mixte $2*I_{diff}*I_{bal}$ en violet pour un milieu diffusant anisotrope avec g =0.9 et g=0.98 respectivement en (**a**) et (**b**). Tiré de [39].

Le ratio entre la fluorescence au focus (S) et hors focus (B) selon la profondeur z pour un échantillon marqué sur tout son volume en négligeant la fluorescence émise par les photons diffus est donné par [40]:

$$\frac{S}{B} = \frac{2\pi (NA)^2}{\lambda n l_s} z^2 \exp\left(-\frac{2z}{l_s}\right)$$
(1.5)

Avec λ la longueur d'excitation, n l'indice du milieu, l_s le libre parcours moyen de diffusion et NA l'ouverture numérique du système. Finalement, la profondeur d'imagerie maximum est atteinte pour 4.2 l_s = 850 µm (l_s = 200 µm, n=0.33 et λ = 925 nm). Si la fluorescence émise par les photons diffusés avait été prise en compte dans cette étude, la profondeur limite d'imagerie serait abaissée.

1.2.3 Comment aller encore plus loin ?

Les solutions pour augmenter la profondeur d'imagerie ne sont pas seulement optiques mais peuvent avoir lieu à tous les niveaux. De nombreux chercheurs travaillent sur la synthèse de nouveaux fluorophores dotés d'une meilleure efficacité quantique [35]. La stratégie de marquage de l'échantillon impacte la profondeur d'imagerie : un marquage clairsemé va limiter l'émission de fluorescence parasite permettant d'imager en plus grande profondeur [29]. En diminuant la fraction de marquage par 6, la profondeur d'imagerie est augmentée d'un libre parcours moyen de diffusion.

Une deuxième solution est d'augmenter la longueur d'onde d'excitation pour être moins sensible à la diffusion [33]. Deux gammes de longueurs d'onde sont possibles, juste en dessous de 1400 nm et au-dessus de 1600 nm pour éviter les pics d'absorption de l'eau. En utilisant un laser pulsé à 1280nm pour exciter de la Alexa680-Dextran, le groupe of Chris Xu a pu imager à une profondeur record de 1,6 mm, soit 5 l_s à cette longueur d'onde [7].

Une autre solution pour imager à plus grande longueur d'onde est d'utiliser la fluorescence à 3 photons. Ce processus non linéaire est encore moins efficace que l'absorption à 2 photons. Les sections efficaces d'absorption à 3 photons sont de l'ordre de 10^{-84} cm⁶s², la probabilité de recombinaison à trois photons est très faible mais est encore réalisable en augmentant l'énergie par impulsion et en réduisant le taux de répétition du laser. Le même groupe fut capable, en 3 photons, d'imager à une profondeur de 1.4 mm [31,41]. Cette technique a aussi l'avantage de générer moins de fluorescence hors focus en raison de sa non linéarité d'ordre supérieur. Le ratio entre la fluorescence au focus (S) et hors focus (B) selon la profondeur z est alors de :

$$\frac{s}{B} = \frac{12(NA)^6}{\lambda^3 l_e} z^3 \exp(-\frac{3z}{l_e})$$
(1.6)

Avec l_e la longueur d'atténuation (l'absorption n'est plus négligeable à ces longueurs d'ondes).

La figure 10 présente les valeurs analytiques des ratios S/B en deux et trois photons. A priori, la microscopie à trois photons est capable d'imager jusqu'à 9 l_e . Expérimentalement, cette limite n'a pas encore été atteinte en raison de la faible efficacité de l'absorption à trois photons.



Figure 10. Calcul analytique du ratio entre la fluorescence au focus (S) et hors focus (B) à deux photons, trois photons aux longueurs d'ondes de 1,280 et 1,7 μm. En améliorant le sectionnement optique, à longueur d'onde égale, la microscopie à trois photons peut fondamentalement imager à plus grande profondeur que celle à deux photons. Tiré de [31]

Une dernière solution est, en amont de l'échantillon, de corriger la diffusion des photons pour les focaliser en profondeur [13]. L'objectif est ici d'augmenter le rapport signal fluorescent au focus sur fluorescence hors focus à puissance constante en augmentant la qualité de la focalisation. Cette solution sera décrite en détail dans le chapitre 2.

1.3 Conclusion

Nous venons de voir les principales techniques de microscopie de fluorescence. Elles sont fondamentalement limitées pour imager en profondeur par la diffusion de la lumière qui fait chuter la quantité de photons balistiques utilisés pour imager. La microscopie non linéaire (deux et trois photons) permet d'atteindre les plus grandes profondeurs d'imagerie dépassant millimètre dans le meilleur des cas. Elle reste fondamentalement limitée par deux effets : par la réduction de la fluorescence émise au focus à cause de la décroissance exponentielle des photons balistiques mais aussi par l'augmentation de la fluorescence hors focus.

Nous nous sommes principalement attardés ici aux solutions optiques pour augmenter la profondeur d'imagerie mais nous insistons que seul un travail commun de chimistes, biologistes et opticiens permet de remarquables avancées pour imager en grande profondeur.

Toutes les solutions évoquées dans ce chapitre ainsi que celle qui sera détaillée dans le chapitre 2 peuvent être bien sûr combinées.

II Optique adaptative et façonnage de front d'onde

Nous avons vu précédemment que la microscopie repose sur l'utilisation de photons balistiques et les lois de l'optique ondulatoire pour former une image. Cependant en profondeur la quantité de photons balistiques chute exponentiellement et, dans le cas de la microscopie de fluorescence, la fluorescence émise hors focus augmente rendant impossible l'imagerie. Les techniques actuelles, dites d'optique adaptative, corrigent principalement les aberrations pour restaurer la qualité du focus [42]. Néanmoins il reste un grand nombre de photons diffusés dans le milieu qui, comme nous allons le voir, peuvent aussi être utilisés, en profondeur, pour augmenter l'intensité au focus et donc le rapport signal sur background et, à grande profondeur, pour recréer un focus. Il s'agit de techniques de façonnage du front d'onde [43].

Après une brève description du phénomène de diffusion et des grandeurs caractéristiques associées, nous allons décrire comment l'emploi de modulateurs spatiaux de lumière a rendu possible la correction partielle de la diffusion de la lumière et a permis ainsi l'imagerie à grande profondeur. L'étude du fonctionnement du cerveau d'une souris étant le cœur des travaux de recherche de l'équipe de Laurent Bourdieu, nous allons essentiellement nous intéresser à un cas particulier : décrire la diffusion de la lumière à travers un cortex de souris aux longueurs d'onde de la microscopie à deux photons (~ 900 nm, imagerie calcique avec des marqueurs protéiques du type GCamP).

2.1 Propagation de la lumière en milieu inhomogène

Dans cette partie, après avoir décrit le phénomène de diffusion, nous allons expliciter les trois régimes de diffusion. A faible profondeur dans les tissus (< 100 μ m), la propagation dominée par les photons balistiques suit les lois de l'optique classique : c'est à dire à grande échelle peut être décrite par l'optique géométrique (formation d'image), et à petite échelle, comme pour la résolution, par l'optique ondulatoire. A grande profondeur (> 5mm), des approximations peuvent être faites pour déduire le comportement de la lumière en régime de diffusion multiple (élargissement temporel du pulse, transmission de l'énergie, ...). Décrire la propagation de la lumière aux profondeurs typiques (entre 500 μ m et 1 mm) où la microscopie à deux photons commence à échouer n'est pas chose aisée. Dans ce régime de diffusion où sont présents à la fois des photons balistiques, des photons diffusés une ou quelques fois, mais où le régime de diffusion isotrope n'est pas encore atteint, nous allons extrapoler le comportement de la lumière à l'aide des deux régimes extrêmes, de simulations et d'expériences issues de la littérature.

Dans l'intégralité de ce chapitre, l'absorption sera négligée.

2.1.1 Diffusion de la lumière

Le phénomène de diffusion élastique de la lumière apparait quand la lumière se propage dans un milieu présentant des inhomogénéités d'indice optique. Dans un milieu biologique, les inhomogénéités sont à toutes les échelles. Si ces inhomogénéités sont des particules, on les appelle des diffuseurs. Nous allons maintenant pour décrire la physique de la diffusion, s'intéresser au cas le plus simple de diffuseurs de taille bien déterminée. On discutera par la suite de la nature multi-échelle des tissus.

A l'échelle microscopique, une onde électromagnétique incidente va interagir différemment selon les propriétés des diffuseurs (taille et indice optique). Pour un diffuseur de petite taille devant la longueur d'onde, nous parlons de diffusion de Rayleigh [44], la lumière est diffusée de manière isotrope autour de la particule. A l'inverse, pour un diffuseur de taille comparable ou supérieure à la longueur d'onde, nous parlons de diffusion de Mie et la figure de rayonnement est principalement vers l'avant [45]. Ces phénomènes sont illustrés en figure 1.

Ces diagrammes de rayonnement sont valables pour une lumière incidente non polarisée, ils sont plus compliqués (et ne seront pas traités ici) pour le cas d'une lumière incidente polarisée. De manière générale, l'état de polarisation de la lumière diffusée ne sera que rapidement évoqué dans cette thèse par simplicité. Nous considérerons généralement la lumière comme un objet scalaire [46].



Figure 1. Diffusion par un diffuseur unique. d taille de la particule et λ longueur d'onde. Pour une particule plus petite que la longueur d'onde, la diffusion est isotrope. Pour une particule de la taille de la longueur d'onde ou plus grande, la diffusion est anisotrope. La diffusion est d'autant plus vers l'avant que la particule est grande.

Le diagramme de rayonnement d'une particule est complexe et dépend de sa forme, de sa taille et de son indice de réfraction. Deux quantités moyennes importantes permettent de décrire la diffusion par une particule. Premièrement, la section efficace de diffusion σ_s est telle que le produit σ_s . I_{inc} soit égal à la puissance diffusée par la particule dans tout l'espace, avec I_{inc} étant la puissance par unité de surface de l'onde incidente et σ_s homogène à une surface. La section efficace de diffusion est principalement contrôlée par la différence d'indice entre le diffuseur et le milieu environnant et la taille. Deuxièmement, le paramètre d'anisotropie g quantifie la directionnalité moyenne de la diffusion : $g = \langle \cos \theta \rangle$, avec θ l'angle de diffusion. Dans le cas de la diffusion de Rayleigh, isotrope, $g \approx 0$. Pour la diffusion de Mie, g sera d'autant plus grand (diffusion vers l'avant) que le diffusion principalement vers l'avant : $g \ge 0.9$ [47].

A l'échelle mésoscopique, une onde électromagnétique va interagir avec plusieurs diffuseurs ou inhomogénéités d'indice. Deux longueurs caractéristiques décrivent la propagation à cette échelle. Le libre parcours moyen de diffusion l_s et le libre parcours moyen de transport l* qui représentent respectivement la distance moyenne entre deux évènements de diffusion et la distance moyenne après laquelle le faisceau incident a perdu la mémoire de sa direction d'origine. En introduisant ρ le nombre de diffuseurs par unité de volume, nous pouvons relier l'échelle microscopique à l'échelle mésoscopique avec les relations suivantes : $l_s = (\rho, \sigma_s)^{-1}$ et $l^* = l_s/(1 - g)$. Ainsi dans un milieu à diffusion anisotrope, l* peut être très différent de l_s .

Comme vu dans le chapitre précédent, l'intensité d'un faisceau se propageant à travers un milieu diffusant (en négligeant l'absorption) va décroitre exponentiellement en fonction de la profondeur z :

$$I(z) = I_0 \exp\left[-\frac{z}{l_s}\right]$$
(2.1)

Trois régimes de propagation peuvent être distingués selon l'épaisseur z du milieu (cf figure 2) :

- Pour $z < l_s$: régime balistique : la lumière est diffusée en moyenne moins d'une fois.
- Pour z ~ l_s, l* : régime de diffusion simple : présence de balistique, et de lumière ayant subi un ou quelques évènements de diffusion.
- Pour z >> l_s, l* : régime de diffusion multiple : absence de balistique, la lumière a été diffusée de nombreuses fois.

En régime balistique, la propagation des ondes optiques est dictée par l'optique ondulatoire. La lumière est, en moyenne, diffusée moins d'une fois. C'est le cas de l'imagerie d'échantillons peu épais. En régime de diffusion simple, l'imagerie échoue en profondeur en raison d'un manque de photons balistiques. Finalement en régime de diffusion multiple, l'intégralité des photons a été diffusée, il est alors, a priori, impossible d'imager avec une résolution limitée par la diffraction.



Figure 2. Régimes de diffusion (figure tirée de [9]). Propagation d'un faisceau collimaté à travers un milieu diffusant. Pour une épaisseur inférieure à l_s, le faisceau balistique n'est pas diffusé. A plus grande profondeur, l'intensité du faisceau balistique diminue exponentiellement et de plus en plus de photons diffusés sont présents. Après une distance l*, on peut considérer la diffusion comme isotrope.

2.1.2 Régime balistique et aberrations

Dans le régime balistique, par définition, la lumière n'a pas été diffusée. Cependant cette description de la propagation de la lumière dans un milieu inhomogène est incomplète, elle ne prend en compte que la propagation à travers une matrice d'indice constante présentant localement des inhomogénéités d'indices. Pour l'imagerie d'un tissu, le faisceau optique va aussi se propager à travers des milieux indices différents (objectif de microscope, solution d'immersion, lamelle et tissus). Chaque interface va réfracter les photons de leur direction d'origine. Ces déviations par rapport aux trajectoires désirées s'appellent les aberrations géométriques.

Dans une situation où le faisceau est focalisé, par exemple en microscopie à deux photons, les aberrations induites par l'échantillon vont augmenter le volume focal et répartir l'énergie sur un plus grand volume réduisant ainsi la résolution du système d'imagerie et le contraste (comme le signal à deux photons). La PSF du système optique n'est alors plus une tache d'Airy (cf. Figure 3.).



Figure 3. **A.** Aberration optique induite par la courbure d'un capillaire. **B.** Volume focal mesuré en imageant une bille fluorescente de 500nm de diamètre en présence d'aberration. **C.** Volume focal en l'absence d'aberration. La présence d'aberrations augmente le volume focal et répartit l'énergie sur un plus grand volume. Adaptée de [48].

La première source d'aberration dans un montage de microscopie vient du système optique lui-même. Des erreurs d'alignement et l'imperfection des optiques vont engendrer un focus aberré. Un alignement rigoureux ainsi qu'un choix d'optique adapté limitent ces aberrations. La deuxième source d'aberration a pour origine l'interface entre le liquide d'immersion et la lamelle. Par exemple, la différence d'indice entre les deux milieux, par réfraction, va dévier différemment chaque angle d'incidence d'un faisceau convergent. Le focus en sera alors allongé, il s'agit d'une aberration sphérique. Le focus sera d'autant plus sensible à cette aberration que l'ouverture numérique de l'objectif de microscope est grande. Cette aberration est en générale corrigée par l'objectif de microscope. De même, une lamelle inclinée va engendrer de la coma. Malgré les progrès réalisés sur l'alignement d'un microscope [49], ces aberrations ne sont jamais entièrement corrigées avec des techniques classiques. Nous verrons, par la suite, que les techniques d'optique adaptative peuvent corriger ces aberrations.

Pour la propagation d'un pulse laser de largeur spectrale finie s'ajoute aussi des aberrations chromatiques. L'indice optique dépend de la longueur d'onde, chaque longueur

d'onde d'un pulse peut être focalisé en un point différent (longitudinalement et transversalement). L'utilisation d'optiques achromatiques réduit cet effet.

2.1.3 Régime de diffusion multiple

2.1.3.1 Lois générales

Dans cette sous partie, nous allons nous intéresser au régime de diffusion multiple, en négligeant l'absorption. A grande profondeur : $z >> l^*$, une solution analytique de la propagation de la densité d'énergie existe. Il a été montré [50] qu'elle suit une équation de diffusion avec un coefficient de diffusion photonique D = (1/3).v.l*, avec v la vitesse de la lumière dans le milieu [51]. A des profondeurs plus faibles, seules des simulations numériques (Monte Carlo par exemple) et des expériences sont capables de décrire la propagation de la lumière.

De cette équation de diffusion la transmission T de la densité d'énergie peut être déduite de l'épaisseur du milieu z [51] :

$$T \propto \frac{l^*}{z}$$
 (2.2)

Nous retrouvons ici un analogue de la loi d'Ohm pour des conducteurs diélectriques. Par conservation d'énergie, si l'absorption est négligée, l'énergie non transmise est réfléchie. La mesure de la transmission totale pour différentes épaisseurs permet, si besoin, de mesurer l*. De plus la taille du halo diffus obtenu après propagation dans un milieu diffusant est proportionnelle à l'épaisseur de ce milieu [46].

En régime de diffusion multiple, pour une lumière incidente polarisée quelconque, la lumière en sortie possède tous les états de polarisation [52]. La description analytique de la propagation d'une lumière polarisée reste ardue.

2.1.3.2 Le speckle

Pour l'instant, nous n'avons pas considéré le caractère cohérent de la lumière pour la description de la diffusion. Nous allons commencer par décrire le cas monochromatique dans un régime de diffusion multiple. Dans un premier temps, nous allons ignorer la polarisation de la lumière. Un photon se propageant à l'intérieur d'un milieu diffusant peut emprunter de

nombreux chemins/trajectoires, voir figure 4.A. Cette vision incomplète de la propagation à l'intérieur d'un milieu complexe ne considère pas le caractère ondulatoire de la lumière pour la propagation ; mais elle reste néanmoins suffisante pour comprendre les figures d'interférences générées après propagation.

Chaque chemin optique que la lumière emprunte en se propageant dans un milieu diffusant va accumuler un retard de phase aléatoirement réparti entre 0 et 2π . Une figure d'interférence complexe, appelée Speckle, issue de la recombinaison des différents chemins va ainsi être créée en réflexion, en transmission et à l'intérieur du milieu diffusant [53]. Un exemple de figure de Speckle est présenté en figure 4.B Chaque grain brillant correspond à une interférence constructive des différents chemins optiques empruntés par la lumière se recombinant en ce point, et inversement un grain sombre correspond à une interférence destructive.



Figure 4. **A.** Exemple de trajectoires empruntées par la lumière à l'intérieur d'un milieu diffusant. Les ronds blancs indiquent les événements de diffusion. **B.** Exemple de figure de speckle observée après un milieu diffusant. Chaque grain de speckle est une interférence complexe générée par les différents chemins que la lumière emprunte dans le milieu. **C.** Un grain brillant est alors une interférence constructive.

Les statistiques d'une telle figure d'interférence sont bien connues. Si on ne considère qu'une polarisation de sortie, la distribution d'intensité P(I) est donnée par une statistique de Rayleigh :

$$P(I) = \frac{1}{\langle I \rangle} \exp(\frac{-I}{\langle I \rangle})$$
(2.3)

Avec <I> l'intensité moyenne du speckle.

Le contraste C du speckle défini comme le rapport de l'écart type ΔI sur la valeur moyenne de l'intensité $\langle I \rangle$ vaut C = $\Delta I / \langle I \rangle = 1$.

Si on considère maintenant la polarisation, nous pouvons considérer que, quelle que soit la polarisation de la lumière incidente, tous les états de polarisation seront présents en sortie en régime de diffusion multiple [52]. Finalement, le speckle formé sera la somme incohérente de deux figures de speckles indépendantes pour deux états de polarisation orthogonaux (par exemple linéaire verticale et horizontale). Les statistiques d'une telle figure de speckle sont aussi connues [53]. La distribution d'intensité est l'auto-convolution de celle explicitée à l'équation 2.3. Le contraste chute alors à $1/\sqrt{2}$.

2.1.3.3 Modes de propagation

De manière analogue à un guide d'onde, il existe des modes propres de propagation à l'intérieur d'un milieu diffusant qui dépendent de la structure du milieu [43]. Ils sont à la fois difficiles à mesurer et à exciter indépendamment mais leur nombre reste quantifiable [54]. Le nombre de modes, à une longueur d'onde donnée, est proportionnel au nombre de grains de speckle mesurés en sortie d'un milieu diffusant. Sachant qu'un grain de speckle est limité par diffraction (taille $\sim\lambda$) et que la taille du halo diffus est de l'ordre de l'épaisseur du milieu z, nous obtenons :

$$N_{modes} \sim \left(\frac{z}{\lambda}\right)^2$$
 (2.4)

Pour un milieu d'un millimètre d'épaisseur illuminé par un laser à $1\mu m$, le nombre de modes de propagation est de l'ordre du million.

2.1.3.4 Dispersion chromatique

Pour une source monochromatique, le speckle est caractéristique de la configuration du milieu diffusant mais aussi de la longueur d'onde incidente. Si la longueur d'onde incidente est légèrement modifiée, les déphasages accumulés sur les différents chemins empruntés par la lumière à l'intérieur du milieu vont changer et, ultimement, ces chemins vont être modifiés. Nous pouvons définir la bande passante de corrélation spectrale du milieu $\delta\omega$ (Hz) sur laquelle des speckles présentant des corrélations vont être générés [55–57]. Cette bande passante peut être exprimée en fonction des propriétés de diffusion du milieu :

$$\delta\omega = \frac{D}{z^2} \tag{2.5}$$

Avec z l'épaisseur du milieu et D le coefficient de diffusion. Plus le milieu est épais, plus il est sensible aux déphasages induits par un changement de longueur d'onde.

Pour le cas d'un laser pulsé de largeur spectrale $\Delta \omega$ (Hz), si le ratio $\Delta \omega / \delta \omega$ devient supérieur à 1, les composantes spectrales vont acquérir un déphasage différent après propagation dans le milieu. En chaque point du speckle en sortie du milieu, les différentes composantes spectrales ne seront plus en phase : le pulse va être allongé temporellement car le spectre (en longueur d'onde) du pulse de sortie va présenter une figure de speckle.

On peut ainsi définir le temps de Thouless τ_d qui est l'inverse de la bande passante de corrélation spectrale du milieu :

$$\tau_d = \frac{1}{\delta\omega} = \frac{z^2}{D} \tag{2.6}$$

On retrouve ici une relation de Fourier entre la largeur spectrale d'un pulse dans l'espace des fréquences et la durée d'un pulse dans l'espace temporel. Un pulse sera allongé par le temps de Thouless τ_d . Ce phénomène est illustré sur la figure 5.



Figure 5. Transmission d'un pulse optique à travers un milieu diffusant épais (adaptée de [58]). Un pulse caractérisé par sa durée temporelle ou sa largeur spectrale se propage à travers un milieu diffusant. Temporellement, un pulse va présenter une structure constituée par des grains de speckle temporels de taille égale à la durée initiale du pulse δt , la largeur totale du pulse est donnée par le temps de Thouless τ_d . D'un point de vue spectral, le spectre va aussi présenter des grains de speckle de largeur égale à la bande passante de corrélation du milieu δw et la largeur totale est donnée par la largeur spectrale du pulse Δw . Les deux approches sont reliées par une relation de Fourier.

Les statistiques d'une figure de speckle polychromatique en intensité vont aussi être modifiées. La figure de speckle est ici la somme $N_{sp} = \Delta \omega / \delta \omega$ speckles indépendants qui se somment de manière incohérente [53]. Par exemple, le contraste chute à $1/\sqrt{N_{sp}}$.

2.1.4 Régime de diffusion vers l'avant : propagation à travers un tissu de cortex

Nous allons nous intéresser ici au régime de diffusion vers l'avant (diffusion anisotrope présentant quelques évènements de diffusion : $z \sim l_s$, l*) et plus spécifiquement au cas du cortex de souris ($l_s \approx 150 \ \mu m$ et l* = 1280 $\ \mu m$ [59]) aux longueurs d'onde de la microscopie à 2 photons (~900nm). Dans ce régime, les approximations effectuées en régime de diffusion multiple ($z >> l^*$) ne sont plus valables et donc les phénomènes physiques associés (allongement du pulse, polarisation, ...) ne suivent plus les mêmes modèles. Bien que la description de la propagation dans ce régime ne présente pas de solution analytique, des simulations et des expériences sont possibles.

2.1.4.1 Intensité relative entre photons balistiques et diffusés

Nous avons vu précédemment, que la quantité de photons balistiques décroit exponentiellement avec la profondeur et que le focus balistique est potentiellement aberré, en particulier par l'interface entre milieu extérieur et tissus et le saut d'indice associé. A noter que le milieu diffusant peut aussi induire des aberrations volumiques. Finalement la frontière entre aberration et diffusion est floue, les deux phénomènes proviennent d'inhomogénéité d'indices optiques. Nous pouvons considérer que des diffuseurs de très grandes tailles engendrent des focus aberrés qui peuvent encore être utilisés pour l'imagerie résolue.

Pour une diffusion anisotrope, nous pouvons aussi considérer que très peu de photons ont été rétrodiffusés sur une épaisseur inférieure à l*. Donc la quasi-totalité des photons est présente dans l'échantillon sous la forme d'un halo de speckle, se diffusant vers l'avant. Pour un milieu plus épais, de plus en plus de photons sont rétrodiffusés pour finalement retrouver l'équation de diffusion de la lumière et la loi d'Ohm optique définie précédemment.

<u>Cas du cortex</u> : A 1 mm de profondeur, l'intensité des photons balistiques est quasiment nulle $I_{bal} = \exp(-1/0.15) = 0.13$ %. Comme la diffusion est préférentiellement vers l'avant, la quasi-totalité de la lumière devrait être présente sous forme diffuse.
En régime de diffusion vers l'avant, les photons diffusés vont toujours accumulés des retards différents et donc former une figure de speckle, voir figure 6.



Figure 6. Mesure d'un focus formé par un pulse laser de 200 fs à 930 nm en transmission à travers différentes épaisseurs de tranches de cortex fixées. l_s et l* n'ont pas été mesurées pour cette expérience, les polymères fixant les tranches augmentent généralement la diffusion. En profondeur, un speckle apparait autour du focus qui lui perd en intensité.

2.1.4.2 Polarisation

Il a été démontré par M. Xu et al [52] qu'il existe une longueur caractéristique l_p après laquelle on peut considérer le speckle présente tous les états de polarisation avec $l_p > l^*$. Après cette longueur d'isotropisation l_p , la direction de diffusion de la lumière est isotrope et l'intensité est également répartie dans tous les états de polarisation.

<u>Cas du cortex</u>: Pour un tissu de cortex de souris, nous pouvons considérer que le speckle se dépolarise après plusieurs millimètres (l*>1mm).

2.1.4.3 Figure de speckle

Pour un milieu diffusant peu épais, diffusant fortement vers l'avant, la propagation peut être modélisée par une succession de masques de phase séparés par le libre parcours moyen de diffusion. Entre chaque masque de phase, le champ optique se propage en espace libre. Les fréquences spatiales de variation de phase des masques appliqués doivent être calculées afin d'obtenir le facteur d'anisotropie g souhaité. Les simulations utilisées ici sont celles de Sam Schott [59]. Entre autre, nous pouvons étudier l'étendue spatiale de la figure de speckle, que nous limiterons ici au cas du cortex. Nous perdons néanmoins, avec cette modélisation, l'information sur la lumière rétrodiffusée par le milieu. De plus, le modèle ne décrit pas parfaitement la réalité : un milieu diffusant est généralement formé d'inhomogénéités d'indice plutôt que de surfaces diffusantes. La géométrie ne concorde pas non plus à celle de la microscopie où un faisceau est focalisé dans l'échantillon. Il donnera néanmoins une idée sur l'étendue du halo diffus à travers un cortex.



Figure 7. Simulation numérique de la propagation d'un faisceau collimaté à travers un milieu diffusant anisotrope présentant les mêmes propriétés de diffusion que le cortex d'une souris.
a. La propagation est simulée par l'interaction successive avec des masques de phase séparés de l_s.
b. Profil latéral à plusieurs profondeurs moyenné sur 100 réalisations. Le halo diffus a une largeur à mi-hauteur égale à la profondeur.

<u>Cas du cortex</u>: Sur la figure 7. Nous avons simulé la diffusion vers l'avant d'un faisceau collimaté à travers un milieu diffusant présentant les mêmes caractéristiques que le cortex de souris. Après propagation à travers le cortex sur une profondeur z, la largeur à mihauteur du halo diffusé est égale à la profondeur et présente de plus une figure de speckle avec $(z/\lambda)^2$ grains de speckle.

2.1.4.4 Largeur temporelle du pulse

Pour un régime intermédiaire où $z < 10.1^*$, la distribution de temps de vol va dévier de celle prévue par l'approximation de diffusion [60]. Finalement, l'allongement du pulse sera inférieur à celui prévu par le temps de Thouless (équation 2.4). Un exemple de cet effet est présenté en figure 8.



Figure 8. Temps de vol d'un pulse à travers un milieu diffusant pour plusieurs épaisseurs (tiré de [60]). Traits pleins : mesures expérimentales ; en pointillés : prédiction par les équations de diffusion. Pour un milieu épais (z>10.1*), la théorie décrit correctement les résultats expérimentaux. Pour des milieux moins épais, la théorie échoue. Finalement, le pulse y est moins allongé que prévu.



Figure 9. Prédiction du temps de Thouless à travers un cortex de souris. Plus le milieu est épais, plus le pulse est élargi. Néanmoins, nous ne sommes pas ici en régime de diffusion multiple (z<10 l*), le pulse sera moins élargi temporellement que ces prédictions.

<u>Cas du cortex</u>: Nous pouvons donner une borne supérieure pour l'allongement du pulse après propagation dans un milieu diffusant à l'aide du temps de Thouless pour un tissu de cortex de souris, voir figure 9. Ces valeurs nous donnent seulement une indication sur la

durée du pulse qui sera a priori plus faible que prévu par cette théorie. Après 1mm, Un pulse de 120 fs sera allongé après environ 300 µm, un pulse de 200 fs sera allongé après 420 µm.

2.1.4.5 Diffusion dynamique de la lumière

Pour l'instant, nous n'avons considéré que le cas de milieu statique. Le processus de diffusion, certes très complexe, reste linéaire et déterministe. La figure de speckle spatiospectrale reste constante dans le temps. Cependant, les tissus biologiques sont dynamiques, les diffuseurs vont se déplacer dans le temps modifiant ainsi la figure de speckle. Plus la lumière va subir d'événements de diffusion, plus le speckle sera instable, c'est à dire sensible au déplacement des diffuseurs [61]. Une mesure d'autocorrélation temporelle du speckle permet de caractériser la stabilité du milieu. Une description détaillée de telles mesures sera présentée aux chapitres 3 et 4.

<u>Cas du cortex</u>: La littérature nous renseigne sur les stabilités présentes pendant l'imagerie du cortex d'une souris. Par exemple, les aberrations seules induites par le cortex, affectant la lumière balistique, sont stables sur plusieurs heures [62]. La décorrélation temporelle du speckle en profondeur a été mesurée par Muhammad Mohsin et al à une longueur d'onde de 600 nm [16] : un millimètre de profondeur la figure de speckle est stable sur 5 ms (voir figure 10). Il s'agit d'un effet qui dépend sans aucun doute de la profondeur et de la longueur d'onde, et il n'existe pas de mesure claire in vivo dans le régime intermédiaire qui nous intéresse. D'autre part, à la longueur d'onde plus élevée de 900 nm utilisée en microscopie à deux photons, la lumière subira moins d'événements de diffusion et le speckle devrait donc être plus stable. Donc nous pouvons penser que la lumière diffusée à une longueur d'onde de 900nm à des profondeurs intermédiaires de 500 à 1000µm devrait décorréler sur un temps au moins égal à 5ms.



Figure 10. Mesure de la stabilité d'une figure de speckle pour plusieurs profondeurs dans le cerveau d'une souris mesurée à une longueur d'onde de 600 nm. Dès un millimètre de profondeur, le speckle décorrèle en moins de dix millisecondes. Tiré de [16]

2.1.4.6 Effet mémoire et isoplanétisme

Malgré la complexité de la propagation à travers un milieu diffusant, des corrélations existent quand on change spatialement l'illumination du milieu diffusant : il s'agit de l'effet mémoire. Nous pouvons le décomposer en deux familles : l'effet mémoire angulaire [63] et l'effet mémoire de translation [64].



Figure 11. Effets mémoires, tirés de [65]. A. Effet mémoire angulaire : dans une certaine gamme d'angles, incliner le front d'onde d'entrée, incline le front de sorti d'un milieu diffusant. B. Effet mémoire de translation : De même, dans une certaine gamme de décalages, la translation du front d'onde est conservée à travers un milieu diffusant fin. C. Les deux effets peuvent être combinés

L'effet mémoire angulaire décrit le phénomène suivant : quand le front d'onde incident est incliné dans une certaine gamme angulaire, le front d'onde à la sortie du milieu diffusant l'est aussi. En champ lointain, la figure de speckle est alors translatée. L'effet mémoire angulaire est en principe infini pour un diffuseur de surface. En régime de diffusion multiple, la gamme d'effet mémoire angulaire est inversement proportionnelle à l'épaisseur [63]. Pour un milieu anisotrope fin, l'effet mémoire angulaire est d'autant plus grand que le milieu est anisotrope [59].

L'effet mémoire de translation décrit un phénomène similaire pour un milieu anisotrope fin : dans une certaine gamme, la translation du front incident translate le front d'onde sortant, en champ proche [64]. En champ lointain, le front d'onde est incliné.

Les deux effets mémoires peuvent être combinés pour maximiser la translation d'une figure de speckle à l'intérieur d'un milieu anisotrope [65]. G. Osnabrugge et al ont démontré analytiquement puis ont validé expérimentalement qu'en conjuguant au tiers du volume diffusant un front d'onde incident que l'on incline pour le scanner au plan focal de l'échantillon (dans une expérience de microscopie non-linéaire à balayage par exemple), l'effet mémoire est maximisé.

Nous retrouvons finalement avec l'effet mémoire, une conservation locale de l'isoplanétisme.

2.1.5 Conclusion

Nous avons mis en avant deux effets majeurs qui limitent l'imagerie en profondeur résolue. Un pulse optique se propageant à travers un milieu diffusant va à la fois s'élargir spatialement et temporellement.

<u>Cas de la microscopie à deux photons</u> : Comme expliqué dans le chapitre 1, la microscopie biphotonique se repose sur les photons balistiques. Nous pouvons tout de même nous intéresser à la fluorescence à deux photons générée par la lumière diffusée qui est alors un signal de fond limitant d'autant plus l'imagerie en profondeur. En grande profondeur, la répartition de l'énergie sur une surface proportionnelle à la profondeur ainsi que l'allongement temporel du pulse rendent très peu probable la génération de fluorescence non linéaire. A des profondeurs plus faibles de l'ordre de quelques l_s (< 1 mm), l'élargissement

spatio-temporel d'un pulse diffus reste faible, l'émission de fluorescence à deux photons est alors possible.

En conclusion, il reste un grand réservoir de photons diffusés qui sont capables d'exciter une fluorescence non linéaire. Malheureusement, il génère une fluorescence de fond limitant l'imagerie en profondeur. Cependant, nous allons voir par la suite qu'il est possible d'utiliser ces photons pour recréer un focus intense en profondeur pour finalement former une image de fluorescence à l'aide de l'effet mémoire.

2.2 Optique de Fourier et conjugaison de phase

Dans cette partie, nous allons introduire le concept d'Optique de Fourier comme un outil mathématique utile pour décrire la propagation à travers un milieu diffusant et/ou aberrant. L'idée principale est de réduire le problème de diffusion (volumique) à une description du champ optique dans la pupille du système d'imagerie. Nous allons ensuite introduire le concept de conjugaison de phase qui permet de refocaliser la lumière diffuse à l'aide de modulateurs spatiaux de lumière.

2.2.1 Optique de Fourier et diffusion

On peut démontrer qu'il existe une relation de transformée de Fourier entre le champ optique dans la pupille d'une lentille d'un objectif de microscope et le champ dans son plan focal pour une illumination cohérente monochromatique : voir [66].

$$I_{plan \, image} = \left| E_{plan \, image} \right|^2 = \left| TF[E_{pupille}] \right|^2 \tag{2.7}$$

Ainsi une onde plane incidente sur une pupille circulaire va former un focus étant la transformée de Fourier de l'ouverture circulaire soit une tache d'Airy. Nous retrouvons ici la limite de diffraction d'un système optique. La propagation à travers un système de pupille finie joue le rôle d'un filtre spatial passe-bas.

Nous pouvons introduire ici la notion de front d'onde comme la surface perpendiculaire à la direction de propagation d'une onde, sur laquelle la phase d'une onde est égale. Pour un système optique parfait le front d'onde est plat. Le moindre écart à une phase plate du champ incident dans la pupille va former après propagation une tache plus étendue que la tache d'Airy : le front d'onde est déformé. Prenons l'exemple d'un point source imagé par un objectif de microscope et une lentille de tube comme illustré sur le schéma 12.a. En l'absence de milieu diffusant, l'image formée est limitée par diffraction. A l'inverse, en présence d'un milieu diffusant, le front d'onde dans la pupille n'est plus plat, le système optique n'arrive pas à imager correctement l'objet, la résolution est perdue. La PSF de notre système est détériorée.

Nous retrouvons ce phénomène par exemple pour un système optique imparfait donc aberré ou encore en Astronomie pendant l'observation d'étoiles à travers l'atmosphère (ici à travers un système de lentille et non pas un objectif de microscope). Nous retrouvons aussi un front d'onde fortement déformé en imageant à travers un milieu diffusant.



Figure 12. Déformation du front d'onde dans la pupille. A. Un point source est imagé à travers un milieu diffusant par un objectif de microscope et une lentille. B. Phase dans la pupille pour un système, de gauche à droite, sans milieu diffusant, avec un milieu aberrant et avec un milieu diffusant. C. Intensité respective dans le plan image.

Pour une déformation de faible fréquence spatiale, le focus sera aberré. La base orthogonale sur un disque unité des polynômes de Zernike est couramment utilisée pour décrire les déformations subies par un système optique dans la pupille [42]. Généralement les premiers vecteurs de cette base (voir figure 13) suffisent à décrire correctement les aberrations d'un système, comme par exemple les comas et l'aberration sphérique décrites précédemment. Dans le cas de la diffusion le front est fortement déformé et présente une structure aléatoire. La base des polynômes de Zernike n'est alors plus la plus adaptée. Les bases canoniques (1 vecteur = une position dans l'espace) ou d'Hadamard (1 vecteur est composé de la moitié des positions dans l'espace) sont généralement utilisées [13,14].

Pour le cas d'un laser pulsé, le paramètre important est la largeur spectrale de l'impulsion et la bande passante de corrélation spectrale du milieu. Pour un ratio inférieur à 1, chaque longueur du pulse a le même front d'onde dans la pupille. Pour un ratio plus élevé, des fronts d'ondes différents se propageront en sortie du milieu et se sommeront de manière incohérente.



Figure 13. Les premiers modes de Zernike. Les modes de Zernike forment une base de la pupille. Plus l'ordre n du mode est important, plus il contient de hautes fréquences. Tirée de [67]

2.2.2 Focalisation par conjugaison de phase

Nous venons de voir qu'un point source caché derrière un milieu diffusant ou aberrant va générer un front d'onde déformé. H. Kogelnik a démontré que renvoyer le conjugué de phase de ce front d'onde cohérent à travers le milieu permet de focaliser sur la position de la source [68]. Cet effet s'appelle la conjugaison de phase optique et peut aujourd'hui être réalisé à l'aide de modulateurs spatiaux de lumière (SLM) ou de miroirs qui localement contrôlent la phase d'une onde, c'est ce qu'on appelle la conjugaison de phase « digitale ». Les différentes technologies SLM seront détaillées au paragraphe 2.3.

La correction des aberrations par conjugaison de phase pour refocaliser s'appelle l'optique adaptative et est couramment utilisée en microscopie. La correction de la diffusion s'appelle le façonnage de front d'onde et a été développée depuis les travaux de Vellekoop et al en 2007 par la communauté travaillant sur les milieux diffusants [13]. Les deux enjeux de la correction du front d'onde sont de retrouver un focus limité par diffraction et d'y augmenter l'énergie. En surface, l'objectif premier est de retrouver la résolution optique. En profondeur, l'objectif est de conserver une bonne résolution et d'augmenter l'énergie au focus.

La conjugaison de phase est aussi utilisée dans le domaine des lasers, des communications, de l'usinage et bien sûr de l'imagerie. Dans la plupart des domaines, l'accès aux deux côtés du milieu est possible ce qui n'est pas le cas en microscopie. Tout l'enjeu pour la communauté travaillant en optique adaptative et en façonnage de front en microscopie est de pouvoir mesurer le conjugué de phase sans avoir de source bien identifiée. La partie 2.4 de ce chapitre sera dédiée aux différentes techniques de correction du front d'onde pour différentes géométries.

2.2.2.1 Qualité de la focalisation en Optique adaptative

Le rapport de Strehl S, défini comme le rapport entre l'intensité maximale de la PSF avec et sans aberration, est souvent utilisé pour caractériser la perte de contraste et de résolution d'un système optique [69]. Un système aberré va générer un focus étalé réduisant l'intensité maximum du focus et la résolution. Pour de faibles aberrations, le rapport de Strehl peut être relié à l'écart de la phase du front d'onde σ par :

$$S \approx e^{-\sigma^2}$$
 (2.8)

La mesure, en l'a considérant idéale, du front d'onde pour corriger les aberrations nous renseigne donc directement sur le gain en résolution et contraste par le calcul du rapport de Strehl. Pour une forte déformation du front d'onde (focus fortement aberré ou figure de speckle), le rapport de Strehl (alors très mauvais) n'a plus de sens.



2.2.2.2 Qualité de la focalisation par façonnage du front d'onde

Figure. 14 Principe de la focalisation par conjugaison de phase issue de [13]. A. Un front d'onde plan se propageant à travers un milieu diffusant forme en sortie une figure de speckle. B. Envoyer un front d'onde approprié permet de focaliser en sortie du milieu.

Contrairement à la correction des aberrations, la correction de la diffusion sera toujours imparfaite : le nombre de degrés de contrôle (= pixels de SLM utilisés) est largement inférieur au nombre de mode se propageant dans le milieu, qui est proportionnel à $(z/\lambda)^2$. Il est toujours possible de reconstruire un focus qui sera alors superposé sur un fond de speckle. Il est possible de quantifier l'efficacité de la focalisation avec le gain η défini comme le rapport entre l'intensité au focus sur l'intensité moyenne du speckle. Il a été démontré [13] que le gain est proportionnel au nombre de pixels de SLM utilisé. Finalement, même avec un nombre limité de pixels de SLM, un focus intense peut être construit. De plus, pour un speckle pleinement développé, donc en régime de diffusion multiple, la taille du focus sera celle de la taille d'un grain de speckle, il sera donc limité par diffraction [70].

2.2.3 Effet mémoire et conjugaison de phase

Le focus ainsi formé peut ensuite être scanné dans la gamme d'effet mémoire pour former une image de fluorescence [71]. Cependant l'isoplanétisme des corrections obtenues reste faible et diminue avec la profondeur [63]. Le plan où est conjugué le SLM est alors un élément clé de la taille du champ de vue. Pour la correction des aberrations, conjuguer la correction sur le plan introduisant le plus d'aberration augmente le champ de vue par un facteur 2-3 [72], voir figure 15. Le même effet est retrouvé pour la correction de la diffusion [73]. L'utilisation en parallèle de plusieurs systèmes de correction permet d'augmenter le champ de vue en corrigeant indépendamment différentes zones de l'échantillon [74].



Figure 15. Images de billes fluorescentes en microscopie à deux photons derrière un écran aberrant tirées de [72]. (a). Sans correction. (b). Avec correction conjuguée au plan diffusant. (c). Avec correction conjuguée à la pupille.

Introduite par Dicke et al [75] puis expérimentalement testée par Beckers et al [76] en astronomie, la conjugaison multiple en optique adaptative permet d'accroitre encore plus le champ de vue de la correction [77]. Etudiée numériquement en microscopie [78,79] et appliquée à l'imagerie de la rétine, cette technique ouvre de belles perspectives pour la correction de front d'onde en profondeur.

2.2.3 Conclusion

Il est donc possible de compenser à la fois les aberrations et la diffusion en profondeur. Néanmoins, la diffusion dynamique de la lumière impose d'être capable de mesurer le masque de correction de phase dans un laps de temps dépendant de l'échantillon : de la milliseconde (au-delà d'un millimètre de profondeur) à l'heure (pour les aberrations). Il faut donc combiner à la fois un système de modulation rapide de la lumière avec une stratégie de correction de front d'onde efficace et rapide pour espérer réaliser de la microscopie à 2 photons en profondeur.

2.3 Modulateurs spatiaux de lumière et miroirs déformables

L'élément clé de la conjugaison de phase est la capacité de contrôler localement la phase du front d'onde incident. Cela est possible à l'aide de modulateurs spatiaux de lumière (SLM) ou de miroirs déformables, que nous n'avons pas encore détaillés jusqu'à maintenant. Nous allons lister ici les principales technologies et leurs caractéristiques.

2.3.1 Miroirs déformables

Les miroirs déformables sont constitués d'actuateurs qui forment une surface réfléchissante. Chaque actuateur peut être soit déplacé longitudinalement, soit incliné. Un déplacement longitudinal va modifier localement le chemin optique donc la phase de l'onde réfléchie. L'inclinaison d'un actuateur va quant à elle modifier le gradient de la phase. Différentes technologies existent pour déplacer les actuateurs, parmi d'autres : bobine magnétique, piézoélectrique, MEMS ou actionneurs mécaniques. L'ajout d'une membrane continue est parfois utilisé pour assurer la continuité de la modulation de phase.

L'avantage premier de ces technologies est la vitesse. Les fréquences de rafraichissement sont de l'ordre du kilohertz et peuvent atteindre la dizaine de kilohertz dans le cas des MEMS. Cependant, ils présentent un nombre relativement limité d'actuateurs : de la dizaine à quelques milliers. Ils sont aussi relativement chers. Boston Micromachines en fabrique par exemple.

Malgré le nombre limité d'actuateurs, cette technologie est très utilisée pour la correction d'aberration à la fois en Astronomie et en Microscopie.

2.3.1 Modulateurs spatiaux de lumière à cristaux liquides

Cette technologie repose sur les propriétés de biréfringence des cristaux liquides. Des électrodes imposent localement une tension sur les cristaux liquides changeant leur orientation. Ainsi une lumière incidente polarisée, selon l'orientation des cristaux liquides, va voir un indice optique différent. La modulation de l'indice va donc localement changer le chemin optique de la lumière et donc la phase. Calibrer par longueur d'onde, cette technologie peut imposer un déphase entre 0 et 2π . Il existe des versions en transmission et en réflexion.

Contrairement aux miroirs déformables, les SLMs présentent des millions de degrés de liberté. Ils sont cependant lents : le taux de rafraichissement ne dépasse pas la centaine de Hz. Nous pouvons en trouver chez Holoeye, Hamamatsu, Santec, Forth Dimension Displays ou Medowlark par exemple.

2.3.3 Autres technologies

Les matrices de micro-miroirs (DMD) sont une technologie similaire aux miroirs déformables à l'exception qu'ils modulent en amplitude. Les micro-miroirs ont deux inclinaisons possibles : une première « ON » qui réfléchit la lumière dans la direction souhaitée ; la deuxième « OFF » qui réfléchit la lumière vers un bloqueur de faisceau. Cette technologie est à la fois très rapide (~ 10 kHz) et possède des millions de pixels. La modulation d'amplitude est parfois un frein à son utilisation. Par exemple, en microscopie en profondeur, la perte de photons par modulation d'amplitude n'est pas souhaitée. Texas Instrument, Ajile light industries ou Vialux en produisent.

Les modulateurs ferroélectriques sont des modulateurs de phase binaire (0 ou π). Il existe aussi des SLMs à cristaux liquides modulant localement la polarisation d'une onde. Nous pouvons en trouver chez Medowlark.

Finalement ces technologies sont vendues commercialement. Il est aussi possible de détourner d'autres technologies pour s'en servir comme modulateurs de phase. Nous verrons dans les chapitres 5 et 6 que des déflecteurs acousto-optiques peuvent aussi moduler le front d'onde à très grande vitesse (jusqu'à une centaine de kilohertz) avec une centaine de degrés de liberté

2.4 Méthodes de correction du front d'onde

Historiquement, en microscopie, les premières techniques de focalisation par correction du front d'onde ont été développées en épi-détection pour la correction des aberrations. Il s'en est suivit les premiers papiers de correction de diffusion en transmission puis finalement la correction de la diffusion en épi-détection.

Nous n'allons suivre une autre approche que celle historique. Nous allons dans un premier temps traiter le cas de la correction en transmission puis celle en épi-détection. L'objectif ici est de dégager une stratégie de correction du front d'onde valable à la fois en transmission et en épi-détection capable de compenser les aberrations et la diffusion en profondeur. Nous n'allons donc pas décrire exhaustivement les différentes stratégies mais plutôt nous intéresser aux limites physiques de chacune d'entre elles.

2.4.1 Correction du front d'onde en transmission

En transmission, il existe trois méthodes principales de corrections de la diffusion : l'optimisation consiste à maximiser itérativement l'intensité lumineuse d'un grain de speckle ; la mesure de la matrice de transmission caractérise la propagation du champ entre les pixels d'un SLM et une caméra ; et finalement la conjugaison de phase digitale mesure le champ optique en sorti d'un milieu diffusant afin de renvoyer son conjugué de phase pour focaliser.

2.4.1.1 Conjugaison de phase optique digitale

La conjugaison de phase optique digitale est la directe extension de l'expérience de H. Kogelnik à l'aide de modulateurs spatiaux de lumière [80]. La mesure se fait en deux temps. Dans un premier temps, le champ optique sortant d'un milieu diffusant est mesuré sur une caméra par technique holographique. Le bras de mesure est ensuite fermé et le conjugué de phase est affiché sur un SLM conjugué à la caméra puis imagé sur la sortie du milieu diffusant. Finalement un focus est formé à l'entrée du milieu.



Figure 16. Conjugaison de phase optique digitale. La mesure se fait en deux étapes. A. Mesure du champ optique par technique holographique sur une caméra CCD. Le champ optique mesuré est présenté sur la figure C. B. Application du conjugué de phase sur un SLM, la lumière est ensuite renvoyée dans le milieu diffusant. D. Un focus est formé à l'entrée du milieu diffusant. E. Speckle obtenu sans conjugaison de phase. Adaptée de [80]

<u>Limitations</u>: Pour focaliser, l'accès au deux côtés du milieu diffusant est nécessaire, d'un côté le front d'onde est mesuré, de l'autre le faisceau est refocalisé. Ainsi le montage nécessaire est relativement complexe. Aucune focalisation spatio-temporelle n'a été démontrée jusqu'à présent à travers un milieu diffusant. <u>Avantages :</u> La focalisation est rapide et se fait en deux temps : une mesure de champ complexe suivit de l'affichage d'un masque de phase sur le SLM pour focaliser. Une extension est possible à une géométrie en épi-détection, voir paragraphe 2.4.2.1.

2.4.1.2 Optimisation

L'optimisation consiste à itérativement construire un masque de phase pour former une interférence constructive en sorti d'un milieu diffusant. Historiquement, la première expérience de focalisation par optimisation a été réalisée par Vellekoop et al en 2007 [13]. Un schéma du montage expérimental est présenté sur la figure 17. Un laser cohérent monochromatique à 632.8 nm est modulé en réflexion par un modulateur spatial de lumière (Holoeye LR-2500). Le SLM est ensuite imagé sur la pupille d'entrée d'un objectif de microscope qui focalise la lumière en entrée d'un milieu diffusant. Un deuxième objectif de microscope image une polarisation du speckle de sortie sur une caméra CCD.

L'optimisation itérative se fait comme suit :

- Un pixel de SLM est sélectionné
- Le pixel correspondant est discrètement déphasé entre 0 et 2π et l'intensité de la cible est enregistrée pour chaque phase.
- La phase qui maximise l'intensité est alors calculée via un algorithme de décalage de phase.
- Cette phase est enregistrée puis appliquée à la fin de l'optimisation

A la fin de l'optimisation, les champs optiques contrôlés par chaque pixel de SLM se somment constructivement pour former un focus.

Par la suite de nombreux algorithmes d'optimisation ont été développés : des algorithmes continus [81], génétiques [82], de recuits simulés [83] ... L'utilisation de modulateurs d'amplitude binaire [84] ou de polarisation [85] conduit aussi à une focalisation de la lumière.



Figure 17. Montage optique d'une expérience d'optimisation. Le front d'onde d'un laser continu est modulé en phase par un SLM en réflexion. Le SLM est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope qui focalise la lumière en entrée d'un milieu diffusant. Un deuxième objectif de microscope image un plan de sorti du milieu diffusant sur une caméra. Par rétroaction sur le SLM, l'intensité d'un grain de speckle est maximisée.

<u>Cas polychromatique :</u> Une extension de l'optimisation pour des lasers pulsés a aussi été réalisée expérimentalement [86,87]. L'ajout d'un bras de référence externe pulsé permet de limiter l'interférence mesurée en sortie à une fenêtre temporelle de la taille du pulse optique. Ainsi l'interférence constructive construite par optimisation sera limitée dans l'espace et dans le temps.

<u>Limitations</u>: L'optimisation itérative prend du temps, N modes de SLM successifs doivent être optimisés. Pour focaliser sur une nouvelle cible en dehors de l'effet mémoire, une nouvelle optimisation doit être lancée. Finalement, former une image de fluorescence en utilisant des focus formés par optimisation peut prendre du temps.

<u>Avantages :</u> Une extension possible à une géométrie en épi-détection est possible, voir paragraphe 2.4.2.3.

2.4.1.3 Matrice de transmission

Une autre approche pour focaliser est de mesurer expérimentalement [14] la matrice de transmission \mathbf{t} qui relie le champ optique contrôlé en entrée par un SLM Eⁱⁿ au champ

optique mesuré en sortie E^{out}. Le montage optique est identique à celui utilisé pour l'optimisation, voir figure 17.

$$E^{out} = tE^{in} \tag{2.9}$$

La propagation à travers un milieu diffusant étant linéaire et déterministe, l'inversion ou la conjugaison de phase de la matrice permet de focaliser.

$$E_{focus}^{in} = t^* E^{target} \tag{2.10}$$

Avec E^{target} un vecteur d'amplitude nul excepté au niveau du focus désiré.

<u>Cas polychromatique :</u> Il a été démontré par la suite qu'une mesure résolue spectralement [55] ou temporellement [88] permet de focaliser dans l'espace et dans le temps.

<u>Limitations</u> : Pour caractériser la propagation à travers un milieu diffusant, l'accès au plan de sorti du milieu est nécessaire, aucune extension à une géométrie en épi-détection n'a été démontrée. Un bras de référence est nécessaire pour la mesure du champ complexe. Comme en optimisation, les mesures sont longues.

<u>Avantages :</u> Une seule mesure permet de focaliser sur l'ensemble du champ de vue : l'effet mémoire n'est pas un problème. Il a été démontré par A. Boniface et al [89] qu'il est possible de focaliser n'importe quelle PSF. En caractérisant, la propagation pour plusieurs polarisations, il est aussi possible de contrôler la polarisation du focus formé [90].

2.4.2 Correction du front d'onde en épi-détection

En épi-détection, nous pouvons distinguer trois approches différentes pour focaliser en profondeur [48]. La première consiste à mesurer directement le front d'onde émis par un objet ponctuel à l'intérieur d'un milieu. La deuxième consiste à itérativement optimiser une fonction de mérite basée sur l'image de fluorescence obtenue par microscopie. Finalement la dernière consiste à optimiser directement un signal non linéaire total.

2.4.2.1 Correction par mesure du front d'onde

Une première solution pour corriger les aberrations d'un système est de mesurer le front d'onde de la lumière rétrodiffusée par l'échantillon. L'utilisation d'un fenêtrage

temporel combiné à une mesure du front d'onde avec un Shark Hartmann a permis à M Rueckel et al [91] de corriger itérativement les aberrations. En minimisant la déformation du front d'onde mesuré, un focus non aberré est formé.

<u>Limitations :</u> Cette technique ne corrige que les aberrations. Les photons corrigés ont besoin d'aller ou de revenir du même point à l'intérieur du milieu.

Une deuxième solution pour corriger le front d'onde est de mesurer le front d'onde en épi-détection d'une source ponctuelle, une étoile guide, à l'intérieur du milieu. La conjugaison de phase du front d'onde mesuré permet alors de refocaliser sur la source ponctuelle. Une bille fluorescente [92] ou un émetteur non linéaire (SHG) [93] peuvent être utilisés. Cette technique est capable de focaliser à grande profondeur [94,95] mais la présence de fluorescence hors focus limite la capacité à reconstruire, voir figure 18.c.

D'autres étoiles guides sont possibles : marquage acousto-optique [96] ou champ optique généré par un diffuseur se déplaçant [97]. Cependant la faible portion de lumière rétrodiffusée rend ces techniques difficilement applicables in vivo. Généralement les mesures se font en accédant à deux faces opposées du milieu

Limitations : A très grande profondeur, il peut s'avérer difficile de mesurer un front d'onde issu d'une étoile guide unique : peu de photons générés, plusieurs étoiles guides peuvent être excitées simultanément. A grande profondeur (en absence de photons balistiques) le montage optique peut s'avérer complexe ce qui rend la mesure difficilement applicable in vivo [98]. Les longueurs d'onde d'excitation du laser incident et du front d'onde mesuré doivent être dans la bande passante de corrélation du milieu. Pour la correction d'aberration, cela ne pose pas de problème. Néanmoins la bande passante de corrélation des photons diffusés est fortement réduite.

Avantages : Les mesures sont relativement rapides.



Figure 18. Correction par mesure directe du front d'onde [48] A. Schéma du montage optique. Un analyseur de front d'onde mesure le front d'onde d'un point source à l'intérieur de l'échantillon. B. Exemples de mesures de front d'onde en profondeur. En grande profondeur, la mesure du front d'onde devient difficile. C. Exemples d'images avant et après correction dans un poisson-zèbre.

2.4.2.2 Correction par optimisation d'image

Une deuxième solution pour corriger le front d'onde est d'itérativement améliorer l'image formée par microscopie de fluorescence [48,99]. A chaque itération, plusieurs amplitudes d'un mode spatial du SLM ou d'un miroir déformable sont appliquées. Pour chaque amplitude, une image de fluorescence est formée. La déformation qui optimise une métrique sur l'image (contraste, résolution) est alors conservée avant de passer à l'itération suivante.

<u>Limitations</u>: Ces techniques sont itératives et nécessitent de former une image à chaque itération. La mesure peut être longue. A grande profondeur (plus ou très peu de photons balistiques), aucune image n'est formée limitant l'utilisation de ces techniques.



Figure. 19. Correction en microscopie à deux photons [48] A. Correction par optimisation d'un signal non linéaire. La fluorescence totale mesurée au PMT rétroagi sur le miroir déformable. B Correction par optimisation d'image. Une métrique calculée par l'intermédiaire de l'image de fluorescence permet une rétroaction sur un miroir déformable.

2.4.2.3 Correction par optimisation d'un signal non linéaire

La dernière solution est d'itérativement optimiser un signal non linéaire issu de l'échantillon. Ce signal non linéaire sera maximisé si la lumière est focalisée sur une source non linéaire à l'intérieur de l'échantillon [15,100,101].

<u>Avantages :</u> Ces techniques permettent de corriger simultanément les aberrations et la diffusion [100]. Re-comprimer une pulsation laser après un milieu diffusant permet aussi de maximiser un processus non linéaire [102]. L'optimisation d'un signal non linéaire permet donc de focaliser spatialement et temporellement un pulse à l'intérieur d'un milieu diffusant [87].

<u>Limitations</u> : A grande profondeur, il peut s'avérer difficile de mesurer un signal non linéaire excité par un speckle étalé spatialement et temporellement. Il s'agit de techniques itératives qui nécessitent donc d'être réalisées avant la décorrélation du speckle.

2.4.2.4 Autre : technique holographique (F-sharp)

En séparant le faisceau laser incident en deux faisceaux : un statique et un balayé sur l'échantillon, I. Papadopoulos et al ont développé une technique holographique pour mesurer le champ complexe à l'intérieur d'un milieu diffusant dans la gamme d'effet mémoire en microscope non linéaire [103]. La mesure du champ au plan objet permet directement de connaitre le masque de phase à appliquer dans la pupille pour obtenir un focus. En deux/trois itérations de la mesure, un focus est formé.

<u>Avantages</u> : Cette technique nécessite de changer que rarement le masque de phase appliqué dans la pupille pour correction (deux-trois fois), elle n'est donc pas restreinte par la vitesse de rafraichissement des SLMs. Elle permet de corriger sans distinction aberration et diffusion.

<u>Limitation :</u> Cette technique nécessite d'avoir un focus fortement aberré contenu dans l'effet mémoire. Elle ne fonctionne donc pas en régime de diffusion multiple.

2.4.3 Conclusion : Correction du front d'onde en microscopie à deux photons

L'objectif de cette thèse est d'investiguer l'emploi de photons diffusés pour l'imagerie de fluorescence non linéaire. En régime de diffusion faible (présence de photons balistiques et diffusés) où la microscopie échoue en raison d'une fluorescence de fond trop importante, les techniques de correction de front d'onde aideront à maximiser l'intensité au focus pour augmenter le rapport signal sur background. En régime de diffusion multiple, ces techniques nous permettront de créer un focus par-dessus une figure de speckle pour, à terme, former une image de fluorescence en balayant le focus dans la gamme d'effet mémoire [65]. Nous allons appliquer une stratégie commune pour la correction du front d'onde dans ces deux situations.

A grande profondeur, il n'existe plus de photons balistiques pour former une image de fluorescence. Toutes les stratégies de correction du front d'onde par optimisation de l'image sont donc impossibles. La mesure directe du front d'onde d'une source fluorescente non linéaire est aussi impossible. Si nous ne considérons que les photons diffusés, les longueurs d'onde d'excitation et d'émission seront en dehors de la bande passante de corrélation du milieu. L'information mesurée est inutile pour focaliser le laser d'excitation. Cette stratégie efficace en optique adaptative, ne fonctionne donc plus pour la correction de la diffusion.

La conjugaison de phase de photons marqués acoustiquement en profondeur est une bonne alternative. Les montages peuvent cependant être très volumineux (nécessité d'ajouter un transducteur échographique). De plus la tache focale ainsi créée est de l'ordre de la longueur d'onde acoustique (>10 μ m). La résolution est trop faible pour l'imagerie neuronale. Cette solution est néanmoins la plus rapide à focaliser à l'intérieur d'un milieu [104].

Finalement, l'optimisation d'un signal non linéaire parait être un bon candidat pour l'imagerie en profondeur. La résolution optique est conservée et l'émission de fluorescence est isotrope facilitant la mesure. Néanmoins un système rapide d'optimisation doit être utiliser pour focaliser à travers un milieu diffusant dynamique tel que les tissus biologiques [16].

III Façonnage du front d'onde avec un MEMS

Nous venons de voir précédemment que l'optimisation du front d'onde est une méthode de choix pour corriger la diffusion et les aberrations d'un système aussi bien en transmission qu'en épi-détection. La clé pour focaliser les photons diffusés en profondeur à travers un milieu biologique est la vitesse. Il faut être capable de focaliser ces photons diffusés avant que le milieu ne décorrèle, ie que l'interférence constructive formée au foyer soit détruite par la dynamique du milieu qui change les positions des inhomogénéités d'indice, c'est à dire les déphasages des différentes contributions. Nous allons décrire ici un système de correction du front d'onde rapide capable de focaliser la lumière à travers des milieux diffusants dynamiques. Un modulateur spatial de lumière (SLM) basé sur une technologie MEMS, un détecteur rapide et une électronique FPGA sont combinés pour mettre en œuvre une optimisation continue du front d'onde avec un taux d'optimisation par mode de 4,1 kHz. L'essentiel des travaux décrits dans ce chapitre est publié [105].

Nous allons dans un premier temps décrire les différents algorithmes d'optimisation afin de justifier l'algorithme mis en place pour focaliser à travers un milieu dynamique. Nous allons ensuite décrire en détail le système construit avant de finalement démontrer son efficacité pour focaliser à travers un milieu diffusant dynamique.

3.1 Algorithmes d'optimisation

Le principe général d'une optimisation en transmission est présenté sur la figure 1. Le front d'onde incident est modulé en phase par un SLM avant d'être focalisé en entrée d'un milieu diffusant. Un plan quelconque en sortie du milieu diffusant est imagé et l'intensité d'un grain de speckle est optimisée itérativement. Selon l'algorithme de rétroaction utilisé, l'efficacité de la focalisation varie.

Il existe une large gamme d'algorithmes d'optimisation pour focaliser à travers un milieu diffusant [106]. Les premiers algorithmes mis en place sont basés sur l'équation d'interférométrie par décalage de phase et sont ceux les plus couramment utilisés [81]. D'autres algorithmes, plus complexes, comme les algorithmes génétiques, ont aussi été développés, ils sont généralement plus performants en présence de bruit mais sont plus couteux en calcul et donc pas forcement adaptés à une optimisation rapide [82].



Figure 1. Principe général d'une optimisation en transmission. Un SLM module le front d'onde incident. Le front d'onde modulé est focalisé sur un milieu diffusant par l'intermédiaire d'un objectif de microscope. Un deuxième objectif de microscope image la figure de speckle dans un plan en sortie du milieu. Avant optimisation, une figure de speckle est mesurée. L'intensité de l'un des grains de speckle est utilisée comme signal de rétroaction pour générer le masque de phase qui va focaliser. Après optimisation, un focus est formé.

3.1.1 Algorithmes par décalage de phase

Les algorithmes par décalage de phase sont des algorithmes d'optimisation itératifs de l'intensité d'un grain de speckle en sortie du milieu [81]. Une itération des algorithmes d'optimisation présente une structure commune. Une fraction des pixels du SLM (= un mode spatial du SLM) est sélectionnée puis modulée p fois en phase entre 0 et 2π . Les autres pixels restent fixes et servent de référence. Pour chaque décalage p de phase appliqué, l'intensité résultante I(p) de l'interférence du champ de speckle généré par les pixels modulés $E_{mod} = |E_{mod}|e^{i\theta(p)}$ et du champ de speckle généré par les pixels de référence $E_{ref} = |E_{ref}|e^{i\phi}$ est mesurée :

$$I(p) = |E_{mod} + E_{ref}|^2 = |E_{mod}|^2 + |E_{ref}|^2 + 2|E_{ref}||E_{mod}|\cos(\theta(p) + \varphi)$$
(3.1)

La différence de phase φ entre les deux champs de speckle peut être déduite de l'équation d'interférométrie par décalage de phase :

$$\varphi = \tan^{-1} \frac{\sum I(p) \sin \theta(p)}{\sum I(p) \cos \theta(p)}$$
(3.2)

L'optimisation d'un mode de SLM est illustrée sur la figure 2. Imposer à ce mode de SLM la phase φ mesurée va maximiser l'intensité en faisant interférer constructivement les deux speckles. Ce processus est réalisé itérativement pour une série de modes du SLM.



Figure 2. Optimisation d'un mode (ici un pixel de SLM) par décalage de phase. Un mode de SLM est déphasé p = 4 fois entre 0 et 2π . L'intensité du grain de speckle ciblé est mesurée (croix rouges) pour toutes les phases appliquées $(0, \pi/4, \pi/2, 3\pi/4)$. La différence de phase φ entre le mode et la référence donnant l'intensité maximale du grain de speckle ciblé est déduite par l'équation d'interférométrie par décalage de phase.

Si les phases maximisant l'intensité sont appliquées après chaque itération, nous parlons d'algorithme continu. Au contraire, si elles sont appliquées après avoir testé tous les modes, nous parlons d'algorithme par étape ou d'algorithme pas à pas. Plusieurs sets de modes peuvent être utilisés pour sélectionner les pixels à optimiser : la base canonique (un mode = un pixel de SLM) ; des vecteurs aléatoires ou encore la base d'Hadamard où un mode est constitué de la moitié des pixels de SLM. Des exemples d'algorithmes par décalage de phase sont présentés sur la figure 3. Comme le speckle de référence (pixels fixes) change à chaque itération, la base de modes doit être optimisée entre 3 et 5 fois pour finaliser la convergence.



Figure 3. Exemples de trois algorithmes d'optimisation. (a) Algorithme par étape avec la base canonique, les segments sont adressés (carré rouge) les uns après les autres. Après que les phases optimales soient trouvées pour chaque pixel, le SLM impose le masque de phase optimum. (b) L'algorithme continu avec la base canonique est similaire au premier à l'exception que la phase optimale est appliquée à chaque itération (carré gris). (c) L'algorithme continu avec des vecteurs aléatoires sélectionne aléatoirement les pixels et mesure la phase optimale du groupe de pixel. Le SLM applique à chaque itération le masque de phase maximisant l'intensité. Tirée de [2]

3.1.2 Autres algorithmes

La plupart des algorithmes d'optimisation développés au jour d'aujourd'hui peuvent être appliqués à la focalisation en milieu diffusant. Ils sont en général plus robustes au bruit que les algorithmes par décalage de phase mais ils sont plus complexes à implémenter. Nous trouvons dans la littérature des algorithmes génétiques [82,108–110] des algorithmes par recuit simulé [83] ou encore des algorithmes d'optimisation par apprentissage statistique [111]. Le choix de l'algorithme sera discuté au paragraphe 3.2.1 après avoir présenté les spécificités de notre système de contrôle de front d'onde (SLM et électroniques).

3.1.3 Efficacité de focalisation

L'efficacité de la focalisation peut être quantifiée par le calcul du gain η défini comme le rapport entre l'intensité au focus sur l'intensité moyenne du speckle.

$$\eta = \frac{I_{focus}}{\langle I_{speckle} \rangle}$$
(3.3)

Il a été démontré [9] que pour un modulateur de phase et une seule polarisation de sortie considérée, le gain est proportionnel au nombre de pixels indépendants utilisé N_{SLM} .

$$\eta = \frac{\pi}{4} N_{SLM} \text{ pour } N_{SLM} >>1$$
(3.4)

Pour un speckle de contraste inférieur à 1 (les deux polarisations considérées ou un laser de bande passante plus large que la bande passante de corrélation du milieu). Le gain chute à $\eta = \pi/4.N_{SLM}/N_{sp}$, avec N_{sp} le nombre de figures de speckle indépendantes se sommant de manière incohérente [113].

Il est également possible de focaliser sur plusieurs cibles en même temps. Le gain par cible sera alors le gain défini précédemment divisé par le nombre de cible [13].

La présence de bruit va aussi diminuer le gain [81]. L'utilisation d'un SLM de phase mal calibré ou capable d'une modulation de phase incomplète (modulation binaire : 0 ou π par exemple) va réduire le gain et la vitesse de convergence [104]. Finalement, la dynamique du milieu va aussi réduire le gain, ce point sera traité dans le paragraphe 3.4.4.

3.2 Implémentation de la technologie MEMS

La technologie SLM utilisée pour ces travaux est une technologie à base de MEMS de la compagnie Boston Micromachines : un SLM Kilo-DM segmenté. Il s'agit de l'un des SLMs les plus rapides présents sur le marché. Il est composé de 1020 pixels indépendants et il est capable de moduler le front d'onde entre 0 et 6π à une longueur d'onde de 532 nm. Il peut déphaser le front d'onde de 2π en 100 µs.

Tout l'enjeu du système construit est d'exploiter la vitesse de ce SLM en implémentant un algorithme efficace pour focaliser à travers un milieu diffusant dynamique. Pour limiter au maximum les temps de transfert entre les différents composants du système (détecteur, SLM et système de calcul), nous avons privilégié l'utilisation d'une électronique FPGA rapide. Il s'agit d'un circuit logique reprogrammable qui permet d'interfacer des systèmes électroniques numériques en limitant le plus possible les temps de transfert et les retards. Néanmoins des algorithmes complexes peuvent y être difficiles à implémenter.

3.2.1 Choix de l'algorithme

Les algorithmes par étape peuvent présenter un faible rapport signal sur bruit lorsque le signal initial est faible, mais ne nécessitent pas d'électronique rapide [14,81]. Tout en exigeant un peu plus d'étapes, un algorithme continu présente plusieurs avantages : il génère un focus très rapidement et le rapport signal sur bruit augmente itération après itération, ce qui aboutit progressivement à une meilleure estimation de la phase optimale.

Dans le même ordre d'idée, le déphasage de la moitié de tous les pixels à chaque itération en utilisant la base de Hadamard augmente l'amplitude de modulation et donc le rapport signal sur bruit comparé à un algorithme modifiant les pixels un par un. Cependant, si une grande erreur est faite sur la mesure de la phase optimale pour un mode et qu'elle est appliquée, le focus sera fortement réduit. Pour éviter cet effet, des algorithmes plus intelligents pourraient être implémentés, où par exemple le nombre de pixels par mode diminue vers la fin de l'optimisation. Cependant, des algorithmes plus complexes peuvent entraîner une pénalité en termes de temps de calcul et réduire la vitesse.

Dans les deux cas (algorithme continu et par étape), pour l'optimisation à travers des échantillons dynamiques, les meilleures performances sont limitées par le temps de décorrélation du milieu. Pour les algorithmes par étape, le nombre de pixels (ou de modes) du SLM utilisés doit être ajusté pour optimiser autant de modes que possible pendant cette période. En revanche, aucune connaissance préalable des propriétés dynamiques du milieu n'est nécessaire pour ajuster le nombre de modes pour les algorithmes continus [81].

D'autres approches basées sur des algorithmes génétiques réussissent également à créer un focus mais sont généralement plus lentes et plus exigeantes en termes de calcul [82].

Pour toutes ces raisons, nous avons décidé d'implémenter un algorithme d'optimisation continu avec une sélection des pixels par la base d'Hadamard, qui nous semblait le meilleur compromis entre simplicité d'implémentation et efficacité.

3.2.2 Montage expérimental

La figure 4 décrit le montage expérimental. Le front d'onde d'un laser continu à $\lambda =$ 532 nm (Coherent Sapphire) est modulé par un modulateur spatial de lumière MEMS (Kilo-DM segmenté, Boston Micromachines). Le SLM est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope (10x, 0,25), qui éclaire un échantillon diffusant (statique ou dynamique) avec une puissance incidente de 14 mW. Un deuxième objectif de microscope (20x, 0,4) permet d'imager la figure de speckle en sortie du milieu sur une caméra CCD (Allied Vision Technologies Manta_G-046B) et sur un mono-détecteur (PMT, Hamamatsu H10721-20). Le PMT est conjugué au même plan que la caméra et recueille l'intensité d'un grain de speckle à travers une fibre optique multimode (Thorlabs M64L02) comme signal de rétroaction pour le processus d'optimisation. Le focus est formé dans ce plan en dehors du milieu diffusant. Nous avons adapté la taille du grain de speckle au diamètre de la fibre en ajustant l'ouverture numérique de détection avec un iris. Un état de polarisation du speckle de sortie est sélectionné avec un polariseur. La caméra CCD est uniquement utilisée pour une surveillance passive du processus.



Figure 4. Montage expérimental. P : polariseur ; A : Iris ; L : lentille ; BS : Séparateur de faisceau ; MEMS-SLM : Modulateur de lumière spatial basé sur la technologie MEMS. Le front d'onde d'un faisceau laser collimaté (532 nm) est modulé par un modulateur spatial de lumière. Le SLM est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope qui focalise la lumière sur un échantillon diffusant. Un deuxième objectif de microscope permet d'imager la figure de speckle à la sortie du milieu diffusant à la fois sur une caméra CCD et sur un PMT. Le PMT mesure l'intensité d'un grain de speckle à travers une fibre optique. Un iris contrôle la taille de l'ouverture numérique pour faire correspondre la taille du grain de speckle avec le diamètre de la fibre optique. Un polariseur sélectionne un état de polarisation de la figure de speckle de sortie. Le signal du PMT est acquis par une carte d'acquisition (NI PXIe-6361) et est envoyé à une carte FPGA (NI PXIe-7962R). Pendant l'algorithme d'optimisation, la carte FPGA calcule la phase optimale pour un mode d'Hadamard donné, l'ajoute au masque de phase actuel du SLM et applique le nouveau masque sur le SLM.

3.2.3 Algorithme utilisé

L'algorithme continu utilisé fonctionne comme suit. A chaque itération, un mode d'Hadamard composé de la moitié des pixels SLM est sélectionné. Un déphasage continu de 0

à 2π est imposé à ces pixels, en plus du masque de phase précédent appliquée sur le SLM. L'autre moitié des pixels reste fixe, et sert en pratique de référence. Le signal mesuré au PMT est acquis lorsque la phase appliqué par le SLM est de 0, $2\pi/3$ et $4\pi/3$. Le déphasage continu permet ici de supprimer les temps de stabilisation des pixels de SLM aux positions où les intensités sont mesurées. Un algorithme d'interférométrie à décalage de phase calcule ensuite la phase optimale, qui maximise l'intensité mesurée sur le PMT. Un nouveau masque de phase est finalement généré en ajoutant au front d'onde précédent le mode d'Hadamard avec cette phase optimale. Ce masque est appliqué sur le SLM avant de commencer l'itération suivante. Lorsque la base d'Hadamard complète a été optimisée, l'algorithme redémarre avec le premier mode de cette base. Le processus est finalement arrêté lorsqu'un gain d'intensité stable a été atteint.

3.2.4 Implémentation FPGA

Une carte FPGA (NI PXIe-7962R) contrôle toute l'optimisation. Les mesures d'intensités au PMT sont collectées par une carte DAQ (NI PXIe-6361) avant d'être transférées sur la carte FPGA. L'algorithme d'optimisation est implémenté sur la carte FPGA, qui écrit directement sur le SLM le masque de phase souhaité. Un deuxième DAQ indépendant acquiert l'intensité mesurée au PMT pour surveiller le processus sans le ralentir. Un schéma du flux de travail est montré sur la figure 5 pour l'optimisation d'un mode. Au début d'une itération, un masque de phase est transféré sur le SLM en 13 µs. Le front d'onde est déphasé continument de 0 à 2π en 100 µs et le FPGA envoie 3 déclencheurs, de sorte que la carte d'acquisition acquiert les trois valeurs d'intensité correspondant aux phases 0, $2\pi/3$ et $4\pi/3$. Après la fin de la troisième mesure (c'est-à-dire après 68 µs), les données sont transférées de la carte DAQ à la carte FPGA en 49 µs. Après un temps de calcul négligeable pour l'algorithme d'interférométrie à décalage de phase, le masque de phase optimal est envoyé au SLM en 13 µs et nécessite 100 µs supplémentaires pour être appliqué efficacement. Cette dernière étape garantit que le SLM sera dans son régime de fonctionnement linéaire (déphasage continu entre 0 et 2π possible) pour la prochaine itération. Les phases appliquées pour corriger le front d'onde étant réparties de manière aléatoire entre 0 et 2π , un déphasage proche de 2π est généralement appliqué au moins sur quelques pixels. En parallèle, le vecteur d'Hadamard pour la prochaine itération est calculé. La fréquence de coupure de l'électronique du PMT est réglée à 33 kHz pour moyenner autant de bruit que possible sans atténuer la modulation de phase.



Figure 5. Déroulement d'une itération d'optimisation du front d'onde à l'aide d'une électronique FPGA. Au début d'une nouvelle itération, un masque de phase est envoyé au SLM. Une différence de phase continue entre 0 et 2π est d'abord imposée à tous les pixels d'un mode d'Hadamard (constitué de la moitié des pixels totaux du SLM). A la volée, 3 mesures d'intensité sont prises correspondants à des déphasages de 0, $2\pi / 3$ et $4\pi / 3$. Les 3 mesures sont transférées sur la carte FPGA, qui calcule la valeur de phase optimale pour ce mode d'Hadamard et l'ajoute au masque de phase précédent. Le nouveau masque optimal est ensuite affiché sur le SLM en 100 µs. En parallèle, le mode d'Hadamard pour la prochaine itération est calculé.

Pour conclure, l'optimisation d'un mode prend $T_{mode} = 243 \ \mu s$ (c'est-à-dire un "taux d'optimisation d'un mode" de 4,1 kHz). Cela correspond de manière équivalente à afficher trois masques de phases et un masque optimal à une fréquence de rafraîchissement de 16 kHz.

3.3 Optimisation rapide à travers un milieu diffusant statique

3.3.1 Validation de l'implémentation

Pour valider l'algorithme d'optimisation et son déroulement, nous avons d'abord utilisé ce système pour focaliser un faisceau laser à travers un échantillon diffusant statique (verre dépoli, Thorlabs DG10-120 A) collé au premier objectif de microscope, voir Fig. 6.a.

Le gain en intensité défini comme le rapport entre l'intensité au foyer après optimisation et l'intensité moyenne de la figure du speckle, caractérise l'efficacité de l'optimisation : $\eta = I_{focus} / I_{speckle}$. Dans un échantillon statique, le gain maximal est proportionnel au nombre de pixels du SLM. Après quelques centaines de millisecondes d'optimisation, un plateau est atteint, ce qui signifie que tous les modes sont entièrement

optimisés. Lorsque le plateau est atteint, l'intensité au foyer varie considérablement en raison du processus d'optimisation, qui génère une modulation de près de 100%. Alors qu'une seule optimisation permet déjà d'atteindre un gain de 120, il faut 3 à 5 itérations sur la base de Hadamard pour atteindre son maximum, de l'ordre de 210, valeur typique pour une optimisation réalisée avec 1020 pixels. La présence de bruit et la calibration surement imparfaite du SLM nous empêchent d'obtenir le gain prévu par la théorie ($\pi/4.1020=800$).

Sur la figure 6b, les principales étapes de l'optimisation peuvent être identifiées : l'étape d'apprentissage (ligne bleue), l'application de la phase optimale (ligne verte) et les temps de transfert principaux (ligne rouge). Les temps mesurés concordent parfaitement avec l'algorithme implémenté sur la carte FPGA.



Figure 6. Optimisation à travers un échantillon diffusant statique (verre dépoli). (a) Optimisation de 5000 modes. Ligne pointillée rouge : début de l'optimisation. Ligne pointillée verte : fin de l'optimisation. Les deux encarts montrent les images CCD avant et après optimisation. Pour cet échantillon, un gain de 210 est obtenu. (b) Zoom sur l'optimisation d'un mode. Les lignes rouges correspondent au transfert depuis ou vers le FPGA. La ligne bleue correspond à l'étape d'apprentissage et les étoiles rouges aux 3 mesures d'intensité. Une optimisation de mode se termine par l'affichage de la phase optimale sur le SLM (ligne verte), qui consiste en général à appliquer une différence de phase proche de 2π . L'optimisation d'un mode prend T_{mode} = 243 µs.

3.3.2 Comment aller plus vite

Actuellement pour l'optimisation d'un mode de SLM, la moitié des pixels reste fixe et l'autre moitié est déphasée jusqu'à 2π . Une solution pour accélérer le système serait de déphaser une première moitié de π et la deuxième de $-\pi$. Potentiellement un taux de rafraîchissement du masque de phase affiché deux fois supérieur pourrait être atteint.

Une autre solution pour accélérer le système pourrait être la mise en place d'un système dit « overdrive ». La transition vers le masque de phase souhaité peut être accélérée en appliquant un masque intermédiaire bien choisi. Thalhammer et al [114] ont ainsi multiplié par 10 la vitesse de rafraichissement d'un SLM à cristaux liquides avec cette technique.

Ces deux solutions ne sont pour l'instant pas implémentables sur le système d'optimisation. En effet, il existe un temps mort de l'ordre de 30 µs pendant lequel le système d'acquisition ne peut pas recevoir de déclencheur après une mesure. Ce temps est suffisamment court pour l'optimisation actuelle mais il sera limitant pour une implémentation plus rapide.

3.4 Optimisation rapide à travers un milieu diffusant dynamique

3.4.1 Diffusion dynamique de la lumière

La focalisation à travers un milieu diffusant dynamique nécessite maintenant de générer le focus avant que le milieu n'ait changé. Les diffuseurs présents au sein du milieu se déplacent dans le temps. Les retards de phase accumulés par une onde optique en se propageant dans le milieu change au cours du temps. La figure de speckle mesurée en sortie dépend donc aussi du temps. Ce phénomène est illustré sur la figure 7.



Figure 7. Diffusion dynamique de la lumière. A. Les diffuseurs présents dans le milieu diffusant se déplacent au cours du temps. B. Le speckle imagé en sortie évolue au cours du temps.

La stabilité du milieu est caractérisée par le temps de décorrélation τ caractéristique du speckle, c'est-à-dire le temps moyen pendant lequel le speckle peut être considéré comme statique. Il est possible de caractériser les fluctuations de la figure de speckle avec la fonction de corrélation temporelle en intensité du speckle g₂ définie comme :

$$g_2(t) = \frac{\langle I(0)I(t) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2}$$
(3.5)

Il a été montré que [115] que le temps de décorrélation τ est alors l'inverse de la pente à l'origine de la fonction g₂. Pour focaliser à travers un milieu diffusant dynamique, il est donc nécessaire d'optimiser suffisamment de modes pour obtenir une amélioration significative de l'intensité pendant ce temps caractéristique.

En régime de diffusion multiple, il est possible de directement mesurer g_2 avec une caméra [116]. La figure d'intensité du speckle est mesurée au cours du temps. La corrélation au cours du temps des images successives est alors la fonction g_2 .

3.4.2 Echantillons diffusants dynamiques

Pour tester notre système sur des échantillons dynamiques bien contrôlés, nous avons conçu des solutions diffusantes colloïdales de particules de TiO_2 dans du glycérol avec une stabilité temporelle ajustable. Le réglage de la température modifie la viscosité du glycérol et donc les propriétés dynamiques de nos échantillons dues au mouvement brownien. Ce mouvement brownien se traduit par une décroissance quasi exponentielle de l'autocorrélation d'intensité de speckle g_2 [116], dont le temps de décroissance est égal à la durée moyenne de décorrélation du speckle.

Nous avons utilisé une solution de particules de TiO₂ (Sigma Aldrich 224227) dans du glycérol avec une concentration massique de 20 g/l et une épaisseur de 500 μ m. Cette solution présente des longueurs caractéristiques (l_s = 70 μ m et l* = 200 μ m) similaires à celles des tissus biologiques [47]. Le réglage de la température entre 10 ° C et 24 ° C modifie le temps de décorrélation de cet échantillon de 350 ms à 30 ms. Ces temps concordent avec la plage de temps de décorrélation des échantillons biologiques [96], voir figure 8.



Figure 8.A. Photo d'une solution colloïdale utilisée. B. Mesures de la fonction g₂ pour un même échantillon à différentes températures.

3.4.3 Optimisation à travers un milieu dynamique

Sur la figure 9a, un ajustement exponentiel de la fonction d'autocorrélation indique un temps de décorrélation de 250 ms pour cette solution à 15 ° C. La figure 9b montre un exemple d'optimisation à travers cet échantillon. Après quelques temps de décorrélation, l'optimisation atteint un plateau lorsque la décorrélation et l'optimisation s'équilibrent. Le gain obtenu (~ 80) est réduit par rapport à celui obtenu avec un échantillon statique. Même en ne considérant que les points où la phase optimale de chaque mode est appliquée, certaines fluctuations temporelles du focus optimisé sont toujours observées en raison d'erreurs de mesure de phase et de l'évolution temporelle du speckle, ce qui rajoute un « bruit » de décorrélation au bruit de mesure conventionnel. Lorsque l'optimisation se termine, en raison de la dynamique du milieu, l'intensité du focus diminue avec une échelle de temps comparable à la durée de décorrélation du milieu. Une étude plus poussée de la persistance du focus après l'optimisation sera conduite au chapitre 4.


Figure 9. Optimisation à travers un échantillon dynamique. (a) Autocorrélation de la figure de speckle mesurée avec la caméra CCD. En ajustant la fonction d'autocorrélation avec une exponentielle, le temps de décorrélation caractéristique du speckle est mesuré à la sortie de l'échantillon. Pour cette solution τ= 250 ms. (b) Focalisation à travers un milieu diffusant dynamique. Avant le début de l'optimisation (ligne pointillée rouge), le speckle fluctue dans le temps en raison du mouvement brownien des particules de TiO₂ dans le glycérol. Lorsque l'optimisation commence, l'intensité augmente rapidement jusqu'à atteindre un plateau. Un gain de 80 est obtenu. La fin de l'optimisation est marquée par la ligne verte. L'évolution du focus dans le temps sur le CCD est affichée après la fin de l'optimisation.

3.4.4 Gain d'optimisation par focalisation à travers un milieu dynamique

Pour les échantillons à décorrélation rapide, le nombre effectif de modes contribuant à la focalisation est proportionnel au temps de décorrélation τ divisé par le temps passé à optimiser un mode T_{mode} . Le gain, proportionnel au nombre de modes, doit donc être proportionnel au rapport τ/T_{mode} . Par conséquent, on s'attend à ce que le gain augmente linéairement avec τ pour les petits temps de décorrélation et finira par saturer pour des échantillons plus stables à une valeur similaire à celle obtenue avec des milieux statiques. Enfin, les temps requis pour obtenir des gains stables devraient également être de l'ordre de τ , le temps d'atteindre l'état d'équilibre entre l'optimisation du focus et la décorrélation du speckle.

Sur la figure 10.a, nous avons mesuré l'intensité du focus pendant l'optimisation pour 3 échantillons avec des temps de décorrélation caractéristiques différents variant de 30 ms à 340 ms. Les résultats obtenus ont été moyennés sur 25 réalisations. Dans les trois cas, le gain atteint un plateau. Ce plateau est obtenu dans un temps caractéristique de l'ordre de leur temps de décorrélation. De plus, les gains obtenus diminuent comme attendu avec la stabilité de l'échantillon. Sur la figure 10b, une relation presque linéaire entre le gain et le temps de décorrélation est mise en évidence.



Figure 10. Optimisation en fonction du temps de décorrélation. Pour le même échantillon diffusant, en modifiant la température, le temps de décorrélation passe de 46,5 ms à 344 ms.
(a) Évolution dans le temps de l'intensité au focus (moyenne et écart type sur 25 optimisations). Plus la décorrélation du speckle est rapide, plus l'optimisation du focus atteint un plateau rapidement et plus son gain est faible. (b) Gain en intensité maximum obtenu en fonction du temps de décorrélation. Le gain est proportionnel à τ.

Pour des temps de décorrélation longs (340 ms), un gain de 110 est atteint, proche de celui obtenu en régime statique après l'optimisation d'une base. Ceci est cohérent avec le fait que la base d'Hadamard complète a été au moins optimisée une fois pendant le temps de décorrélation.

La saturation du gain à des temps de décorrélation plus élevés n'a pas être mise en évidence en raison de l'impossibilité pratique de préparer des échantillons à des températures plus basses. En revanche, pour l'échantillon ayant la dynamique la plus rapide (30 ms), l'optimisation atteint un gain typique de 10, ce qui reste important et pourrait être suffisant pour obtenir un signal significatif pour la microscopie.

3.5 Conclusion

En résumé, nous avons utilisé avec succès un SLM basé sur une technologie MEMS couplée à une électronique FPGA pour mettre en œuvre une optimisation rapide du front d'onde. Nous avons pu focaliser la lumière un milieu diffusant avec un taux d'optimisation par mode de 4,1 kHz (0,243µs). Le système répond aux exigences en termes de vitesse et de gain pour focaliser à travers des tissus biologiques. Comme preuve de principe, nous avons montré que notre configuration permet de focaliser la lumière diffusée à travers des échantillons à décorrélation rapide, avec des temps de décorrélation aussi faibles que 30 ms.

Le système décrit dans ce chapitre était, à notre connaissance, le système de correction de front d'onde par optimisation le plus rapide avec un algorithme continu décrit dans la littérature. Par rapport aux implémentations continues précédentes, un mode est optimisé 37 fois plus rapidement [117]. Deux configurations plus rapides, bien qu'utilisant des algorithmes par étape, ont été décrites dans la littérature : 0.125 ms / mode [118] et 0.130 ms / mode [101]. Bien que plus lente, notre approche continue, devrait être plus robuste en présence de bruit. Récemment O. Tzang et al [119] ont réalisé un système basé sur une nouvelle technologie SLM : grating light valve pour focaliser avec un algorithme par étape à une vitesse 15x fois supérieure à l'état de l'art : un mode est optimisé en 8.4 μ s !

Les expériences ont été réalisées en transmission à travers un échantillon diffusant avec un signal linéaire comme signal de rétroaction. Cependant, la méthode décrite ici est entièrement compatible avec une géométrie en réflexion pour focaliser à l'intérieur d'un milieu diffusant. En particulier, pour obtenir la même optimisation dans un échantillon, une fluorescence non linéaire peut être utilisée [15]. Notons que des images de fluorescence peuvent être obtenues en balayant le focus grâce à l'effet mémoire après arrêt de l'optimisation [71]. Comme le focus a une durée de vie de l'ordre du temps de décorrélation, une image doit être obtenue dans ce délai [96]. La focalisation en réflexion et l'obtention d'image par effet mémoire seront traitées dans le chapitre 6 avec un système de correction du front d'onde développé dans le chapitre 5.

IV Stabilité du focus après correction du front d'onde

Le système de correction du front décrit au chapitre 3 présente les caractéristiques suffisantes en termes de vitesse et de gain pour focaliser à travers un milieu diffusant dynamique ayant des échelles de temps caractéristiques de l'ordre de quelques millisecondes à la seconde. L'étape naturelle suivante pour former une image de fluorescence est de balayer le focus formé à l'aide de l'effet mémoire [65]. Cependant le focus formé va perdre en intensité au cours du temps en raison de la dynamique du milieu limitant le temps disponible pour former une image de fluorescence. Il est donc essentiel que le focus formé après optimisation ait la stabilité temporelle la plus grande possible. Dans ce chapitre, nous avons souhaité étudier le temps caractéristique de stabilité du focus dans un milieu diffusant dynamique, et en particulier étudier s'il existe des situations expérimentales où la stabilité du focus peut être significativement plus grande que celle de la figure de speckle.

Nous allons donc étudier dans ce chapitre la stabilité du focus obtenu par optimisation itérative du front à travers des milieux diffusants dynamiques. On s'attend, logiquement, à ce que la stabilité du focus soit la même que celle du speckle environnant, c'est ce qui a été vérifié expérimentalement récemment dans des expériences de conjugaison de phase [104,120]. En variant la largeur de la distribution des temps de stabilité des différentes « séquences » de diffusion (c'est à dire de trajet de diffusion d'un photon dans le milieu) présentent dans le milieu, et en étudiant des milieux où la dynamique est hétérogène, nous allons mettre en évidence des situations où le focus présente une stabilité temporelle accrue par rapport au speckle environnant. Finalement, nous allons mettre en évidence expérimentalement un résultat similaire à travers un tissu biologique.

4.1 Diffusion dynamique de la lumière

4.1.1 Diffusion dynamique par une solution colloïdale monodisperse

Le milieu diffusant dynamique le plus simple à décrire est une solution colloïdale diffusante où chaque diffuseur présente une taille et une constante de diffusion brownienne similaires. Pour une solution colloïdale très diluée, la lumière est en moyenne diffusée une seule fois. Le speckle mesuré en sorti est la somme cohérente des champs diffusés une seule fois par différentes particules dans le milieu. La fonction de corrélation temporelle en intensité du speckle g_2 peut être explicitée par l'équation de diffusion dynamique de la lumière (dynamic light scattering : DLS en anglais) pour une solution monodisperse [121] :

$$g_2(t) = \exp(-2.D_b, q^2, t)$$
 (4.1)

Avec D_b le coefficient de diffusion brownien des diffuseurs et $q = 2k_0 \sin(\theta/2)$ avec θ l'angle par rapport à l'axe optique où la mesure est effectuée et k_0 la norme du vecteur d'onde optique.

Pour un milieu diffusant plus épais, la diffusion peut être décrite par une somme de différentes séquences de diffusion (voir figure 1). Un photon peut être diffusé une fois puis sortir du milieu, deux fois puis sortir du milieu, trois fois ... Finalement, la figure de speckle formée en sortie du milieu est la somme cohérente des différentes séquences de diffusion qui ont eu lieu à l'intérieur du milieu [56]. Cette description de la diffusion par des séquences de diffusion est ici fortement simplifiée. Dans cette description, les séquences paraissent indépendantes et non-corrélées ce qui n'est bien sûr pas strictement parlant le cas (voir par exemple [56]. Néanmoins, une étude théorique des phénomènes de diffusion sort du cadre de cette thèse et une vision naïve de la diffusion par des séquences de diffusion simplifiées sera conservée, qui est suffisante en générale pour les milieux dilués tridimensionnels. L'effet mémoire est un exemple de corrélation existante et importante pour des milieux dilués qui n'est pas incluse dans ce modèle.



Figure 1 : Illustration de deux séquences de diffusion possibles. Les cercles noirs représentent des événements de diffusion.

Pour une solution colloïdale diffusante monodisperse, chaque événement de diffusion est affecté par une dynamique identique des diffuseurs. Ainsi la décorrélation temporelle du champ d'une séquence de diffusion de longueur s = p.ls avec p le nombre d'évènements de diffusion subit est, en moyenne, égale à : $\exp(-2.\frac{t}{\tau_0}\frac{s}{l^*})$, avec $\tau_0 = (k_0^2 D_b)^{-1}$ [122]. Nous pouvons dresser un premier constat, qui est que les séquences de diffusion courtes à l'intérieur d'une solution colloïdale monodisperse sont plus stables que les longues.

Finalement la fonction de corrélation temporelle en champ mesure la moyenne des décorrélation des différentes séquences de diffusion. Via la relation de Siegert et en considérant la distribution complète P(s) des longueurs des chemins qu'une onde peut emprunter à l'intérieur d'un milieu, la fonction de corrélation temporelle en intensité peut s'écrire [61] :

$$g_{2}(t) = \left| \int_{0}^{\infty} ds P(s) \exp(-\frac{s}{l*\tau_{0}}) \right|^{2}$$
(4.2)

Nous pouvons remarquer que la distribution P(s) est directement reliée à la distribution P(t) des temps de vol introduite au chapitre 2 avec s = ct/n [123].

Il est possible de mesurer directement la distribution des longueurs de chemins par des mesures interférométriques avec une lumière présentant une courte cohérence temporelle [124] ou avec des pulsations lasers courtes [55]. Malheureusement pour une illumination monochromatique, comme celle utilisée pour les expériences présentées dans ce chapitre, il n'existe pas, à notre connaissance, de mesure directe de P(s). La fonction g_2 donne par contre des indications sur la forme de P(s). En particulier, il a été montré dans [115] que pour une solution mono disperse, la pente à l'origine de g_2 permet de remonter à la longueur moyenne du chemin <s>.

4.1.2 Diffusion dynamique de la lumière par un milieu diffusant quelconque

La plupart des milieux diffusants dynamiques ne sont pas constitués de diffuseurs monodisperses en solution. Ils sont généralement constitués de diffuseurs ou d'inhomogénéités d'indices de tailles hétérogènes présentant des constantes de diffusion brownienne différentes. Chaque événement de diffusion va induire une décorrélation temporelle différente de la figure de speckle. Dans ces milieux, ils n'existent donc pas de lien direct entre la longueur d'une séquence de diffusion et sa stabilité comme établi précédemment. Pour illustrer ce phénomène, nous pouvons prendre l'exemple d'un tissu biologique composé de neurones fixes et de cellules sanguines se déplaçant rapidement dans un vaisseau sanguin. Il peut, par exemple, exister des chemins courts interagissant avec des diffuseurs très dynamiques (vaisseaux sanguins) décorrélant plus rapidement que des chemins longs les évitant (alors que l'on s'attendrait à ce que les chemins longs, contenant plus d'événements de diffusion décorrèlent plus rapidement).

Néanmoins, la description de la diffusion de la lumière comme une somme de séquence de diffusion est toujours possible. Chaque séquence de diffusion présente un temps de stabilité donné. La distribution des temps de stabilité des séquences de diffusion n'est cependant pas mesurable. La mesure de la fonction de corrélation temporelle est alors une mesure de la stabilité moyenne des différentes séquences de diffusion. De plus l'inverse de la pente à l'origine de g_2 est alors le temps de stabilité moyen des différentes séquences de diffusion [115].

4.2 Principe de l'expérience

La décorrélation du speckle dans le temps et la diminution d'intensité du focus après optimisation du front d'onde ont pour origine le même phénomène physique : le déplacement des inhomogénéités d'indices optiques au sein du milieu diffusant. La question posée pour ce chapitre est la suivante : est-ce que, après une optimisation itérative du front d'onde, certaines séquences de diffusion sont privilégiées ? Finalement, est-ce que le focus formé à travers un milieu diffusant présente une stabilité accrue par rapport au speckle environnant ?

En plus d'offrir plus de temps pour balayer le focus après optimisation, une stabilité accrue du focus présenterait d'autres avantages. Un focus plus stable pourrait signifier que plus de modes de SLM participent au focus impliquant alors un gain de focalisation plus important. De plus, à travers une solution colloïdale monodisperse, un focus plus stable serait alors formé de séquences de diffusion plus courtes. Comme montré par M. Kadobianskyi et al [125], des séquences de diffusion plus courtes induisent un effet mémoire plus grand.

Dans la littérature, nous pouvons trouver des expériences similaires en DOPC [104,120] et en optimisation [126] où les focus formés présentent la même stabilité que le speckle vis-à-vis du phénomène de décorrélation. Nous allons décrire, dans les prochains paragraphes, ces expériences afin de mettre en avant la différence qui nous a poussée à envisager qu'un focus plus stable que le speckle pouvait être formé après optimisation itérative du front d'onde.

4.2.1 Cas de la conjugaison de phase optique digitale

Dans les études de M. Jang et al [120] et de Y. Liu et al [104], la stabilité du focus après focalisation à travers un milieu diffusant dynamique a été comparée théoriquement et expérimentalement à la stabilité du speckle. Il a été démontré que la fonction de corrélation temporelle en intensité $g_2(t)$, utilisée pour quantifier la stabilité du speckle, est proportionnelle à l'évolution temporelle de l'intensité $I_{focus}(t)$ après conjugaison de phase :

$$I_{focus}(t) \propto g_2(t) \tag{4.3}$$

Dans l'étude de M. Jang et al [120], la vérification expérimentale de l'équation 4.3 a été réalisée en focalisant un laser par une technique de conjugaison de phase optique digitale à travers un gel d'agar diffusant se solidifiant. Des mesures de $g_2(t)$ et F(t) à différentes étapes de solidification du gel sont présentées sur la figure 2. Ces mesures montrent, que pour une expérience de conjugaison de phase optique digitale, le focus présente la même stabilité que le speckle.

La même expérience a été conduite à travers des tissus biologiques (ici la peau dorsale d'une souris) conduisant au même résultat.

Dans le cas de la conjugaison de phase optique digitale, nous pouvons considérer que la focalisation est quasiment instantanée (limitée par le temps d'intégration de la caméra, donc de quelques dizaines à quelques centaines de microsecondes), au contraire de notre optimisation itérative du front d'onde. De fait, aucune séquence de diffusion particulière n'a pu être avantagée dans cette situation.



Figure 2. Mesures simultanées de la fonction de corrélation temporelle du speckle g₂ et de la décroissance du focus F après focalisation par DOPC à travers un gel d'agar diffusant se solidifiant. (a) En rouge : temps de décroissance caractéristique du speckle. En bleu : temps de décroissance caractéristique du focus pour différents états de solidification du gel. Les fonctions g₂ et F présentent les mêmes temps caractéristiques. (b1-b3) Les fonctions d'autocorrélation du speckle (en bleu) et l'intensité du focus après focalisation (en rouge) à différents temps de durcissement. Pour différentes échelles de temps, les deux courbes montrent un accord étroit dans leur évolution temporelle. Adapté de [120]

4.2.2 Cas de l'optimisation

Une mesure similaire a été réalisée en optimisation par le groupe de A. Mosk [126]. L'expérience est la suivante : un montage standard d'optimisation du front d'onde est utilisé pour focaliser en transmission un laser monochromatique à une fréquence ω_0 à travers un milieu diffusant statique. Après focalisation, la longueur d'onde du laser incidente est modifiée de ω_0 à $\omega_0+\Delta\omega$ induisant une décorrélation du speckle. Dans ce papier, il a alors été démontré expérimentalement et théoriquement que l'intensité du focus $I_{focus}(\omega_0+\Delta\omega)$ est proportionnelle à la fonction de corrélation spectrale en intensité du speckle $<I(\omega_0)I(\omega_0+\Delta\omega)>$, ce qui est équivalent à dire que comme précédemment il n'y a pas de changement de distribution des chemins entre le focus et le reste du speckle.

De manière analogue aux mesures en DOPC, l'expérience de focalisation a été réalisée sur un milieu statique en lumière monochromatique, ce qui explique pourquoi il n'y a pas de sélection sur la longueur des chemins.

4.2.3 Motivation

Nous allons dans ce chapitre étudier expérimentalement la relation entre la fonction de corrélation temporelle du speckle et la persistance du focus après une expérience d'optimisation du front d'onde en milieu dynamique. La différence principale avec les techniques utilisées dans les expériences décrites précédemment est donc le caractère itératif des techniques d'optimisation couplé à une dynamique des diffuseurs : l'optimisation et la décorrélation du speckle se produisant simultanément, nous avons voulu voir si la stabilité relative du focus peut être affectée. Nous verrons en particulier par la suite comment cela peut aider, dans certaines conditions, à former un focus plus stable que le speckle environnant.

Nous avons mené une première série d'expériences à travers une solution colloïdale en régime de diffusion multiple (la même qu'au chapitre précédent). Nous allons retrouver en essence le même résultat que les expériences de DOPC, La fonction $g_2(t)$ et la moyenne de $I_{focus}(t)$ sur de nombreuses réalisations semblent identiques, en tout cas avec les algorithmes utilisés et les constantes de temps en jeu. Cependant nous allons également voir que pour une réalisation donnée de l'expérience de focalisation, la décroissance du focus peut différer significativement de la fonction de corrélation temporelle.

Nous avons mené une deuxième série d'expériences à travers des milieux diffusants présentant des distributions de stabilité larges de différentes natures : dans un premier cas, une partie de la lumière n'est pas diffusée de manière dynamique (solutions colloïdales en régime de diffusion simple, avec une contribution significative de lumière balistique) ; dans un second cas, celui des échantillons biologiques, la distribution de temps de décorrélation semble présenter deux temps caractéristiques dominants (tranches de cerveaux). A travers ces milieux, le focus formé après optimisation est plus stable que la fonction de corrélation du speckle. Ces résultats semblent indiquer que sous certaines conditions l'optimisation itérative tend à utiliser les séquences de diffusion les plus stables pour former le focus.

4.3 Expériences

4.3.1 Montage expérimental

Le montage expérimental est le même que celui décrit au chapitre précédent (paragraphe 3.2.2). A cela près, qu'une illumination oblique [2] dans le proche infrarouge a

été rajoutée (cf figure 3) pour imager les tranches de cerveaux en transmission. L'illumination oblique est équivalente, en transmission, à une illumination plein champ. Les tissus biologiques étant principalement des objets de phase, le contraste obtenu par microscopie plein champ est faible. L'ajout d'un masque d'amplitude asymétrique dans la pupille permet de convertir le déphasage induit par un objet de phase en contraste d'intensité dans le plan objet. Comme au chapitre précédent, l'optimisation d'un mode de notre SLM prend 243 μ s. Une optimisation complète de la base prend alors 250 ms. Finalement, pour assurer la convergence 5 itérations sur la base de Hadamard sont réalisées.



Figure 3. Montage expérimental. Dans l'ensemble, le montage est identique à celui présenté dans le chapitre 3. Une illumination oblique (ici en rouge) a été ajoutée pour mieux imager des tranches de cerveaux.

4.3.2 Protocole expérimental

Pour les expériences réalisées par la suite, le protocole expérimental est identique. Une série de M optimisations successives du front d'onde est réalisée par le système décrit au chapitre précédent, chacune d'elles séparée de plusieurs secondes. En continue, l'intensité mesurée par le PMT est enregistrée par une carte d'acquisition (NI PCIe-6341) pilotée par ordinateur. A la fin de chaque optimisation individuelle, la carte FPGA envoie un déclencheur lui aussi enregistré par la carte d'acquisition. Les déclencheurs permettent alors pendant le traitement de segmenter les M différentes séquences de focalisation pour une analyse statistique.

4.4 Milieux diffusants dynamiques homogènes

Le premier échantillon utilisé est le même que celui utilisé au chapitre 3 à savoir une solution de TiO₂ (Sigma Aldrich 224227) dans du glycérol avec une concentration massique de 20 g/l ($l_s = 70 \mu m$ et $l^* = 200 \mu m$) et une épaisseur de 500 μm . Nous sommes donc en régime de diffusion multiple. Les résultats sont présentés sur la figure 4. Dans un premier temps (figure 4.b), la température a été ajustée autour de 16°C pour obtenir un temps de decorrélation moyen du speckle de $\tau_{speckle} = 268$ ms. Pour cet échantillon dynamique, une decorrélation moyenne du focus de $\tau_{focus} = 273$ ms avec un écart type de 82 ms a été mesurée. Sur la figure 4.b, les expériences ont été triées par temps de décorrélation et ont été moyennées par quintile (i.e les 100 réalisations les moins stables ont été moyennées, la deuxième centaine de réalisations les moins stables aussi,...) pour mettre en avant cette dispersion.



Figure 4. Stabilité du focus après focalisation à travers une solution colloïdale homogène. **A.** Pour un milieu de diffusion dynamique homogène, la distribution de la stabilité temporelle est

liée à la distribution de la longueur du trajet. Les chemins longs rencontrent plus d'événements de dispersion, ils sont moins stables. **B.** Les décroissances du focus sont triées par temps de decorrélation puis moyennées par quintile. Pour une réalisation individuelle, la stabilité du focus peut différer de celle du speckle. **C.** Rapport entre le temps caractéristique du focus sur le temps caractéristique du speckle pour différentes stabilités de speckle. Néanmoins, en moyenne, en régime de diffusion multiple, le focus et le speckle présentent la même stabilité.

Nous avons ensuite mesuré la valeur moyenne de decorrélation du focus et son écart type pour différentes stabilités de milieu variant de 100ms à 300ms (obtenues en changeant la température de l'échantillon). Sur la figure 4.c, le rapport $\tau_{focus}/\tau_{speckle}$ est présenté. Ce rapport est constant et unitaire sur l'ensemble des stabilités essayées. Finalement, une réalisation individuelle de la focalisation peut présenter un temps caractéristique différent de celui du speckle mais en moyenne ils sont identiques.

Dans un deuxième temps, nous avons essayé de trouver un critère expérimental pour distinguer ou favoriser les focus les plus stables. En plus d'offrir plus de temps pour imager, obtenir un focus plus stable à travers une solution diffusante dynamique homogène permettrait d'augmenter l'effet mémoire. En effet, dans ces milieux, un focus plus stable est obtenu en utilisant des chemins plus courts. Comme montré par Scott et al, cela revient à augmenter l'effet mémoire [59].

Notre premier essai fut de jouer sur la longueur d'optimisation (ie le nombre de modes optimisés). Pour des optimisations longues, les séquences les moins stables optimisées aux premières itérations devraient avoir decorrélé à la fin de l'optimisation. Finalement une optimisation de plus en plus longue permettrait d'accumuler de plus en plus de séquences stables au focus. Malheureusement cette idée n'a pas fonctionné expérimentalement. Probablement, la différence de stabilité entre séquences de diffusion courtes et longues n'est pas suffisante pour faire apparaître cet effet.

Notre deuxième tentative fut basée sur la relation linéaire entre gain et stabilité du milieu démontrée au chapitre 3 (paragraphe 3.4.4). Si un focus est plus stable, plus de modes de SLM ont pu y être corrigés. Finalement la relation linéaire à prendre en compte serait entre le gain et la stabilité du focus, et non celle du speckle. Les résultats, présentés sur la figure 5, ne mettent malheureusement pas en évidence une telle relation linéaire. D'autres facteurs doivent impacter le gain obtenu après optimisation.



Figure 5. Effet de la stabilité du focus sur le gain. Aucun lien direct entre gain et stabilité du focus n'a pu être démontré.

Pour l'instant, nous n'avons pas pu mettre en avant une sélection préférentielle des séquences stables par optimisation du front d'onde à travers les solutions colloïdales diffusantes en régime de diffusion multiple. Nous allons voir par la suite que cet effet peut apparaître à travers des milieux présentant des dynamiques plus complexes.

4.5 Milieux diffusants dynamiques inhomogènes

Dans ce paragraphe, nous allons mettre en avant expérimentalement des milieux où les séquences de diffusion les plus stables sont favorisées pendant une optimisation itérative du front d'onde. L'élément clé est la largeur de la distribution des temps de stabilité (qui n'est toujours pas mesurable). Des milieux présentant une partie des photons diffusés dynamiquement et l'autre partie diffusés par des diffuseurs statiques ou quasi statique vont privilégier ces derniers au focus.

4.5.1 Sous quelles conditions peut-on observer un focus plus stable que le speckle ?

Nous avons identifié deux potentielles raisons qui pousseraient à envisager que des séquences plus stables puissent être favorisées pendant l'optimisation itérative du front d'onde.

Les calculs faits dans [104,120,126] supposaient que le masque de correction était mesuré à un temps unique t_0 . Cette approximation est néanmoins fausse en optimisation. A chaque itération de l'optimisation les champs générés par plusieurs séquences de diffusion (avec des temps de stabilité différents) sont remis en phase pour focaliser. Certaines séquences de diffusion peuvent être instables (avec un temps de stabilité associé d'une dizaine de millisecondes par exemple) et d'autres sont beaucoup plus stables (avec un temps de stabilité associé de l'ordre de la seconde par exemple). Le temps de décorrélation du speckle mesuré avec la fonction g_2 est la moyenne de la distribution totale des temps de stabilité. Les séquences instables remises en phase aux premières itérations de l'optimisation (qui dure 1.25s) ont quasiment totalement décorrélé à la fin de l'optimisation, elles ne participeront donc plus au focus. A l'inverse les séquences de diffusion les plus stables sont encore présentes au focus soit principalement formé de séquence de diffusion décorrélant lentement. Le focus sera donc plus stable que le speckle. Cet effet devrait être important si la distribution des temps de stabilité des séquences de diffusion est large.

Deuxièmement, l'erreur faite pendant la mesure d'une phase optimale pour un mode donné par une mesure par décalage de phase va dépendre de la dynamique du milieu [127]. Les séquences de diffusion présentant des temps de stabilité de l'ordre ou inférieur au temps mis pour optimiser un mode (= $243 \mu s$) ne pourront jamais être optimisées.

Les deux effets introduits ne vont réellement influencer la decorrélation du focus que si le milieu diffusant présente une distribution des temps de stabilité large. En particulier plus large que celle correspondant juste à la diffusion par des particules browniennes homogènes : on a vu au paragraphe précédent que cette distribution ne donnait pas d'effet particulier sur le focus. Nous avons donc synthétisé et simulé des milieux présentant des distributions de temps de stabilité très dispersées.

4.5.2 Décorrélation sub-milliseconde d'une partie du speckle

Le premier milieu simulé et synthétisé comporte une partie des séquences de diffusion décorrélant très rapidement (diffusion par une solution aqueuse diffusante décorrélant en moins d'une milliseconde) et l'autre partie des séquences parfaitement stables (diffusion par des diffuseurs statiques).

4.5.2.1 Simulations

Afin de mettre en évidence ces effets, commençons par un modèle numérique très simple où une partie de la lumière se propage à travers un milieu diffusant statique, puis à travers une solution colloïdale diffusante très dynamique (décorrélation plus rapide que le temps T_{mode} mis pour optimiser un mode) en régime de diffusion faible. Les épaisseurs totales des milieux diffusants statique et dynamique sont fixées à 1mm chacune. Le libre parcours moyen de diffusion du milieu dynamique est contrôlé.

Si la partie dynamique est peu diffusante, une partie de la lumière ne va pas être diffusée de manière dynamique. La fonction de corrélation temporelle en intensité du speckle devrait présenter une première décorrélation rapide (due au milieu dynamique) puis un plateau correspondant à la partie uniquement diffusée par le milieu statique, voir figure 6.a. Sur cette figure, le libre parcours moyen de diffusion a été progressivement augmenté (bleu = pas de solution dynamique, vert : $l_s = 1$ mm, ie 60% de la lumière a été diffusé au moins une fois par un diffuseur en mouvement).

Pendant une expérience de correction de front d'onde, dans le cas extrême où la décorrélation de la partie dynamique est très rapide, alors la lumière diffusée dynamiquement sera vue comme un bruit supplémentaire de mesure (en plus du bruit de grenaille et du bruit propre du détecteur). Le système de correction de front d'onde ne sera capable de refocaliser les photons diffusés dynamiquement. Finalement, le focus obtenu devrait être peu intense, mais parfaitement stable. La figure 6.b présente les processus d'optimisation moyennés sur 100 réalisations avec N = 64 pixels de SLM utilisés pour les fonctions g₂ présentées à la figure 6.a. La ligne pointillée noire correspond à l'arrêt de l'optimisation. Après arrêt de l'optimisation, les focus sont parfaitement stables. Cependant le gain diminue au fur et à mesure que le libre parcours moyen de diffusion de la solution dynamique diminue.

Le gain obtenu après une optimisation en présence de bruit peut être calculé analytiquement sous l'approximation que le bruit est faible [128] :

$$\eta = \frac{\pi}{4} N \cos^2 \frac{\sigma}{s} \tag{4.4}$$

Avec N le nombre de pixels de SLM, σ l'écart type du bruit et S le signal moyen. Ici, le rapport σ /S quantifie la fraction de photons diffusés dynamiquement. L'évolution du gain obtenu est représentée en bleu sur la figure 6.c en fonction du rapport σ /S. La courbe rouge est la prédiction théorique selon l'équation 4.4. Pour de grande valeur de bruit, l'approximation de bruit faible n'est plus valide, la prédiction théorique n'est donc plus valable.





A. Fonction de corrélation en intensité g₂(t) pour différents libres parcours moyens de diffusion de la solution colloïdale. La décorrélation moyenne du speckle est supérieure au temps T_{mode} = 4 u.a nécessaire pour une itération de l'optimisation. La position relative du plateau montre l'augmentation du nombre de photons diffusés dynamiquement par le milieu.
 B. Evolution du gain au cours du temps pour les différents milieux simulés moyenné sur 100 réalisations. La ligne noire en pointillé indique l'arrêt de l'optimisation. Malgré le temps de décorrélation moyen rapide du milieu, une optimisation du front d'onde est possible. Le focus

formé après optimisation est parfaitement stable. **C.** Evolution du gain pour les différentes mesures en fonction du bruit ajouté par la diffusion dynamique de la lumière. Si plus de la moitié des photons ont été diffusés dynamiquement, l'optimisation échoue.

Finalement, il est toujours possible de focaliser à travers un milieu fortement dynamique fin. Mais le gain obtenu chute rapidement en raison du bruit additionnel engendré par la diffusion dynamique de la lumière et de la faible fraction de lumière non-diffusée. A partir du moment où environ 60% des photons ont été diffusés de manière dynamique, l'optimisation échoue. Cela correspond à un ratio l_s/L de 1.1.

4.5.2.2 Expériences

Nous avons synthétisé un tel milieu à l'aide d'une solution de bille de polystyrène (Polybead® Carboxylate Microspheres 0.35µm) dans de l'eau positionnée au-dessus d'un milieu diffusant statique épais. L'épaisseur de la solution diffusante dynamique est de 1mm, voir figure 7.a pour un schéma du milieu utilisé.

Le pourcentage de photons balistiques à travers la solution diffusante dynamique est contrôlé en ajustant la concentration de polystyrène. La théorie de Mie (diffraction par un diffuseur sphérique d'indice optique connu) nous permet de calculer la concentration adaptée pour obtenir un libre parcours moyen de diffusion donné dans la partie dynamique. Ce pourcentage s'étale de 67% ($l_s = 2.5$ mm) à 100% (pas de solution diffusante).

L'ajout du diffuseur statique nous assure d'être en régime de diffusion multiple nous permettant alors de mesure g_2 à la caméra et de réaliser une optimisation. Pour chaque solution, la mesure de la fonction g_2 confirme que les photons diffusés dynamiquement decorrèlent en moins d'une milliseconde, voir figure 7.b (lignes en pointillées).

Pour chaque milieu, la décorrélation du focus moyennée sur 100 réalisations est tracée sur la figure 7.b (trait plein). Pour chaque expérience, le système de correction du front d'onde a été capable de former un focus. Les focus formés sont largement plus stables que la décorrélation moyenne du speckle (<1ms). Effectivement notre système n'est pas suffisamment rapide pour refocaliser les photons diffusés dynamiquement. Finalement à travers ces milieux, la distribution de mode utilisée pour former un focus est très différente de celle du speckle.

Ici, la fraction du champ optique diffusée dynamiquement est vue comme un bruit de mesure supplémentaire. Par conséquent, le gain de focalisation obtenu chute quand la solution diffusante devient de plus en plus diffusante, voir figure 7.c. Dès que plus de 30% de la lumière ont été diffusés de manière dynamique, le gain devient très faible (<5). Cela correspond à un rapport ls/L de 2.8. En raison de bruits de mesure supplémentaires, cette limite est deux fois plus élevée que celle obtenue en simulation.



Figure 7. Focalisation à travers un milieu diffusant très dynamique fin. A. Schéma du milieu diffusant considéré. Un faisceau laser est focalisé sur un milieu diffusant statique. Une solution diffusante dynamique est placée derrière cette couche statique. La solution étant fine, une partie des photons la traverse sans être diffusée. B. Mesures de g₂ et de F (moyenné sur 100 réalisations) pour différents libres parcours moyens de diffusion. Le speckle en traversant ce milieu décorrèle en moyenne en moins d'une milliseconde. Cependant le focus formé par

correction du front d'onde est beaucoup plus stable. **C.** Evolution du gain obtenu après optimisation en fonction du pourcentage de photons diffusés la solution colloïdale. Le champ optique diffusé dynamiquement est un bruit de mesure supplémentaire. Quand la quantité de

photons se propageant balistiquement dans le milieu dynamique diminue, le gain de focalisation chute. **D.** Image à la caméra des focus obtenus pour les différents échantillons utilisés (même code couleur que pour la figure B).

4.5.3 Décorrélation sub-seconde d'une partie du speckle

Pour continuer notre étude, nous nous sommes intéressés à un milieu similaire au précédent (paragraphe 4.5.2.2) mais où les séquences de diffusion dynamiques présentent de plus grandes stabilités (~100ms). Le système de correction du front est assez rapide pour corriger toutes les séquences. Néanmoins le milieu présente une distribution des temps de stabilité très large (diffusion statique + diffusion dynamique). Nous avons regardé si le focus formé à travers ce milieu présente une stabilité accrue par rapport au speckle.

L'échantillon utilisé est une solution de billes de polystyrène (Polybead® Microspheres 1.00µm) dans de l'eau. Le coefficient de diffusion d'une particule sphérique est inversement proportionnel à son rayon. L'utilisation de billes plus grandes qu'au paragraphe 4.5.2.2 permet alors de diminuer la vitesse de déplacement des diffuseurs et donc d'augmenter la stabilité du speckle diffusé par cette solution.

Les longueurs caractéristiques de diffusion peuvent être calculées par la théorie de Mie (diffraction par une sphère) en fonction de la taille des billes et de leur concentration. Pour les billes de 1µm à une longueur d'onde de 532 nm, nous avons g = 0.92. En jouant sur la concentration, l_s peut être ajusté de 0.2 mm à 0.85 mm. 1 mm de cette solution est déposé audessus d'un milieu diffusant statique (plastique blanc), voir figure 7.a. De même que précédemment, l'ajout du diffuseur statique nous assure d'être en régime de diffusion multiple nous permettant alors de mesurer g_2 à la caméra.

La présence d'un plateau lors des mesures de g_2 (lignes en pointillées de la figure 8.b) confirme l'existence de photons diffusés statiquement par l'échantillon. De plus, la mesure des pentes à l'origine de la fonction g_2 nous renseigne sur le temps de décorrélation moyen du speckle pour ces échantillons. Ils s'étalent ici de 100ms à 1s. Notre système de correction du front d'onde est suffisamment rapide pour corriger ces décorrélations.

A priori, dans cette situation, la décroissance du focus et la décorrélation du speckle devraient être similaires car notre système est suffisamment rapide pour corriger toutes les séquences de diffusion quel que soit leur stabilité. Néanmoins, les focus obtenus après focalisation sont plus stables que les speckles associés (voir figure 8.c). Leur temps moyen de decorrélation (pente à l'origine) est supérieur à ceux du speckle. De plus la position de leur

plateau est supérieure à celle du speckle. Le gain de focalisation est, en moyenne, de 15 pour $l_s = 0.21$ mm ; et est de 125 pour $l_s = 0.86$.



Figure 8. Focalisation à travers un milieu diffusant dynamique. Le milieu est similaire à celui présenté au paragraphe 4.5.2.2. Ici les billes de polystyrène sont plus grosses (1 μ m), elles diffusent donc plus lentement dans la solution. **A.** Mesures de g₂ (courbes en pointillés) et de F moyenné sur 100 réalisations (courbes pleines) pour différents libres parcours moyens de diffusion. Le speckle en traversant ce milieu décorrèle en moyenne en plusieurs centaines de millisecondes (1.1 s pour la courbe bleue foncée et 100 ms pour la bleue claire). Notre système de façonnage de front d'onde est capable de compenser l'intégralité de la diffusion. Cependant le focus formé est plus stable que le speckle. **B.** Rapport τ_{focus} sur τ_{speckle} pour différents l_s. Pour des milieux présentant de grande disparité de stabilité (photons diffusés statiquement + photons diffusés de nombreuses fois dynamiquement ; ie l_s petit), le focus est beaucoup plus stable que le speckle. Pour des milieux très stables (l_s grand), le focus reste légèrement plus stable que le speckle.

Nous nous attendons que pour une solution suffisamment diffusante pour être en régime de diffusion multiple (régime des expériences du paragraphe 4.3), les stabilités du focus et du speckle redeviennent identiques. Pour ces milieux, cet effet n'a pas pu être observé, la dynamique du speckle à travers cette solution aqueuse est trop grande en régime de diffusion multiple.

Finalement, ces expériences nous confirment que la présence d'une distribution de stabilité large des séquences de diffusion permet, après optimisation itérative du front d'onde, d'obtenir un focus plus large que le speckle. Cependant, n'ayant pas accès à cette distribution, nous n'avons pas pu mettre en avant les paramètres exacts (largeur de distribution, vitesse d'optimisation) qui permettent l'apparition de cet effet. Des simulations numériques pourront, par la suite, être nécessaires pour caractériser finement cet effet.

4.5.4 Tranches aigues de cerveaux de souris

Pour finir, nous avons cherché à savoir si des tissus biologiques présentent des distributions de stabilité assez large pour obtenir un focus plus stable que le speckle après optimisation. Dans l'optique de faire de la microscopie non linéaire après correction du front d'onde, une stabilité accrue du focus offrirait un temps supplémentaire pour la formation d'une image de fluorescence.

Le dernier échantillon utilisé est donc une tranche aigue de cerveau de souris de 300 μ m d'épaisseur. Pour maintenir les tranches en vie, un flux d'une solution de 125 mM de NaCl, de 2.5 mM de KCl, de 2 mM de CaCl₂, de 1 mM de MgCl₂, de 1.25 mM NaH₂PO₄, de 26 mM NaHCO₃ et de 25 mM de glucose, bullée par 95% O₂ et 5% CO₂ est imposé autour de la tranche [129]. Tous les efforts ont été faits pour maintenir les tranches de cerveaux en vie pendant la durée de l'expérience. Malgré tout, on ne peut exclure que la stabilité mesurée pour cette expérience puisse différer de celle que nous pourrions mesurer au sein d'un laboratoire utilisant de manière journalière des tranches aigues de cerveaux, et en particulier pouvant réaliser des tranches de cerveau à côté du montage expérimental, donc sans avoir besoin d'un temps de transport entre les deux (~10 min pour nous)....

Les mesures effectuées ici ont été réalisées ici à travers une tranche de tronc cérébral de 300 μ m (l_s~40 μ m [47]). La figure 9.a présente, en rouge, la fonction de corrélation temporelle du speckle. Elle présente ici une décorrélation moyenne rapide (pente à l'origine) de 205ms et au temps long, elle présente une décorrélation d'une dizaine de seconde. Nous n'avons pas cherché ici à connaître l'origine microscopique de ces différents temps de décorrélation, mais simplement à la comparer à la stabilité du focus. Comme dans l'expérience précédente, nous avons observé que le focus formé est en moyenne (sur 500 réalisations) plus stable que le speckle et présente un gain moyen de 33±10. Les figures 9.b et 9.c présentent respectivement le focus le moins stable et celui le plus stable. Ces deux optimisations ont menées à un gain pratiquement identique de 30. Pour cette expérience le gain obtenu ne semble donc pas être un indicateur de la stabilité de la focalisation.

Nous avons donc un second exemple de milieu dans lequel le système de correction du front d'onde forme un focus plus stable que le speckle. Contrairement au cas précédent où cet effet était lié à l'existence d'une sous partie du système qui était statique et diffusante, l'élément clé permettant d'obtenir un focus de stabilité augmenté semble être dans ce second

cas la largeur de la distribution des temps de stabilité, comme nous l'avons présenté au paragraphe 4.5.1.



Figure 9. Focalisation à travers une tranche aigue de cerveau de souris. A. Mesures de g_2 (courbes en rouge) et de F moyenné sur 100 réalisations (courbes bleu). Contrairement aux expériences précédentes, l'intégralité de la lumière incidente est diffusée dynamiquement. La diffusion semble présenter au moins deux temps caractéristiques, une décorrélation de 200 ms aux temps courts puis une d'une dizaine de seconde aux temps longs. En moyenne, le focus est plus stable que le speckle. B. Le focus le moins stable (η =33) présente la même décorrélation que le speckle. C. Au contraire que le focus le plus stable (η =31) présente une stabilité de l'ordre de la dizaine de seconde.

4.5 Conclusions et perspectives

A l'aide de simulations et d'expériences, nous avons étudié dans ce chapitre la stabilité d'un focus formé par un système d'optimisation itérative du front d'onde. La compréhension de cette stabilité est importante dans la perspective de faire de la microscopie de fluorescence avec des photons diffusés refocalisés par un système de contrôle du front d'onde. Elle nous renseigne sur le temps disponible pour former une image de fluorescence par balayage du focus.

Dans un premier temps, nous avons observé expérimentalement qu'en régime de diffusion multiple pour un milieu diffusant dynamique homogène, le focus présente en moyenne la même stabilité que le speckle comme cela est prédit dans la littérature [120].

Néanmoins, nous avons montré en outre que les réalisations individuelles d'un focus peuvent présenter une large distribution de temps de decorrélation autour de cette valeur moyenne.

Dans un deuxième temps, nous avons décrit deux situations expérimentales où nous avons pu montrer que la stabilité du focus obtenu par optimisation du front d'onde était significativement plus stable que le speckle.

Dans la première situation, nous avons étudié un milieu diffusant statique (en régime de diffusion multiple) suivi d'un milieu où la propagation à travers les diffuseurs dynamiques s'opérait en régime de diffusion faible. Pour des billes de petites tailles (paragraphe 4.5.2.2), la stabilité des séquences de diffusion dynamique était trop faible pour que notre système puisse la corriger. Le focus résultant est donc beaucoup plus stable que le speckle car il n'utilise alors que les séquences de diffusion statique. Pour des billes plus grandes (paragraphe 4.5.3), notre système est suffisant rapide pour optimiser toutes les séquences de diffusion, néanmoins il privilégie quand même les séquences les plus stables. Dans de tels milieux, le focus résultant de l'optimisation est stable, puisque principalement formé par des photons diffusés par le milieu statique et qui traversent balistiquement la solution dynamique. Ces expériences semblent indiquer que l'optimisation privilégie les séquences de diffusion stables quand deux gammes distinctes de temps de stabilité existent : très stable (balistique à travers le milieu dynamique) et peu stable (diffusé par le milieu dynamique).

Nous avons observé dans un second temps un résultat similaire à travers une tranche de cerveau de souris qui présente des temps de décorrélations multiples, dans un régime de diffusion intermédiaire entre la diffusion simple et multiple. En particulier, la dynamique complexe du milieu présente des séquences de diffusion relativement stable (~10s) et nous avons observé que ce sont ces chemins qui semblent sélectionnés pendant le façonnage du front d'onde. Comme précédemment, le processus d'optimisation permet d'obtenir un focus ayant une stabilité temporelle augmentée par rapport au speckle.

L'élément clé pour obtenir un focus plus stable que le speckle semble être la largeur de la distribution des temps de stabilité des séquences de diffusion. Plus cette distribution est large, plus il semble possible de privilégier les séquences de diffusion stable. A l'inverse, une distribution étroite (voir paragraphe 4.4) ne permet pas, à une optimisation itérative du front d'onde, de distinguer les différentes stabilités des séquences. Un deuxième élément clé pour obtenir cet effet est la vitesse à laquelle l'optimisation est faite. Si l'optimisation est trop rapide par rapport au temps de décorrélation du milieu, cet effet n'apparait pas (comme en DOPC). Dans notre cas, si le temps d'optimisation est de l'ordre des temps de stabilité présents dans le milieu, un focus plus stable que le speckle peut apparaître. L'influence de ces deux paramètres reste difficile à analyser expérimentalement. Des études numériques poussées pourront aider

De plus, une étude plus poussée de l'impact de l'algorithme d'optimisation sur la stabilité du focus pourrait mettre en avant des stratégies d'optimisation susceptibles de favoriser d'autant plus les modes de propagation stables.

Nous pensons que des résultats similaires peuvent être obtenus à travers d'autres systèmes :

- Pendant l'imagerie in vivo d'un cerveau de souris (le crâne ayant été enlevé et remplacé par une lamelle de verre), une partie la lumière traversera des vaisseaux sanguins imposant alors une décorrélation très rapide du speckle. Malgré cela, un système de correction du front d'onde devrait être capable de focaliser les photons diffusés par des structures statiques ou ayant une dynamique lente (cellules ...), si la fraction de lumière diffusée dynamiquement reste faible. Si celle-ci augmente, elle agira comme un bruit supplémentaire sur le processus d'optimisation qui sera d'autant plus perturbé que la fraction sera grande.

- Une imagerie résolue à travers le crâne est aussi envisageable. Le crâne serait alors un diffuseur fixe et le tissu cérébral serait le diffuseur dynamique. A priori, dans ce cas-là, le système de correction du front d'onde corrigera préférentiellement la diffusion par le crâne.

- Un dernier cas intéressant est la correction du front d'onde en présence d'un front d'onde balistique mais aberré à l'intérieur d'un tissu. Les photons diffusés le sont de manière dynamique alors que les photons aberrés seront relativement stables. Une correction du front d'onde corrigerait alors préférentiellement les aberrations.

Une perspective serait d'étendre cette étude expérimentale à la focalisation de d'impulsions lasers à travers un milieu dynamique. La propagation d'un pulse optique court à travers un milieu diffusant induit une élongation temporelle du pulse en transmission selon la distribution des temps de vol. Une mesure interférométrique réalisée avec un tel pulse allongé (pour focaliser par exemple) donnera plus de poids au centre du pulse allongé. Ainsi, Mounaix et al [58] ont montré que la focalisation d'un pulse optique court à l'aide du matrice

de transmission unique recompressait temporellement le focus obtenu par rapport à la courbe de temps de vol. Pour des milieux diffusants homogènes, cela revient à favoriser les séquences de diffusion courtes. Une mesure d'optimisation semblable avec des impulsions optiques pourrait confirmer l'existence de cet effet pour la focalisation à travers un milieu diffusant statique puis dynamique. Si tel est le cas, dans le cas du milieu dynamique, le focus obtenu serait plus stable que le speckle.

V Correction du front d'onde avec des déflecteurs acoustooptiques

Dans ce chapitre, nous allons montrer qu'un système de déflecteurs acousto-optiques (AODs) peut être utilisé comme un modulateur rapide de front d'onde. Nous allons dans un premier temps rappeler le fonctionnement d'un dispositif acousto-optique puis nous allons expliquer comment l'utiliser pour moduler le front d'onde.

Dans un deuxième temps, nous allons décrire un système de correction de front d'onde basé sur deux AODs croisés couplés à une électronique rapide. Ce système nous permettra de focaliser rapidement la lumière à travers un milieu diffusant à l'aide d'un algorithme d'optimisation continu du front d'onde avec un taux d'optimisation par mode de 3.6 kHz. Tout d'abord, nous allons mettre en avant les spécificités du façonnage du front d'onde avec ce système puis nous allons démontrer sa vitesse de focalisation à travers des milieux diffusants statiques.

5.1 Déflecteurs acousto-optiques

5.1.1 Principe d'un dispositif acousto-optique

Un cristal acousto-optique repose sur la diffraction d'une onde optique par une onde acoustique dans un milieu transparent. L'onde acoustique change localement la densité des ions ou atomes présents dans le milieu ce qui se traduit par un changement local d'indice optique. Ainsi une onde acoustique sinusoïdale forme un réseau d'indice sinusoïdal sur lequel la lumière peut venir diffracter.

Un dispositif acousto-optique est généralement formé d'un cristal d'épaisseur L où la lumière et l'onde acoustique vont interagir, et d'un transducteur piézoélectrique pour générer l'onde acoustique. Selon l'épaisseur du cristal et de ses propriétés cristallographiques (cristaux isotropes ou non), nous pouvons distinguer plusieurs régimes de fonctionnement.

5.1.1.1 Régimes de Raman-Nath et de Bragg

Premièrement, nous pouvons introduire une épaisseur critique l_c du dispositif acoustooptique [130] : V Correction du front d'onde avec des déflecteurs acousto-optiques

$$l_c = \frac{n\lambda_a^2}{2\pi\lambda_o} \tag{5.1}$$

Avec λ_o , la longueur d'onde de la lumière dans le vide, n l'indice optique du cristal et λ_a la longueur d'onde acoustique.

Pour L<<l_c, nous sommes en régime de Raman-Nath. L'onde optique diffracte sur un réseau infiniment mince. Pour une incidence normale (ou quasi normale), le faisceau diffracté se répartit sur des ordres multiples de diffraction. L'angle α entre chaque ordre est défini par $\sin(\alpha) = \lambda_0 / \lambda_a$. Le rendement de diffraction maximum pour l'ordre 1 est de 33%.

Pour L>>l_c, nous sommes en régime de Bragg. L'onde optique est diffractée à plusieurs reprises sur l'épaisseur du réseau et les ondes diffractées interfèrent. A l'incidence de Bragg θ_B , un seul ordre de diffraction interfère constructivement. L'angle de Bragg dépend des propriétés du cristal considéré.

A l'incidence de Bragg, la diffraction dans le 1^{er} ordre peut être décrite par la conservation des moments et de l'énergie. La conservation des moments s'écrit :

$$\overrightarrow{K_d} = \overrightarrow{K_l} \pm \overrightarrow{K_a} \tag{5.2}$$

Avec $\overrightarrow{K_l}$ le vecteur d'onde du faisceau incident, $\overrightarrow{K_d}$ celui du faisceau diffracté et $\overrightarrow{K_a}$ le vecteur d'onde acoustique. Nous avons de plus : $K_d = \frac{2\pi n_d}{\lambda_o}$, $K_i = \frac{2\pi n_i}{\lambda_o}$ et $K_a = \frac{2\pi F_a}{V}$ avec n_d et n_i les indices optiques respectifs de l'onde diffractée et incidente, F_a la fréquence acoustique et V la vitesse du son dans le cristal.

La conservation de l'énergie s'écrit :

$$F_d = F_i \pm F_a \tag{5.3}$$

Avec F_d et F_i respectivement les fréquences des ondes optiques diffractées et incidentes.

De l'équation 5.3 apparait directement un décalage de fréquence de l'onde diffractée par effet Doppler. Cependant ce décalage est très faible, en effet $F_{i,d}$ (~400 THz) >> F_a (~100 MHz).



Figure 1 : Diffraction par un système acousto-optique. **A.** Si le cristal est suffisamment fin $(L \ll l_c)$, la diffraction se fait en régime de Raman-Nath. Plusieurs ordres de diffraction existent. Au mieux, 33% de l'énergie peuvent être transférés dans l'ordre 1. **B.** Pour un cristal épais, la diffraction se fait en régime de Bragg. Pour une incidence correspondant à l'angle de Bragg θ_b , un seul ordre de diffraction apparait. Il est possible d'obtenir une efficacité de diffraction de 100% dans l'ordre 1.

5.1.1.2 Cristaux isotropes et anisotropes

En régime de Bragg, selon la symétrie du cristal utilisé, l'efficacité de diffraction et les angles incidents et diffractés associés varient.

Premièrement, pour un cristal isotrope, l'onde incidente et l'onde diffractée expérimentent les mêmes indices optiques $n = n_i = n_d$. La polarisation de la lumière est conservée par interaction avec l'onde acoustique. Pour maximiser la diffraction dans le 1^{er} ordre, l'angle d'incidence doit être l'angle de Bragg θ_B [131]:

$$\Theta_B = \frac{\lambda_o F_a}{2Vn} \tag{5.4}$$

Alors l'angle θ_d entre le faisceau diffracté et celui incident vaut deux fois l'angle de Bragg :

$$\Theta_d = \frac{\lambda_o F_a}{Vn} \tag{5.5}$$

Pour un cristal anisotrope, l'onde diffracte sur un réseau épais biréfringent. L'onde diffractée voit alors sa polarisation changer par rapport à l'onde incidente. Les angles d'incidences θ_i et diffractés θ_d peuvent être explicités avec les équations de Dixon [132] :

$$\sin \Theta_i = \frac{\lambda_o}{2V n_i} \Big\{ F_a + \frac{V^2}{\lambda_o^2 F_a} (n_i^2 - n_d^2) \Big\}$$
(5.6)

$$\sin \Theta_d = \frac{\lambda_o}{2V n_i} \Big\{ F_a - \frac{V^2}{\lambda_o^2 F_a} (n_i^2 - n_d^2) \Big\}$$
(5.7)

Finalement pour $F_a \gg F_{critique} \equiv \frac{v}{\lambda_o} \sqrt{n_i^2 - n_d^2}$, les équations 5.6 et 5.7 peuvent être relativement bien approximées par les équations 5.4 et 5.5 [132]. Par simplicité, nous allons considérer les équations 5.4 et 5.5 valides aussi bien pour des cristaux isotropes et anisotropes, bien que $F_{critique}$ ne soit, en générale, pas négligeable devant F_a . Les mesures expérimentales d'Akemann et al [133] justifient ce choix.

Dans les deux situations (cristaux isotropes et anisotropes), l'efficacité de diffraction η_{AO} définie comme le rapport entre l'intensité diffractée I_d sur l'intensité incidente I_i peut être explicitée à l'incidence de Bragg [131] :

$$\eta_{AO} = \frac{I_d}{I_i} = \sin^2(\sqrt{A.P}) \tag{5.8}$$

Avec A un paramètre dépendant de la longueur d'onde, de la symétrie et de la géométrie du cristal [131] et P la puissance acoustique (exprimée en Watt). Il est possible d'obtenir une diffraction de 100% pour $\sqrt{A.P} = \pi/2$. Cependant, une telle efficacité de diffraction n'est que rarement obtenue car elle nécessite des puissances acoustiques élevées et/ou des cristaux très larges. Plus vraisemblablement, des efficacités de diffraction autour de 70-80% sont obtenues. Finalement, le régime de Bragg est généralement privilégié pour des dispositifs acousto-optiques car la quasi-totalité de l'énergie incidente peut être transférée dans le 1^{er} ordre de diffraction.

De plus, pour un cristal isotrope, l'onde acoustique sera une onde de compression alors qu'une onde de cisaillement se propagera dans un cristal anisotrope.

Des différentes équations explicitées précédemment, nous pouvons en déduire les utilisations principales des dispositifs acousto-optiques. Premièrement un tel cristal peut servir à décaler en fréquence la lumière pour, par exemple, des mesures hétérodynes [134]. De tels cristaux peuvent servir comme modulateurs d'amplitudes, en jouant sur la puissance acoustique et donc sur l'efficacité de diffraction, l'intensité diffractée peut être modulée. Nous parlons alors de modulateurs acousto-optiques (AOM). Finalement, ces dispositifs peuvent aussi servir pour défléchir la lumière, en jouant sur la fréquence acoustique, l'angle du faisceau défléchi peut être contrôlé. Nous parlons alors de déflecteurs acousto-optiques (AOD).

5.1.2 Déflecteurs acousto-optiques

Pour défléchir un faisceau à l'aide d'un déflecteur acousto-optique, il suffit de changer la fréquence de l'onde acoustique utilisée selon l'équation 5.5 en conservant l'angle d'incidence fixe. Deux paramètres sont importants pour la déflection par un AOD : l'efficacité de diffraction en dehors de la condition de Bragg et la résolution angulaire obtenue.

5.1.2.1 Efficacité de diffraction

Modifier la fréquence acoustique diminue l'efficacité de diffraction : la conservation des moments et donc l'accord de phase ne sont plus respectés. L'équation 5.2 doit alors être réécrite [131] :

$$\overrightarrow{K_d} = \overrightarrow{K_l} \pm \overrightarrow{K_a} + \overrightarrow{\Delta K}$$
(5.9)

Avec ΔK le vecteur d'onde manquant pour assurer la conservation des moments. Finalement l'efficacité de diffraction chute du facteur :

$$\left[\frac{\sin(\Delta K.L/2)}{\Delta K.L/2}\right]^2 \tag{5.10}$$

Les vecteurs d'ondes optiques peuvent être représentés géométriquement sur la surface des indices par des vecteurs de même origine et d'amplitudes proportionnelles à l'indice optique. Le vecteur d'onde acoustique est quant à lui de direction arbitraire (et contrôlée) et d'amplitude proportionnelle à sa fréquence. De schémas simples, l'amplitude du désaccord de phase peut être évaluée pour des cristaux isotropes et anisotropes. Pour un milieu isotrope les vecteurs d'ondes optiques se baladent sur un cercle de rayon n. Ils sont symétriques par apport à l'axe optique. Le vecteur d'onde acoustique est alors perpendiculaire à l'axe optique, voir figure 2.a.

Un cristal anisotrope pour un AOD est généralement coupé de telle manière que la polarisation de l'onde incidente soit extraordinaire (n_i dépend de θ_i) et que la polarisation diffractée soit normale, voir figure 2.b. Dans cette configuration, le vecteur d'onde acoustique n'est plus perpendiculaire à l'axe optique.



Figure 2 : Accord de phase pour l'effet acousto-optique. A. Pour un cristal isotrope, les vecteurs d'ondes incident K_i et diffracté K_d sont de même amplitude. Quand l'accord de phase est respecté (ici pour K_{a1} et K_{d1}), l'efficacité de diffraction est maximum. Pour dévier un faisceau la fréquence acoustique est modifiée, le vecteur d'onde acoustique est allongé ou raccourci (ici K_{a2}), l'accord de phase n'est plus respecté : apparition d'un désaccord de phase d'amplitude ΔK pour le vecteur d'onde diffracté K_{d2}. L'efficacité de diffraction chute. B. Pour un cristal anisotrope, les ondes incidentes et diffractées ne partagent pas le même indice optique (ici l'onde incidente se propage avec l'indice n_e et l'onde diffractée avec l'indice n_o). Il existe des géométries où le désaccord de phase est minimisé quand le faisceau est dévié (ΔK quasiment nul), pour une gamme importante de fréquences acoustiques donc d'angles de déviation. Cette géométrie permet donc de réaliser des déflecteurs ayant une plus grande amplitude de déflection.

Dans les deux configurations, augmenter l'amplitude du vecteur d'onde acoustique revient à briser l'accord de phase. Cependant, pour un cristal anisotrope, le vecteur d'onde acoustique intersecte le cercle des indices ordinaires plus tangentiellement que pour le cas d'un cristal isotrope, résultant à un désaccord de moment plus faible quand le faisceau est dévié et donc à une meilleure efficacité de diffraction. Ceci correspond à une plus grande gamme d'angle de déflexion avec une bonne efficacité de diffraction. Commercialement, la gamme d'angle obtenue est proche de 40mrad.

5.1.2.2 Vitesse de rafraichissement et résolution angulaire

La déviation d'un faisceau par un déflecteur acousto-optiques (AOD) n'est pas une déflection mécanique, elle ne souffre donc pas de l'inertie d'un système mécanique. Le taux de rafraichissement F_{AO} dépend de la longueur du cristal l_{cr} et de la vitesse V de propagation de l'onde acoustique dans le cristal : $F_{AO} = V/l_{cr}$.

La vitesse dépend du mode de propagation de l'onde acoustique. Une onde de cisaillement (cristaux anisotropes, v~600 m/s) se propage plus lentement qu'une onde de compression (cristaux isotropes, v~6 km/s). Par conséquent, le rafraichissement de l'onde acoustique pour une même taille de cristal est plus rapide pour un cristal isotrope.

Le temps de commutation dépend donc aussi de la taille du cristal l_{cr} . En pratique dans un système de balayage, il est d'intéressant d'avoir l_{cr} le plus grand possible. En effet, pour un angle de balayage θ_{max} donné, un cristal plus grand donnera accès à champ de vue d'autant plus grand (en considérant que ce système de balayage est imagé par un télescope afocal de grossissement adapté pour obtenir une même couverture de la pupille de l'objectif). Des systèmes standards ont des dimensions de 4 à 8 mm, et notre laboratoire a obtenu des cristaux sur mesure de 13 mm d'ouverture.

L'intérêt de grand déflecteur est généralement décrit en termes de résolution angulaire accrue. Dans ce cas la résolution angulaire est définie comme le nombre de directions indépendantes dans lesquelles le faisceau peut être défléchi. On la définit comme l'angle θ_{max} du déflecteur divisé par la divergence du faisceau gaussien (provoqué par diffraction à travers l'ouverture du cristal), de l'ordre de π . $\lambda/4l_{cr}$. On voit donc qu'un grand déflecteur donne accès à plus de points indépendantes :

$$N_{point} = \frac{4\theta_{max}l_{cr}}{\pi\lambda} \tag{5.11}$$

Par conséquent les techniques d'imagerie à balayage privilégient des déflecteurs ayant un grand angle de balayage et une bonne résolution angulaire ; ils privilégient donc les systèmes anisotropes. Le prix à payer est un taux de rafraichissement plus faible. Nous pouvons typiquement trouver des taux de rafraichissement de la dizaine à la centaine de kilohertz. Cela reste 2 à 3 ordres de grandeur meilleure que le taux de rafraichissement d'une position angulaire avec un système de balayage galvanométrique classique utilisé dans un mode de balayage point par point discret (« random access »), d'où l'intérêt de cette approche.

5.1.2.3 Caractéristiques des systèmes commerciaux utilisés

Les déflecteurs acousto-optiques sont donc le plus souvent en régime de Bragg pour maximiser l'efficacité de diffraction dans le 1^{er} ordre. Ils sont composés de cristaux anisotropes pour maximiser la bande passante acoustique (l'angle maximum de balayage) et la résolution angulaire.

Pour les expériences réalisées dans ce chapitre et le suivant, nous avons utilisé deux déflecteurs acousto-optiques d'AA optoélectroniques en TeO₂ (DTSX-A15-800.1000). Ce sont des cristaux anisotropes de 15mm d'ouverture, avec une vitesse acoustique v=650m/s donnant un temps de rafraichissement de l'onde acoustique est 23 μ s. Ces AODs ont une efficacité de diffraction autour de 75% pour une gamme d'angle de 47mrad à 900nm. Ce qui correspond à une bande passante acoustique de 40MHz. Couplé, via un télescope 1:1, à un objectif 20x Olympus de focal 9mm, un tel AOD donne accès à un champ de vue de 400 μ m (= θ_{max} .focal).

5.1.3 Déflecteurs acousto-optiques et pulsation laser

Avant d'utiliser des déflecteurs acousto-optiques pour la microscopie non linéaire, il reste deux problèmes majeurs à compenser. Les cristaux acousto-optiques en TeO2 sont très dispersifs, une pulsation laser est allongée temporellement par propagation à travers un AOD. De plus, l'angle de déviation après un AOD dépend de la longueur d'onde optique, ainsi un laser à bande passante large présentera une dispersion angulaire chromatique après un AOD. La résolution d'un microscope par balayage construit avec des AODs sera donc réduite.

D'après l'équation 5.5, l'angle de déflection par un AOD dépend de la longueur d'onde. Pour un pulse de bande passante $\Delta\lambda$, la dispersion angulaire est de $\Delta\Theta = \frac{\Delta\lambda.F_a}{V}$. Pour un pulse laser de 10 nm de bande passante à une fréquence acoustique centrale de 100 MHz et une vitesse acoustique de 650 m/s, la dispersion angulaire est de 1.5 mrad. La dispersion angulaire est d'autant plus importante que la fréquence acoustique est élevée. Il est possible de compenser cette dispersion angulaire en imposant une dispersion angulaire chromatique contraire à l'entrée de l'AOD [135]. Cela peut, par exemple, être réalisé avec un modulateur

acousto-optique en amont du setup [136]. La dispersion angulaire chromatique peut être complètement compensée pour l'angle de déflection central et minimisée aux autres angles. La dispersion angulaire chromatique résiduelle en bord de champ est alors de l'ordre de $\Delta\Theta_{res} = \frac{\Delta\lambda\Delta F_a}{V}$ (=0.3 mrad pour nos AODs).

Tout élément dispersif (prismes, réseaux ou AOM) peut être utilisé pour monter un système de compensation de la dispersion temporelle. Nous pouvons trouver dans la littérature des systèmes basés sur des prismes [136,137] ou encore un AOM [138].

Finalement, des compensations simultanées de la dispersion temporelle et angulaire ont été réalisées à l'aide d'un prisme [137] ou d'un AOM [138]. Ces solutions ont l'avantage de limiter le nombre d'éléments optiques sur un montage de microscope et donc de maximiser la transmission totale du montage. Ce point est notamment important pour la microscopie non linéaire en profondeur. La puissance disponible en sortie d'un laser pulsé est limitée (~1W). La transmission totale d'un système composé de deux scanners et d'un compensateur est de l'ordre de 20 à 40%. Finalement la puissance incidente sur l'échantillon est de l'ordre de 200 à 400mW, ce qui est suffisant pour l'imagerie. Des pertes additionnelles empêcheraient l'imagerie en profondeur. Un avantage majeur de la solution avec un AOM est qu'elle permet de construire un système accordable sur une grande gamme de longueur d'onde, typiquement 200 nm, en changeant juste les fréquences acoustiques utilisées dans l'AOM et les AOD mais sans modifier l'alignement [138].

5.1.4 Applications en microscopie de fluorescence

Finalement, deux AODs croisés conjugués l'un à l'autre et conjugués à la pupille d'un objectif de microscope forment un système de balayage rapide utilisable pour la microscopie de fluorescence. En microscopie confocale, nous pouvons trouver plusieurs systèmes dans la littérature [139,140]. Des systèmes combinés couplés à des compensations angulaires et temporelles ont été réalisés pour la microscopie non linéaire [141,142].

Un des énormes avantages de ces scanneurs non mécaniques est l'implémentation de balayage aléatoire (random access en anglais). En neuroscience, l'information utile n'est pas l'image totale de fluorescence mais seulement la variation de fluorescence de certains neurones. L'utilisation d'AODs permet de focaliser successivement sur ces points d'intérêts sans perdre de temps à focaliser ailleurs.

Un système de balayage classique à l'aide de miroirs galvanométriques permet d'imager un plan (500x500 pixels) à des cadences de 1 à 10 Hz. Des images à des cadences plus élevées (10-100Hz) sont possibles en utilisant des miroirs galvanométriques résonants [24]. Néanmoins, à de telles cadences, le temps passé par pixels n'est pas suffisant pour obtenir un signal significatif, en particulier sur des grands champs, et généralement des moyennes sur plusieurs images sont nécessaires. L'implémentation d'une stratégie random access permet d'acquérir les signaux émis par des neurones sélectionnés à la fois à une fréquence plus élevée, de l'ordre de 100Hz au kilohertz et avec un rapport signal sur bruit augmenté grâce à un échantillonnage plus long des seuls points d'intérêts. Ceci est d'autant plus intéressant quand une partie significative de l'information spatiale peut être sacrifiée pour augmenter le rapport signal à bruit et la fréquence d'échantillonnage. C'est le cas la plupart du temps en neuroscience, où par exemple dans le cortex, les corps cellulaires des neurones occupent seulement une surface d'environ 10%.

5.2 Déflecteurs acousto-optiques comme SLM

En principe, il est possible détendre l'utilisation de déflecteurs acousto-optiques pour générer des masques de phase arbitraire. En modulant dans le temps la fréquence acoustique, l'angle de déviation d'un faisceau laser peut être spatialement modulé après propagation de l'onde acoustique dans le cristal. Cependant la non-stationnarité de l'onde acoustique empêche d'obtenir des masques de phase statique.

Une première solution a été trouvée pour la génération d'un defocus qui est un masque de phase relativement simple : il s'agit d'une fonction de phase parabolique. En combinant deux par deux, des AODs dans lesquels l'onde acoustique se propage dans la même direction mais en sens opposé, il est possible de former un système scannant en volume [143–150]. Cependant cette solution est couteuse en transmission totale du système car elle nécessite 4 AODs dont 2 sont utilisés à un angle d'incidence non optimale, différent de celui de Bragg. D'autre part, elle reste limitée à la formation d'une lentille diffractive. Enfin, la durée d'établissement d'une lentille est d'autant plus courte que la lentille a une courte focale, car elle correspond à une grande variation linéaire de fréquence qui ne peut donc être établie que pendant une durée faible compte tenu de la bande passante finie. Il s'agit néanmoins d'une solution implémentée commercialement par la société Femtonics.

5.2.1 Modulation de phase en une dimension par un déflecteur acousto-optique

Il a ensuite été démontré par le groupe de Laurent Bourdieu [133] que la nonstationnarité de l'onde acoustique pouvait être résolue en synchronisant une pulsation laser au rafraichissement de l'onde acoustique dans le cristal. Le taux de répétition du laser doit donc être inférieur ou égal au taux F_{AO} de rafraîchissement du déflecteur acousto-optique. Ainsi, entre chaque pulsation laser, une nouvelle onde acoustique a le temps de se propager dans le cristal. Dans cette situation, chaque pulsation laser individuelle sera diffractée par un réseau acousto-optique arbitraire avec un taux de rafraîchissement de la dizaine à la centaine de kilohertz. La pulsation du laser est suffisamment courte et rapide pour voir un réseau acoustooptique statique pendant sa propagation à travers le cristal. Ces taux de répétition concordent avec l'emploi d'amplificateur régénératif utilisé en microscopie non linéaire pour imager en profondeur. Dans cette configuration, nous allons voir qu'un AOD peut être utilisé simultanément comme un modulateur de phase 1D et comme un système de balayage.





La déviation locale imprimée par un AOD à la position x dans le cristal peut être déduite de l'équation 5.5 qui doit alors être réécrite :

$$\Theta_d(x) = \frac{\lambda_0 F_a(x)}{Vn} \tag{5.10}$$
Dévier localement un faisceau revient à moduler la dérivée de sa phase ϕ :

$$\frac{d\varphi}{dx} = \frac{2\pi n}{\lambda_0} \Theta_d(x) = \frac{2\pi F_a(x)}{V}$$
(5.11)

Finalement la phase locale appliquée en x au front d'onde par un AOD peut être obtenue en intégrant l'équation 5.11 sur la longueur x du cristal en prenant $l_{cr}/2$ comme position de référence. En considérant, le front d'onde comme plat pour un faisceau dévié par la fréquence acoustique centrale F_c (i.e en redéfinissant la direction de l'axe optique Oz par la direction du vecteur d'onde de l'onde diffractée par un réseau acousto-optique à F_c : voir figure 4), la phase du front d'onde peut être écrite :

$$\varphi(x) = \frac{2\pi}{V} \int_{-l_{cr}/2}^{x} \Delta F(u) du \qquad (5.12)$$

Avec $\Delta F(u) \equiv F_c - F_a(u)$.

Nous trouvons ici une relation non locale entre la phase du front d'onde modulée par un AOD et la fréquence acoustique. Cette non-localité assure la continuité de la phase du champ optique par modulation avec un AOD.



Figure 4 : Modulation de phase en une dimension avec un AOD. Une modulation ΔF de la fréquence acoustique dans le temps autour de sa fréquence centrale F_c revient, après propagation de l'onde acoustique dans le cristal et interaction avec une pulsation laser, à

moduler en phase le front d'onde optique selon l'équation 5.12. L'axe optique après diffraction est déterminé par la direction de diffraction d'une pulsation laser par la fréquence acoustique centrale F_c .

A noter qu'en modulant localement la puissance acoustique, l'efficacité de diffraction par un AOD est modulée, cf équation 5.8. Ainsi, un tel système peut aussi moduler localement en amplitude un front d'onde. Pour la suite, nous n'utiliserons cependant que la modulation de phase.

5.2.2 Modulation du front d'onde en 2 dimensions

Conjuguer deux AODs croisés permet de moduler un front d'onde en deux dimensions. Chaque AOD contrôle la phase selon l'axe perpendiculaire à la propagation de son onde acoustique. Finalement, un système de deux AODs croisés permet de générer n'importe quel front d'onde tant que les phases selon X et Y sont linéairement séparables (voir figure 5) :

$$E(x, y) = e^{i(\varphi_1(x) + \varphi_2(y))}$$
(5.13)

Cette contrainte nous empêche de générer n'importe quel front d'onde. Par exemple un astigmatisme oblique ($\varphi(x, y) \propto xy$) ne peut pas être généré alors qu'une aberration sphérique ($\varphi(x, y) \propto 6x^4 + 6y^4 + 12x^2y^2 - 6x^2 - 6y^2 + 1$) n'est que partiellement générée [133]. Néanmoins, une large gamme de fronts d'ondes utiles peut être générée, par exemple un défocus ($\varphi(x, y) \propto 2x^2 + 2y^2 + 1$) ainsi que des tilts peuvent être imprimés sur un front d'onde sans problème ouvrant alors la possibilité d'un balayage en volume du focus. Il a aussi été démontré par Akemann et al [133] que la plupart des modes de Zernike (n<15) pouvaient être soit réalisés, soit approximés correctement (sauf l'astigmatisme oblique). Des modulations de front d'onde plus complexes peuvent être réalisées et Akemann et al [25] ont montré que des hologrammes pouvaient être produits avec un tel système.



Figure 5 : Contrôle du front d'onde en deux dimensions avec deux AODs croisés. A. Chaque AOD contrôle le front d'onde selon une direction. B. Pour deux AODs croisés, l'un module les colonnes du front d'onde (ligne verte) et l'autre les lignes (lignes rouges) selon l'équation 5.13. Finalement, les deux AODs ne contrôlent pas indépendamment le front d'onde.

5.2.3 Résolution spatiale et bruit de phase

La résolution spatiale de la modulation de phase par un AOD est donnée par la cadence à laquelle le synthétiseur de haute fréquence peut changer la fréquence générée. Nous utilisons dans notre montage un synthétiseur de haute fréquence de chez AA optoélectronique (DDSPA, AA Optoelectronic) capable de rafraichir la fréquence générée à 14 MHz (c-a-d 71ns). Pour un cristal de 15 mm de long et une vitesse du son de 0.650 km/s, cela revient à avoir 340 pixels d'une longueur de 44 μ m. Le pixel ne correspond pas ici à une contrainte physique, mais est juste imposé par le taux de rafraichissement de la fréquence acoustique. A titre de comparaison, l'onde acoustique y a une fréquence de 100MHz, correspondant à une longueur d'onde de 6.5 μ m. Pour appliquer un déphasage de π entre deux « pixels » consécutifs, une différence de fréquence de 7 MHz doit être appliquée d'après l'équation 5.12. Il est à noter que le synthétiseur de fréquence.

En considérant la fréquence générée par le synthétiseur de haute fréquence exacte, l'erreur sur la phase appliquée par le SLM vient de l'incertitude sur le temps nécessaire pour modifier la fréquence acoustique. L'écart type de cette erreur $\delta \tau_{DDS}$ est pour notre système de 8.7ns [133]. L'écart type $\delta \phi$ de l'erreur appliquée sur la phase entre 2 pixels consécutifs dépend alors de $\delta \tau_{DDS}$ et de la pente de phase appliquée et donc de la différence de fréquence acoustique δF entre deux pixels consécutifs [133] :

$$\delta \varphi = 2\pi . \, \delta \tau_{DDS} . \, |\delta F| \tag{5.14}$$

Finalement, l'écart type de l'erreur totale générée par N décalages de fréquence consécutifs est de $\sqrt{N.\delta\phi}$.

L'erreur commise sur la phase appliquée est proportionnelle à sa dérivée. L'erreur sera donc relativement faible pour des masques de phases de faibles fréquences spatiales et/ou de faible amplitude, comme une lentille sphérique [133]. Elle devient cependant importante pour de grands sauts de phase. Pour un masque de phase aléatoire, utilisé par exemple pour corriger la diffusion, la phase moyenne a appliquée est de π . L'écart type de l'erreur faite pour un déphasage de π entre deux pixels est de 12%. Sur l'ensemble des 340 pixels de l'AOD cela revient à une erreur de 216%. Cette erreur est bien sûr trop importante. Pour réduire ce bruit, il convient alors de limiter les fréquences spatiales utilisées ce qui revient à limiter le nombre de pixels utilisés. Typiquement, nous avons limité notre système à 50 pixels par AOD.

5.2.4 Conclusion

Nous venons de voir que des déflecteurs acousto-optiques combinés à un laser à bas taux de répétition forment un système de modulation de phase rapide. Selon la taille des AODs utilisés, une modulation de phase de plusieurs dizaines à plusieurs centaines de kilohertz est possible ce qui en fait l'un des SLM le plus rapide disponible [119].

L'équation 5.12 étant linéaire, il est possible de superposer des masques de phases en additionnant simplement les fréquences acoustiques générées. Par exemple, additionner à un front d'onde corrigeant la diffusion une fréquence acoustique constante permet de lui ajouter un tilt pour balayer le focus. Finalement l'avantage d'un tel système est qu'il combine directement un modulateur rapide de lumière et un système de balayage (en 3D) rapide du faisceau. Evidemment, cette addition pourra être limitée par la bande passante du déflecteur, si de grands angles sont balayés avec un profil de phase nécessitant une grande modulation.

5.3 Implémentation du façonnage de front d'onde

Le microscope non linéaire basé sur des déflecteurs acousto-optiques utilisé a été développé par Walther Akemann pour des expériences de neuroscience [25,133]. Nous avons par la suite modifié l'électronique rapide utilisée pour implémenter un système de correction du front d'onde rapide en transmission et en épi-détection. Nous allons dans cette partie

décrire le montage optique, l'électronique implémentée puis l'algorithme d'optimisation utilisée.

Deux montages de correction du front d'onde ont été réalisés : l'un en transmission par l'optimisation de l'intensité d'un grain de speckle (chapitre 5) ; et l'autre en épi-détection par l'optimisation de la fluorescence non linéaire totale émise par l'échantillon (chapitre 6). Pour les deux montages, le montage d'illumination et de contrôle du front d'onde est identique, il sera présenté au paragraphe 5.3.1. L'électronique utilisée, qui est commune aux deux montages, sera présentée au paragraphe 5.3.2.

5.3.1 Montage expérimental de façonnage du front d'onde

Un schéma du montage expérimental est présenté sur la figure 6. Une pulsation laser de 100 fs à une longueur d'onde de 1030 nm et un taux de répétition de 80 MHz est émise par un laser (Pharos SP6, Light Conversion, Vilnius, Lithuania). La pulsation laser est amplifiée par un amplificateur régénératif à une pulsation de 10µJ de 200 fs à un taux de répétition de 40 kHz. La pulsation amplifiée est ensuite convertie par un oscillateur amplificateur paramétrique (plage d'accordabilité : 630-2600 nm, Orpheus OPA, Light Conversion) à 930 nm et une puissance de 500 mW de 200 fs. Le signal de pompe résiduel à 514 nm de l'OPA est coupé par un filtre passe-haut (longueur d'onde de coupure = 750 nm, Thorlabs). Le faisceau laser est ensuite grossi pour remplir la pupille d'un AOM (MTS130-B37A15-800.100.023, AA optoélectronique) à 45° des axes x et y. Deux AODs, l'un orienté selon x et l'autre selon y, (DTSX-A15-800.1000, AA optoélectronique) conjugués l'un à l'autre par un télescope afocal de grandissement 1 sont ensuite placés à distance adéquate pour compenser la dispersion spatiale et temporelle de l'ensemble du système optique [138]. Le dernier AOD est ensuite imagé sur la pupille d'un objectif de microscope. La taille du faisceau optique est ajustée pour couvrir partiellement la pupille d l'objectif.

En épi-détection, un miroir dichroïque réfléchie la fluorescence non linéaire émise par l'échantillon. La fluorescence est séparée en deux par un deuxième miroir dichroïque sur deux PMTs pour des mesures simultanées dans le vert et le rouge.



Figure 6 : Schéma du microscope non linéaire (courtoisie Walther Akemann). Une chaine laser fournit une pulsation laser à 940 nm de 200 fs avec un taux de répétition de 40 kHz. Un AOM pré-compense les dispersions spatiales et temporelles des AODs. Deux AODs croisés, conjugués l'un à l'autre, à 45° de l'AOM, contrôlent le front d'onde. La distance entre l'AOM et les AODs est contrôlée par une ligne à retard pour compenser finement les dispersions. Le dernier AOD est ensuite conjugué à la pupille d'un objectif de microscope. La génération d'une pulsation laser est détectée par une photodiode (PD) pour synchroniser l'écriture des ondes acoustiques par des synthétiseurs de hautes fréquences. Deux PMTs sont présents en épi-détection pour mesurer la fluorescence non linéaire émise si besoin via une carte d'acquisition FPGA.

5.3.2 Implémentation électronique

Les signaux acoustiques sont générés via des piézoélectriques alimentés par des synthétiseurs numériques à hautes fréquences (DDSPA, AA Optoelectronic) recevant en entrées des commandes numériques d'une carte FPGA (PXIe 7822R FPGA, NI). Les commandes numériques comprennent 32 bits dont 23 codant pour la fréquence acoustique et 8 codant pour la puissance acoustique.

Les cycles d'écriture sur les AODs sont synchronisés par la pulsation laser à 40 kHz mesurée en sortie de l'amplificateur régénératif via une photodiode. Ce signal déclenche un

train d'impulsions de 340 pulses à 14 MHz sur une carte compteur (NI PXIe-6612, National Instruments). Ce train d'impulsions sert à déclencher l'écriture des entrées numériques commandant le synthétiseur de hautes fréquences. Les commandes écrites sont calculées in situ sur la carte FPGA pour les différentes opérations réalisées : balayage en x,y,z et modes spatiales de déformation du front d'onde pour la compensation de la diffusion.

Le signal du laser à 40kHz déclenche aussi l'acquisition des signaux sur les détecteurs (PMT en épi détection ou photodiode en transmission) par une carte d'acquisition FPGA (PXIe 7971R FPGA, NI). La carte d'acquisition moyenne le signal reçu sur un intervalle de 40ns autour de l'arrivée du pulse pour réduire le bruit de mesure. Pour former une image de fluorescence, ces signaux sont redirigés vers un ordinateur. Pour une expérience de correction du front d'onde, les signaux sont aussi redirigés vers la carte FPGA d'écriture (PXIe 7822R FPGA, NI) comme signal de rétroaction pour un algorithme d'optimisation.

5.4 Optimisation en transmission

Dans un premier temps, nous avons utilisé le système de façonnage de front d'onde pour focaliser à travers un milieu diffusant en transmission. Nous avons ainsi validé l'emploi d'AODs comme modulateurs spatiaux de lumière rapide pour la correction du front d'onde. Nous avons validé expérimentalement la focalisation à l'aide de deux SLMs 1D où la phase appliquée à chaque pixel n'est pas indépendante (selon l'équation 5.13). Nous avons finalement réalisé une optimisation rapide du front d'onde avec un taux d'optimisation par mode de 3,6 kHz.

5.4.1 Montage en transmission

La figure 7 décrit le montage expérimental. Une pulsation laser à 940 nm et à un taux de répétition de 40 kHz est modulée en phase par le montage décrit au paragraphe 5.3.1. Le front d'onde modulé est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope (10x, 0,3), qui éclaire un échantillon diffuseur de surface. Le diffuseur de surface est placé entre l'objectif et son foyer. Un deuxième objectif de microscope (10x, 0,3) permet d'imager un speckle de sortie sur une caméra CCD (Basler acA2040-55um) et sur une photodiode (Thorlabs DET100A/M). Le PMT est conjugué au même plan que la caméra et recueille l'intensité d'un grain de speckle à travers un pinhole comme signal de rétroaction pour le processus d'optimisation. Une iris contrôle la taille d'un grain de speckle pour la faire concorder à celle

du pinhole. La caméra CCD est uniquement utilisée pour une surveillance passive du processus.



Figure 7 : Montage expérimental en transmission. A : Iris ; L : lentille ; BS : Séparateur de faisceau. Le front d'onde incident est modulé en phase par deux AODs croisés. Le deuxième AOD est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope (10x, 0.3) qui permet de focaliser à travers un diffuseur de surface (verre dépoli). Un deuxième objectif de microscope (10x, 0.3) permet d'imager la figure de speckle à la sortie du milieu diffusant à la fois sur une caméra CCD et sur une photodiode. La photodiode mesure l'intensité d'un grain de speckle à travers un pinhole. Un iris contrôle la taille de l'ouverture numérique pour faire correspondre la taille du grain de speckle avec le diamètre du pinhole. Le signal de la photodiode est acquis par une carte d'acquisition FPGA (PXIe 7971R FPGA, NI) et est envoyé à une carte FPGA d'écriture (PXIe 7822R FPGA, NI) qui contrôle digitalement la génération des ondes acoustiques se propageant dans les AODs.

5.4.2 Algorithme d'optimisation

En transmission l'optimisation continue du front d'onde est similaire à celle présentée aux chapitres 3 et 4. Initialement, le masque de fréquences appliqué à chaque AOD est constant et fixé à la fréquence centrale de la bande passante de l'AOD. L'algorithme d'optimisation cherche itérativement le masque de fréquences $\Delta f_{correction}$ à ajouter à la fréquence centrale pour maximiser l'intensité d'un grain de speckle et donc focaliser.

A chaque itération i, un mode spatial de l'AOD est sélectionné. Il consiste en un pixel d'un des deux AODs dont la fréquence varie. Les autres pixels garderont une fréquence constante. Ce mode est pondéré N_{step} fois puis est additionné au précédent masque de correction $\Delta f_{correction}$. Pour chaque pondération appliquée, l'intensité de la photodiode est mesurée et moyennée sur N_{pulse} pulsations lasers. Un nouveau masque de fréquence optimal est finalement généré en ajoutant au masque précédent le mode spatial avec la pondération optimum. Lorsque l'intégralité du set de modes a été optimisée, l'algorithme redémarre avec le premier mode de ce set. Le processus est finalement arrêté lorsqu'un gain d'intensité stable a été atteint.

Finalement, l'optimisation d'un mode spatial de l'AOD se fait à une cadence égale à :

$$f_{AOD}^{opt} = \frac{f_{laser}}{N_{step} * N_{pulse}}$$

Pour les expériences menées en transmission, le nombre de pondérations appliquées N_{step} est de 12 et le nombre de pulses intégrés N_{pulse} varie entre 1 et 10 selon le bruit de mesure. Ainsi le taux d'optimisation d'un mode des AODs varie entre 360 Hz et 3.6 kHz.

Le nombre de pondérations appliquées est relativement élevé en raison de la complexité de la déformation essayée à chaque itération. Connaitre une forme analytique de l'évolution de l'intensité pour chaque pondération appliquée à chaque itération permettrait de diminuer le nombre de mesures nécessaires. Cependant modifier localement la fréquence acoustique revient à appliquer un tilt local sur le front d'onde tout en conservant la continuité du front d'onde, voir figure 8. La déformation du front d'onde appliquée n'est alors ni triviale ni similaire à chaque itération. Par conséquent, définir analytiquement l'évolution de l'intensité en fonction des pondérations appliquées aux modes est plus compliqué que pour l'optimisation décrite au chapitre 3 (où il s'agissait d'une sinusoïde). Un tel calcul est possible mais l'intégration au sein d'un FPGA d'une fonction analytique par modes de SLM est difficilement réalisable.

Ce set de mode, comportant 54x2 modes, ne forme pas une base de l'espace, il explore donc mal l'ensemble des solutions possibles, voir figure 8.c pour deux exemples de mode. L'optimisation ne convergera donc pas rapidement. Au chapitre 6, l'utilisation d'un autre set de modes qui est une base de la pupille sera étudiée.



Figure 8. Récapitulatif de l'algorithme d'optimisation. A. Optimiser un mode du système consiste à modifier la fréquence appliquée sur un pixel d'un des deux AODs autour de la fréquence centrale. Plusieurs fréquences (pondérations) sont essayées et les signaux de rétroaction résultants sont enregistrés. La fréquence qui maximise l'intensité est alors appliquée avant de passer au prochain mode. B. Optimiser un mode revient à localement moduler la pente du front d'onde. C. Deux exemples de déformations du front d'onde imposées par les modes utilisés. Le set de modes utilisé ne forme pas une base de l'espace.

5.4.3 Optimisation du front d'onde avec 2 AODs

Pour valider le système d'optimisation basé sur deux SLMs 1D, nous l'avons d'abord utilisé pour focaliser une pulsation laser à travers un échantillon diffusant statique (verre dépoli, Thorlabs DG10-120 A) positionné au contact du premier objectif de microscope, voir Fig. 7.

Dans un premier temps, nous avons optimisé le front d'onde en utilisant seulement un seul des AODs (courbes bleu et rouge de la figure 9.A). Pour cette optimisation 54 modes ont été optimisés itérativement à une cadence de 360 Hz par mode (12 pondérations appliquées par itération, 10 pulsations lasers intégrées), le gain final obtenu est de 13 pour chacun des AODs seuls. La convergence est cependant lente, le set de mode a été optimisé une trentaine de fois (après 54*30/360 = 4.5s) avant d'obtenir un gain stable car ce set n'est pas une base de l'espace.

Dans un deuxième temps, nous avons utilisés les deux AODs pour focaliser la lumière à travers un milieu diffusant. Chaque AOD fut optimisé à tour de rôle avant d'arrêter l'optimisation quand le gain atteignit un plateau (courbe verte de la figure 9.C). Pour cette optimisation 108 modes ont été optimisés toujours à une cadence de 360 Hz par mode. La convergence finale de l'optimisation est encore plus lente que pour l'optimisation d'un seul AOD : le set de modes n'a pas totalement fini de converger après 60s (>180 fois le temps nécessaire pour optimiser une fois tous les modes). Chaque optimisation d'un AOD détruit partiellement l'optimisation de l'autre AOD car ils contrôlent le front d'onde de manière dépendante l'un de l'autre. Des exemples de masques de phase obtenus après optimisations d'un et deux axes du front d'onde sont respectivement présentés sur la figure 9.E et 9.F, illustrant la dépendance du front d'onde aux deux AODs. Néanmoins, la convergence initiale est plus rapide pour un système d'AODs croisés.

Finalement, le gain obtenu est de 33 ce qui est 2.6 fois plus que l'optimisation avec un seul AOD. En doublant le nombre de modes utilisés, le gain fait plus que doubler. Finalement, il existe des corrélations supplémentaires entre le masque de phase que la paire d'AODs est capable de générer avec un nombre fixe de pixels (selon l'équation 5.13) et le masque aléatoire 2D optimum pour focaliser.



Figure 9. Optimisation avec un AOD (54 modes) ou deux AODs croisés (108 modes) à une cadence de 360 Hz par mode. A. Intensité mesurée pendant l'optimisation en bleu et rouge pour un AOD et en vert pour l'optimisation itérative d'un AOD puis l'autre. Ici seule l'intensité maximale pour chaque itération est affichée. L'optimisation d'un seul AOD converge après avoir répété une trentaine de fois le set de modes en environ 5 secondes. Le gain obtenu est de 13. L'optimisation des deux AODs combinés est plus longue à converger mais permet d'obtenir un gain plus important de 33. De manière surprenante, le gain fait plus que doubler en doublant le nombre de modes utilisés. B. Image du speckle avant optimisation.
C. Image du focus après optimisation d'un des AODs. D. Image du focus après optimisation des deux AODs. E. et F. Phases appliquées pour la correction de la diffusion respectivement avec un AOD et deux AODs croisés.

5.4.2 Optimisation rapide du front d'onde

L'optimisation du front d'onde peut être accélérée en diminuant le nombre de pulsations lasers moyennées à chaque mesure. Nous avons fait varier ce nombre de 1 à 10

pour démontrer la capacité de notre système à focaliser rapidement à travers un milieu diffusant. Le nombre de pondérations appliquées à chaque itération reste de 12. Comme précédemment, nous avons utilisé notre système pour focaliser une pulsation laser à travers un échantillon diffusant statique en variant le taux d'optimisation d'un mode de 360 Hz à 3.6 kHz. Pour chaque expérience, les deux AODs sont optimisés (108 modes au total) dix fois (1000 itérations de l'algorithme).

Pour des cadences par mode inférieures ou égales à 720 Hz, les gains obtenus après l'optimisation de 1000 modes sont identiques (voir figure 10.B). Le gain chute ensuite pour des cadences plus rapides en raison du bruit de mesure.

Néanmoins pour un temps d'optimisation donné, ici 300 ms (qui est égal à un temps typique de décorrélation du speckle à travers un milieu biologique), il reste plus avantageux en termes de gain obtenu d'optimiser à la cadence maximale (voir figure 10.A). Certes les mesures effectuées sont plus bruitées mais le nombre de modes optimisés pendant l'intervalle de temps est plus élevé. Un compromis doit être trouvé pour chaque expérience entre bruit de mesure et cadence d'optimisation pour maximiser le gain. Des détecteurs plus performants qu'une photodiode peuvent être utilisés pour diminuer le bruit de mesure. A l'inverse focaliser à travers des milieux plus épais réduira le pourcentage de lumière transmise et diminuera donc le rapport signal sur bruit. A travers de tel milieu, augmenter le nombre de pulses intégrés peut s'avérer nécessaire.



Figure 10. Correction du front d'onde avec deux AODs croisés à différentes cadences d'optimisation. **A.** Gains obtenus au cours du temps (sur une période de 300 ms) pour des optimisations à des cadences de 3.6 kHz à 360 Hz. A cadence élevée, l'optimisation est plus bruitée ; néanmoins le gain obtenu reste plus important car plus de modes ont été optimisés.

B. Focus obtenus après l'optimisation de 1000 modes pour différentes vitesses d'optimisation. A faibles cadences (< 1kHz), les gains finaux obtenus sont similaires. Aux cadences plus élevées les gains finaux chutent en raison d'un rapport signal sur bruit plus faible pendant l'optimisation.

5.5 Conclusions et perspectives

Nous avons utilisé avec succès deux AODs croisés comme modulateur spatial de lumière pour réaliser une expérience de contrôle de front d'onde. Le système permet de focaliser la lumière à travers un milieu diffusant avec un taux d'optimisation par mode maximum de 3.6 kHz. Ce système présente un nombre de modes relativement faible (108 modes) mais permet néanmoins d'atteindre des gains supérieurs à 30. Ce système de correction du front d'onde semble présenter des caractéristiques suffisantes pour focaliser les photons diffusés à l'intérieur d'un tissu biologique pour la microscopie non-linéaire. De plus, il nous permettra de balayer le focus formé par le simple ajout d'une fréquence constante sur les AODs pour former une image de fluorescence. Ce système d'AODs est donc à la fois l'un des SLMs les plus rapides existant et un système de balayage rapide.

Il ne possède pour l'instant qu'un nombre limité de degré de liberté (54 par AOD). Améliorer la précision d'écriture des synthétiseurs de hautes fréquences utilisés permettra d'augmenter le nombre de pixels de SLM disponibles. Pour un synthétiseur idéal, jusqu'à 340 degrés de liberté seront disponibles par AOD. Les gains obtenus alors après optimisation du front d'onde devraient dépasser la centaine.

Pour l'optimisation, les modes utilisés imposent une déformation de phase sur l'ensemble de la pupille. Il est possible de générer des modes déformant localement la phase. Par exemple, un mode, où une fréquence de F est imposée à un pixel i et une fréquence de –F au pixel i+1, va selon l'équation 5.12 imposer un déphasage local (en forme de triangle). L'utilisation de tels modes pour l'optimisation aurait l'avantage d'appliquer la même déformation au front d'onde pour chacun des modes. Ainsi l'évolution de l'intensité en fonction des pondérations appliquées à chaque itération serait identique et intégrable sur l'électronique FPGA. Néanmoins ces modes nécessitent deux sauts de fréquence les rendant plus sensibles à l'imprécision d'écriture des synthétiseurs de hautes fréquences.

L'utilisation d'un set de modes qui n'est pas une base diminue la vitesse de convergence. Au prochain chapitre, nous allons voir une base de la pupille qui peut être

générée avec une paire d'AODs. Nous allons la comparer au set de modes utilisés dans ce chapitre.

VI Correction du front d'onde en épi-détection

Le dernier défi mais pas le moindre est de focaliser à l'intérieur d'un milieu diffusant (modèle puis in vivo) en optimisant en épi-détection. Pour cela il faut changer le signal de rétroaction car l'intensité d'un unique grain de speckle à l'intérieur du milieu diffusant n'est plus accessible. Comme nous allons le voir, optimiser la fluorescence non linéaire totale émise par un milieu marqué par des fluorophores permet de focaliser à l'intérieur d'un milieu [87].

Plusieurs systèmes basés sur l'optimisation d'un signal non linéaire ont été développés pour la correction du front d'onde pour l'imagerie en profondeur [100,151,152]. La fluorescence non linéaire totale est généralement augmentée de 20 à 50% par ces systèmes de correction du front d'onde. Ces mesures ne sont pas en régime de diffusion multiple : un focus est déjà présent avant optimisation. Le groupe de Meng Cui [153] a aussi utilisé un tel système pour compenser la diffusion multiple induite par un crâne de souris in vivo. Ils ont alors multiplié par un facteur 6 la fluorescence non linéaire émise par des dendrites marquées.

Nous avons utilisé le même système de contrôle du front d'onde que celui décrit dans le chapitre précédent [133] (paragraphe 5.3.1) en y modifiant la détection. Dans un premier temps, nous avons utilisé notre système sur des échantillons contrôlés diffusants (couches de parafilm) pour comprendre les paramètres importants du façonnage de front d'onde en épidétection pour la correction des aberrations et de la diffusion. Finalement nous avons appliqué notre système de correction pour l'imagerie in vivo de cerveaux de souris malgré les difficultés supplémentaires inhérentes à ses expériences : faible niveau de fluorescence émise, photo-blanchiment, artefacts de mouvements...

6.1 L'optimisation en épi-détection

6.1.1 Principe de l'optimisation en épi-détection

Comme imaginé initialement, l'algorithme d'optimisation est quasiment identique pour l'optimisation en transmission et en épi-détection, seul le signal utilisé pour la rétroaction change. En épi-détection, une solution pour focaliser à l'intérieur d'un milieu (sans y avoir accès) est d'optimiser la fluorescence non-linéaire totale émise [87]. Grâce à la non-linéarité, la fluorescence totale émise sera maximum si la lumière est focalisée en un point. Prenons le cas simplifié d'un échantillon fluorescent à deux photons illuminé par N_g grains de speckles où la puissance incidente P_i se repartit uniformément sur les grains de speckles. La puissance totale P_{tot} générée par la fluorescence à deux photons est alors [15] :

$$P_{tot} = N_g \left(\frac{P_i}{N_g}\right)^2 = P_i^2 \left(\frac{1}{N_g}\right) \tag{6.1}$$

La puissance totale émise est bien maximisée si la lumière est focalisée sur $N_g = 1$ grain de speckle par façonnage du front d'onde.

L'optimisation de la fluorescence non linéaire présente dans le milieu sélectionne un grain de speckle qui devient alors une étoile guide pour la correction du front d'onde.

Cette approche est valable pour un focus présentant plusieurs lobes (speckle ou focus balistique + speckle). Pour un système faiblement aberré, il a été montré que les aberrations de bas ordre élargissent le volume focal plutôt que de former des lobes secondaires [154] (i.e l'ouverture numérique effective du système diminue). Cependant la fluorescence à deux photons émise par un objet fluorescent étendu en volume ne dépend pas de la taille du volume focal [155]. Cette approche d'optimisation de la fluorescence à deux photons totale n'est donc pas la plus adaptée pour corriger efficacement des aberrations de bas ordres. Mais elle y arrive quand même partiellement (voir paragraphe 6.2.1 ou [154]).

6.1.2 Montage en épi-détection

Un schéma du montage expérimental est présenté sur la figure 1. Un laser impulsionnel à 940 nm avec un taux de répétition de 40 kHz est modulé en phase grâce au montage acousto-optique décrit au paragraphe 5.3.1. Le front d'onde modulé est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope (20x, 1.05). La pupille de l'objectif est partiellement remplie, l'ouverture numérique d'excitation résultante est de 0.6. Un milieu fluorescent (billes fluorescentes sur une lame de microscope ou grains de pollen marqués par des fluorophores sur une lame de microscope) est placé au focus de l'objectif. Ce milieu fluorescent est ensuite recouvert d'un nombre variable de couches de parafilm. Une couche de parafilm non étirée à une épaisseur de 120 µm et, éclairée à une longueur d'onde de 940 nm, présente un libre

parcours moyen de transport d'environ 100 μ m, comparable aux tissus biologiques. Le libre parcours moyen de diffusion a été estimé en mesurant l'extinction du focus balistique à travers un nombre de couches variables de parafilm. Le parafilm n'étant pas une surface diffusante homogène, cette mesure n'est qu'une approximation. Une fraction de la fluorescence non linéaire totale émise est collectée en épi-détection (à travers le milieu diffusant) et filtrée par un miroir dichroïque puis mesurée par un PMT, donc sans résolution spatiale. La fluorescence non linéaire totale mesurée est le signal de rétroaction pour le processus d'optimisation. Pour vérifier la focalisation effective au niveau de l'échantillon, un deuxième objectif de microscope (10x, 0.3) est placé en transmission et image l'échantillon fluorescent sur une caméra CCD, sans être utilisé dans la boucle d'optimisation. La caméra est retirée pour les expériences in vivo.



Figure 1 : Montage expérimental en épi-détection. L : lentille ; D : Miroir dichroïque Le front d'onde incident est modulé en phase par deux AODs croisés. Le deuxième AOD est conjugué à la pupille d'un objectif de microscope (20x, 1.05) qui permet de focaliser à travers un milieu diffusant sur un échantillon fluorescent. La pupille de l'objectif est sous remplie pour obtenir une ouverture numérique à l'excitation de 0.6. Un miroir dichroïque placé en épi-détection permet de mesurer la fluorescence non-linéaire totale émise par l'échantillon. Le signal mesuré au PMT est acquis par une carte d'acquisition FPGA (PXIe 7971R FPGA, NI) et est envoyé à une carte FPGA d'écriture (PXIe 7822R FPGA, NI) qui contrôle digitalement la génération des ondes acoustiques se propageant dans les AODs. Un deuxième objectif de microscope (10x, 0.3) permet d'imager la figure de speckle sur l'échantillon fluorescent sur une caméra CCD pour un contrôle passif de l'optimisation.

6.1.3 Algorithme d'optimisation en épi-détection

Une expérience de correction du front d'onde en épi-détection commence par la prise d'une première image de fluorescence non linéaire par balayage du focus avec les AODs avec un front incident plat (sans correction). Selon l'épaisseur du milieu diffusant, l'image est plus ou moins (voir pas du tout) résolue. Nous ciblons ensuite, avec les AODs, un point de l'image où l'optimisation aura lieu. L'algorithme d'optimisation cherche ensuite le masque de fréquences $\Delta f_{correction}$ à ajouter pour maximiser l'intensité totale de fluorescence non linéaire et donc focaliser sur le point précédemment choisi. L'algorithme d'optimisation est ensuite identique à celui présenté au paragraphe 5.4.2 à l'exception du signal de rétroaction. Finalement, une nouvelle image de fluorescence est obtenue en scannant le focus corrigé sur l'échantillon fluorescent avec les AODs. En ajoutant une fréquence constante au masque de correction mesuré, un tilt est ajouté au front d'onde nous permettant alors de balayer le focus. Avant et après optimisation, une image en transmission du focus est prise pour valider passivement l'optimisation. Finalement, nous avons simultanément accès au gain linéaire sur le focus d'excitation (via la caméra en transmission) et au gain sur la fluorescence non linéaire totale à partir de l'image de fluorescence non linéaire obtenue. Par la suite, les intensités des images du focus obtenues en transmission seront transcrites du bleu et rouge. Les images de fluorescence non linéaire seront en niveau de gris.

Pour ces expériences en épi-détection, un set de modes similaire à celui utilisé pour les expériences en transmission (imposant localement des tilts sur le front d'onde) a été choisi. Cependant le nombre de mode utilisé a été diminué à 64 modes (32 modes par AOD). Les rapports signaux sur fluorescence de fond étant relativement faible en profondeur, nous avons préféré réduire le bruit de phase supplémentaire induit par l'utilisation de hautes fréquences spatiales.

Nous avons de plus introduit un nouveau set de modes. Une modulation sinusoïdale de même fréquence est imposée sur les deux AODs. Pour chaque fréquence appliquée, deux modes sont générés en mettant en phase ou en opposition de phase les modulations sinusoïdales : $\Delta f(x,y)=\cos(wx)\pm\cos(wy)$ avec w une fréquence spatiale harmonique de la taille de la pupille. La phase appliquée sur le front d'onde, qui est l'intégrale de ces fréquences, est alors aussi une modulation sinusoïdale selon les deux axes des AODs. Des exemples de tels modes sont présentés sur la figure 2. Contrairement au précédent set de modes, ces modes harmoniques forment quasiment une base de la pupille ce qui permettra, a

priori, d'accélérer le processus d'optimisation [81]. Seuls les 30 premiers modes de basse fréquence ont été utilisés, les modes de fréquences supérieures introduisent un bruit de phase trop important pour être utilisés pour l'optimisation.



Figure 2. Trois exemples de modes harmoniques utilisés pour l'optimisation. Chaque mode est la somme ou la différence d'une phase sinusoïdale appliquée selon x et d'une appliquée sur y de même fréquence.

Pour les expériences menées ici le nombre de pondérations appliquées à chaque itération a été ajusté à 8. Le signal de fluorescence non linéaire peut être faible en profondeur car la fluorescence est excitée par une figure de speckle étalée spatialement et temporellement. Ainsi le nombre d'impulsions lasers à accumuler sur le détecteur pour avoir un signal suffisant est supérieur à celui utilisé en transmission. Il varie de 10 à 100 selon les expériences réalisées, ce qui revient à un taux d'optimisation par mode variant de 50 à 500 Hz. La cadence d'optimisation a été ajustée à chaque expérience pour obtenir le meilleur gain possible pour un temps d'optimisation minimum.

6.2 Correction du front d'onde sur des échantillons contrôlés

Dans un premier temps, nous avons réalisé des expériences de focalisation à travers des échantillons diffusants contrôlés. Nous avons utilisé des couches de parafilm de libre parcours moyen de diffusion environ égal à 100 μ m. En variant le nombre de couches utilisées (d'épaisseur 120 μ m), nous avons fait varier le régime de diffusion de simple (1 ou 2 couches) à multiples (4 couches). En observant la distribution de lumière initiale, ainsi que le front d'onde optimisé final, on voit que pour deux couches de parafilm, un focus balistique aberré est toujours présent et nous estimons que notre système corrige un mélange d'aberrations et de diffusion. Pour quatre couches de parafilm, le focus disparait totalement et le façonnage de front va essentiellement corriger de la diffusion. Nous avons aussi étudié

l'influence de la taille de « l'étoile guide » (i.e. de l'objet fluorescent) utilisée pour l'optimisation : vitesse de convergence (compétition entre grain de speckle pour trouver l'étoile guide), gain obtenu en fluorescence non linéaire (présence d'une fluorescence émise hors focus qui fait chuter le gain final obtenu).

6.2.1 Système correction

Nous avons commencé par corriger les aberrations induites par notre montage optique, voir figure 3. Un grain de pollen fluorescent a été directement imagé par notre microscope (sans milieu diffusant). Pour l'imagerie, seulement la lamelle recouvrant les grains de pollen est traversée. Une première image de fluorescence réalisée avant correction (figure 3.A) révèle la présence d'aberration : le bord supérieur du grain est mal résolu probablement dû à l'inclinaison de la lame de microscope supportant les grains de pollen. Après correction, une bonne résolution est retrouvée sur l'intégralité de l'image et la fluorescence émise est accrue d'une dizaine de pourcents.



Figure 3. Correction des aberrations du montage optique. A. Image de fluorescence obtenue avant correction du front d'onde d'un grain de pollen. La partie supérieure du pollen est mal résolue. B. Après correction, la qualité de l'image obtenue en résolution et en signal a été améliorée. La croix rouge correspond au point où l'optimisation a été conduite. C. Profil du grain de pollen avant (en bleu) et après optimisation (en rouge) le long de la ligne rouge présente sur la figure 3.B. Le signal total a augmenté de 10% et les bords du grain de pollen sont mieux résolus. D. Masque de phase appliqué pour corriger le front d'onde. On voit que seules des basses fréquences ont été corrigées.

A noter qu'un système de correction du front d'onde basé sur deux AODs croisés n'est pas capable de corriger toutes les aberrations du montage. Par exemple, si l'aberration dominante est un astigmatisme oblique, notre système ne pourra la corriger (voir paragraphe 5.2.2) [133].

6.2.2 Correction rapide du front d'onde avec une bille fluorescente

Nous avons ensuite corrigé la déformation du front d'onde induite par un milieu faiblement diffusant, à savoir 2 couches de parafilm avec $L/l_s \approx 2.4$, L étant l'épaisseur totale du milieu diffusant. Nous nous plaçons ainsi dans un régime similaire à la microscopie à deux photons du cortex ($l_s = 200 \mu m$ et L varie de 300 à 600 μm). Le focus avant correction (figure 4.A) fortement déformé est utilisé pour imager une bille fluorescente unique d'un micromètre de diamètre. L'image de fluorescence (4.C) présente alors des artefacts dus aux lobes secondaires du focus.

La bille fluorescente joue ici le même rôle que le filtre spatial utilisé pour les expériences en transmission, elle permet de sélectionner un grain de speckle à optimiser. L'optimisation du front d'onde permet, en 300 ms, de maximiser le signal de fluorescence (figure 4.E). L'optimisation a été réalisée avec la base harmonique avec un taux d'optimisation par mode de 500 Hz. L'optimisation a donc été réalisée ici à une cadence comparable à celle utilisée en transmission. Des optimisations plus rapides ont été tentées mais ont échoué en raison d'un bruit de mesure trop important.

L'intensité du focus d'excitation (linéaire) mesurée en transmission sur la caméra CCD (figure 4.B) après optimisation a été améliorée de 40%. L'image de fluorescence à deux photons après correction (figure 4.C) ne présente plus d'artefact et le signal de fluorescence maximum obtenue a été multiplié par deux, ce qui concorde avec l'amélioration obtenue sur le focus linéaire ($\approx 1,40^2$).

A noter que pendant le processus d'optimisation (figure 4.E), la fluorescence non linéaire totale a été multipliée par 6 et non pas par deux. En plus d'être amélioré, le focus a été déplacé par le processus d'optimisation pour être focalisé sur la zone la plus brillante de la bille fluorescente afin de maximiser le signal. Il s'agit d'un inconvénient de cette technique d'optimisation qui ne permet pas d'éviter pas le déplacement du focus pendant l'optimisation.



Figure 4. Correction rapide du front d'onde à moyenne profondeur (L/l_s ≈ 2.4). A. et B. Respectivement les focus imagés en transmission sur une caméra CCD avant et après correction du front d'onde. Le focus initial est aberré, un focus brillant est obtenu après optimisation C. et D. respectivement les images de fluorescence non linéaire obtenues avant et après correction du front d'onde en balayant le focus avec les AODs. La croix rouge indique la position où l'optimisation a eu lieu. Les artefacts présents avant correction disparaissent après correction du front d'onde prend seulement 300ms. F. Profils de fluorescence obtenus avant et après optimisation selon la ligne rouge tracée sur la figure D. Le gain sur la fluorescence au point où l'optimisation a lieu est proche de 200% en accord avec le gain obtenu sur le focus G. Masque de phase obtenu après correction

6.2.3 Correction du front d'onde sur un objet fluorescent étendu

L'utilisation d'un objet fluorescent étendu par rapport à la taille d'un grain de speckle complique le processus d'optimisation. Plusieurs grains de speckle vont exciter de la fluorescence non linéaire simultanément. Ils vont rentrer en compétition pendant l'optimisation du front d'onde. Si un grain très brillant (ou un focus) existe initialement, le système de correction du front d'onde va focaliser dessus. Sinon, après un certain temps d'optimisation, l'un des grains de speckle va gagner la compétition et le système focalisera dessus.

De plus, la variation de la fluorescence pendant l'optimisation d'un mode sera plus faible car elle sera alors la moyenne des variations de fluorescence émise par chaque grain de speckle avec des maximas différents. Finalement, le rapport amplitude de modulation sur bruit sera plus faible, nécessitant alors l'intégration sur plus d'impulsions laser.

Deux couches de parafilm ont été déposées au-dessus de grains de pollens. Le focus formé est ici fortement déformé (figure 5.A) et présente 5-6 lobes intenses. L'image de fluorescence formée avant correction (figure 5.C) est donc fortement aberrée. L'optimisation du front d'onde a ici pris 5 s pour converger avec le set des modes imposant des tilts locaux avec un taux d'optimisation par mode de 50 Hz. Un focus a été formé (figure 5.B) d'intensité 2 fois plus élevée que les lobes présents avant correction.

L'image de fluorescence ensuite générée (figure 5.D) est bien résolue autour du point où la correction a eu lieu (croix rouge sur la figure 5.C). L'interstice entre deux lobes de ce grain de pollen apparait. Néanmoins, l'aire de l'effet mémoire est plus petite que la taille du grain de pollen. Ici, la partie basse du pollen est moins bien imagée qu'avant, le masque de phase appliqué corrige bien la diffusion dans la gamme d'effet mémoire mais, au contraire, détériore encore plus le focus en dehors.



Figure 5. Optimisation sur un échantillon fluorescent étendu à travers un milieu diffusant (L/l_s~2.4). A. et B. Respectivement les focus imagés en transmission avant et après correction du front d'onde. Le focus initial est formé de cinq pics intenses, un focus unique trois fois plus intense est obtenu après optimisation C. et D. respectivement les images de fluorescence obtenues avant et après correction du front d'onde. La croix rouge indique la position où l'optimisation a eu lieu. E. Evolution de la fluorescence non linéaire pendant l'optimisation. La correction du front d'onde est plus longue que précédemment à converger car plusieurs grains de speckle sont en compétition. F. Profils de fluorescence obtenus avant et après optimisation selon la ligne rouge tracée sur la figure D. Le gain sur la fluorescence au point où l'optimisation à lieu est proche de 60%. Le gain sur la fluorescence reste faible en raison de la fluorescence émise hors focus. G. Masque de phase obtenu après correction

Ici le gain en fluorescence non linéaire n'est que de 60% alors que nous nous attendrions à un gain de 400% (le carré du gain obtenu au focus). Un modèle simple peut expliquer ce résultat. Avant correction, la fluorescence non linéaire est générée par le grain de speckle qui va être optimisé mais aussi par l'ensemble des autres grains de speckle qui illumine l'objet fluorescent. Ces derniers génèrent alors un signal de fond. Seul un des grains voit son intensité être augmentée alors que les autres conservent leur intensité d'origine. Finalement le gain réel en fluorescence totale définie comme le rapport en la fluorescence émise après optimisation F_{opt} sur la fluorescence émise avant optimisation F_{ref} peut être écrit comme :

$$\frac{F_{opt}}{F_{ref}} = \frac{S_{opt} + B}{S_{ref} + B} \tag{6.2}$$

Avec S_{ref} et S_{opt} les fluorescences émises par le grain de speckle, respectivement, avant et après correction et B la fluorescence de fond émise par les autres grains de speckle. Ce modèle est entièrement valable en régime de diffusion multiple où une expérience de façonnage de front d'onde ne modifie pas l'énergie du speckle environnant le focus formé. Ce n'est pas entièrement le cas pour des régimes moins diffusants comme ici mais il permet néanmoins de bien comprendre le faible gain non linéaire obtenu.

Dans notre situation, nous avons multiplié par 2 l'intensité d'un grain de speckle ce qui a résulté à un gain en fluorescence non linéaire totale de 160%. Selon l'équation 6.2, cela revient à avoir un background de fluorescence généré par 4 grains de speckle. C'est raisonnable au vu de l'image de speckle mesurée avant optimisation.

Nous retrouvons, d'une certaine manière, la limite fondamentale de l'imagerie en profondeur en microscopie à deux photons présentée au chapitre 1. Le signal d'intérêt est noyé au milieu d'une fluorescence non linéaire émise hors focus. En général, la fluorescence de fond est émise en surface résultant à un signal parasite constant sur l'ensemble des images de fluorescence. Ici le signal de fond est généré par le halo de speckle entourant le focus, le signal de fond résultant ne sera pas constant sur l'ensemble de l'image formée par balayage du focus. Il dépend alors de la taille du halo de speckle (donc de la profondeur), de la taille des objets fluorescents et de leur distribution (marquage fluorescent clairsemé ou dense).

Néanmoins, après l'optimisation, le signal de fluorescence est beaucoup plus spécifique ! Il provient préférentiellement du focus. Dans notre situation, le rapport signal deux photons sur bruit a été multiplié par 4. Il peut être néanmoins difficile de l'estimer à partir de l'image de fluorescence seule car le background n'est pas constant sur l'ensemble de l'image.

6.2.4 Correction en profondeur

Superposer quatre couches de parafilm permet de quasiment supprimer le focus balistique ($L/l_s \approx 5$). La figure de speckle en transmission (voir figure 6.A) ne présente aucun focus significatif. Un échantillon de grain de pollen a été placé sous l'échantillon diffusant.

La fluorescence non linéaire mesurée en balayant un speckle est constante sur l'ensemble de l'image. Aucune structure ne ressort, voir figure 6.C. Le processus d'optimisation est possible mais il met du temps à converger (~50s) en raison de la compétition entre les différents grains de speckle. Le taux d'optimisation par mode est de 50 Hz. Néanmoins un focus est formé avec un gain de focalisation (intensité au focus sur intensité moyenne du speckle) de 10, voir figure 6.B. Le gain sur la fluorescence totale reste limité à 60% en raison de la très forte fluorescence émise hors focus. Néanmoins le signal émis spécifiquement par le focus a été multiplié par 100 !

Finalement, l'image de fluorescence formée après correction présente un pic intense autour du point où la correction a été calculée, voir figure 5.D. Cette étendue représente la zone d'effet mémoire où la correction est valable qui est ici plus petite que l'objet considéré. A grande profondeur, la zone d'effet mémoire reste très limitée. Un effort supplémentaire devra être réalisé pour accroitre le champ de vue disponible après correction.



Figure 6. Optimisation à travers un milieu diffusant épais (L/l_s~5). A. et B. Respectivement les focus imagés en transmission avant et après correction du front d'onde. Le focus initial est une figure de speckle, un focus avec un gain de 10 est obtenu après optimisation C. et D. respectivement les images de fluorescence obtenues avant et après correction du front d'onde. La croix rouge indique la position où l'optimisation a eu lieu. E. Evolution de la fluorescence non linéaire pendant l'optimisation. La correction du front d'onde est longue à converger car de nombreux grains de speckle rentrent en compétition. F. Profils de fluorescence obtenus avant et après optimisation selon la ligne rouge tracée sur la figure D. Le gain sur la fluorescence au point où l'optimisation a lieu est proche de 100%. Néanmoins l'étendue de l'effet mémoire est plus petite que l'objet fluorescent à imager. G. Masque de phase obtenu après correction

6.2.5 Comparaison des sets de modes

Pour réaliser nos optimisations, nous avons utilisé deux sets de modes. Le premier consiste à imposer des tilts locaux au front d'onde, il est constitué de 64 modes. Le deuxième est une base de l'espace composée de fonctions sinusoïdales harmoniques. Il contient 30 modes. Les deux algorithmes ont été comparés expérimentalement. La fluorescence émise par un échantillon de grain de pollen fluorescent a été utilisée comme signal de rétroaction. Deux échantillons diffusants ont été considérés : le premier, faiblement diffusant (L/I_s \approx 1.2), constitué d'une couche de parafilm ; et le deuxième, plus diffusant (L/I_s \approx 2.4), constitué de deux couches de parafilm. Les optimisations, réalisées avec un taux d'optimisation par mode de 50 Hz (100 pulsations lasers intégrées par mesures), ont été moyennées sur 20 réalisations. Les résultats sont présentés sur la figure 7. Malheureusement, des mesures similaires à travers trois/quatre couches de parafilm n'ont pas été réalisées en raison de la faiblesse de la fluorescence non linéaire émise par une bille unique.

L'algorithme imposant des tilts locaux présente un gain final supérieur à l'algorithme utilisant la base harmonique en raison du nombre de modes utilisés plus important. La base harmonique présente une convergence plus rapide et sera donc plus robuste pour focaliser à l'intérieur d'un milieu dynamique.



Figure 7. Comparaison des algorithmes d'optimisation. En bleu optimisation avec la base harmonique présentée dans ce chapitre. En vert optimisation avec les tilts locaux présentés au chapitre précédent. Respectivement en **A.** et **B.** Optimisation à travers 1 couche de parafilm $(L/l_s \approx 1.2)$ et 2 couches $(L/l_s \approx 2.4)$ avec un taux d'optimisation par mode de 50 Hz. Dans les deux situations, les modes harmoniques convergent plus rapidement car ils forment une base de l'espace. Néanmoins, plus de modes sont disponibles avec les tilts locaux permettant d'obtenir un gain en fluorescence final supérieur.

6.2.6 Conclusion

Il est possible de focaliser à l'intérieur d'un milieu aberrant ou diffusant en optimisant la fluorescence non linéaire totale émise en épi-détection. Plus l'objet fluorescent utilisé comme étoile guide sera étendu par rapport à la taille d'un grain de speckle, plus l'optimisation sera longue et difficile. En effet, optimiser chaque grain de speckle illuminant des fluorophores est une solution au processus d'optimisation. Cette compétition va allonger l'optimisation, le temps qu'un grain de speckle brillant sorte du lot. De plus l'intensité de chaque grain de speckle est modulée pendant l'optimisation d'un mode. Cette modulation présente un maximum différent selon le grain de speckle. Ainsi la fluorescence non linéaire totale émise, qui est la somme des carrés de l'intensité des grains de speckle, verra son amplitude de modulation réduite. Le rapport signal (= amplitude de modulation) sur bruit sera donc plus faible pour la correction du front d'onde pour un objet fluorescent étendu. Le processus d'optimisation sera plus efficace sur un objet fluorescent de la taille de la tache focale. L'utilisation de plusieurs fluorophores présentant des spectres d'émission différents peut être une bonne stratégie pour corriger le front d'onde. Un premier set de d'objets fluorescents clairsemés et ponctuels à une première longueur d'onde d'émission peut être utilisé comme étoile guide pour l'optimisation. Le focus ainsi corrigé pourra mieux imager le deuxième set de fluorophores.

Les gains obtenus en fluorescence non linéaire restent relativement faibles comparés aux gains obtenus sur le focus. Ceci s'explique par la présence d'une fluorescence émise hors focus assez forte. Une première solution pour maximiser le gain serait d'augmenter le nombre de pixels de SLM utilisés. Une deuxième solution peut être d'utiliser une fluorescence non linéaire d'ordre supérieur (fluorescence à trois photons par exemple) afin d'amplifier le gain en fluorescence obtenu au focus [154]. Le signal émis spécifiquement du focus est cependant améliorer drastiquement.

En profondeur, l'effet mémoire limité est également problématique pour former des images utiles. Conjugué plus judicieusement, le front d'onde de correction permettrait d'accroitre le champ de vue de la correction [65,153]. Une autre solution pourrait être de prendre avantage de la capacité unique à notre système d'appliquer un masque de phase différent à chaque pulsation laser. Des premières mesures pourront établir les différentes corrections à appliquer sur les sous-zones du champ de vue d'intérêt. Dans un deuxième temps, pendant le balayage du focus, la correction appliquée évoluera pour maximiser en chaque point la correction de la diffusion. Cette approche est valable tant que le milieu est statique, les mesures des masques de correction ainsi que la prise d'image doivent être réalisées plus rapidement que le temps de décorrélation du milieu.

6.3 Correction du front d'onde pour des échantillons biologiques

Ce système de correction du front d'onde a été développé pour imager en profondeur des neurones d'une souris. Une première configuration possible pour ce montage est de corriger la diffusion induite par le crâne intact pour imager les neurones des couches superficielles du cerveau [153]. Deuxièmement, la diffusion induite par le cerveau lui-même peut être corrigée pour améliorer en profondeur les images de fluorescence réalisées et ultimement améliorer la profondeur d'imagerie.

6.3.1 Crâne de souris ex vivo

Un crâne collecté après la chirurgie d'une souris ($l_s = 55\mu m$ [153] et L~300 μm) a été placé au-dessus d'un échantillon de grains de pollen. Le focus formé après propagation à travers le crâne est fortement détérioré, voir figure 8.A et l'image de fluorescence formée est fortement aberrée mais un grain de pollen en forme de losange reste devinable. Une optimisation du front d'onde, réalisée en 30s, permet d'obtenir un focus avec un gain de focalisation de 13. Le signal non linéaire émis par le focus a donc été multiplié par 170 mais la fluorescence de fond reste importante.

La taille d'effet mémoire au niveau de l'échantillon est de l'ordre de 15 μ m est ici plus petite que l'objet à imager. Elle est cependant plus grande que la taille moyenne d'un neurone d'une souris (10 μ m) ouvrant la perspective d'une imagerie neuronale à travers un crâne intact (à l'échelle d'un corps cellulaire individuel). Une caractérisation plus précise de l'effet mémoire à travers un crâne de souris sera nécessaire dans le futur.



Figure 8. Optimisation à travers un crâne de souris ex-vivo. A. et B. Respectivement les focus imagés en transmission avant et après correction du front d'onde. C. et D. respectivement les images de fluorescence obtenues avant et après correction du front d'onde. E. Profils de fluorescence obtenus avant et après optimisation selon la ligne rouge tracée sur la figure D. Le gain sur la fluorescence au point où l'optimisation a lieu est proche de 100%. Néanmoins l'étendue de l'effet mémoire est plus petite que l'objet fluorescent à imager. L'insert est le masque de phase obtenu après correction

6.3.2 Souris In vivo

Pour finir, nous avons installé des souris anesthésiées sous le microscope non linéaire. Deux lignées de souris transgéniques ont été utilisées, l'une exprimant tdTomato dans les neurones inhibiteurs Paravalbumine (PV-tdTomato), l'autre exprimant l'EGFP dans tous les neurones inhibiteurs (GAD65-EGFP). Les deux souris présentent un marquage clairsemé limitant la fluorescence émise hors focus, car les neurones inhibiteurs représentent environ 10% des neurones du cortex. Nous avons ensuite utilisé notre système de correction du front d'onde jusqu'à une profondeur de 500 μ m. Les images de fluorescence obtenues pour trois profondeurs avant et après correction sont présentées sur la figure 8. La correction est obtenue en optimisant la fluorescence non linéaire au centre du neurone. A faible profondeur (130 et 300 μ m) l'optimisation est rapide (respectivement 200 et 300 ms) car le système corrige, a priori, principalement des aberrations. Le gain sur l'image de fluorescence est donc relativement faible de 10 à 20%. A plus grande profondeur, la correction commence à corriger la diffusion, l'optimisation prend alors plusieurs secondes (5s) mais le gain sur la fluorescence est plus important : il est ici de 60%.

Une borne supérieure du champ de vue de la correction peut être estimée à partir de la figure 9.C3. Le neurone présent en haut du champ de vue (voir figure 9.C1 et C2) voit son intensité diminuer après optimisation. Il est à la limite de l'effet mémoire du système qui est alors de l'ordre de 40 μ m. Si besoin, une étude plus poussée de l'étendue de l'effet mémoire pourra être menée avec notre système.

Souris (RedTomato, anesthésiée) à 130 µm de profondeur



Figure 9. Correction du front d'onde à plusieurs profondeurs chez des souris anesthésiées in vivo. A1, B1 et C2 sont respectivement les images de fluorescence obtenues à 130, 300 et 500 µm avant correction du front d'onde. A2, B2 et C2 sont les images équivalentes obtenues après correction du front d'onde. A3, B3 et C3 sont les profils d'intensités obtenus selon les lignes en pointillés rouges.

La correction de la diffusion au-delà de 500 µm a été rendue difficile en raison du photo-blanchiment des fluorophores présents. Le fluorophore ciblé photo-blanchit avant la fin de l'optimisation. Le focus n'est finalement jamais optimisé et, au contraire, est détérioré.

La décorrélation du speckle, à ces profondeurs, n'a pas semblé impacter le processus d'optimisation. Néanmoins des mesures poussées n'ont pas encore été réalisées pour conclure correctement sur ce point. Le mouvement individuel d'un neurone est parfois un frein à l'optimisation (dû à la respiration ou au battement cardiaque). Si le neurone se déplace en dehors du focus, le signal de fluorescence est perdu et l'optimisation échoue. Cet effet semble plus marqué pour des neurones en profondeur.

6.3.3 Conclusion

Pour conclure, nous avons corrigé partiellement un mélange d'aberrations et de diffusions induites par des échantillons biologiques ex vivo et in vivo. Ex vivo, nous avons corrigé la diffusion induite par un crâne de souris. Le champ de vue de la correction appliquée est plus grand qu'un neurone et la diffusion induite par un crâne de souris semble stable dans le temps. Il est donc envisageable d'imager un neurone de suivre l'activité neuronale à travers le crâne avec un meilleur rapport signal sur bruit avec ce système, en utilisant des marqueurs calciques du type GCamp6. In vivo, nous avons corrigé partiellement de la diffusion et des aberrations induites par le cortex d'une souris jusqu'à 500 μ m de profondeur. A ces profondeurs l'effet mémoire semble encore large (~40 μ m) et la décorrélation temporelle du speckle semble lente. Des mesures complémentaires seront nécessaires pour confirmer ces observations.

La stratégie d'optimisation utilisée n'est pas forcement la plus adaptée. Les différentes optimisations ont été réalisées sur des objets fluorescents étendus : les neurones. Pour accélérer la convergence et donc réduire le photo-blanchiment, il serait préférable d'optimiser sur des objets fluorescents plus petits comme des dendrites. L'optimisation devra alors être plus rapide que le temps mis par l'objet pour sortir du focus.

Les autres systèmes de correction du front d'onde décrits dans la littérature [151,152] obtiennent des gains sur la fluorescence totale similaire au notre (de l'ordre de plusieurs dizaines de pourcents) sur les corps cellulaires des neurones en profondeur. Ils ont, de plus, montré que des gains beaucoup plus importants peuvent être obtenus sur des objets fluorescents de petites tailles (comme des dendrites). J. Park et al [153] ont obtenu des gains de 6 à travers un crâne sur une dendrite.

In vivo, le gain obtenu spécifiquement par le focus n'est pas mesurable avec nos techniques (on ne peut pas mettre une caméra à l'intérieur d'une souris). Aucune image du focus n'est accessible, il est donc difficile de comprendre par quoi est émise la fluorescence (par le focus ou le speckle environnant). Seul le F-SHARP [103] développé par I.

Papadopoulos et al est actuellement capable d'imager la forme du focus en profondeur et donc est capable d'estimer le gain de focalisation obtenu sur le focus d'excitation.

6.4 Conclusion et perspectives

Nous venons de voir dans ce chapitre qu'un système de modulation du front d'onde optimisant la fluorescence non linéaire totale était capable de corriger une partie de la diffusion et des aberrations induites par le milieu imagé. Nous avons utilisé un système basé sur deux AODs croisés pour, à la fois, moduler le front d'onde et balayer le focus pour former une image de fluorescence non-linéaire.

En profondeur (jusqu'à L~5l_s), le système est capable de corriger partiellement le front d'onde et d'améliorer les qualités des images obtenues. Néanmoins le gain sur le signal de fluorescence reste faible en raison de la présence d'un fort signal fluorescent généré en dehors du focus. Pour augmenter le gain obtenu sur la fluorescence, il faudrait augmenter le nombre de pixels de SLM disponibles. Améliorer la précision d'écriture de nos synthétiseurs à hautes fréquences peut être une solution. Moins d'imprécision sur les phases générées serait obtenue, permettant ainsi d'augmenter le nombre de modes utilisés (voir paragraphe 5.2.3). Utiliser un autre SLM présentant plus de pixels est aussi une option, le MEMS utilisé aux chapitres 3 et 4 est un bon candidat. L'utilisation de la fluorescence à trois photons permettra aussi de maximiser les gains de fluorescence [154]. Malgré un faible gain sur la fluorescence non linéaire totale, un focus intense est formé. La fluorescence non linéaire émise par ce focus augmente donc drastiquement (par-dessus une fluorescence de fond), notre système est donc beaucoup plus spécifique. Dans la perspective de l'imagerie calcique de l'activité neuronale, cette spécificité accrue peut être bénéfique. L'activité individuelle de chaque neurone pourra être extraite plus facilement.

Nous avons proposé ici deux sets de modes pour l'optimisation itérative du front d'onde. L'utilisation d'autres sets de modes devra par la suite être étudiée pour améliorer la convergence ou le gain obtenu [81]. Améliorer la précision d'écriture pour augmenter le nombre de modes disponibles sera nécessaire pour imager à plus grande profondeur. De plus pour le moment, nous sommes incapables de savoir exactement ce que nous corrigeons entre diffusions et aberrations. Il pourrait être intéressant de mettre en avant des stratégies d'optimisation avec notre système qui soient capable de corriger préférentiellement l'un ou l'autre. Optimiser les aberrations seulement permettrait de maximiser l'effet mémoire [125]. L'optimisation de la diffusion permettrait de maximiser le gain de focalisation ce qui pourrait être bénéfique pour l'imagerie calcique. Comme observé au chapitre 4, jouer avec la dynamique du milieu et la vitesse d'optimisation peut aider en ce sens.

En profondeur, la zone d'effet mémoire devient rapidement limitée. A terme, cet isoplanétisme limité de la correction peut être un frein à l'emploi des techniques de correction du front d'onde. Pour notre montage, modifier le plan où sont conjugués les AODs pour augmenter l'effet mémoire [65] serait une solution mais peut s'avérer difficile. Les AODs servent aussi à balayer le focus et doivent donc être conjugué à la pupille de l'objectif. Il peut être bien sûr possible d'utiliser un modulateur de phase supplémentaire pour découpler façonnage du front d'onde et balayage du focus. Une deuxième option pourrait être de prendre avantage de la capacité de notre système à façonner de manière indépendante chaque pulsation laser. Le front d'onde corrigeant la diffusion peut être adapté pulse après pulse selon la zone imagé. A terme, coupler le balayage dit « random access » avec notre correction du front d'onde pourra être mis en place pour l'imagerie calcique in vivo.

Finalement, nous proposons ici une nouvelle stratégie de correction du front d'onde. Les techniques actuelles utilisent [100,151,152] un SLM « lent » couplé à un scanneur rapide. Nous proposons ici un système où scanneur rapide et un SLM rapide sont confondus pour maximiser l'effet mémoire. Nous envisageons d'utiliser un tel système pour l'imagerie calcique en deux photons à travers un crâne de souris intact. La diffusion par un crâne est stable dans le temps [153] : au moins 30 minutes. Une première étape de caractérisation des corrections à appliquer en plusieurs points suivit d'un balayage du focus où la correction évolue selon la position imagée permettra de maximiser le champ de vue obtenu, voir figure 10.



Figure 10. Schéma de principe d'une stratégie pour maximiser le champ de vue. Notre système est capable d'imposer un masque de phase différent à chaque impulsion laser. Pour une zone dans la gamme d'effet mémoire (cercle rouge), une image serait formée avec un masque de correction donné. Pour une autre zone d'intérêt, un autre masque de correction sera utilisé.

Conclusion générale

Les principales techniques de microscopie de fluorescence sont fondamentalement limitées pour imager en profondeur par la diffusion de la lumière qui fait chuter la quantité de photons balistiques utilisés pour imager. La microscopie non linéaire permet d'atteindre les plus grandes profondeurs d'imagerie dépassant le millimètre dans le meilleur des cas. Elle reste fondamentalement limitée par deux effets : par la réduction de la fluorescence émise au focus à cause de la décroissance exponentielle des photons balistiques mais aussi par l'augmentation de la fluorescence hors focus [8]. Finalement, le sectionnement optique est perdu en profondeur. Deux solutions sont possibles pour imager plus loin : réduire la fluorescence émise hors focus ; et augmenter l'énergie au focus, donc l'émission de fluorescence.

L'utilisation de fluorescence de non linéarité supérieure (trois photons [156]) permet de réduire le background. L'ingénierie de la durée d'un pulse laser (long en surface et court au focus) avec des techniques de « temporal focusing » [157,158] permet aussi de réduire l'excitation de la fluorescence non linéaire hors focus.

L'optique adaptative, d'abord développée en Astronomie [42] puis adaptée en microscopie, permet, en corrigeant les aberrations et en réduisant l'étalement du volume focal, de maximiser la fluorescence non linéaire [48]. Ceci est réalisé à l'aide de miroirs déformables ou de modulateurs spatiaux de lumière capables de moduler en phase le front d'onde incident et ainsi de pré-compenser les déformations induites par le milieu. Plus récemment les techniques de façonnage de front ont étendu cette approche à la correction partielle de la diffusion [13]. En s'appuyant sur le principe de conjugaison de phase, il est possible de faire interférer constructivement une partie des photons diffusés à l'intérieur d'un milieu diffusant reformant ainsi un focus capable d'être balayé dans la gamme d'effet mémoire pour former une image de fluorescence [15]. Ils existent plusieurs techniques pour focaliser les photons diffusés à l'intérieur d'un milieu diffusant : techniques de conjugaison de phase digitale (DOPC) ou d'optimisation en utilisant une étoile guide soit acoustique, soit non linéaire ou bien une particule en mouvement [159].

Mettre en pratique la correction de la diffusion pour l'imagerie in vivo nécessite l'utilisation conjointe de modulateurs de lumière rapides, de détecteurs rapides et d'une
électronique rapide afin de corriger le front d'onde avant la décorrélation du milieu. Ce temps de décorrélation du milieu varie de la milliseconde à la minute selon la profondeur et le milieu biologique considéré [16]. Nous avons développé deux systèmes chacun basé sur un SLM capable de moduler le front d'onde à haute cadence. Le premier système utilise un MEMS-SLM de chez Boston Micromachines capable de moduler le front d'onde à environ 10 kHz [105]. Le deuxième, plus original, basé sur des travaux antérieurs de l'équipe de Laurent Bourdieu [133], utilise deux AODs couplés à un laser pulsé à bas taux de répétition et synchronisé avec l'onde acoustique se propageant dans les AODs, pour moduler le front d'onde pour, à terme, focaliser à l'intérieur d'un milieu diffusant en optimisant la fluorescence non linéaire totale. Implémentés sur un microscope non linéaire, ces systèmes devraient être capables de former un focus en profondeur dont la dimension est limitée par la diffraction optique.

Nous avons donc implémenté des montages d'optimisation rapide du front d'onde (en transmission et en épi-détection) avec ces deux systèmes à l'aide d'électroniques FPGA. Bien que limité pour implémenter des algorithmes complexes, le FPGA nous permet de réduire au minimum les temps de transferts entre les différents composants de nos systèmes. En transmission, des algorithmes d'optimisation continus du front d'onde à des taux d'optimisation par modes de 4.1kHz pour le MEMS (voir chapitre 3) et de 3.6 kHz pour les AODs (voir chapitre 5) ont été réalisés. Ces deux systèmes sont donc très rapides et permettent d'obtenir des gains suffisants pour focaliser à travers des tissus biologiques.

Jusqu'à très récemment, ces deux technologies étaient probablement les modulateurs spatiaux de phases les plus rapides disponibles. Depuis au moins une nouvelle technologie est apparue sur le marché : les « micro-electro-mechanical grating light valve » qui, en combinant une technologie MEMS et des déformations acoustiques est capable de moduler le front d'onde en phase à 350 KHz [119]. La modulation rapide du front d'onde présente un intérêt certain pour l'imagerie en profondeur mais pas seulement. Une modulation rapide du front d'onde pourrait être utile pour la génération d'holographie pour la microscopie [25], l'excitation de neurones par des techniques d'opto-génétique [160], l'amélioration de la résolution et du sectionnement optique en illumination structurée [20,161] ...

A l'aide du système basé sur un MEMS, nous avons pu étudier la physique de la focalisation à travers un milieu diffusant dynamique (voir chapitres 3 et 4). Nous avons

notamment mis en avant expérimentalement un phénomène, jusqu'alors jamais observé dans la littérature, où le focus formé à travers certains milieux est plus stable que le speckle environnant. Si la décorrélation du focus et l'optimisation ont lieu en même temps, le focus formé n'aura pas exactement la même stabilité que le focus. Si de plus, les séquences de diffusion présentent une distribution de stabilité large, le focus sera plus stable que le speckle. Pour la suite de ces travaux, il serait intéressant de mener une étude analytique et/ou numérique pour mettre en avant les paramètres exacts régissant cet effet ouvrant la voie à des stratégies de contrôle de front d'onde plus efficaces pour obtenir un focus stable. Une étude similaire pourra aussi être menée en régime impulsionnel. Des études précédentes en effet ont démontré (en milieu statique) la sélection de séquences de diffusion courtes par conjugaison de phase d'une impulsion laser [58].

Cet effet peut être utile pour l'imagerie en profondeur offrant alors plus de temps au système pour balayer le focus afin de former une image de fluorescence. En télécommunication, un système de correction du front d'onde plus robuste au changement de perturbation peut s'avérer utile : à travers un nuage, à travers un milieu réverbérant comme une ville ou bien à travers une fibre optique. De manière plus générale, d'autres études se sont intéressées à la stabilité de modes de propagation vis-à-vis d'un phénomène de décorrélation. Il a été démontré que des modes plus robustes au changement de longueur d'onde existent à travers des milieux diffusants [162,163]. Certains modes de propagation sont insensibles aux déplacements de diffuseurs uniques [164,165].

Nous avons appliqué le système basé sur une paire d'AODs pour corriger la déformation du front d'onde en épi-détection et pour balayer le focus pour la microscopie non linéaire (voir chapitre 6). Nous avons, avec succès, refocalisé rapidement les photons diffusés à l'intérieur d'un milieu diffusant et réalisé des images dans la gamme d'effet mémoire, montrant qu'un système d'AODs peut être utilisé simultanément comme système de balayage et de mise en forme du front d'onde. Néanmoins, les champs de vue obtenus en profondeur restent limités. Maximiser l'isoplanétisme sera nécessaire pour la suite. Une première possibilité serait par exemple de conjuguer le SLM au milieu aberrant [72] ou diffusant [65]. In vivo, aux profondeurs imagées (~ 500 µm) ou bien à travers un crâne intact, le milieu est relativement stable. Nous proposons donc pour maximiser le champ de vue de caractériser la correction en plusieurs points puis de changer le masque de correction selon la position pendant la formation d'image. Cette solution est particulièrement adaptée au système d'AODs

144

qui peut moduler individuellement chaque impulsion laser pour à la fois corriger le front d'onde et balayer le focus en 3D.

A terme, les techniques de correction du front d'onde devront être combinées pour maximiser la profondeur d'imagerie. La fluorescence émise en dehors du focus limite la profondeur d'imagerie. L'utilisation de techniques de « temporal focusing » [157,158] ou de fluorescence à trois photons [156] sont des solutions. Cette dernière aura de plus l'avantage de faciliter le processus d'optimisation en maximisant l'amplitude de modulation à chaque itération [154]. Le gain sur la fluorescence totale sera aussi accru [154]. Dans la perspective de l'imagerie trans-crânienne, la microscopie à trois photons a déjà démontré des résultats impressionnants [156]. Des images jusqu'à 600 μ m de profondeur ont été réalisées. La microscopie à trois photons reste néanmoins limitée par le faible flux du signal de fluorescence. L'utilisation d'un système d'AODs combiné à une stratégie de balayage « random access » et à une correction du front d'onde permettrait de maximiser le flux de photons en passant plus de temps aux points d'intérêts et en optimisant l'excitation non linéaire.

Bibliographie

- 1. "Antony van Leeuwenhoek," http://www.ucmp.berkeley.edu/history/leeuwenhoek.html.
- 2. J. Mertz, Introduction to Optical Microscopy (n.d.).
- 3. Y. Zhao, S. Araki, J. Wu, T. Teramoto, Y.-F. Chang, M. Nakano, A. S. Abdelfattah, M. Fujiwara, T. Ishihara, T. Nagai, and R. E. Campbell, "An Expanded Palette of Genetically Encoded Ca2+ Indicators," Science 1208592 (2011).
- 4. H. H. Yang and F. St-Pierre, "Genetically Encoded Voltage Indicators: Opportunities and Challenges," J. Neurosci. **36**, 9977–9989 (2016).
- 5. B. O. Leung and K. C. Chou, "Review of Super-Resolution Fluorescence Microscopy for Biology," Appl Spectrosc **65**, 967–980 (2011).
- 6. "High resolution, high speed, long working distance, large field of view confocal fluorescence microscope | Scientific Reports," https://www.nature.com/articles/s41598-017-13778-2.
- 7. D. Kobat, N. G. Horton, and C. Xu, "*In vivo* two-photon microscopy to 1.6-mm depth in mouse cortex," JBO, JBOPFO **16**, 106014 (2011).
- 8. F. Helmchen and W. Denk, "Deep tissue two-photon microscopy," Nature Methods 2, 932–940 (2005).
- 9. V. Ntziachristos, "Going deeper than microscopy: the optical imaging frontier in biology," Nature Methods **7**, 603–614 (2010).
- 10. L. V. Wang, "Ultrasound-mediated biophotonic imaging: A review of acousto-optical tomography and photo-acoustic tomography," Disease Markers **19**, 123–138 (2004).
- 11. V. G. Andreev, A. A. Karabutov, and A. A. Oraevsky, "Detection of ultrawide-band ultrasound pulses in optoacoustic tomography," IEEE Transactions on Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control **50**, 1383–1390 (2003).
- 12. "Optical Projection Tomography as a Tool for 3D Microscopy and Gene Expression Studies | Science," http://science.sciencemag.org/content/296/5567/541.
- 13. I. M. Vellekoop and A. P. Mosk, "Focusing coherent light through opaque strongly scattering media," Opt. Lett., OL **32**, 2309–2311 (2007).
- 14. S. M. Popoff, G. Lerosey, R. Carminati, M. Fink, A. C. Boccara, and S. Gigan, "Measuring the Transmission Matrix in Optics: An Approach to the Study and Control of Light Propagation in Disordered Media," Phys. Rev. Lett. **104**, 100601 (2010).
- 15. O. Katz, E. Small, Y. Guan, and Y. Silberberg, "Noninvasive nonlinear focusing and imaging through strongly scattering turbid layers," Optica **1**, 170 (2014).
- M. M. Qureshi, J. Brake, H.-J. Jeon, H. Ruan, Y. Liu, A. M. Safi, T. J. Eom, C. Yang, and E. Chung, "In vivo study of optical speckle decorrelation time across depths in the mouse brain," Biomed. Opt. Express, BOE 8, 4855–4864 (2017).
- S. Feng, C. Kane, P. A. Lee, and A. D. Stone, "Correlations and Fluctuations of Coherent Wave Transmission through Disordered Media," Phys. Rev. Lett. 61, 834–837 (1988).
- 18. "Optical sectioning microscopy | Nature Methods," https://www.nature.com/articles/nmeth815.
- M. a. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson, "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope," Opt. Lett., OL 22, 1905–1907 (1997).
- 20. C. Ventalon and J. Mertz, "Quasi-confocal fluorescence sectioning with dynamic speckle illumination," Opt. Lett., OL **30**, 3350–3352 (2005).
- 21. W. Denk, J. H. Strickler, and W. W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy," Science **248**, 73–76 (1990).

- 22. "Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen - Göppert-Mayer - 1931 - Annalen der Physik - Wiley Online Library," https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.19314010303.
- "The Parker Lab at UCI (homepage)," http://parkerlab.bio.uci.edu/index.htm.
- 23. G. Y. Fan, H. Fujisaki, A. Miyawaki, R. K. Tsay, R. Y. Tsien, and M. H. Ellisman, 24.
- "Video-rate scanning two-photon excitation fluorescence microscopy and ratio imaging with cameleons.," Biophys J 76, 2412–2420 (1999).
- W. Akemann, C. Ventalon, J.-F. Léger, B. Mathieu, S. Dieudonné, B. Blochet, S. 25. Gigan, and L. Bourdieu, "Ultra-fast 3D scanning and holographic illumination in nonlinear microscopy using acousto-optic deflectors," in Biomedical Imaging and Sensing Conference (International Society for Optics and Photonics, 2017), Vol. 10251, p. 102510L.
- 26. R. Kurtz, M. Fricke, J. Kalb, P. Tinnefeld, and M. Sauer, "Application of multiline twophoton microscopy to functional in vivo imaging," Journal of Neuroscience Methods 151, 276-286 (2006).
- 27. W. Yang and R. Yuste, "In vivo imaging of neural activity," Nature Methods 14, 349-359 (2017).
- W. Akemann, M. Sasaki, H. Mutoh, T. Imamura, N. Honkura, and T. Knöpfel, "Two-28. photon voltage imaging using a genetically encoded voltage indicator," Scientific Reports 3, 2231 (2013).
- A. Birkner, C. H. Tischbirek, and A. Konnerth, "Improved deep two-photon calcium 29. imaging in vivo," Cell Calcium 64, 29-35 (2017).
- T. Vo-Dinh, "Biomedical Photonics Handbook," 1787 (n.d.). 30.
- N. G. Horton, K. Wang, D. Kobat, C. G. Clark, F. W. Wise, C. B. Schaffer, and C. Xu, 31. "In vivo three-photon microscopy of subcortical structures within an intact mouse brain," Nature Photonics 7, 205–209 (2013).
- 32. D. Kobat, M. E. Durst, N. Nishimura, A. W. Wong, C. B. Schaffer, and C. Xu, "Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation," Opt. Express, OE 17, 13354–13364 (2009).
- M. Wang, C. Wu, D. Sinefeld, B. Li, F. Xia, and C. Xu, "Comparing the effective 33. attenuation lengths for long wavelength in vivo imaging of the mouse brain," Biomed. Opt. Express, BOE 9, 3534–3543 (2018).
- M. Oheim, E. Beaurepaire, E. Chaigneau, J. Mertz, and S. Charpak, "Two-photon 34. microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth," Journal of Neuroscience Methods 111, 29–37 (2001).
- 35. J. B. Grimm, A. K. Muthusamy, Y. Liang, T. A. Brown, W. C. Lemon, R. Patel, R. Lu, J. J. Macklin, P. J. Keller, N. Ji, and L. D. Lavis, "A general method to fine-tune fluorophores for live-cell and in vivo imaging," Nature Methods 14, 987–994 (2017).
- K. Charan, B. Li, M. Wang, C. P. Lin, and C. Xu, "Fiber-based tunable repetition rate 36. source for deep tissue two-photon fluorescence microscopy," Biomed. Opt. Express, BOE 9, 2304–2311 (2018).
- T. B. Norris, "Femtosecond pulse amplification at 250 kHz with a Ti:sapphire 37. regenerative amplifier and application to continuum generation," Opt. Lett., OL 17, 1009-1011 (1992).
- J. Ying, F. Liu, and R. R. Alfano, "Effect of scattering on nonlinear optical scanning 38. microscopy imaging of highly scattering media," Applied Optics 39, 509 (2000).
- 39. P. Theer and W. Denk, "On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy," J. Opt. Soc. Am. A, JOSAA 23, 3139-3149 (2006).

- P. Theer, M. T. Hasan, and W. Denk, "Two-photon imaging to a depth of 1000 μm in living brains by use of a Ti:Al₂O₃ regenerative amplifier," Opt. Lett., OL 28, 1022–1024 (2003).
- 41. D. G. Ouzounov, T. Wang, M. Wang, D. D. Feng, N. G. Horton, J. C. Cruz-Hernández, Y.-T. Cheng, J. Reimer, A. S. Tolias, N. Nishimura, and C. Xu, "*In vivo* three-photon imaging of activity of GCaMP6-labeled neurons deep in intact mouse brain," Nature Methods **14**, 388–390 (2017).
- 42. R. Tyson, Principles of Adaptive Optics (CRC Press, 2010).
- 43. S. Rotter and S. Gigan, "Light fields in complex media: Mesoscopic scattering meets wave control," Rev. Mod. Phys. **89**, 015005 (2017).
- 44. H. C. Hulst and H. C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles* (Courier Corporation, 1981).
- 45. "Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen Mie 1908 -Annalen der Physik - Wiley Online Library," https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/andp.19083300302.
- "Rev. Mod. Phys. 71, 313 (1999) Multiple scattering of classical waves: microscopy, mesoscopy, and diffusion," https://journals.aps.org/rmp/abstract/10.1103/RevModPhys.71.313.
- 47. S. L. Jacques, "Optical properties of biological tissues: a review," Physics in Medicine and Biology **58**, R37–R61 (2013).
- 48. N. Ji, "Adaptive optical fluorescence microscopy," Nature Methods **14**, 374–380 (2017).
- 49. G. L. Galiñanes, P. J. Marchand, R. Turcotte, S. Pellat, N. Ji, and D. Huber, "Optical alignment device for two-photon microscopy," Biomed. Opt. Express, BOE **9**, 3624–3639 (2018).
- 50. A. Ishimaru, "Diffusion of light in turbid material," Appl. Opt., AO **28**, 2210–2215 (1989).
- 51. A. Z. Genack, "Optical Transmission in Disordered Media," Phys. Rev. Lett. **58**, 2043–2046 (1987).
- 52. M. Xu and R. R. Alfano, "Random Walk of Polarized Light in Turbid Media," Phys. Rev. Lett. **95**, 213901 (2005).
- 53. J. W. Goodman, *Speckle Phenomena in Optics: Theory and Applications* (Roberts and Company Publishers, 2007).
- 54. C. W. Hsu, S. F. Liew, A. Goetschy, H. Cao, and A. Douglas Stone, "Correlationenhanced control of wave focusing in disordered media," Nature Physics **13**, 497–502 (2017).
- 55. M. Mounaix, D. Andreoli, H. Defienne, G. Volpe, O. Katz, S. Grésillon, and S. Gigan, "Spatiotemporal Coherent Control of Light through a Multiple Scattering Medium with the Multispectral Transmission Matrix," Phys. Rev. Lett. **116**, 253901 (2016).
- 56. E. Akkermans, *Physique mésoscopique des électrons et des photons* (EDP Sciences, 2012).
- 57. D. Andreoli, G. Volpe, S. Popoff, O. Katz, S. Grésillon, and S. Gigan, "Deterministic control of broadband light through a multiply scattering medium via the multispectral transmission matrix," Sci. Rep. **5**, (2015).
- 58. M. Mounaix, H. B. de Aguiar, and S. Gigan, "Temporal recompression through a scattering medium via a broadband transmission matrix," Optica, OPTICA **4**, 1289–1292 (2017).
- 59. S. Schott, J. Bertolotti, J.-F. Léger, L. Bourdieu, and S. Gigan, "Characterization of the angular memory effect of scattered light in biological tissues," Opt. Express, OE 23, 13505–13516 (2015).

- 60. K. M. Yoo, F. Liu, and R. R. Alfano, "When does the diffusion approximation fail to describe photon transport in random media?," Phys. Rev. Lett. **64**, 2647–2650 (1990).
- 61. G. Maret and P. E. Wolf, "Multiple light scattering from disordered media. The effect of brownian motion of scatterers," Z. Physik B Condensed Matter **65**, 409–413 (1987).
- 62. N. Ji, D. E. Milkie, and E. Betzig, "Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues," Nat Meth **7**, 141–147 (2010).
- 63. I. Freund, M. Rosenbluh, and S. Feng, "Memory Effects in Propagation of Optical Waves through Disordered Media," Phys. Rev. Lett. **61**, 2328–2331 (1988).
- 64. B. Judkewitz, R. Horstmeyer, I. M. Vellekoop, I. N. Papadopoulos, and C. Yang, "Translation correlations in anisotropically scattering media," Nature Physics **11**, 684– 689 (2015).
- 65. G. Osnabrugge, R. Horstmeyer, I. N. Papadopoulos, B. Judkewitz, and I. M. Vellekoop, "Generalized optical memory effect," Optica, OPTICA **4**, 886–892 (2017).
- 66. J. Goodman, "Introduction to Fourier optics," (n.d.).
- 67. "L'Optique de A à Z," http://www.dicoptic.izispot.com/aberrometrie_aberrations_de_haut_degre_865.htm.
- 68. H. Kogelnik, "Holographic Image Projection through Inhomogeneous Media," Bell System Technical Journal **44**, 2451–2455 (1965).
- 69. "Optical Imaging and Aberrations, Part II. Wave Diffraction Optics, Second Edition | (2011) | Mahajan | Publications | Spie," https://spie.org/publications/book/898443?print=2&SSO=1.
- 70. I. M. Vellekoop, A. Lagendijk, and A. P. Mosk, "Exploiting disorder for perfect focusing," Nature Photonics **4**, 320–322 (2010).
- 71. I. M. Vellekoop and C. M. Aegerter, "Scattered light fluorescence microscopy: imaging through turbid layers," Opt. Lett., OL **35**, 1245–1247 (2010).
- 72. H. P. Paudel, J. Taranto, J. Mertz, and T. Bifano, "Axial range of conjugate adaptive optics in two-photon microscopy," Opt. Express, OE **23**, 20849–20857 (2015).
- 73. X. Tao, T. Lam, B. Zhu, Q. Li, M. R. Reinig, and J. Kubby, "Three-dimensional focusing through scattering media using conjugate adaptive optics with remote focusing (CAORF)," Opt. Express, OE **25**, 10368–10383 (2017).
- 74. J.-H. Park, L. Kong, Y. Zhou, and M. Cui, "Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics," Nature Methods **14**, 581–583 (2017).
- 75. R. H. Dicke, "Phase-contrast detection of telescope seeing errors and their correction," The Astrophysical Journal **198**, 605–615 (1975).
- 76. J. M. Beckers, "Increasing the Size of the Isoplanatic Patch with Multiconjugate Adaptive Optics," in (1988), Vol. 30, p. 693.
- 77. B. Ellerbroek and F. Rigaut, "Astronomy: Optics adapt to the whole sky," Nature **403**, 25–26 (2000).
- 78. T. Wu and M. Cui, "Numerical study of multi-conjugate large area wavefront correction for deep tissue microscopy," Opt. Express, OE **23**, 7463–7470 (2015).
- 79. R. D. Simmonds and M. J. Booth, "Modelling of multi-conjugate adaptive optics for spatially variant aberrations in microscopy," J. Opt. **15**, 094010 (2013).
- 80. M. Cui and C. Yang, "Implementation of a digital optical phase conjugation system and its application to study the robustness of turbidity suppression by phase conjugation," Opt. Express, OE **18**, 3444–3455 (2010).
- 81. I. M. Vellekoop and A. P. Mosk, "Phase control algorithms for focusing light through turbid media," Optics Communications **281**, 3071–3080 (2008).
- 82. D. B. Conkey, A. N. Brown, A. M. Caravaca-Aguirre, and R. Piestun, "Genetic algorithm optimization for focusing through turbid media in noisy environments," Opt. Express, OE **20**, 4840–4849 (2012).

- 83. Z. Fayyaz, N. Mohammadian, F. Salimi, A. Fatima, M. R. R. Tabar, and M. R. N. Avanaki, "Simulated annealing optimization in wavefront shaping controlled transmission," Appl. Opt., AO **57**, 6233–6242 (2018).
- 84. D. Akbulut, T. J. Huisman, E. G. van Putten, W. L. Vos, and A. P. Mosk, "Focusing light through random photonic media by binary amplitude modulation," Opt. Express, OE **19**, 4017–4029 (2011).
- 85. J. Park, J.-H. Park, H. Yu, and Y. Park, "Focusing through turbid media by polarization modulation," Opt. Lett., OL **40**, 1667–1670 (2015).
- J. Aulbach, B. Gjonaj, P. M. Johnson, A. P. Mosk, and A. Lagendijk, "Control of Light Transmission through Opaque Scattering Media in Space and Time," Phys. Rev. Lett. 106, 103901 (2011).
- 87. O. Katz, E. Small, Y. Bromberg, and Y. Silberberg, "Focusing and compression of ultrashort pulses through scattering media," Nature Photonics **5**, 372–377 (2011).
- 88. M. Mounaix, H. Defienne, and S. Gigan, "Deterministic light focusing in space and time through multiple scattering media with a Time-Resolved Transmission Matrix approach," arXiv:1607.06331 [physics] (2016).
- A. Boniface, M. Mounaix, B. Blochet, R. Piestun, and S. Gigan, "Transmission-matrixbased point-spread-function engineering through a complex medium," Optica, OPTICA 4, 54–59 (2017).
- W. Xiong, C. W. Hsu, Y. Bromberg, J. E. Antonio-Lopez, R. A. Correa, and H. Cao, "Complete polarization control in multimode fibers with polarization and mode coupling," Light: Science & Applications 7, 54 (2018).
- 91. M. Rueckel, J. A. Mack-Bucher, and W. Denk, "Adaptive wavefront correction in twophoton microscopy using coherence-gated wavefront sensing," PNAS **103**, 17137–17142 (2006).
- 92. X. Tao, A. Norton, M. Kissel, O. Azucena, and J. Kubby, "Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars," Opt. Lett., OL **38**, 5075–5078 (2013).
- 93. R. Aviles-Espinosa, J. Andilla, R. Porcar-Guezenec, O. E. Olarte, M. Nieto, X. Levecq, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez, "Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy," Biomed. Opt. Express, BOE 2, 3135–3149 (2011).
- 94. I. M. Vellekoop, M. Cui, and C. Yang, "Digital optical phase conjugation of fluorescence in turbid tissue," Appl Phys Lett **101**, (2012).
- 95. C.-L. Hsieh, Y. Pu, R. Grange, and D. Psaltis, "Digital phase conjugation of second harmonic radiation emitted by nanoparticles in turbid media," Opt. Express, OE **18**, 12283–12290 (2010).
- 96. Y. Liu, P. Lai, C. Ma, X. Xu, A. A. Grabar, and L. V. Wang, "Optical focusing deep inside dynamic scattering media with near-infrared time-reversed ultrasonically encoded (TRUE) light," Nature Communications **6**, 5904 (2015).
- 97. B. Judkewitz, Y. M. Wang, R. Horstmeyer, A. Mathy, and C. Yang, "Speckle-scale focusing in the diffusive regime with time reversal of variance-encoded light (TROVE)," Nat Photon 7, 300–305 (2013).
- 98. H. Ruan, J. Brake, J. E. Robinson, Y. Liu, M. Jang, C. Xiao, C. Zhou, V. Gradinaru, and C. Yang, "Deep tissue optical focusing and optogenetic modulation with time-reversed ultrasonically encoded light," Sci Adv **3**, eaao5520 (2017).
- 99. D. Débarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson, "Image-based adaptive optics for two-photon microscopy," Opt. Lett., OL **34**, 2495–2497 (2009).

- P. T. Galwaduge, S. H. Kim, L. E. Grosberg, and E. M. C. Hillman, "Simple wavefront correction framework for two-photon microscopy of in-vivo brain," Biomed. Opt. Express, BOE 6, 2997–3013 (2015).
- 101. M. Cui, "Parallel wavefront optimization method for focusing light through random scattering media," Optics Letters **36**, 870 (2011).
- 102. M. Mounaix, D. M. Ta, and S. Gigan, "Transmission matrix approaches for nonlinear fluorescence excitation through multiple scattering media," Opt. Lett., OL 43, 2831– 2834 (2018).
- 103. I. N. Papadopoulos, J.-S. Jouhanneau, J. F. A. Poulet, and B. Judkewitz, "Scattering compensation by focus scanning holographic aberration probing (F-SHARP)," Nature Photonics **11**, 116–123 (2017).
- 104. Y. Liu, C. Ma, Y. Shen, J. Shi, and L. V. Wang, "Focusing light inside dynamic scattering media with millisecond digital optical phase conjugation," Optica, OPTICA 4, 280–288 (2017).
- 105. B. Blochet, L. Bourdieu, and S. Gigan, "Focusing light through dynamical samples using fast continuous wavefront optimization," Opt. Lett., OL **42**, 4994–4997 (2017).
- 106. I. M. Vellekoop, "Feedback-based wavefront shaping," Opt. Express, OE 23, 12189–12206 (2015).
- 107. I. M. Vellekoop and A. P. Mosk, "Phase control algorithms for focusing light through turbid media," Optics Communications **281**, 3071–3080 (2008).
- 108. B. R. Anderson, P. Price, R. Gunawidjaja, and H. Eilers, "Microgenetic optimization algorithm for optimal wavefront shaping," Appl. Opt., AO **54**, 1485–1491 (2015).
- 109. Q. Feng, B. Zhang, Z. Liu, C. Lin, and Y. Ding, "Research on intelligent algorithms for amplitude optimization of wavefront shaping," Appl. Opt., AO **56**, 3240–3244 (2017).
- 110. C. Gong, T. Wu, J. Liu, H. Li, X. Shao, and J. Zhang, "Focusing of light through turbid media by curve fitting optimization," Opt. Eng 55, 123105–123105 (2016).
- R. Horisaki, R. Takagi, and J. Tanida, "Learning-based focusing through scattering media," Appl. Opt., AO 56, 4358–4362 (2017).
- 112. I. M. Vellekoop and A. P. Mosk, "Focusing coherent light through opaque strongly scattering media," Opt. Lett., OL **32**, 2309–2311 (2007).
- 113. N. Curry, P. Bondareff, M. Leclercq, N. F. van Hulst, R. Sapienza, S. Gigan, and S. Grésillon, "Direct determination of diffusion properties of random media from speckle contrast," Opt. Lett., OL 36, 3332–3334 (2011).
- 114. G. Thalhammer, R. W. Bowman, G. D. Love, M. J. Padgett, and M. Ritsch-Marte, "Speeding up liquid crystal SLMs using overdrive with phase change reduction," Opt. Express, OE **21**, 1779–1797 (2013).
- 115. R. Savo, R. Pierrat, U. Najar, R. Carminati, S. Rotter, and S. Gigan, "Observation of mean path length invariance in light-scattering media," Science **358**, 765–768 (2017).
- 116. "Dynamic light scattering with a CCD camera: Review of Scientific Instruments: Vol 64, No 9," https://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1143864.
- 117. C. Stockbridge, Y. Lu, J. Moore, S. Hoffman, R. Paxman, K. Toussaint, and T. Bifano, "Focusing through dynamic scattering media," Opt. Express, OE 20, 15086–15092 (2012).
- 118. A. S. Hemphill, J. W. Tay, and L. V. Wang, "Hybridized wavefront shaping for high-speed, high-efficiency focusing through dynamic diffusive media," J. Biomed. Opt **21**, 121502–121502 (2016).
- 119. O. Tzang, E. Niv, S. Singh, S. Labouesse, G. Myatt, and R. Piestun, "Wavefront shaping in complex media at 350 KHz with a 1D-to-2D transform," (2018).
- 120. M. Jang, H. Ruan, I. M. Vellekoop, B. Judkewitz, E. Chung, and C. Yang, "Relation between speckle decorrelation and optical phase conjugation (OPC)-based turbidity

suppression through dynamic scattering media: a study on in vivo mouse skin," Biomed. Opt. Express, BOE **6**, 72–85 (2015).

- 121. W. I. Goldburg, "Dynamic light scattering," American Journal of Physics **67**, 1152–1160 (1999).
- D. J. Pine, D. A. Weitz, J. X. Zhu, and E. Herbolzheimer, "Diffusing-wave spectroscopy: dynamic light scattering in the multiple scattering limit," J. Phys. France 51, 2101–2127 (1990).
- 123. D. T. Delpy, M. Cope, P. van der Zee, S. Arridge, S. Wray, and J. Wyatt, "Estimation of optical pathlength through tissue from direct time of flight measurement," Phys Med Biol 33, 1433–1442 (1988).
- 124. D. A. Boas, K. K. Bizheva, and A. M. Siegel, "Using dynamic low-coherence interferometry to image Brownian motion within highly scattering media," Opt. Lett., OL 23, 319–321 (1998).
- 125. M. Kadobianskyi, I. N. Papadopoulos, T. Chaigne, R. Horstmeyer, and B. Judkewitz, "Scattering correlations of time-gated light," Optica, OPTICA **5**, 389–394 (2018).
- 126. F. van Beijnum, E. G. van Putten, A. Lagendijk, and A. P. Mosk, "Frequency bandwidth of light focused through turbid media," Opt. Lett., OL **36**, 373–375 (2011).
- 127. M. Lehmann, "Decorrelation-induced phase errors in phase-shifting speckle interferometry," Appl. Opt., AO **36**, 3657–3667 (1997).
- H. Yılmaz, W. L. Vos, and A. P. Mosk, "Optimal control of light propagation through multiple-scattering media in the presence of noise," Biomed. Opt. Express, BOE 4, 1759–1768 (2013).
- 129. "High-Affinity Zinc Inhibition of NMDA NR1–NR2A Receptors | Journal of Neuroscience," http://www.jneurosci.org/content/17/15/5711.
- 130. F. Sanchez, OPTIQUE NON-LINEAIRE COURS ET PROBLEMES RESOLUS (n.d.).
- 131. R. Stroud and J. Xu, Acousto-Optic Devices: Principles, Design and Applications (1992).
- 132. R. Dixon, "Acoustic diffraction of light in anisotropic media," IEEE Journal of Quantum Electronics **3**, 85–93 (1967).
- 133. W. Akemann, J.-F. Léger, C. Ventalon, B. Mathieu, S. Dieudonné, and L. Bourdieu, "Fast spatial beam shaping by acousto-optic diffraction for 3D non-linear microscopy," Optics Express **23**, 28191 (2015).
- 134. A. H. Bachmann, R. A. Leitgeb, and T. Lasser, "Heterodyne Fourier domain optical coherence tomography for full range probing with high axial resolution," Opt. Express, OE 14, 1487–1496 (2006).
- 135. B. K. A. Ngoi, K. Venkatakrishnan, B. Tan, P. Stanley, and L. E. N. Lim, "Angular dispersion compensation for acousto-optic devices used for ultrashort-pulsed laser micromachining," Opt. Express, OE 9, 200–206 (2001).
- 136. R. Salomé, Y. Kremer, S. Dieudonné, J.-F. Léger, O. Krichevsky, C. Wyart, D. Chatenay, and L. Bourdieu, "Ultrafast random-access scanning in two-photon microscopy using acousto-optic deflectors," Journal of Neuroscience Methods 154, 161–174 (2006).
- 137. S. Zeng, X. Lv, C. Zhan, W. R. Chen, W. Xiong, S. L. Jacques, and Q. Luo, "Simultaneous compensation for spatial and temporal dispersion of acousto-optical deflectors for two-dimensional scanning with a single prism," Opt. Lett., OL **31**, 1091– 1093 (2006).
- 138. Y. Kremer, J.-F. Léger, R. Lapole, N. Honnorat, Y. Candela, S. Dieudonné, and L. Bourdieu, "A spatio-temporally compensated acousto-optic scanner for two-photon microscopy providing large field of view.," Opt. Express, OE 16, 10066–10076 (2008).

- P. Saggau, A. Bullen, and S. S. Patel, "Acousto-optic random-access laser scanning microscopy: fundamentals and applications to optical recording of neuronal activity.," Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) 44, 827–846 (1998).
- "High-speed, random-access fluorescence microscopy: I. High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators," Biophysical Journal **73**, 477– 491 (1997).
- 141. B. F. Grewe, D. Langer, H. Kasper, B. M. Kampa, and F. Helmchen, "High-speed in vivo calcium imaging reveals neuronal network activity with near-millisecond precision," Nature Methods **7**, 399–405 (2010).
- 142. V. Iyer, B. E. Losavio, and P. Saggau, "Compensation of spatial and temporal dispersion for acousto-optic multiphoton laser-scanning microscopy," JBO, JBOPFO 8, 460–472 (2003).
- 143. G. D. Reddy, K. Kelleher, R. Fink, and P. Saggau, "Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity," Nature Neuroscience 11, 713–720 (2008).
- 144. G. D. Reddy and P. Saggau, "Fast three-dimensional laser scanning scheme using acousto-optic deflectors," J Biomed Opt **10**, 064038 (2005).
- 145. G. D. Reddy, K. Kelleher, R. Fink, and P. Saggau, "Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity," Nature Neuroscience 11, 713–720 (2008).
- 146. T. Fernández-Alfonso, K. M. N. S. Nadella, M. F. Iacaruso, B. Pichler, H. Roš, P. A. Kirkby, and R. A. Silver, "Monitoring synaptic and neuronal activity in 3D with synthetic and genetic indicators using a compact acousto-optic lens two-photon microscope," J. Neurosci. Methods 222, 69–81 (2014).
- 147. P. A. Kirkby, K. M. N. S. Nadella, and R. A. Silver, "A compact acousto-optic lens for 2D and 3D femtosecond based 2-photon microscopy," Opt. Express, OE 18, 13720– 13744 (2010).
- 148. K. M. N. S. Nadella, H. Roš, C. Baragli, V. A. Griffiths, G. Konstantinou, T. Koimtzis, G. J. Evans, P. A. Kirkby, and R. A. Silver, "Random-access scanning microscopy for 3D imaging in awake behaving animals," Nature Methods 13, 1001–1004 (2016).
- 149. G. Katona, G. Szalay, P. Maák, A. Kaszás, M. Veress, D. Hillier, B. Chiovini, E. S. Vizi, B. Roska, and B. Rózsa, "Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes," Nature Methods **9**, 201–208 (2012).
- 150. G. Szalay, L. Judák, G. Katona, K. Ócsai, G. Juhász, M. Veress, Z. Szadai, A. Fehér, T. Tompa, B. Chiovini, P. Maák, and B. Rózsa, "Fast 3D Imaging of Spine, Dendritic, and Neuronal Assemblies in Behaving Animals," Neuron 92, 723–738 (2016).
- 151. L. Kong and M. Cui, "In vivo fluorescence microscopy via iterative multi-photon adaptive compensation technique," Optics Express **22**, 23786 (2014).
- 152. C. Wang, R. Liu, D. E. Milkie, W. Sun, Z. Tan, A. Kerlin, T.-W. Chen, D. S. Kim, and N. Ji, "Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging in vivo," Nature Methods 11, 1037–1040 (2014).
- 153. J.-H. Park, W. Sun, and M. Cui, "High-resolution in vivo imaging of mouse brain through the intact skull," PNAS **112**, 9236–9241 (2015).
- 154. D. Sinefeld, H. P. Paudel, D. G. Ouzounov, T. G. Bifano, and C. Xu, "Adaptive optics in multiphoton microscopy: comparison of two, three and four photon fluorescence," Opt. Express, OE **23**, 31472–31483 (2015).
- 155. J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy* (Springer Science & Business Media, 2007).

- 156. T. Wang, D. G. Ouzounov, C. Wu, N. G. Horton, B. Zhang, C.-H. Wu, Y. Zhang, M. J. Schnitzer, and C. Xu, "Three-photon imaging of mouse brain structure and function through the intact skull," Nature Methods **15**, 789 (2018).
- 157. "Functional patterned multiphoton excitation deep inside scattering tissue | Nature Photonics," https://www.nature.com/articles/nphoton.2013.9.
- 158. "Wide-field multiphoton imaging through scattering media without correction | Science Advances," (n.d.).
- 159. R. Horstmeyer, H. Ruan, and C. Yang, "Guidestar-assisted wavefront-shaping methods for focusing light into biological tissue," Nat Photon **9**, 563–571 (2015).
- 160. O. Hernandez, E. Papagiakoumou, D. Tanese, K. Fidelin, C. Wyart, and V. Emiliani, "Three-dimensional spatiotemporal focusing of holographic patterns," Nature Communications 7, 11928 (2016).
- 161. N. Chen, C.-H. Wong, and C. J. R. Sheppard, "Focal modulation microscopy," Opt. Express, OE 16, 18764–18769 (2008).
- 162. J. Bosch, S. A. Goorden, and A. P. Mosk, "Frequency width of open channels in multiple scattering media," Opt. Express, OE **24**, 26472–26478 (2016).
- 163. J. Carpenter, B. J. Eggleton, and J. Schröder, "Observation of Eisenbud–Wigner–Smith states as principal modes in multimode fibre," Nat Photon 9, 751–757 (2015).
- 164. P. Ambichl, A. Brandstötter, J. Böhm, M. Kühmayer, U. Kuhl, and S. Rotter, "Focusing inside Disordered Media with the Generalized Wigner-Smith Operator," Phys. Rev. Lett. 119, 033903 (2017).
- 165. B. Gérardin, J. Laurent, P. Ambichl, C. Prada, S. Rotter, and A. Aubry, "Particlelike wave packets in complex scattering systems," Phys. Rev. B **94**, 014209 (2016).