



HAL
open science

Optique adaptative en source étendue pour la microscopie à feuille de lumière en neuroimagerie

Antoine Hubert

► **To cite this version:**

Antoine Hubert. Optique adaptative en source étendue pour la microscopie à feuille de lumière en neuroimagerie. Optique [physics.optics]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS103 . tel-03470509

HAL Id: tel-03470509

<https://theses.hal.science/tel-03470509v1>

Submitted on 8 Dec 2021

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.

**THÈSE DE DOCTORAT
DE SORBONNE UNIVERSITÉ**

Spécialité : Physique

École doctorale n°564: Physique en Île-de-France

réalisée

au Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux

Synthèse et Imagerie de Sonde Inorganiques

sous la direction d'Alexandra FRAGOLA

présentée par

Antoine HUBERT

pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Sujet de la thèse :

**Optique adaptative en source étendue pour la
microscopie à feuille de lumière en neuroimagerie**

soutenue le 2 juillet 2021

devant le jury composé de :

M. Emmanuel BEAUREPAIRE	Rapporteur
M. Serge MEIMON	Rapporteur
M^{me} Valentina EMILIANI	Présidente
M. Rémi GALLAND	Examinateur
M^{me} Caroline KULCSÁR	Examinatrice
M^{me} Alexandra FRAGOLA	Directrice de thèse
M. Fabrice HARMS	Co-encadrant de thèse

Table des matières

Introduction	5
1 Optique adaptative pour la microscopie de fluorescence	9
1.1 Introduction	10
1.2 Rappels sur les aberrations	14
1.2.1 Définition des aberrations géométriques	14
1.2.2 Description des aberrations	16
1.3 De la mesure de front d'onde à l'optique adaptative	19
1.3.1 Mesure de front d'onde	19
1.3.2 Correction du front d'onde	21
1.4 L'optique adaptative pour la microscopie	24
1.4.1 Les méthodes indirectes	24
1.4.2 Utilisation d'un analyseur de type Shack-Hartmann	27
1.4.3 Limitation de l'OA en microscopie	30
1.5 Conclusion	31
2 Mesure de front d'onde pour la microscopie avec un analyseur en source étendue	37
2.1 Introduction	38
2.1.1 Principe de fonctionnement	39
2.1.2 L'adaptation à la microscopie	41
2.2 Développement d'un analyseur de type Shack-Hartmann en source étendue	42
2.2.1 Dimensionnement physique	42
2.2.2 Algorithmes	44
2.3 Caractérisation du capteur	50
2.3.1 Montage pour la caractérisation du capteur	50
2.3.2 Discussion sur l'influence des structures de l'objet sur la mesure du front d'onde	53
2.4 Premiers résultats sur échantillons biologiques	55
2.4.1 Description de l'échantillon biologique	55
2.4.2 Protocole	55
2.4.3 Résultats	56
2.5 Conclusion et perspectives	56
3 Implémentation d'une boucle d'OA en source étendue sur un microscope à feuille de lumière	61
3.1 La microscopie à feuille de lumière pour l'imagerie du vivant	62
3.1.1 État de l'art de la microscopie des tissus	62

3.1.2	L'apport de l'optique adaptative en microscopie à feuille de lumière	69
3.2	Réalisation d'un AO-LSFM en source étendue	72
3.2.1	L'implémentation d'un bras d'OA en LSFM	72
3.2.2	Réalisation du porte échantillon	74
3.3	Caractérisation du microscope	75
3.3.1	Performances du AO-LSFM	75
3.3.2	La zone isoplanétique	82
3.4	Limitations liées aux échantillons volumétriques	84
3.5	Conclusion et perspectives	86
4	Optique adaptative en source étendue pour l'imagerie du cerveau de <i>drosophila melanogaster</i> en microscopie à feuille de lumière	95
4.1	Présentation de l'échantillon	96
4.1.1	Zones et structures d'intérêt	96
4.1.2	Etat de l'art de l'imagerie chez la drosophile	97
4.1.3	Les limites et les besoins	102
4.2	Utilisation d'un marquage structurel	105
4.2.1	Montage à 1 couleur	105
4.2.2	Le montage AO-LSFM bicouleur	109
4.3	Configuration de la correction en source étendue	113
4.3.1	Mesure du front d'onde	113
4.3.2	Paramètres de la boucle	117
4.3.3	Discussion	123
4.4	Apport de l'optique adaptative dans le cadre d'un marquage fonctionnel	123
4.4.1	Matériels et méthodes	123
4.4.2	Résultats sur les neurones d'horloge	124
4.4.3	Résultats sur les neurones du sommeil	125
4.4.4	Discussion	128
4.5	Conclusion et perspectives	128
	Conclusion générale	133

Remerciements

Avant toute chose je tiens à remercier l'ensemble des membres du jury d'avoir accepté d'y participer et d'avoir lu mon manuscrit, les rapporteurs Emmanuel Beaurepaire et Serge Meimon, les examinateurs et examinatrices Valentina Emiliani, Rémi Galland et Caroline Kulscár. La discussion fût très intéressante et vos remarques étaient pertinentes.

Tout à commencé il y a déjà 4 ans dans ce labo et je me dois de remercier Alexandra pour m'avoir dans un premier temps accepté en stage puis, par la suite, en thèse. C'était une grande aventure semée d'embûches et de mouches mais nous avons, malgré des détours improbables, réussi, je crois. Ce n'est que le début de ce travail pour toi, ce n'est que le début de la recherche pour moi mais on ne se quitte pas pour autant, on se retrouvera au détour d'une vague ou d'une montagne.

Tout est lié dans cette thèse et Fabrice tu as tissé d'une main de maître les relations entre le labo et l'entreprise pour permettre un déroulement idéal. J'aurais souhaité apprendre encore plus à tes côtés, tant dans la biblio et ton imaginaire de montages optiques que dans le rock où nous avons encore sans doute à échanger !

Reste à mes côtés quotidiennement ce labo, cette incroyable équipe. En commençant par les permanents je voudrais remercier Vincent, qui m'a beaucoup accompagné au début, j'ai travaillé sur la source étendue, il fallait bien que tu manques de ponctualité le jour de ma thèse, c'était toujours un plaisir de t'avoir dans les salles de manip. Thomas, comment définir Monsieur Thomas ? Je pense que tu participes tellement à toutes les thèses et à tout le labo, multitâche et tellement pertinent. Le blob mais en mieux. Nicolas, chef, une vraie bonne humeur quotidienne, c'est toujours chouette de te voir à midi parler placo et planeur, merci pour tous tes points et ton rire ! Sandrine, plutôt plaquettes que placo, une merveille quand après une matinée de manips une douce odeur de crème de marron inonde les couloirs. Merci pour ton rire quotidien aussi, pour tes gâteaux et puis bon... Tu es la meilleure en Escape Game. Céline, je te souhaite plein de bonheur dans cette équipe de permanents de choc !

Arrivent enfin tous les thésards, postdocs, stagiaires, la famille presque... Merci à tous : Eva pour les piscines le midi ou le soir, Manon et Marion, vous êtes presque indissociables dans ma tête tellement j'ai eu la sensation d'avoir deux sœurs de thèse qui m'aidaient, ces pauses jeux l'été me manqueront ! Susmita pour ces manips SIM interminables de SIM en time-lapse, Nicolas G., arrivé en même temps que moi, pour son riz au lait normand complètement dément. Je pense aussi à Ye, Djamila, Fatima, et ceux que j'ai croisés au début de ma thèse et les incroyables Clément et Bertille, merci de votre bonne humeur et votre compagnie !

Puis les nouveaux, les géniaux, Nicolas M. alias Mogha, une amitié vraiment importante née dans ce labo, merci pour tout, pour ton écoute, pour tes écoutes. Alexandra B. merci pour ton monde bien à toi et ton soutien tout du long, Subha, it's always been nice talking with you, at least when you were not fighting against Marion. Fanny merci également pour ta bonne humeur et le superbe voyage au ski, tu es toujours le rayon de soleil réfléchi par la neige !

Enfin je pense dorénavant à tous les nouveaux venus, Yuzhou et sa victoire aux paris indéniable, Po pour ses smoothies, Corentin pour ses explications chouettes quand on était co-bureau, Lina bienvenue profite bien! Aussi je remercie tous les anciens stagiaires passés par là durant ces 4 années, Marcellin, Bach-Maï, Pierre, Nicolas, Méline, Pauline, Thomas pour la quête de Sophie Marceau. Charlie pour sa super bonne humeur bonne thèse qui arrive et encore bravo pour l'agrégation!

Z'avez cru que je vous avais oublié petite sœur et petit frère? J'ai un paragraphe particulier pour vous car vous êtes la relève, vous avez apporté beaucoup de bonne humeur dans ce mini groupe d'optique. Sophia ton implication dans le projet et ta motivation sont autant un régal que ton accent londonien au poil, tu m'as ramené un peu de sud qui me manquait au quotidien, merci. Mathias, je pense que tu vas mener d'une main de maître ton nouveau setup contemporain, tu es déjà très présent et sur tout les fronts (d'onde) bravo pour ton travail déjà accompli et tes paris sportifs qui nécessitent une thèse à la compréhension.

L'équipe d'Imagine Optic a contribué dans tout ce projet à commencer par Rémy qui a été d'une aide gigantesque à mes débuts, et Christophe évidemment, Cynthia qui a accompagné depuis le début jusqu'aux derniers jours tous mes travaux, puis également Pauline, Guillaume D. et Xavier L. pour leur expertise. Enfin je tiens particulièrement à remercier l'équipe de foot avec qui j'ai passé pas mal de mardis midis, Raf, Adam, Guillaume T., Thomas, Lionel, Guillaume B., Émilie, Arthur, Fahem, et tous les autres...

Entre tous ces projets il est important de noter l'aide conséquente de l'équipe de NeuroPSI, en particulier Georges pour toutes les dissections pour toutes les discussions, c'était extrêmement important, également Julie et François pour leur aide. Je tiens également à en profiter pour remercier ici Laurent, dans mon comité de suivi de thèse et dans ce projet qui a été pertinent tout du long du projet, merci beaucoup. Dans une collaboration plus récente je remercie également Alejandro et Martin pour les travaux sur le poisson et leur aide.

Sans une équipe du laboratoire solide, rien ne serait possible, donc merci à Marie-Claude, Sophie et Francis, merci aux directeurs, Dimitri d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et Ricardo pour avoir passé des heures à dépanner la cafetière sans succès avec moi et sa magnifique démonstration de la supraconductivité sur le petit-train du labo! Merci à l'atelier, Ludo, Alex et Amaury ce fût toujours un plaisir.

Tout du long de ce périple j'ai été également soutenu par mes projets personnels et les gens qui y sont associés. Je remercie donc chaleureusement les membres de A Case Of Us, de Nanostorm et Richard. La musique a une part importante dans cette thèse puisqu'elle a ponctué mes semaines et mes weekends. Je vous remercie donc encore une fois pour tout le temps associé. Je pense que je peux remercier également tous les artistes qui ont participé à mes différentes listes de lecture de rédaction, de manip ou bien de trajets à pied ou en RER.

On ne démarre pas une thèse par hasard et je me dois donc de remercier mes anciens professeurs, qui sont encore là ou ne sont plus là malheureusement, qui m'ont donné le goût de la science et dont j'ai été admiratif. Je pense à Messieurs Boterf, Bellat et Robin de mon lycée, Messieurs Pawlowski, Durand et Madame Bedel de ma licence. J'ai démarré mes études sans penser un seul instant faire une thèse et finalement à suivre ses envies on réalise ce qu'on n'aurait jamais cru possible.

Une fois n'est pas coutume de terminer par sa famille, mes parents et mon frère qui m'ont aidé tout au long de mes études en Bretagne et ailleurs, qui m'ont soutenu sans faille et ont permis la réalisation d'un pot haut en couleurs (à savoir noir et blanc peuplé d'hermines). Merci aussi à mes amis car vous êtes ma famille : Fabien mon binôme, un béco ! Benoît, Baptiste mes amis d'enfance que je ne vois plus assez. Clothilde pour le voyage à Dijon et ses contreparties inattendues. Le Zoo, vous tous qui avez toujours été présents, merci à vous. Les oScom une famille depuis plus de 10 ans aussi !

Supplément d'âme apporté, bouffée d'oxygène dans mon univers, je te dédie ce presque post-scriptum de remerciements. Merci à toi Júlia, parce que tu as tout changé, parce que tu es rayonnante dans un monde aussi aberrant.

Introduction

Le fonctionnement du cerveau est basé sur une communication entre les différents acteurs qui le composent. Depuis l'échelle moléculaire jusqu'à la physiologie et le comportement, l'étude du cerveau permet de comprendre les mécanismes qui mènent à des pathologies neurodégénératives. À cet effet, la neuroimagerie est une méthode importante pour localiser les neurones et visualiser les inter-connexions entre-eux et ainsi cartographier les réseaux impliqués dans un comportement spécifique.

Une étape clef dans cette compréhension passe par l'imagerie du cerveau en fonctionnement, que ce soit par stimulation externe ou comportement spontané, ce qui représente l'activité cérébrale. À grande échelle, et notamment chez l'humain, les électroencéphalogrammes, les magnétoencéphalogrammes ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) sont utilisés pour analyser le système cérébral. En particulier, depuis plusieurs années, l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) permet d'étudier les modulations de l'activité cérébrale lors de l'exécution d'une tâche spécifique.

Ces méthodes sont utiles pour l'investigation du cerveau dans sa globalité en regardant les différentes aires qui le composent mais ne permettent pas de résoudre des phénomènes à l'échelle cellulaire. En effet, l'IRM acquiert des images avec une résolution spatiale autour du millimètre [1]. Bien que de nouveaux développements notamment en France, à NeuroSPIN, soient en cours avec des champs magnétiques plus importants permettant d'augmenter la résolution, cette recherche est actuellement incompatible pour analyser un neurone individuel et réaliser la cartographie de réseaux neuronaux.

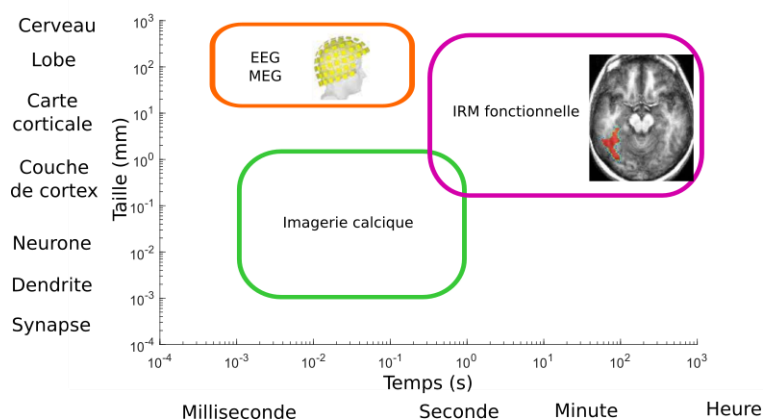


FIG. 1 Représentation des techniques pour les études cognitives chez l'homme. EEG : Électroencéphalographie, MEG : Magnétoencéphalographie. Adapté de [2] et du cours de S. Dehaene "Progrès récents en imagerie cérébrale et décodage des représentations mentales" (Collège de France, 2019)

La figure 1 représente quelques méthodes utilisées selon leurs résolutions spatio-temporelles pour décoder les mécanismes du cerveau en fonctionnement. Il est nécessaire de combiner ces méthodes parce qu'elles n'ont ni la même résolution spatiale, ni la même résolution temporelle et ni le même caractère invasif. Ainsi, afin d'étudier le cerveau à une échelle plus petite, la microscopie optique s'avère essentielle. Celle-ci permet de résoudre des structures de quelques micromètres et peut dans ses conditions nominales imager des neurones individuels voire des structures subcellulaires suivant les modalités d'imagerie. En revanche, en microscopie optique il est nécessaire d'adopter un modèle animal plus commode tel que la souris, le poisson-zèbre, le ver *C. Elegans* ou la drosophile. Ces modèles facilitent les conditions d'étude du cerveau, que ce soit par leur taille ou leur accessibilité. De plus, bien que les dimensions soient réduites et que les espèces soient variées, elles présentent déjà une grande complexité dans les études cognitives et permettent des avancées significatives dans la connaissance des mécanismes du cerveau et des réseaux de neurones. Enfin, la recherche en biochimie et en génétique permet actuellement de réaliser des marquages structuraux, notamment grâce à l'utilisation de la protéine GFP ("Green Fluorescent Protein"), émettrice de fluorescence très modulable. Il est donc possible de visualiser en fluorescence des zones d'intérêt spécifiquement impliquées dans un comportement.

Par ailleurs, plus récemment, l'adaptation de cette protéine pour la rendre sensible à un flux entrant d'ions calcium a permis de visualiser indirectement l'activité neuronale. L'émission de fluorescence de ces marqueurs calciques serait vaine si la microscopie n'avait pas, elle non plus, connu des avancées majeures pour la collection de photons à des résolutions spatio-temporelles représentatives des flux neuronaux. Comme indiqué sur la figure 1 l'imagerie calcique peut résoudre des structures inférieures à la dizaine de micromètres en quelques millisecondes. Ces conditions sont devenues possibles grâce aux développements en instrumentation, notamment dans les techniques multiphotoniques et les nouvelles méthodes innovantes d'imagerie capables d'acquérir des images sur de grands champs contenant plusieurs centaines de neurones [3, 4]. Ces instruments permettent d'effectuer des études de biologie quantitative et d'obtenir une information sur toute une partie ou bien même sur le cerveau entier de l'animal en fonctionnement.

C'est en particulier le cas de la microscopie à feuille de lumière qui illumine l'échantillon uniquement dans la zone d'intérêt, générant ainsi un sectionnement optique qui permet des acquisitions volumiques à haute cadence. Des méthodes utilisant une feuille de lumière ont été introduites dans des manipulations *in vivo* et *ex vivo* et ont permis des études pionnières du cerveau en fonctionnement notamment sur le cycle circadien [5, 6]. Malheureusement, l'utilisation de la lumière comme source d'imagerie, bien que favorable à une résolution des hautes fréquences spatiales, est soumise à de multiples phénomènes qui limitent la possibilité de résoudre les neurones et empêchent les études quantitatives, en particulier en profondeur. L'absorption, la diffusion de la lumière et les aberrations induites par l'échantillon vont perturber le système d'imagerie, ce qui aboutit à un rapport signal sur fond diminué et une impossibilité de résoudre les structures d'intérêt. En neurosciences, les principaux modèles sont choisis pour absorber et diffuser peu la lumière grâce à leur transparence, l'exemple le plus illustratif étant le poisson-zèbre. Les aberrations issues des variations d'indice optique le long de l'épaisseur du tissu sont, dès lors, une cause

importante de la dégradation de la qualité d'imagerie du système. L'objectif de cette thèse se situe dans la correction de ces aberrations, grâce à une approche d'optique adaptative innovante. L'optique adaptative initialement conçue pour corriger les turbulences atmosphériques en astronomie s'est avérée être efficace en microscopie et s'ajoute actuellement à de nombreux dispositifs d'imagerie pour retrouver les conditions nominales en profondeur dans les tissus biologiques et permettre d'améliorer les études quantitatives en biologie [7, 8, 9].

Au cours de cette thèse nous avons développé un analyseur de front d'onde capable de mesurer les aberrations en utilisant une méthode originale basée sur l'image. Nous avons couplé une boucle d'optique adaptative utilisant cet analyseur à un microscope à feuille de lumière afin d'en améliorer les performances lors de l'imagerie en profondeur dans le cerveau de la drosophile pour l'imagerie structurelle et fonctionnelle. Enfin, nous avons mis au point un prototype désormais installé chez nos partenaires dans un laboratoire de biologie (NeuroPSI) à Gif-sur-Yvette, afin d'améliorer l'imagerie fonctionnelle quantitative des neurones impliqués dans le cycle circadien dans des expériences allant de plusieurs minutes à plusieurs jours pour étudier les réseaux de neurones impliqués dans ce comportement.

Cette thèse s'articule autour de 4 chapitres :

Dans le chapitre premier je présenterai l'état de l'art de l'optique adaptative en microscopie de fluorescence. Je m'attarderai sur l'imagerie biologique et les limitations induites de telles modalités dans le cas de la mesure et de la correction des aberrations.

Dans le second chapitre je développerai le dimensionnement de l'analyseur de front d'onde en source étendue et les premières expériences d'optique adaptative en microscopie. Je détaillerai ensuite les spécificités des différents algorithmes de mesure.

Dans le troisième chapitre je décrirai l'implémentation d'une boucle d'optique adaptative avec notre analyseur en source étendue sur un microscope à feuille de lumière. Je présenterai les étapes préliminaires de mesure et correction des aberrations sur des sources ponctuelles et étendues.

Le dernier chapitre porte sur l'imagerie biologique couplée à une boucle d'optique adaptative pour l'imagerie structurelle et fonctionnelle. Je présenterai des résultats d'expériences sur le cerveau *ex vivo* de la drosophile corrigé des aberrations et une étude des paramètres clés de la boucle d'optique adaptative.

Bibliographie

- [1] Ana Luísa Pinho, Alexis Amadon, Baptiste Gauthier, Nicolas Clairis, André Knops, Sarah Genon, Elvis Dohmatob, Juan Jesús Torre, Chantal Ginisty, Séverine Becuwe-Desmidt, et al. Individual brain charting dataset extension, second release of high-resolution fmri data for cognitive mapping. *Scientific Data*, 7(1) :1–16, 2020.
- [2] Terrence J Sejnowski, Patricia S Churchland, and J Anthony Movshon. Putting big data to good use in neuroscience. *Nature neuroscience*, 17(11) :1440–1441, 2014.
- [3] Na Ji, Jeremy Freeman, and Spencer L Smith. Technologies for imaging neural activity in large volumes. *Nature neuroscience*, 19(9) :1154, 2016.
- [4] Sophie Aimon, Takeo Katsuki, Tongqiu Jia, Logan Grosenick, Michael Broxton, Karl Deisseroth, Terrence J Sejnowski, and Ralph J Greenspan. Fast near-whole-brain imaging in adult drosophila during responses to stimuli and behavior. *PLoS biology*, 17(2) :e2006732, 2019.
- [5] Xitong Liang, Timothy E Holy, and Paul H Taghert. Synchronous drosophila circadian pacemakers display nonsynchronous ca²⁺ rhythms in vivo. *Science*, 351(6276) :976–981, 2016.
- [6] Xitong Liang, Timothy E Holy, and Paul H Taghert. A series of suppressive signals within the drosophila circadian neural circuit generates sequential daily outputs. *Neuron*, 94(6) :1173–1189, 2017.
- [7] Martin J Booth. Adaptive optical microscopy : the ongoing quest for a perfect image. *Light : Science & Applications*, 3(4) :e165–e165, 2014.
- [8] Vivien Marx. Microscopy : hello, adaptive optics. *Nature methods*, 14(12) :1133–1136, 2017.
- [9] Pranoy Sahu and Nirmal Mazumder. Improving the way we see : Adaptive optics based optical microscopy for deep-tissue imaging. *Frontiers in Physics*, 9 :138, 2021.

Chapitre 1

Optique adaptative pour la microscopie de fluorescence

Sommaire

1.1	Introduction	10
1.2	Rappels sur les aberrations	14
1.2.1	Définition des aberrations géométriques	14
1.2.2	Description des aberrations	16
1.3	De la mesure de front d'onde à l'optique adaptative	19
1.3.1	Mesure de front d'onde	19
1.3.2	Correction du front d'onde	21
1.4	L'optique adaptative pour la microscopie	24
1.4.1	Les méthodes indirectes	24
1.4.2	Utilisation d'un analyseur de type Shack-Hartmann	27
1.4.3	Limitation de l'OA en microscopie	30
1.5	Conclusion	31

1.1 Introduction

La microscopie tient dans son étymologie le mot « examiner », l'objectif de ce domaine de la physique est d'étudier des échantillons plus petits que la limite de résolution de l'œil qui ne résout que jusqu'à 50 μ m. Mais quelles sont les conditions qui permettent d'examiner correctement des échantillons? En premier lieu, nous pouvons penser à l'illumination ou à la préparation de l'échantillon. En réalité pour étudier correctement ces échantillons, il faut avant tout les voir nets, c'est-à-dire voir de manière distincte les zones d'intérêt sur l'image formée par le microscope et être capable de résoudre ce que l'œil ne peut pas percevoir.

Pour réaliser une image avec un système optique dans le cadre de l'optique géométrique, on se place généralement dans les conditions de Gauss. En d'autres termes, nous faisons l'hypothèse de travailler avec de petits angles et des rayons qui respectent l'approximation paraxiale. Dans ces conditions, il y a stigmatisme et aplanétisme.

Définition 1.1, Stigmatisme

Tout rayon issu d'un point objet A passe, après avoir traversé un système optique, par un seul et unique point A' . A' est l'image de A et les deux points sont dits conjugués.

Définition 1.2, Aplanétisme [1]

Pour tout système qui possède un axe de symétrie, défini comme l'axe optique, l'aplanétisme est la propriété de conservation du stigmatisme dans un plan de front perpendiculaire à cet axe.

Par application de ces définitions nous pouvons prédire qu'à travers un système d'imagerie un objet ponctuel a pour image un point.

Un microscope est un système d'imagerie qui se compose de trois éléments majeurs. Tout d'abord l'objectif, qui est un assemblage de lentilles caractérisé par son grandissement et son ouverture numérique. Cet objectif conjugue l'échantillon, via le second élément nécessaire, la lentille de tube, à son image sur un détecteur, par exemple une caméra, troisième et dernier élément. Ce dernier permet l'acquisition de l'image.

La réponse impulsionnelle du microscope aussi appelée fonction d'étalement du point (PSF pour "Point Spread Function") définit la limite de résolution pour un point. Un système d'imagerie classique permet de résoudre deux points dès lors qu'ils sont éloignés d'une distance supérieure à la limite de diffraction d'après le critère de Rayleigh. Nous considérerons ces "systèmes à la limite de diffraction" comme des systèmes dans leurs conditions nominales. Grâce aux travaux de Ernst Abbe [2], la limite de diffraction se définit pour une pupille circulaire par :

$$d_{x,y} = \frac{1.22\lambda}{2ON} \quad (1.1)$$

Où λ est la longueur d'onde considérée et ON l'ouverture numérique de l'objectif¹. Pour un système typiquement utilisé en microscopie de fluorescence à $\lambda = 500\text{nm}$ et

1. On utilise aussi la fréquence de coupure (f_c) comme notation définie par $f_c = \frac{1}{d_{x,y}}$

$ON = 1$ la limite de diffraction est donc de 305nm.

Pour un microscope fonctionnant dans ses conditions nominales chaque objet est donc résolu à la limite de diffraction et forme une tache d'Airy. Une manière commune d'évaluer la qualité d'un microscope est le rapport de Strehl effectué sur des billes plus petites que la PSF du microscope, ceci permet d'évaluer la répartition d'énergie à l'intérieur d'une tache d'Airy.

Définition 1.3, Rapport de Strehl

Il correspond au rapport entre le pic d'intensité d'une PSF expérimentale et d'une PSF théorique de ce même système optique, s'il était limité par la diffraction. Par conséquent il varie de 0 à 1.

Cependant les conditions ne sont pas toujours réunies pour obtenir un rapport de Strehl égal à 1. En effet, d'une part les objectifs actuellement utilisés en imagerie à haute résolution ont des ouvertures numériques très grandes et ne respectent plus les hypothèses de l'approximation paraxiale. D'autre part, ils sont corrigés uniquement pour leur milieu d'immersion (air, eau ou huile). En dehors de ces milieux les conditions nominales ne sont plus respectées. Par conséquent les objectifs très ouverts utilisés actuellement qui permettent une haute résolution sur un grand champ de vue sont très rapidement sensibles aux écarts à la configuration nominale pour laquelle ils ont été conçus comme on peut le voir sur la figure 1.1

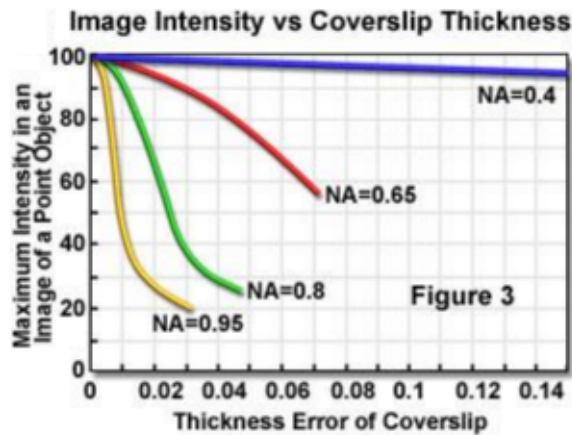


FIG. 1.1 Évolution du maximum d'intensité en fonction de l'erreur sur l'épaisseur de la lamelle corrigée par les objectifs pour des ouvertures variées (extrait de [3])

Au-delà de ces éléments spécifiques à l'objectif, l'utilisation d'échantillons biologiques et, *a fortiori* l'imagerie *in vivo*, sont une source importante de variabilité d'indices optiques. En définitive, un objectif de microscope n'est pas corrigé pour ce type d'échantillon, il en résulte une qualité d'image dégradée. Ce sont les aberrations.

Définition 1.4, Aberrations

Défaut qui altère la qualité des images données par un système optique^a.

^a. Définition selon Larousse en ligne, mars 2021

Les aberrations vont déformer le front d'onde sphérique émis par le point source comme représenté sur la figure 1.2.

Définition 1.5, Front d'onde

Surface dont les points sont en phase. Géométriquement cela correspond à l'ensemble des points perpendiculaires aux rayons de propagation issus d'une source. Pour une source de lumière ponctuelle à distance finie le front d'onde est sphérique. Dans le cas d'une source à l'infini le front d'onde est plan.

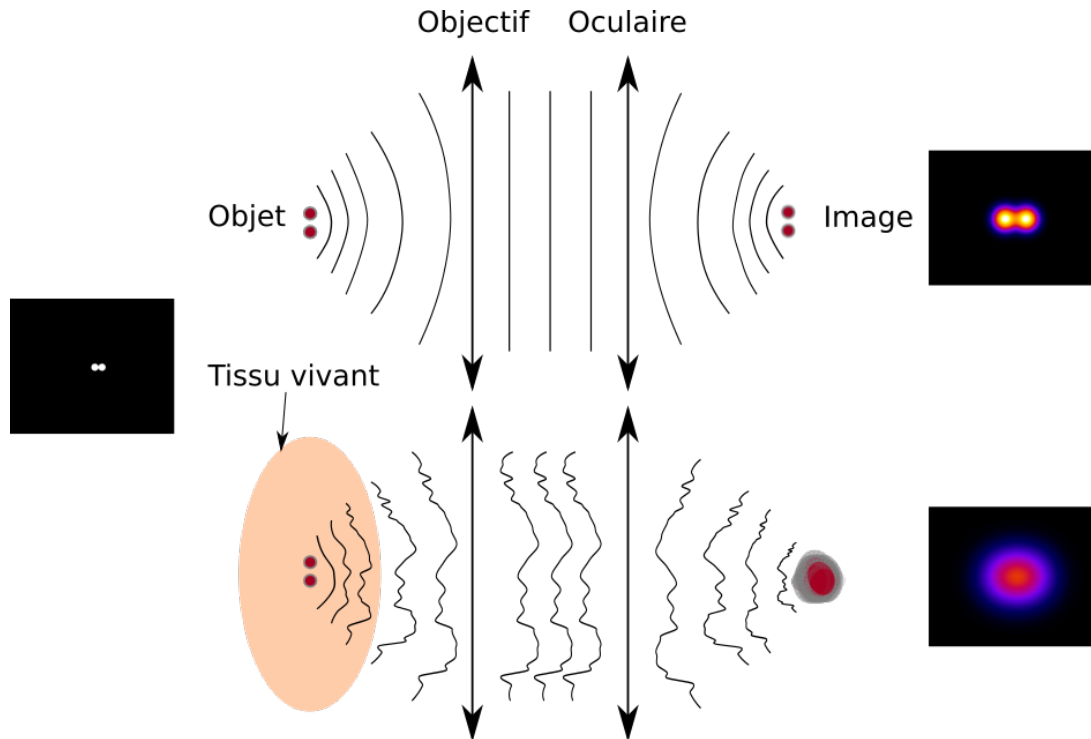


FIG. 1.2 Illustration de la dégradation de la qualité de l'image de deux points dans un tissu vivant pour deux objets ponctuels proches de la limite de résolution du microscope

En s'écartant des conditions nominales du microscope, un objet ponctuel deviendra une tache étendue à cause de la déformation du front d'onde. Il résulte d'une image issue d'un milieu aberrant une résolution dégradée. Toutefois ce n'est pas la seule grandeur caractéristique que l'on peut mesurer d'une image. La qualité de l'image va se caractériser par sa netteté. Plusieurs paramètres quantitatifs permettent d'évaluer la qualité de l'image d'un échantillon, tout d'abord le rapport signal sur fond (SBR).

Définition 1.6, SBR (signal-to-background ratio)

On le définit comme le rapport du maximum d'intensité du signal provenant du plan de mise au point sur le signal issu des plans hors du plan de mise au point :

$$\text{SBR} = \frac{\text{Max}(img)}{\text{Mean}(hors\ focus)}$$

où Max est une fonction qui détermine le maximum d'intensité, Mean la moyenne "hors focus" de la zone d'intérêt.

Il existe également un critère de variation d'intensité entre deux zones d'une image pour les comparer, le contraste.

Définition 1.7, Contraste

Rapport de la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale d'intensité sur la somme des deux. On estime généralement le contraste le long de profils, un bon contraste étant égal à 1.

$$\text{Contraste} = \frac{Max - Min}{Max + Min}$$

Avec Max le maximum d'intensité et Min le minimum d'intensité dans l'image.

Les échantillons biologiques observés en microscopie sont composés d'une multitude d'éléments variés et donc possèdent des indices optiques différents (figure 1.3).

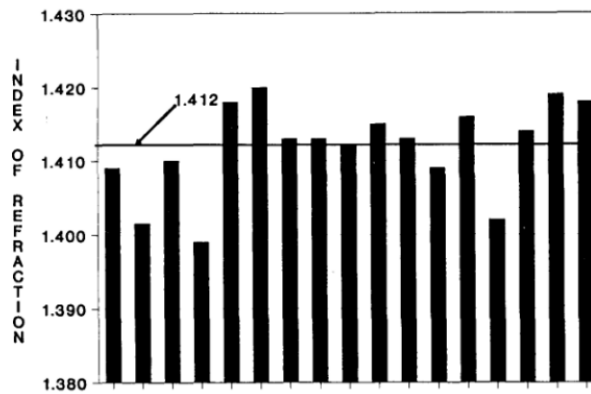


FIG. 1.3 Indices optiques mesurés pour 17 échantillons de muscle bovin (d'après [4])

En plus de ces variations d'indice optique entre celle du milieu d'immersion de l'objectif et celle d'un tissu, à l'intérieur même d'un tissu on observe un indice optique inhomogène [5, 6, 7, 8].

La traversée des rayons lumineux avant d'arriver à l'objectif se fait le long de milieux d'indices optiques différents [9]. Il en résulte une perte en contraste, en sensibilité et en résolution à cause des déformations subies par le front d'onde [10, 11].

La figure 1.4 représente un exemple d'une bille fluorescente de $2\mu\text{m}$ imagée dans les conditions nominales du microscope et à travers une tranche de cerveau de souris de $75\mu\text{m}$ d'épaisseur. L'image est moins résolue et moins contrastée du fait, en partie, des aberrations à la traversée de la tranche de cerveau et des aberrations résiduelles du microscope.

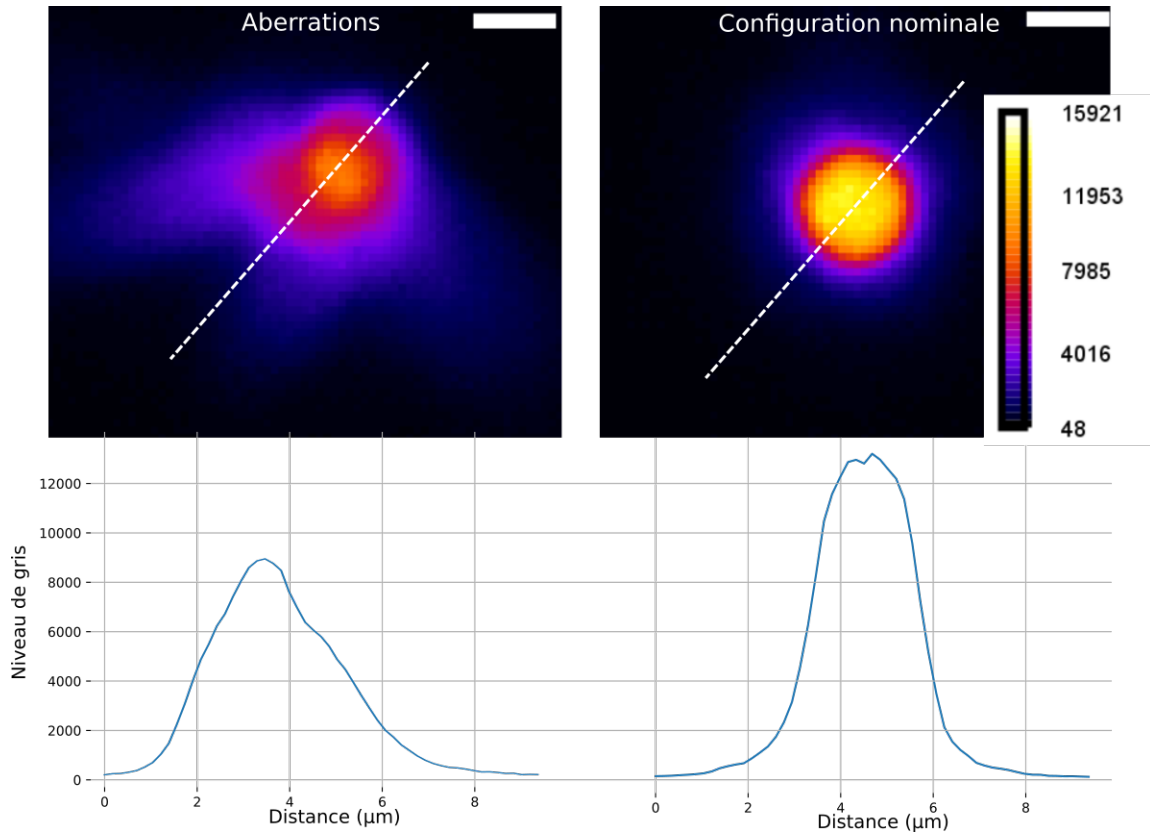


FIG. 1.4 *Bille fluorescente ($2\mu\text{m}$) sous $75\mu\text{m}$ d'une tranche de cerveau de souris + aberration résiduelles microscope (gauche), bille sous lamelle de microscope (droite), barre d'échelle : $2\mu\text{m}$*

Pour permettre une imagerie de meilleure qualité dans les échantillons biologiques, il est nécessaire de comprendre et de quantifier les aberrations afin de pouvoir les corriger et rétablir la qualité d'image à la limite de diffraction.

Ce chapitre a pour objectif de définir comment se quantifient les aberrations grâce à la mesure de front d'onde, depuis son historique jusqu'à ses limites. Puis la problématique de la correction des aberrations en imagerie biologique et l'approche originale proposée dans cette thèse sont introduites, définies et caractérisées.

1.2 Rappels sur les aberrations

Les aberrations peuvent se diviser en deux catégories, les aberrations chromatiques et les aberrations géométriques. Les aberrations chromatiques sont dues à la variation de l'indice optique des matériaux en fonction de la longueur d'onde, la dispersion. Dans le cas de cette étude, nous considérons les aberrations géométriques qui résultent des écarts aux conditions de Gauss à une longueur d'onde donnée.

1.2.1 Définition des aberrations géométriques

Lorsque les conditions de Gauss ne sont plus valables, avec des angles importants des rayons par rapport à l'axe optique ou bien trop éloignés de celui-ci, les aberrations deviennent importantes. Les aberrations sont la conséquence d'une propagation de

la lumière dans un milieu dont l'indice optique est hétérogène. Si on considère des rayons issus d'une source ponctuelle à l'infini comme indiquée sur la figure 1.5, les variations d'indice induisent des changements de direction de propagation des rayons et vont perturber le front d'onde. L'aberration se mesure comme la distance entre la surface aberrante et la surface parfaite de référence (front d'onde sphérique par exemple).

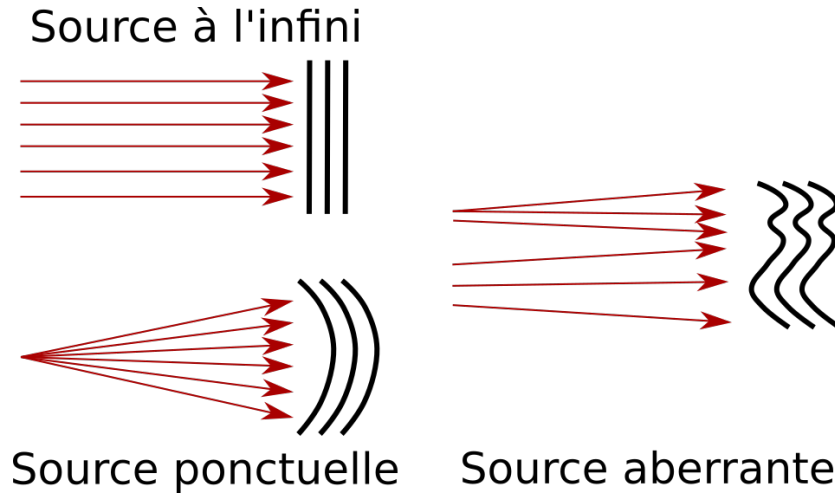


FIG. 1.5 Représentation des aberrations au sens géométrique

Cette distance, notée Δ ou $n\Delta$ si on considère le chemin optique, va élargir le point où convergeraient, idéalement, les rayons. Dans un système d'imagerie cet élargissement conduit à une dégradation de la résolution spatiale comme vu dans l'introduction figure 1.4. Cette distance est généralement d'autant plus importante que l'on s'éloigne de l'axe optique et donc des conditions de Gauss. De même, elle est d'autant plus importante que le nombre de milieux traversés est grand. Au changement de milieu il y a conservation du chemin optique d'après le théorème de Gouy, on en déduit donc :

$$n_m \Delta_{tot} = \sum_{i=1}^m n_i \Delta_i \quad (1.2)$$

où n_m est l'indice optique du dernier milieu, Δ_{tot} l'écart total, n_i l'indice du milieu considéré et Δ_i l'erreur induite par la surface i . En conséquence plus il y a de surfaces plus Δ est susceptible d'évoluer.

Cette différence entre la position sans et avec aberration peut être calculée via la théorie géométrique des aberrations réalisée par SEIDEL [12] où l'analyse se fait entre la pupille de sortie du système optique et l'écran (voire figure 1.6).

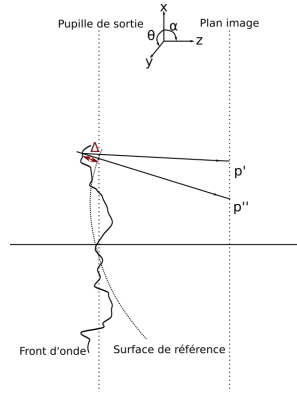


FIG. 1.6 Illustration d'une surface d'onde aberrante et la surface de référence dans la pupille de sortie d'un système optique. Un point source émet une onde sphérique à travers le système. L'écart à la surface de référence est donnée par Δ la distance perpendiculaire entre les deux surfaces.

Dans le cadre de la théorie de la diffraction, l'écart au front d'onde théorique à la traversée d'un système optique est déterminé par les relations de NIJBOER issue de la théorie de NIJBOER-ZERNIKE[13] :

$$\begin{aligned} dx' &= \frac{\partial \Delta}{\partial \alpha} \frac{\cos \theta}{\cos \alpha} - \frac{\partial \Delta}{\partial \theta} \frac{\sin \theta}{\sin \alpha} \\ dy' &= \frac{\partial \Delta}{\partial \alpha} \frac{\sin \theta}{\cos \alpha} + \frac{\partial \Delta}{\partial \theta} \frac{\cos \theta}{\sin \alpha} \end{aligned} \quad (1.3)$$

où x et y sont les positions de l'image et dx' et dy' représentent les écarts à la position sans aberrations, θ et α les angles utilisés dans les coordonnées sphériques.

1.2.2 Description des aberrations

Comme on l'a précédemment vu, les aberrations sont à l'origine d'une dégradation de la qualité des images et afin de les corriger, il est tout d'abord nécessaire de les quantifier de manière précise. Dans un premier temps, en prenant en considération la symétrie cylindrique des systèmes optiques utilisés, on peut quantifier les aberrations grâce aux coefficients de Seidel et ainsi obtenir ce qu'on appelle les aberrations du troisième ordre que sont : l'aberration sphérique, la coma, l'astigmatisme, la courbure de champ et la distorsion. Dans un second temps, le formalisme de Zernike permet non seulement de représenter les aberrations du troisième ordre mais aussi celles d'ordres plus élevés [14].

Polynômes de Zernike

Une méthode classique pour représenter les aberrations est d'utiliser les polynômes de Zernike (de F. ZERNIKE, prix Nobel 1953 pour l'invention du microscope à contraste de phase). Ceux-ci permettent de décrire les aberrations en utilisant une base propre dans le cercle unité, donc pour une pupille circulaire. Nous pouvons ainsi décomposer les aberrations sur cette base. Les polynômes radiaux sont de la forme :

$$R_n^m(u) = \sum_{s=0}^{\frac{n-m}{2}} \frac{(-1)^2(n-s)!}{s! \left(\frac{n+m}{2} - s\right)! \left(\frac{n-m}{2} - s\right)!} u^{n-2s}$$

avec $R_n^n(1) = 1$ $R_n^n(u) = u^n$

Desquels se déduisent les polynômes circulaires de Zernike :

$$Z_n^m(u, \theta) = \left[\frac{2(n+1)}{1 + \delta_{m0}} \right]^{1/2} R_n^m(u) \cos m\theta \tag{1.4}$$

où δ_{ij} est le symbole de Kronecker ($\delta_{ij} = 1 \Leftrightarrow i = j$ et $i \neq j \Rightarrow \delta_{ij} = 0$).

Le développement dans cette base orthogonale amène des propriétés intéressantes. Tout d'abord les coefficients c_{nm} représentent l'écart-type de l'erreur du front d'onde sur la pupille pour une aberration donnée. Ils peuvent être tous obtenus par la relation suivante :

$$c_{nm} = \frac{1}{\pi} \int_0^1 \int_0^{2\pi} \Delta(u, \theta) Z_n^m(u, \theta) u du d\theta \tag{1.5}$$

Une partie des polynômes de Zernike $Z_n^m(u, \theta)$ couramment utilisés est donnée dans le tableau 1.1 où il est également possible d'obtenir les valeurs pour les coefficients azimutaux négatifs en remplaçant le cosinus par un sinus dans chacun des polynômes circulaires.

$Z_0^0(u, \theta) = 1$	Piston
$Z_1^1(u, \theta) = 2u \cos \theta$	Tilt 0°
$Z_2^0(u, \theta) = \sqrt{3}(2u^2 - 1)$	Courbure de champ
$Z_2^2(u, \theta) = \sqrt{6}u^2 \cos(2\theta)$	Astigmatisme 0°
$Z_3^1(u, \theta) = \sqrt{8}(3u^3 - 2u) \cos \theta$	Coma 0°
$Z_4^0(u, \theta) = \sqrt{5}(6u^4 - 6u^2 + 1)$	Aberration sphérique 3ème ordre

TABLE 1.1 Quelques polynômes de Zernike usuels

Il est également possible de les représenter sous la forme d'une pyramide ordonnée verticalement par ordre radial et horizontalement par ordre azimutal (figure 1.7).

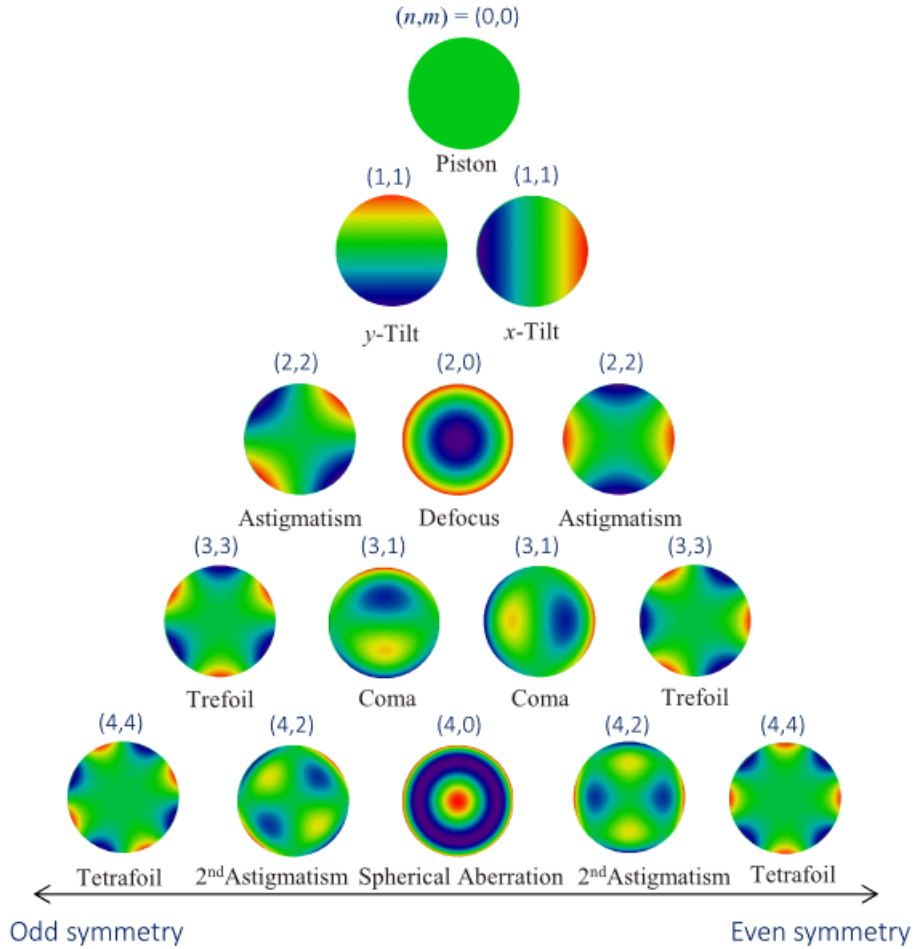


FIG. 1.7 Représentation des coefficients des premiers coefficients de Zernike en pyramide. D'après [15]

Dans la suite de cette thèse nous exprimerons les valeurs des coefficients de Zernike pour différentes aberrations en micromètres voire en nanomètres ou bien en proportion de la longueur d'onde.

Critères et paramètres d'évaluation d'une aberration

La mesure d'un nombre de modes finis des polynômes de Zernike permet d'estimer les aberrations. La déformation totale du front d'onde peut s'exprimer en microns ou en proportion de la longueur d'onde λ en utilisant la moyenne quadratique (ou RMS).

Définition 1.8, Moyenne quadratique (RMS)

Racine carrée de la moyenne arithmétique du carré des valeurs :

$$x_{\text{RMS}} = \sqrt{\frac{1}{n}(x_1^2 + x_2^2 + \dots + x_n^2)}$$

On utilise également comme critère de mesure du front d'onde la valeur de crête (PV : Peak-to-Valley)

Définition 1.9, Valeur de crête (PV)

Elle représente la valeur maximale de l'ensemble des données qui servent à calculer le RMS. On considère ici le PV comme la valeur crête à crête qui correspond à la différence entre la valeur maximale et la valeur minimale.

Pour relier ces paramètres à un critère d'évaluation d'un système optique il a été établi en 1879 par RAYLEIGH qu'une erreur de front d'onde de $\lambda/4$ en bords de pupille dans le cas de l'aberration sphérique avait pour conséquence une diminution de l'illumination de 20% au centre de la tache d'Airy, en d'autres termes cela induit un rapport de Strehl de 0.8, avec, de plus, une déformation de la tache d'Airy [13]. En 1947, le travail d'A. MARÉCHAL a permis de généraliser le critère de Rayleigh aux aberrations d'ordre supérieur en reprenant la considération qu'un système optique n'est pas suffisamment corrigé des aberrations si le rapport de Strehl du système optique est inférieur à 0.8 [16]. Le critère de Maréchal se définit ainsi :

$$\sigma_{\Delta_{tot}} \leq \frac{\sqrt{0.2\lambda}}{2\pi} \sim \frac{\lambda}{14}$$

où $\sigma_{\Delta_{tot}}$ est l'écart type de la PSF aberrante.

La transformée de Fourier de l'image permet également de mesurer l'écart à la limite de diffraction. Les aberrations dégradent le contraste alors que la fréquence de coupure absolue du système reste inchangée. Ainsi, la fréquence de coupure expérimentale paraît plus basse comme visible en figure 1.8. En particulier on peut même observer dans la transformée de Fourier des valeurs négatives sur des plages de fréquences ce qui induit des inversions de contraste [17].

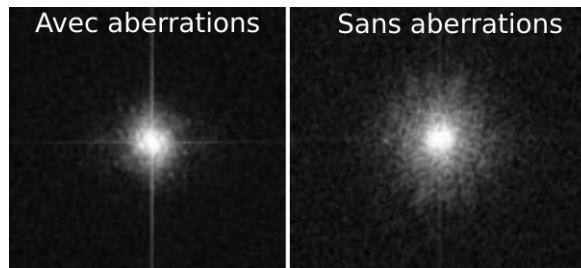


FIG. 1.8 *Influence des aberrations sur la transformée de Fourier d'une image, (gauche) Aberrations présentes, (droite) Sans aberrations*

1.3 De la mesure de front d'onde à l'optique adaptative

1.3.1 Mesure de front d'onde

L'analyse du front d'onde est utilisée depuis de nombreuses années pour différents usages (astronomie, microscopie, métrologie...). L'évaluation des aberrations est utile pour la caractérisation d'éléments optiques, leur conception ou bien la compensation de ces aberrations via un élément adaptatif, par exemple un miroir déformable (DM) ou un modulateur spatial de lumière (SLM), pour retrouver le signal et la résolution de l'image à la limite de diffraction.

Introduction historique

Depuis plus d'un siècle la mesure des aberrations a été la préoccupation de nombreux opticiens que ce soit en astronomie, microscopie ou métrologie. Pour caractériser des lentilles, on peut par exemple observer un faisceau non-aberrant de lumière collimaté ou divergent au travers de cet élément. Le front d'onde émergent sera alors composé des aberrations propres de l'élément à observer. Depuis les années 1970, de nombreuses méthodes ont été développées pour quantifier la déformation d'un front d'onde. Nous pouvons citer en exemple les développements faits en interférométrie, ou bien en utilisant un analyseur de type Shack-Hartmann (SH) ou encore un analyseur de courbure [18, 19, 20].

Les méthodes interférométriques utilisent des interféromètres variés comme Michelson, Mach-Zehnder, ou Shearing pour évaluer la différence de phase. C'est une méthode encore couramment utilisée aussi bien en astronomie qu'en ophtalmologie [21].

L'utilisation d'un SH est très courante en astronomie, en microscopie ou en ophtalmologie [22, 23]. Elle est issue d'un premier développement en 1900 de J. HARTMANN qui proposa l'utilisation d'un masque composé de trous à placer sur l'ouverture d'un télescope [24]. Le masque induit une série de taches sur l'écran. L'étude sur cette nouvelle image des positions des taches par rapport à leurs positions théoriques issues des trous permet d'évaluer la qualité optique [25]. En 1971, R. SHACK décida d'utiliser un masque composés non plus de trous mais de lentilles afin de mesurer les aberrations de la lumière incidente [19]. Cela a pour premier effet d'optimiser la quantité de lumière reçue et de pouvoir enregistrer le signal sur un détecteur. Aujourd'hui, un grand nombre d'applications utilisent un SH dans d'autres domaines, depuis la physique des lasers de haute puissance jusqu'à l'ophtalmologie ou la microscopie. Cette méthode est utilisée pour sa rapidité d'exécution et son optimisation de la quantité de lumière reçue.

Principe de la mesure de front d'onde avec un analyseur de Shack-Hartmann

Les premiers développements de l'analyseur de Shack-Hartmann sont issus de travaux en astronomie, ils utilisent directement la lumière issue d'une étoile suffisamment intense pour mesurer les aberrations à la traversée de l'atmosphère. Autrement, un puissant faisceau laser mitoyen à l'analyseur est dirigé vers le ciel, se réfléchit sur la ionosphère pour créer une étoile artificielle, une source de photons intarissable. Cette source est imagée sur le SH qui se compose d'une matrice de microlentilles et d'un capteur (CCD ou CMOS) au foyer de cette matrice, représenté figure 1.9.

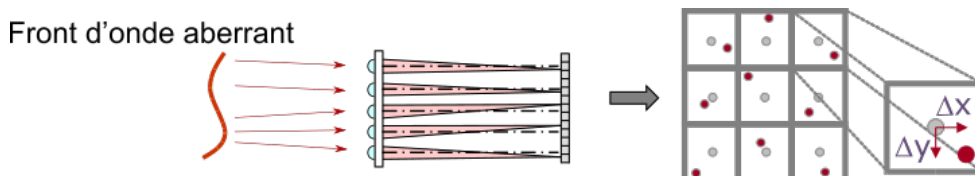


FIG. 1.9 Illustration du principe de fonctionnement d'un analyseur de Shack-Hartmann

Un point source idéal émettra un faisceau divergent ou collimaté sans aucune aberration et donc un front d'onde sphérique ou plan. La matrice de microlentilles est placée dans le plan conjugué de la pupille de sortie du système optique. Le front

d'onde est échantillonné par la matrice de microlentilles. Ceci implique que le faisceau dans la pupille de sortie est décomposé par les microlentilles et donne donc le même nombre de nouveaux faisceaux. Chacun de ceux-ci converge alors en un point image sur le capteur (points gris sur la figure 1.9).

En revanche, s'il y a des aberrations, le front d'onde est déformé. Lors de l'échantillonnage de la pupille, il existe alors une déformation locale. Ceci engendre un déplacement latéral de la tache (points rouge sur la figure 1.9). On peut alors mesurer ce déplacement avec un algorithme, typiquement de recherche de barycentre (Δx , Δy sur la figure 1.9). Cette mesure est directement reliée à la pente locale du front d'onde, donc à la dérivée de celui-ci.

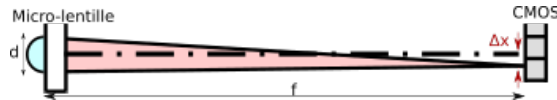


FIG. 1.10 Zoom sur une microlentille d'un analyseur de Shack-Hartmann

On peut ainsi reconstituer le front d'onde avec une précision imposée par d'une part l'échantillonnage des microlentilles et, d'autre part, la localisation des taches. La précision de mesure absolue des SH développés aujourd'hui par Imagine Optic est typiquement de l'ordre de $\lambda/100$.

Les aberrations une fois quantifiées peuvent être corrigées afin de retrouver les performances de configuration nominale du système optique. Pour ce faire, l'optique adaptative combine l'analyseur de front d'onde à un modulateur de front d'onde.

1.3.2 Correction du front d'onde

L'optique adaptative (OA) a été initialement développée pour des applications en astronomie dans les années 50 [26] puis mise en pratique quelques années après [27]. Le principe d'une boucle d'optique adaptative est résumé dans la figure 1.11 où un élément déformable, un miroir déformable (DM) ou modulateur spatial de lumière (SLM), permet de modifier le front d'onde pour compenser les aberrations.

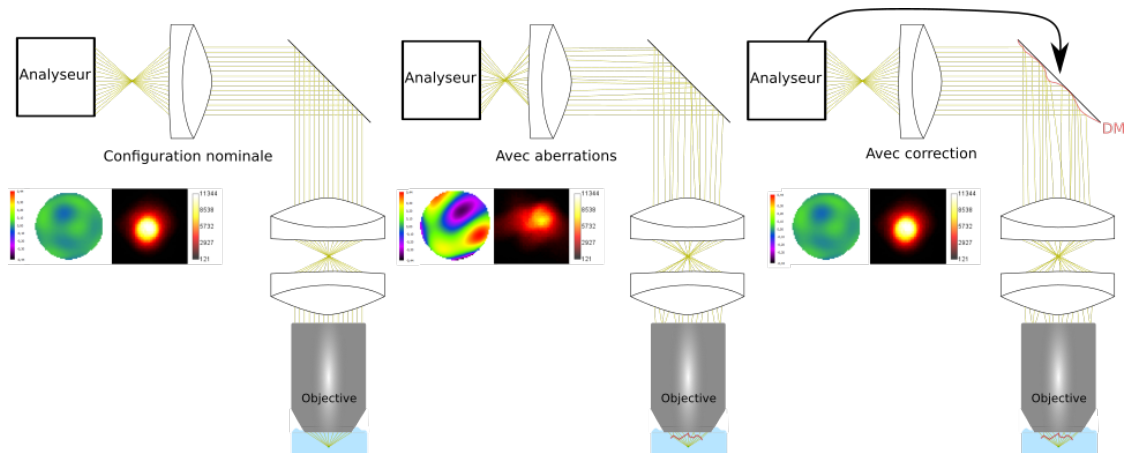


FIG. 1.11 Fonctionnement d'une boucle d'optique adaptative

Nous verrons dans cette section les éléments qui composent une boucle et comment elle peut-être implémentée en microscopie.

Le modulateur de phase

Un SLM est une matrice de cristaux liquides. En fonction du courant émis dans le dispositif, l'indice optique est modifié et peut donc induire un retard sur la phase du faisceau réfléchi. C'est un dispositif qui offre d'excellentes sensibilité et résolution de déformation mais qui nécessite de polariser linéairement la lumière. Dans le cas de la microscopie de fluorescence par exemple, ce n'est pas efficace car la lumière émise n'est pas polarisée.

Le DM est composé d'une membrane réfléchissante souple ou d'un ensemble de micro-miroirs que vont venir déformer des actuateurs. Les dimensionnements varient selon les tailles de la membrane, le nombre d'actuateurs et la technologie de ces derniers. La déformation peut se faire de manière mécanique ou par induction suivant l'amplitude et la rapidité désirée. Cette technologie offre une très grande rapidité d'action, est indépendante de la polarisation et la membrane possède un plus grand facteur de réflexion qu'un SLM.

Pour ces dernières raisons, dans le cadre de cette thèse nous ne traiterons que de l'utilisation d'un DM car c'est le type de modulateur de phase que nous avons utilisé.

Optique adaptative en boucle fermée avec un SH

La méthode qui paraît la plus pratique pour corriger un front d'onde nécessite un couple analyseur de front d'onde et modulateur de phase. Pour moduler un front d'onde, il est important de se placer dans le plan désiré. La mesure des aberrations se fait, dans la plupart des cas, dans un plan pupillaire du système optique, la correction se fait donc dans un plan conjugué de celui-ci. Ainsi, il y a dans cette configuration un couple de lentilles entre le modulateur de phase et l'analyseur.

On utilise une boucle de rétroaction entre l'analyseur de front d'onde et le miroir placé en amont. A chaque mesure l'analyseur va évaluer l'influence sur le front d'onde de la forme prise par le miroir. L'objectif est de minimiser la valeur RMS du front d'onde au cours des étapes de la boucle d'OA.

Pour contrôler les déformations du miroir il faut absolument procéder à une étape d'étalonnage. Pour cela on utilise une bille considérée comme ponctuelle par le SH. Au lancement de l'étalonnage, un front d'onde de référence est pris, puis les actuateurs vont effectuer un à un des mouvements qui vont pousser et tirer sur la membrane afin de la déformer. Les fronts d'onde correspondants sont enregistrés par le SH et forment une base propre du miroir appelée matrice d'interaction, qui correspond aux relations entre la déformation des actuateurs et leur influence sur le front d'onde. Cette matrice est ensuite inversée pour donner naissance à la matrice de commande, qui correspond à des formes de miroir qui constituent sa base propre liée à sa géométrie. Les 12 premiers modes de cette base sur les 52 possibles sont montrés en figure 1.12. Cette base ne coïncide en général pas avec la base de Zernike mais s'en approche.

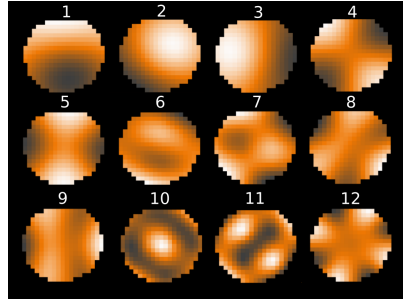


FIG. 1.12 Modes de miroir de 1 à 12 pour le Mirao52-e (Imagine Optic) après étalonnage

En conséquence de la figure 1.12, nous voyons que les modes de miroirs ne sont pas exactement équivalents aux Zernike, par exemple les équivalents de l'astigmatisme n'ont pas des angles de 0 et 45 degrés. De plus, la numérotation n'est pas la même donc corriger le mode 8 du miroir n'a rien à voir avec l'aberration sphérique, mode 8 de Zernike.

La boucle en mesure directe a pour objectif de minimiser un critère tel que le RMS des aberrations. Il est possible de déterminer le nombre de modes de miroirs utilisé. Plus le nombre de modes est élevé, plus la correction va prendre en considération des modes hautes fréquence. En effet, la figure 1.12 montre que le mode 12 est de plus haute fréquence spatiale que les modes précédents.

La correction d'aberrations hautes fréquences permet d'étendre la qualité de l'image sur des détails plus fins. Toutefois cela peut entraîner des instabilités dues au bruit et générer une divergence de la boucle. En revanche, utiliser peu de modes risque d'apporter une correction insuffisante en terme de gain sur les fréquences spatiales. Il faut donc trouver un compromis sur le nombre de modes de miroir pour une correction stable sur un nombre suffisant de modes de Zernike.

Un autre paramètre important d'une boucle est le coefficient multiplicatif aux corrections envoyées au miroir, le gain. En d'autres termes il représente la dynamique en amplitude des corrections envoyées. Un gain fort permet une correction rapide mais induit de très fortes variations à la mesure qui participent à une possible instabilité en altérant la sensibilité de mesure. A l'inverse un gain trop faible peut converger trop lentement voire ne pas converger et n'apporte pas d'intérêt dans ce cas là.

La mesure indirecte

Des méthodes basées sur l'image et sans besoin d'un analyseur ("Sensorless") ont été utilisées afin de corriger les aberrations [21]. Pour cela, des formes de miroir (dans le cas d'un DM) sont appliquées afin de maximiser un facteur de mérite basé généralement sur l'intensité mais qui est variable. Ce critère est défini selon les besoins et le contenu de l'image à partir d'une quantité mesurable [28, 29, 30]. Une méthode usuelle consiste à appliquer au modulateur de phase pour chaque mode de Zernike une variation d'amplitude et à maximiser pour chaque aberration le critère de mérite. Cette technique, itérative, est donc coûteuse à la fois en temps et en photons.

Elle est néanmoins très utilisée pour sa facilité d'implémentation même si la définition d'un critère pertinent peut-être délicate.

La figure 1.13 illustre la différence entre une mesure directe et indirecte.

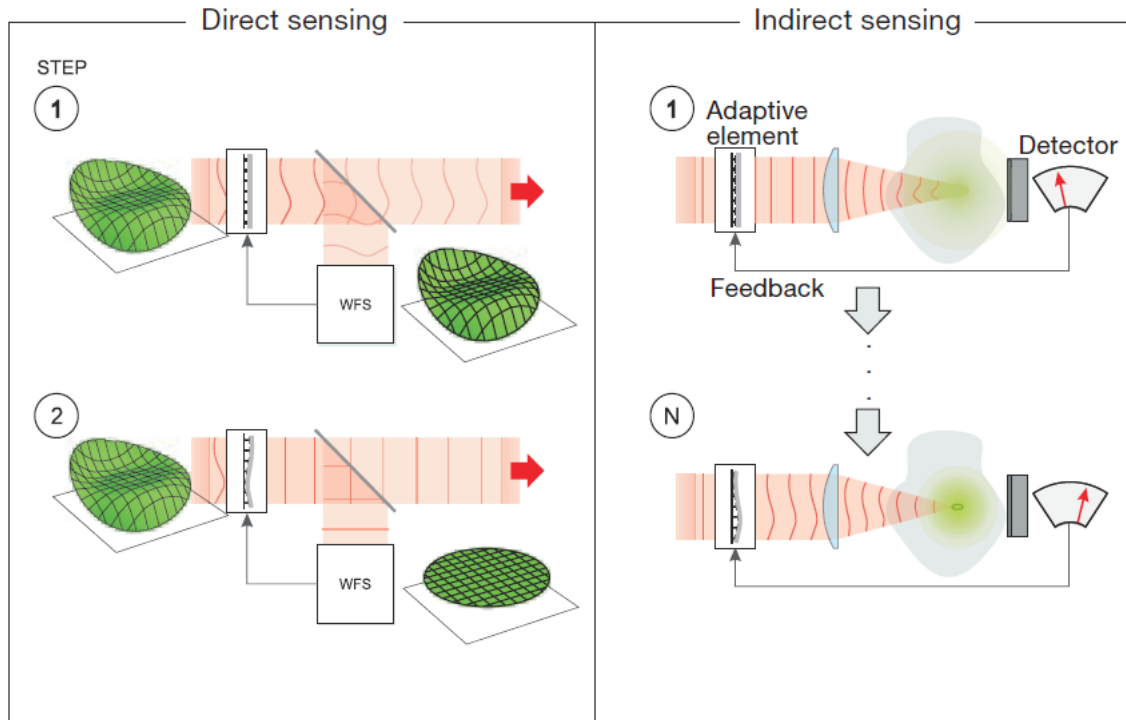


FIG. 1.13 Différence entre mesure directe et mesure indirecte².

Nous avons vu les différentes manières de mesurer et de corriger les aberrations dans les systèmes optiques. D'abord implémentées en astronomie, nous allons ici décrire leur application en microscopie et prenant en considération le cahier des charges de ce domaine.

1.4 L'optique adaptative pour la microscopie

Au cours des dernières décennies l'OA a démontré une capacité à augmenter le signal et la résolution dans les microscopes pour l'imagerie du vivant ; en particulier lors de l'observation en profondeur dans les tissus [31], [32].

Bien que de nombreux parallèles puissent se faire entre la mesure de front d'onde en microscopie et en astronomie, les contraintes ne sont pas du tout les mêmes, notamment à cause de la photométrie du système et du contenu fréquentiel de l'échantillon. L'intérêt de la correction des aberrations a été mis en évidence pour retrouver les performances de la configuration nominale du microscope en termes de résolutions latérale et axiale grâce aux travaux de M. BOOTH *et al.* en 1998 [33]. En utilisant les méthodes développées initialement pour l'astronomie afin de corriger les turbulences atmosphériques, par analogie, les aberrations induites par l'échantillon ont pu être également corrigées.

1.4.1 Les méthodes indirectes

Du fait des techniques de microscopies courantes déjà lourdes en terme de matériel, la mesure indirecte est très utilisée dans la communauté grâce à sa simplicité d'implémentation.

2. Extrait de Booth et al. Optics and photonics news 2012

L'optimisation modale

Dans un premier temps cette technique indirecte a été nommée comme une analyse de front d'onde modale car elle mesure indirectement purement des modes de Zernike. Cette méthode a été privilégiée car il a été montré qu'en microscopie confocale, seuls les modes de Zernike de bas ordres participent significativement à la dégradation de la PSF [33]. Un premier concept développé par [34] a démontré une méthode itérative avec deux bras optiques induisant chacun un biais selon un mode de Zernike respectivement positif ou négatif puis une comparaison entre les signaux sur les détecteurs afin de déterminer les aberrations présentes dans l'échantillon. Pour un point source, quand le front d'onde est parfait, les aberrations introduites induisent une distorsion égale du front d'onde et les deux taches sont similaires. Dans le cas contraire, une des taches devient plus intense quand l'autre sera davantage dégradée. La soustraction des signaux permet de mesurer l'amplitude de l'aberration. De cette manière, en utilisant cette méthode pour chaque mode de Zernike, il est possible d'obtenir une mesure du front d'onde.

Des configurations pour des implémentations en microscopie à balayage ont été proposées basées sur un système simplifié représenté figure 1.14 ajoutant un modulateur de phase dans les plans I, II ou III afin de corriger les aberrations à l'excitation, à l'émission ou bien dans les deux chemins [35, 36]. Ceci a également été montré sur des microscopes en transmission [37] et des systèmes d'imagerie avec des résultats performants (figure 1.15).

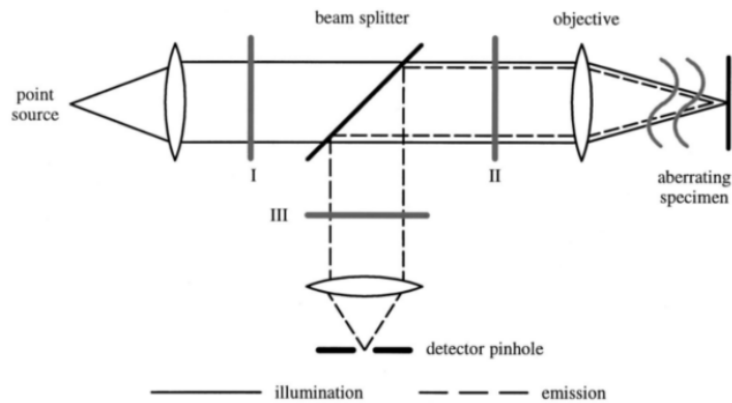


FIG. 1.14 Schéma générique d'un microscope à balayage où les plans I, II et III représentent les plans pupillaires (extrait de [35])

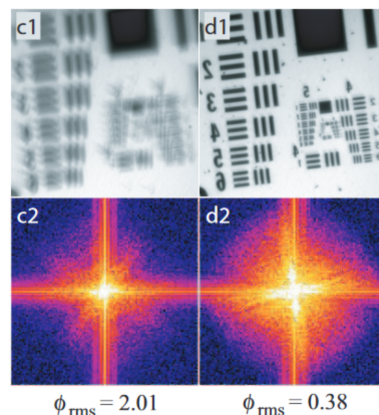


FIG. 1.15 Correction d'une mire USAF et densité spectrale avant correction (gauche) et après (droite) φ est la phase résiduelle. [37]

Finalement ces méthodes ont pu être appliquées à l'imagerie du vivant notamment par D. DÉBARRE et E. BEAUREPAIRE [38, 39, 40] en utilisant l'intensité moyenne de l'image qu'ils ont reliée aux coefficients d'aberrations. Les coefficients optimaux sont alors déduits pour N modes d'aberrations à partir de 3 à 9 mesures par mode suivant la stratégie envisagée.

La méthode dite 3N est représentée en figure 1.16 avec un critère ici basé sur l'intensité dans l'image. Un biais d'une valeur connue est ajouté ou soustrait (points M_{+1} et M_{-1}) et pour les trois points obtenus il est possible de déterminer un maximum local de la courbe en considérant celle-ci comme une parabole.

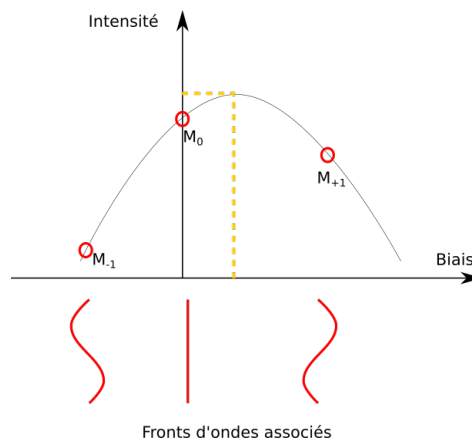


FIG. 1.16 Représentation du fonctionnement d'un algorithme d'optimisation 3N basé sur l'intensité dans l'image

Ceci étant réalisé dans le cadre de la microscopie non-linéaire, donc à balayage, des corrections locales dans un champ restreint et une cartographie des aberrations est possible [41].

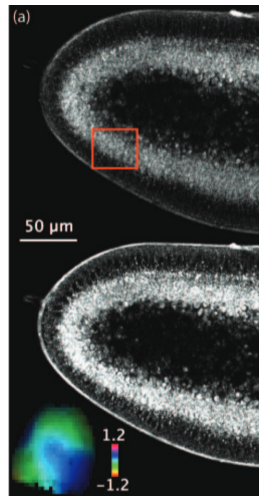


FIG. 1.17 Larve de drosophile en développement sans (haut) et avec (bas) correction à l'excitation, correction sensorless avec phase appliquée indiquée (encart bas-gauche), microscopie non-linéaire, génération de troisième harmonique, (issu de [42])

La segmentation de pupille

N. Ji a proposé une nouvelle méthode de correction en 2010 ([43]) en segmentant la pupille arrière de l'objectif en sous-pupilles conjuguées avec un SLM. Cette méthode ne se base pas sur des coefficients de Zernike mais directement sur l'intensité lumineuse de chaque sous-pupille imagée en maximisant le signal par la modulation de la phase. Pour réaliser cela, la pupille arrière est divisée en sous-pupilles et le déplacement local pour maximiser l'intensité de chaque sous-pupille correspondra à la variation du front d'onde local³. Les sous-pupilles correspondant à une zone du SLM, il est possible de modifier localement le trajet de la lumière pour corriger ce déplacement afin de superposer l'ensemble des sous-pupilles. Cette méthode a montré de très bons résultats pour l'imagerie de tissus fixés en profondeur ainsi qu'en imagerie *in vivo* [44, 45, 46].

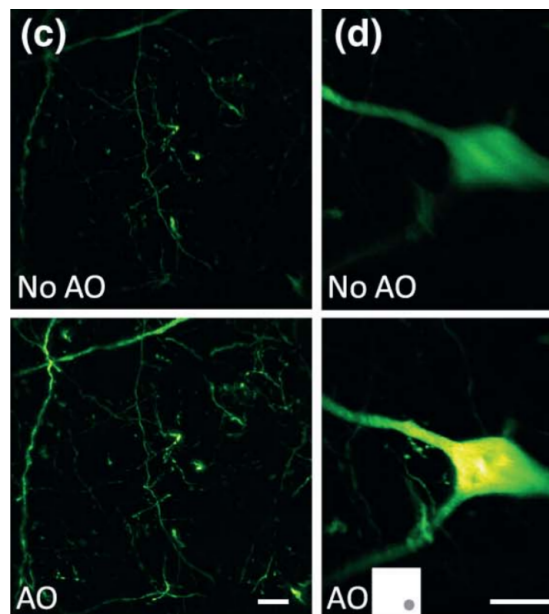


FIG. 1.18 Corrections sur une tranche de cerveau de souris fixée sur 70 μ m d'épaisseur (issu de [45])

1.4.2 Utilisation d'un analyseur de type Shack-Hartmann

Il y a plusieurs difficultés à surmonter pour l'utilisation d'un SH en microscopie. Premièrement, l'étoile guide : comment avoir un point source intarissable en photons comme en astronomie ?

Dans une première expérience, l'équipe de J.L. BEVERAGE et R. SHACK ([47]) a utilisé un SH pour mesurer la PSF 3D d'un microscope à l'aide de billes fluorescentes plus larges que celle-ci. En effet, l'ouverture numérique d'une microlentille est bien plus petite que celle du microscope, une bille de typiquement 10 μ m peut-être utilisée comme source ponctuelle ce qui favorise une émission de fluorescence intense et donc une correction plus robuste. Cette technique a montré des résultats permettant une mesure rapide et efficace de la PSF 3D. Cette méthode a été utilisée pour permettre d'affiner des programmes de déconvolution notamment visible dans [48].

L'utilisation d'un SH a également été référencée pour mesurer les aberrations depuis

3. C'est en cela une analogie de la mesure avec un analyseur de Shack-Hartmann

la lumière rétrodiffusée dans l'échantillon [49]. Pour cela, il est ajouté un diaphragme extrêmement fin dans le but de sélectionner uniquement le signal issu de la profondeur désirée, en d'autres termes, c'est un effet confocal pour limiter le signal de fond qui perturbe la mesure. Néanmoins, dans ces conditions, la lumière traverse à la fois les aberrations à l'aller et au retour ce qui n'est pas le cas de la lumière émise dans l'échantillon.

Pour éviter cet effet, le travail de X. TAO & J. KUBBY a permis l'émergence de techniques de mesure de front d'onde en utilisant des étoiles guides directement dans l'échantillon [50, 51, 52]. L'étoile guide dans [50] est une bille fluorescente de $1\mu\text{m}$ injectée dans l'échantillon. La correction se fait sur une seule bille qui est isolée et la concentration est précisément mesurée afin d'éviter les erreurs liées à de multiples billes sur chaque image de l'analyseur. Cette première preuve de fonctionnement d'un SH en boucle fermée a ouvert la porte à de nombreux développements notamment sur l'étoile guide. Notre équipe au LPEM, en 2011, a d'ailleurs montré des corrections du front d'onde à partir de quantum dots (QDs), des nanoparticules de semi-conducteurs fluorescents, injectés dans des cellules (figure 1.19 bas)[53]. La modularité des QDs fabriqués au laboratoire permet notamment d'avoir des étoiles guides dans des régions spectrales variées et ainsi limiter le photoblanchiment de l'échantillon.

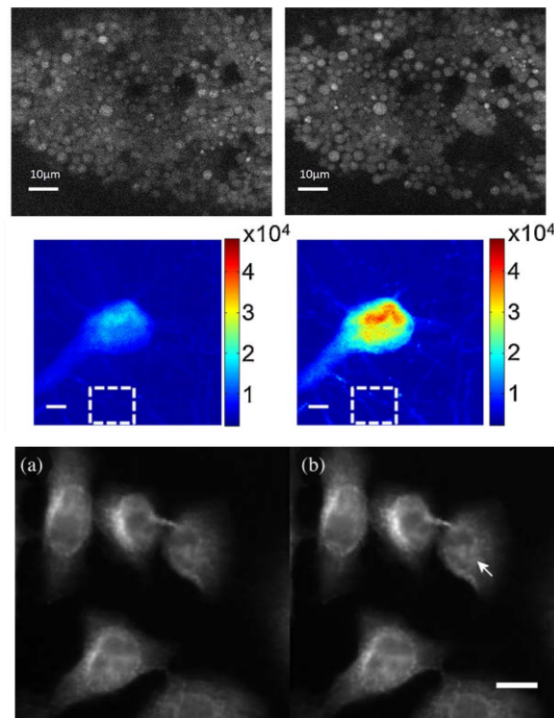


FIG. 1.19 Haut, sans AO/avec AO de l'autofluorescence du vitellus chez la larve de drosophile, microscopie à deux photons, barre d'échelle $10\mu\text{m}$ (issu de [52]), Milieu : sans AO/avec AO sur un corps cellulaire marqué en Yellow Fluorescent Protein (YFP) chez la souris, microscope confocal, barre d'échelle $5\mu\text{m}$ (issu de [51]). Bas : sans AO/avec AO dans des cellules HeLa avec correction sur un QD représenté par la flèche blanche, microscope plein champ, barre d'échelle $10\mu\text{m}$ (issu de [53])

Par la suite, grâce aux possibilités offertes par la diversité des marquages en biologie, des protéines fluorescentes ont été utilisées comme étoiles guides, afin de limiter le caractère invasif pour l'échantillon (figure 1.19 milieu)[51]. La localisation est choisie

astucieusement pour être inférieure à la limite de diffraction d'une microlentille du SH. Les résultats montrent une augmentation d'un facteur 3 du signal avec un rapport de Strehl passant de 0.29 à 0.96 sur des dendrites situées dans un cerveau fixé de souris à 70 μm de profondeur. Puis, l'autofluorescence de l'échantillon a été utilisée dans une configuration de boucle ouverte sur un microscope à deux-photons (figure 1.19 haut) [52]. Cette configuration signifie que le SH est placé avant le miroir, elle est privilégiée afin d'éviter les ajouts d'optiques et d'assurer un nombre de photons suffisants. L'utilisation de l'autofluorescence est rendue possible grâce à l'excitation à deux photons extrêmement localisée qui permet une mesure du front d'onde moins phototoxique pour l'échantillon.

Enfin, l'utilisation d'une source virtuelle issue d'un processus non-linéaire sur un marquage fluorescent a été développée en 2011 [54]. Cette étoile virtuelle est créée en focalisant le faisceau d'excitation dans l'échantillon afin de produire une émission de fluorescence à deux-photons qui est, par définition, localisée. Cette source secondaire de lumière permet la correction des aberrations en boucle fermée sur un SH. Cette méthode est toujours actuellement utilisée dans de nombreux développements en microscopie non-linéaire [55], tout comme en microscopie super résolue [56] ou en microscopie à feuille de lumière [57] et donne des résultats visibles en figures 1.20 et 1.21.

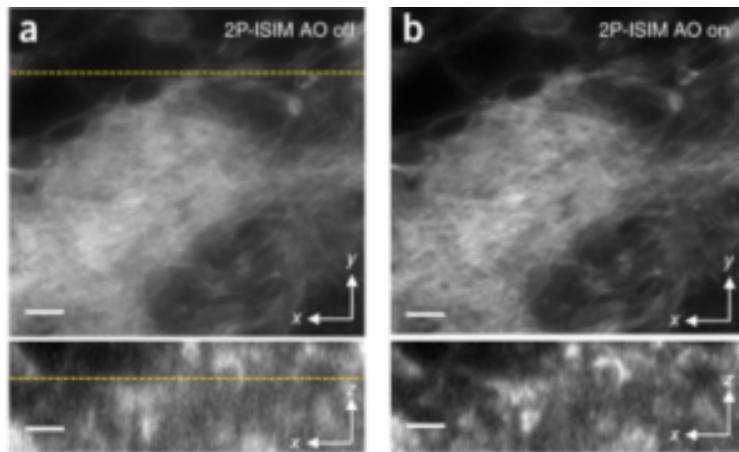


FIG. 1.20 Actine marquée dans le cerveau d'une larve de drosophile (a) sans correction (b) avec correction, barre d'échelle 5 μm (extrait de [55])

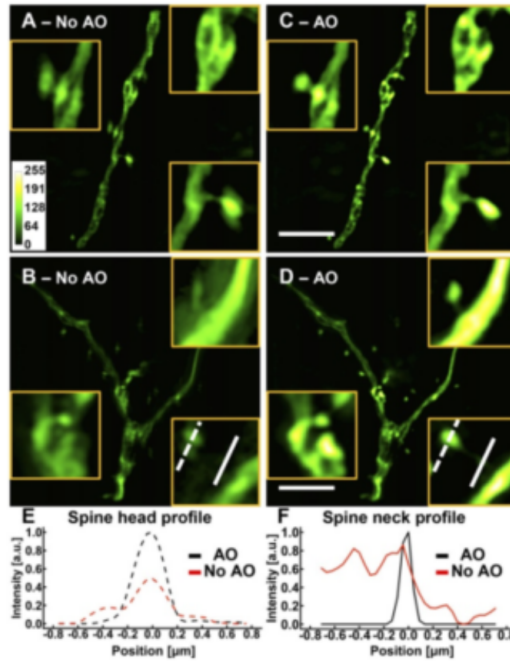


FIG. 1.21 Images avec et sans OA de dendrites dans un cerveau de souris marquée avec *Thy1-GFP* à $25\mu\text{m}$ de profondeur (extrait de [56])

Comme on peut le voir sur les figures précédentes et le lire dans la littérature, l'optique adaptative apporte un gain significatif en signal et résolution dans des échantillons variés au travers de diverses implémentations.

1.4.3 Limitation de l'OA en microscopie

Les figures montrées dans la section précédente démontrent l'intérêt de l'optique adaptative pour augmenter le signal et la résolution lors de l'acquisition d'images en profondeur dans des échantillons vivants. Les développements autour de l'OA en microscopie sont nombreux ce qui d'une part montre l'enthousiasme suscité par la correction des aberrations dans les échantillons et permet, d'autre part, une variabilité et une adaptabilité des montages et des techniques. Néanmoins, la complexité, la toxicité, le coût en temps, sont des facteurs défavorables à l'implémentation d'une boucle d'OA pour des expériences de routine en biologie.

En effet, la méthode indirecte pourtant simple d'utilisation est en réalité coûteuse en temps, par exemple pour un algorithme $3N$, 3 images par mode de correction sont nécessaires [40]. Ainsi, pour corriger uniquement les bas ordres de Zernike (Astigmatisme 0, Astigmatisme 45, Coma0, Coma90, Aberration Sphérique), cela nécessite 15 images. Pour obtenir une correction significative et en cas d'aberrations importantes il est d'ailleurs généralement nécessaire de réitérer le processus ($2(2N+1)$) [41]. Pour l'étude de phénomènes dynamiques où les aberrations varient dans le temps ou bien lors d'acquisition 3D, ce n'est pas compatible. Par ailleurs, l'utilisation de la caméra d'imagerie pour réaliser la correction augmente le photoblanchiment. En conséquence, les méthodes indirectes sont peu compatibles avec l'étude de phénomènes dynamiques *in vivo* en 3D malgré leur facilité d'utilisation et le gain quasi systématique sur l'image. Par exemple, [46] précise que plusieurs minutes sont nécessaires pour arriver aux corrections présentées.

En mesure directe, l'utilisation d'un SH est rapide et précise mais nécessite une mise

en place plus complexe et coûteuse en signal puisqu'une partie des photons n'est pas destinée à la caméra. La nécessité d'une étoile guide pour permettre une correction de la zone d'intérêt de l'échantillon est souvent invasive [50]. D'autre part cela pose une difficulté notable, puisqu'il est difficile de contrôler l'emplacement des billes et leur unicité. Des méthodes de segmentation du champ ont été implémentées afin de permettre des corrections localisées et d'augmenter la zone isoplanétique [53], néanmoins ceci reste une méthode toujours invasive et itérative. De plus, la faible ouverture numérique des microlentilles induit sur les imagerie un fort signal de fond ajoutant une contribution non-négligeable des plans de fluorescence en dehors de celui imagé par la caméra scientifique. Par conséquent cela dégrade la mesure de front d'onde.

Les étoiles guides issues de processus non-linéaires sont actuellement privilégiées pour leur brillance et leur localisation. L'adaptabilité de cette méthode aux différentes modalités d'imagerie (light-sheet, non-linéaire, illumination structurée...) permet une utilisation *in vivo*. Toutefois, l'installation d'un tel système est complexe et coûteux, et, l'ajout d'un second bras d'excitation peut nuire à l'échantillon, notamment en ce qui concerne l'échauffement. C'est pourquoi pour des expériences de biologie en routine cela reste peu répandu.

Malgré les nombreux développements réalisés en optique adaptative, nous voyons que son utilisation n'est pas évidente et repose beaucoup sur des compromis notamment entre la complexité de l'instrument ou le blanchiment de l'échantillon. Dans ce cadre, une approche alternative dans la quête de réalisation d'une correction des aberrations pour l'imagerie dynamique d'échantillon biologique est nécessaire.

1.5 Conclusion

Nous avons développé dans ce chapitre le cadre dans lequel se situe cette thèse pour l'utilisation de l'optique adaptative pour la microscopie de fluorescence d'échantillons biologiques épais. Nous avons détaillé les origines de la mesure de front d'onde depuis les débuts en astronomie jusqu'aux limitations en microscopie des différentes méthodes de correction.

Ce projet de thèse propose une nouvelle manière de réaliser la mesure de front d'onde en microscopie qui favorise la simplicité d'utilisation et minimise à la fois le temps d'acquisition mais aussi la complexité d'implémentation tout en optimisant le budget en photons.

Bibliographie

- [1] J.-P. Pérez. *Optique*. Dunod, 2004.
- [2] E. Abbe. Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv f. mikrosk. Anatomie*, 9 :413–468, 1873.
- [3] P. Vermeulen. *Microscopie à illumination structurée et optique adaptative pour l'imagerie de fluorescence 3D dynamique*. PhD thesis, Université Paris Diderot, 2012.
- [4] Frank P Bolin, Luther E Preuss, Roy C Taylor, and Robert J Ference. Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method. *Applied optics*, 28(12) :2297–2303, 1989.
- [5] H Jacobsen, P Hänninen, E Soini, and Stefan W Hell. Refractive-index-induced aberrations in two-photon confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 176(3) :226–230, 1994.
- [6] CJR Sheppard and Peter To" ro" k. Effects of specimen refractive index on confocal imaging. *Journal of microscopy*, 185(3) :366–374, 1997.
- [7] M. J. Booth and T. Wilson. Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction. *Journal of Biomedical Optics*, 6(3) :266, 2001.
- [8] Jonas Binding, Juliette Ben Arous, Jean-François Léger, Sylvain Gigan, Claude Boccara, and Laurent Bourdieu. Brain refractive index measured in vivo with high-NA defocus-corrected full-field OCT and consequences for two-photon microscopy. *Optics Express*, 19(6) :4833, March 2011.
- [9] G. J. Tearney, M. E. Brezinski, B. E. Bouma, M. R. Hee, J. F. Southern, and J. G. Fujimoto. Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography. *Optics Letters*, 20(21) :2258, November 1995.
- [10] C.J Sheppard. Aberrations in high aperture conventional and confocal imaging systems. *Applied Optics*, 27(22) :4782–6, 1991.
- [11] C.J Sheppard and M. Gu. Aberration compensation in confocal microscopy. *Applied Optics*, 30(25) :3563–8, 1991.
- [12] L. Seidel. Zur dioptrik. Über die entwicklung der glieder 3ter ordnung welche den weg eines ausserhalb der ebene der axe gelegene lichtstrahles durch ein system brechender medien bestimmen. *Astr. Nachr*, 43(1027,1028,1029) :289,305,321, 1856.
- [13] Max Born and Emil Wolf. *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light (7th Edition)*. Cambridge University Press, 7th edition, 1999.
- [14] F. von Zernike. Beugungstheorie des schneidenver-fahrens und seiner verbesserten form, der phasenkontrastmethode. *Physica*, 1(7) :689–704, 1934.

-
- [15] Y. H. Hsieh, Y. T. Yu, Y. H. Lai, M. X. Hsieh, and Y. F. Chen. Integral-based parallel algorithm for the fast generation of the Zernike polynomials. *Optics Express*, 28(2) :936, January 2020.
- [16] A Maréchal. *Etude des effets combinés de la diffraction et des aberrations géométriques sur l'image d'un point lumineux*, volume 2. Éditions de la Revue d'optique théorique et instrumentale, 1947.
- [17] Joseph W Goodman. Introduction to fourier optics. *Introduction to Fourier optics, 3rd ed., by JW Goodman. Englewood, CO : Roberts & Co. Publishers, 2005*, 1, 2005.
- [18] Robert K. Tyson. *Principles of adaptive optics / Robert K. Tyson*. Academic Press, Boston, Mass., 1991.
- [19] Roland V Shack. Production and use of a lecticular hartmann screen. *J. Opt. Soc. Am.*, 61 :656–661, 1971.
- [20] Francois Roddier. Curvature sensing and compensation : a new concept in adaptive optics. *Applied Optics*, 27(7) :1223–1225, 1988.
- [21] M Carbillet, A Ferrari, C Aime, HI Campbell, and AH Greenaway. Wavefront sensing : from historical roots to the state-of-the-art. *European Astronomical Society Publications Series*, 22 :165–185, 2006.
- [22] Ben C Platt and Roland Shack. History and principles of shack-hartmann wavefront sensing. *Journal of refractive surgery*, 17(5) :S573–S577, 2001.
- [23] Larry N Thibos. Principles of hartmann-shack aberrometry. *Vision Science and its Applications*, page NW6, 2000.
- [24] J Hartmann. Bermerkungen über den bau und die justierung von spektrographen. *Zeitschrift für Instrumentenkunde*, 20 :47, 1900.
- [25] Jim Schwiegerling and Daniel R Neal. Historical development of the shack-hartmann wavefront sensor. *Robert Shannon and Roland Shack : Legends in Applied Optics, edited by JE Harvey and RB Hooker—SPIE, Bellingham, WA*, pages 132–139, 2005.
- [26] H. Babcock. The possibility of compensating astronomical seeing. *Publ. Astron. Soc. Pac.*, 65 :229–236, 1953.
- [27] *Active image restoration with a flexible mirror*, volume 75, 1976.
- [28] Richard A Muller and Andrew Buffington. Real-time correction of atmospherically degraded telescope images through image sharpening. *JOSA*, 64(9) :1200–1210, 1974.
- [29] MA Vorontsov, GW Carhart, DV Pruidze, JC Ricklin, and DG Voelz. Image quality criteria for an adaptive imaging system based on statistical analysis of the speckle field. *JOSA A*, 13(7) :1456–1466, 1996.
-

- [30] Marc Cohen, Gert Cauwenberghs, and Mikhail A Vorontsov. Image sharpness and beam focus vlsi sensors for adaptive optics. *IEEE Sensors Journal*, 2(6) :680–690, 2002.
- [31] Martin J Booth. Adaptive optical microscopy : the ongoing quest for a perfect image. *Light : Science & Applications*, 3(4) :e165–e165, April 2014. Citation Key Alias : booth_adaptive_2014-1.
- [32] Na Ji. Adaptive optical fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 14(4) :374–380, April 2017.
- [33] Martin J Booth, Mark AA Neil, and Tony Wilson. Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media. *Journal of microscopy*, 192(2) :90–98, 1998.
- [34] Mark A. A. Neil, Martin J. Booth, and Tony Wilson. New modal wave-front sensor : a theoretical analysis. *Journal of the Optical Society of America A*, 17(6) :1098, June 2000.
- [35] M. J. Booth, M. A. Neil, and T. Wilson. New modal wave-front sensor : application to adaptive confocal fluorescence microscopy and two-photon excitation fluorescence microscopy. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 19(10) :2112–2120, 2002.
- [36] Amanda J Wright, David Burns, Brett A Patterson, Simon P Poland, Gareth J Valentine, and John M Girkin. Exploration of the optimisation algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy. *Microscopy Research and Technique*, 67(1) :36–44, 2005.
- [37] Delphine Débarre, Martin J Booth, and Tony Wilson. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies. *Optics Express*, 15(13) :8176–8190, 2007.
- [38] Delphine Débarre, Edward J Botcherby, Martin J Booth, and Tony Wilson. Adaptive optics for structured illumination microscopy. *Optics express*, 16(13) :9290–9305, 2008.
- [39] Delphine Débarre, Edward J Botcherby, Tomoko Watanabe, Shankar Srinivas, Martin J Booth, and Tony Wilson. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy. *Optics letters*, 34(16) :2495–2497, 2009.
- [40] Aurélie Facomprez, Emmanuel Beaurepaire, and Delphine Débarre. Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics. *Optics express*, 20(3) :2598–2612, 2012.
- [41] Jun Zeng, Pierre Mahou, Marie-Claire Schanne-Klein, Emmanuel Beaurepaire, and Delphine Débarre. 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues. *Biomedical Optics Express*, 3(8) :1898, August 2012.
- [42] Nicolas Olivier, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy. *Optics letters*, 34(20) :3145–3147, 2009.

-
- [43] N. Ji, D. Milkie, and E. Betzig. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues. *Nature Methods*, 7 :141–147, 2010.
- [44] N. Ji, T. R. Sato, and E. Betzig. Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1) :22–27, January 2012.
- [45] Chen Wang and Na Ji. Pupil-segmentation-based adaptive optical correction of a high-numerical-aperture gradient refractive index lens for two-photon fluorescence endoscopy. *Optics Letters*, 37(11) :2001, June 2012.
- [46] Chen Wang, Rui Liu, Daniel E Milkie, Wenzhi Sun, Zhongchao Tan, Aaron Kerlin, Tsai-Wen Chen, Douglas S Kim, and Na Ji. Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging in vivo. *Nature methods*, 11(10) :1037–1040, 2014.
- [47] JL. Beverage, RV. Shack, and MR Descour. Measurement of the three-dimensional microscope point spread function using a shack-hartmann wavefront sensor. *Journal of Microscopy*, 205(Pt 1), June 2002.
- [48] M. Oberlaender, PJ. Broser, B. Sakmann, and S. Hippler. Shack-hartmann wave front measurements in cortical tissue for deconvolution of large three-dimensional mosaic transmitted light brightfield micrographs. *Journal of Microscopy*, 233(2), 2009.
- [49] Jae-Won Cha, Jerome Ballesta, and Peter TC So. Shack-hartmann wavefront-sensor-based adaptive optics system for multiphoton microscopy. *Journal of biomedical optics*, 15(4) :046022, 2010.
- [50] O Azucena, J. Crest, J. Cao, W. Sullivan, P. Kner, D. Gavel, D. Dillon, S. Olivier, and J. Kubby. Wavefront aberration measurements and corrections through thick tissue using fluorescent microsphere reference beacons. *Optics Express*, 18(16), 2010.
- [51] Xiaodong Tao, Oscar Azucena, Min Fu, Yi Zuo, Diana C. Chen, and Joel Kubby. Adaptive optics microscopy with direct wavefront sensing using fluorescent protein guide stars. *Optics Letters*, 36(17) :3389, September 2011.
- [52] Xiaodong Tao, Andrew Norton, Matthew Kissel, Oscar Azucena, and Joel Kubby. Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars. *Optics Letters*, 38(23) :5075, December 2013.
- [53] P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Lorientte, and A. Fragola. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *Journal of Biomedical Optics*, 16(7), 2011.
- [54] Rodrigo Aviles-Espinosa, Jordi Andilla, Rafael Porcar-Guezenec, Omar E. Olarte, Marta Nieto, Xavier Levecq, David Artigas, and Pablo Loza-Alvarez. Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a non-linear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy. *Biomedical Optics Express*, 2(11) :3135, November 2011.
-

- [55] Wei Zheng, Yicong Wu, Peter Winter, Robert Fischer, Damian Dalle Nogare, Amy Hong, Chad McCormick, Ryan Christensen, William P Dempsey, Don B Arnold, Joshua Zimmerberg, Ajay Chitnis, James Sellers, Clare Waterman, and Hari Shroff. Adaptive optics improves multiphoton super-resolution imaging. *Nature Methods*, 14(9) :869–872, June 2017. Citation Key Alias : zheng_adaptive_2017-1, zheng_adaptive_2017-2.
- [56] Raphaël Turcotte, Yajie Liang, Masashi Tanimoto, Qinrong Zhang, Ziwei Li, Minoru Koyama, Eric Betzig, and Na Ji. Dynamic super-resolution structured illumination imaging in the living brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, page 201819965, April 2019.
- [57] Tsung-Li Liu, Srigokul Upadhyayula, Daniel E. Milkie, Ved Singh, Kai Wang, Ian A. Swinburne, Kishore R. Mosaliganti, Zach M. Collins, Tom W. Hiscock, Jamien Shea, Abraham Q. Kohrman, Taylor N. Medwig, Daphne Dambournet, Ryan Forster, Brian Cunniff, Yuan Ruan, Hanako Yashiro, Steffen Scholpp, Elliot M. Meyerowitz, Dirk Hockemeyer, David G. Drubin, Benjamin L. Martin, David Q. Matus, Minoru Koyama, Sean G. Megason, Tom Kirchhausen, and Eric Betzig. Observing the cell in its native state : Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science*, 360(6386) :eaaq1392, April 2018. Citation Key Alias : liu_observing_2018-2.

Chapitre 2

Mesure de front d'onde pour la microscopie avec un analyseur en source étendue

Sommaire

2.1	Introduction	38
2.1.1	Principe de fonctionnement	39
2.1.2	L'adaptation à la microscopie	41
2.2	Développement d'un analyseur de type Shack-Hartmann en source étendue	42
2.2.1	Dimensionnement physique	42
2.2.2	Algorithmes	44
2.3	Caractérisation du capteur	50
2.3.1	Montage pour la caractérisation du capteur	50
2.3.2	Discussion sur l'influence des structures de l'objet sur la mesure du front d'onde	53
2.4	Premiers résultats sur échantillons biologiques	55
2.4.1	Description de l'échantillon biologique	55
2.4.2	Protocole	55
2.4.3	Résultats	56
2.5	Conclusion et perspectives	56

Les méthodes décrites auparavant ne sont pas spécifiquement adaptées à l'imagerie biologique volumétrique d'échantillons vivants à moins de faire des compromis en utilisant un protocole invasif par l'introduction dans l'échantillon d'une étoile guide, ou alors en sacrifiant la vitesse de correction pour optimiser l'image avec un facteur de mérite et un algorithme itératif.

L'utilisation d'une étoile guide permet une mesure précise et une correction rapide mais est, par ailleurs, complexe car son positionnement est aléatoire et imprévisible. Il est possible d'effectuer des découpages locaux pour isoler les sources ponctuelles ce qui est coûteux en temps mais permet de compenser ce caractère aléatoire [1] ou bien d'utiliser une étoile virtuelle. Dans ce dernier cas, le positionnement est également complexe puisque le plan focal du faisceau générateur de l'effet deux photons doit se situer dans le même plan que celui d'imagerie et dans la zone désirée de correction de l'image, dans le cas de l'utilisation d'un microscope à feuille de lumière, la mise en place d'un tel système demande un alignement systématique [2].

Combiner les avantages des méthodes directe et indirecte serait optimal et pour cela, l'utilisation d'un analyseur de front d'onde basé sur l'image et non sur une étoile guide peut apporter une réponse tant pour sa simplicité de mise en œuvre que pour sa rapidité et sa précision de mesure. Des méthodes qui utilisent un analyseur de Shack-Hartmann pour évaluer le front d'onde en source étendue ont été développées pour l'imagerie solaire et satellite à partir des années 1990 [3].

Dans le cas de la neuroimagerie, cette approche est idéale puisque nous nous intéressons à des structures étendues. Cela simplifie l'utilisation de l'OA, est compatible avec l'imagerie du vivant et peut être rapide grâce à une mesure et une correction directes. En microscopie, le manque de développement sur le sujet a été référencé [4] et des premiers résultats ont été avancés en conférence par l'équipe de P. KNER [5]. Mais l'application sur un microscope est venue bien plus tard avec une première démonstration de fonctionnement sur une boucle d'OA dans le cadre de cette thèse en 2019 [6]. Ce sujet intéresse plusieurs groupes de recherche puisque d'autres équipes ont également montré des résultats avec un analyseur en source étendue pour la mesure et la correction des aberrations [7, 8] en 2020.

L'idée d'utiliser une source étendue pour combiner l'OA à la microscopie proposée par Imagine Optic a généré la collaboration avec le LPEM dans le cadre de cette thèse et, plus largement avec Neuro-PSI et l'IBENS dans le cadre de l'ANR "InovAO".

Je développerai dans ce chapitre le principe de fonctionnement d'un analyseur de Shack-Hartmann en source étendue (ESSH, pour "Extended Scene Shack-Hartmann") puis le dimensionnement et les algorithmes pour s'adapter à la microscopie. Enfin, je montrerai les premiers résultats sur microscope. Cette partie du travail a été mené au début de cette thèse à Imagine Optic pour la création du capteur, puis au laboratoire pour la caractérisation et l'implémentation.

2.1 Introduction

À l'origine, la mesure de front d'onde en source étendue a été développé pour l'imagerie du soleil et l'imagerie de la terre par satellite. Ces objets sont larges et il est complexe d'utiliser une étoile-guide dans ces conditions. Si la source étendue contient des fréquences spatiales capables d'être résolues par un Shack-Hartmann, il est alors

possible d'en déterminer la position pour une microlentille. Des études pionnières, menées notamment à l'ONERA par G. ROUSSET et V. MICHAU, à partir des années 1990, ont permis la mise en évidence de l'utilisation d'un analyseur de type Shack-Hartmann en source étendue [9, 3, 10, 11]. Les résultats concernant l'imagerie solaire ont montré la possibilité de mesurer une déformation du front d'onde en comparant les images les unes aux autres. L'expérimentation a montré une précision de $\lambda/10$ et une capacité à mesurer le front d'onde avec cette précision dans le cadre d'un bruit sur l'image lié à la granulation solaire.

En astronomie, les récents développements visent à améliorer la précision de mesure et la rapidité en source étendue [12, 13, 14].

2.1.1 Principe de fonctionnement

Un analyseur de Shack-Hartmann en source étendue est composé d'une matrice de microlentilles et d'une caméra comme c'est le cas pour une source ponctuelle. Le front d'onde issu de l'objet étendu est échantillonné par la matrice de microlentilles. Chaque microlentille forme une "imagerie" de l'objet sur la caméra comme représenté sur la figure 2.1. Les imageries sont décalées latéralement les unes par rapport aux autres en fonction de la pente locale du front d'onde sur la microlentille. Un diaphragme dans un plan conjugué de l'objet et en amont de l'analyseur de Shack-Hartmann permet de limiter la taille du champ vu par les microlentilles et d'éviter le recouvrement entre celles-ci.

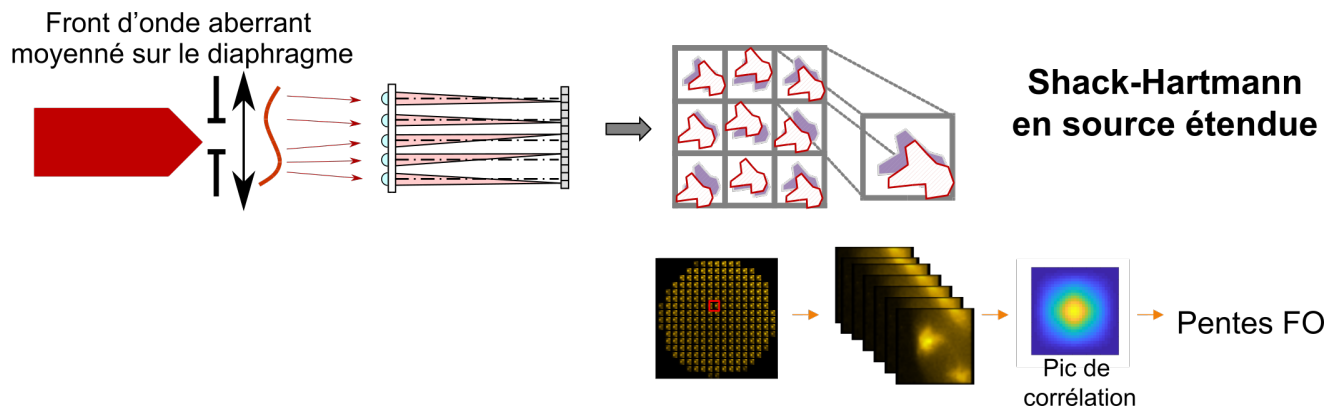


FIG. 2.1 Principe résumé de la mesure en source étendue

Le diaphragme de champ permet également d'adapter la taille des imageries à celle de zone isoplanétique si besoin.

Définition 2.1, Zone isoplanétique

Région d'un objet pour laquelle les aberrations peuvent être considérées constantes [15]. En d'autres termes la correction des aberrations en un point de cette zone amène un gain significatif sur l'ensemble de la zone. Dans le cadre d'échantillons biologiques, la zone isoplanétique dépend de l'hétérogénéité des indices optiques et donc de la morphologie de l'échantillon. Peu d'études référencent la zone isoplanétique biologique tant elle est variable inter et intra échantillons, cela peut aller de $20\mu\text{m}$ à $150\mu\text{m}$ [16, 2].

Le calcul du front d'onde à partir de l'ensemble des imgettes enregistrées par le SH est ensuite réalisé différemment en utilisant non plus directement des algorithmes de recherche de barycentre mais de corrélations entre imgettes. En effet, la mesure d'un déplacement latéral d'une tâche en déterminant la position grâce à un barycentre est efficace, mais dans le cadre de déplacements d'images d'objets étendus l'une par rapport à l'autre cette mesure n'est pas possible car la position du barycentre de l'imgette considérée dépend de la répartition d'intensité de l'imgette. Cette répartition n'est pas uniforme entre toutes les imgettes à cause notamment des variations d'intensité dans la pupille. Par conséquent les décalages sont mesurés avec une corrélation entre une imgette de référence et l'imgette considérée puis, en déterminant la position du pic de corrélation obtenu par rapport au centre de l'imgette. Cette dernière étape peut être réalisée grâce à un algorithme de mesure de type centroïde par exemple.

Définition 2.2, Corrélation

Opération mathématique entre deux matrices A et B de taille (n, m) qui se définit sous la forme suivante :

$$C(k, l) = \sum_{i=0}^{n-1} \sum_{j=0}^{m-1} A[i+k, j+l]B[i, j] \quad \text{où } C \text{ est la carte de corrélation}$$

Lorsque les deux matrices sont identiques ($A = B$), la carte de corrélation possède un maximum en son centre $(n/2, m/2)$. En imagerie, elle permet d'estimer le déplacement rigide d'une image par rapport à l'autre.

La figure 2.2 représente une imgette de référence centrée en $(0,0)$ et une imgette décalée de 50 pixels horizontalement et verticalement. La carte de corrélation possède un pic en $(50,50)$ qui représente le déplacement entre l'imgette et celle de référence.

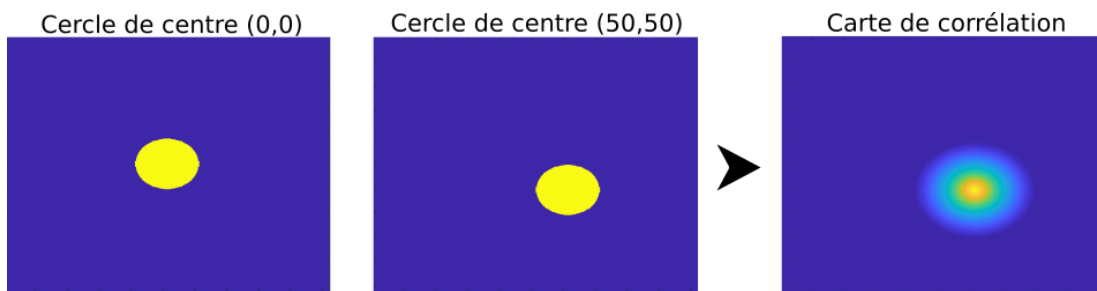


FIG. 2.2 Représentation de la corrélation entre deux cercles de rayon 50 pixels séparés de $[50,50]$ pixels

Les techniques de détection du maximum de la carte de corrélation sont des interpolations subpixeliques et nécessitent des algorithmes d'estimation du centre à partir des pixels environnants. Des méthodes de maximum de vraisemblance pour l'estimation du déplacement ont été proposées mais sont beaucoup plus lourdes en temps de calcul [17].

Une synthèse des différentes manières de corréler les imgettes et d'interpoler pour détecter le maximum de la carte de corrélation a été effectuée en 2010 par M. LÖFDHAL [18]. Dans cet article il est également précisé qu'il existe des erreurs liés à la détection du pic de corrélation en fonction de la structure de l'image et qu'il peut

être intéressant d'utiliser des pré-traitements sur les imagerie afin de les minimiser en utilisant par exemple des seuillages. Des développements plus récents visent à minimiser ces erreurs de mesure en utilisant des calculs itératifs [12, 13].

Enfin, comme pour un analyseur de Shack-Hartmann classique, on associe ce déplacement à la pente locale du front d'onde. Ce qui permet sa reconstruction et la mesure des aberrations. Le front d'onde obtenu est alors le front d'onde moyen de l'objet étendu.

2.1.2 L'adaptation à la microscopie

Dans les techniques d'optique adaptative en mesure directe "classique", barycentrique, il y a un point source. Celui-ci définit le point à partir duquel le front d'onde est mesuré. Dans le cadre de la mesure en source étendue, le front d'onde est évalué sur la zone définie par le champ des microlentilles et le diaphragme placé en amont. Le front d'onde mesuré en microscopie est donc une moyenne des fronts d'onde sur la zone considérée. Il faut en conséquence travailler sur une zone proche de la zone isoplanétique de l'échantillon, ce qui est complexe pour les échantillons biologiques. De la même manière selon la dimension axiale, en mesure "classique", l'utilisation d'un point source permet d'extraire une mesure du front d'onde dans le plan de cette source. Pour une mesure en source étendue axialement, en d'autres termes un échantillon épais, ceci induit une estimation des aberrations sur la profondeur de champ de l'analyseur de front d'onde. Or, dans un analyseur de Shack-Hartmann, l'ouverture numérique des microlentilles est faible, il y a une grande profondeur de champ. En conséquence la mesure du front d'onde se fait sur l'ensemble des fronts d'ondes issus de cette épaisseur, la mesure est moyennée également sur l'épaisseur.

Comme les objectifs de microscopes couramment utilisés pour l'imagerie biologique ont des ouvertures numériques importantes couramment de 0.8 à 1.1, la profondeur de champ pour l'imagerie est couramment de l'ordre de 2λ par rapport à celles des microlentilles plutôt de 100λ dans le cas du dimensionnement décrit après. En conséquence, pour faire de la mesure de front d'onde directe basée sur l'image et sans un point source en microscopie, il est nécessaire de limiter cette moyenne axiale pour corriger les aberrations du plan d'imagerie considéré.

En d'autres termes, la mesure en source étendue n'a pas besoin d'étoile guide mais d'un plan guide. Cette contrainte est bien moins forte mais nécessite tout de même deux conditions ; soit l'utilisation d'un échantillon fin, quelques λ , soit l'utilisation d'un sectionnement optique.

Des études ont montré l'intérêt suscité par cette technique [4] jusqu'à la simulation et des premières approches[5]. Nous avons été les premiers à présenter une boucle d'optique adaptative en mesure directe sur une source étendue[6], suivi d'autres équipes [7, 8].

La suite de ce chapitre va détailler la réalisation de l'analyseur de Shack-Hartmann en source étendue, noté dorénavant ESSH pour "Extended Scene Shack-Hartmann".

2.2 Développement d'un analyseur de type Shack-Hartmann en source étendue

2.2.1 Dimensionnement physique

Notre analyseur a été développé pour répondre aux besoins de l'imagerie du cerveau de la drosophile de $300 \times 300 \times 200 \mu\text{m}^3$ dans le cadre d'une illumination avec $\lambda = 500 \text{nm}$.

Contraintes liées aux échantillons biologiques

La mesure du front d'onde en source étendue doit être réalisée sur un champ qui correspond à une zone d'intérêt en biologie. Ce champ doit être suffisamment grand pour permettre une corrélation sur les structures à observer mais ne pas dépasser la zone isoplanétique référencée dans la littérature [2, 16].

— Zone isoplanétique considérée : $150 \times 150 \mu\text{m}^2$

— Tailles des structures d'intérêt (neurones et projections neuronales) : 1 à $10 \mu\text{m}$

Le champ dans l'échantillon vu par une microlentille doit être au maximum de $150 \times 150 \mu\text{m}^2$. La réduction de résolution liée à une microlentille doit permettre de conserver la capacité à discerner des objets d'intérêt pour effectuer une corrélation sur ceux-ci.

Dimensionnement des microlentilles

Le dimensionnement des microlentilles va permettre de respecter au mieux les contraintes liées à l'échantillon biologique énumérées précédemment. Les différentes caractéristiques des microlentilles sont :

— L'ouverture numérique d'une microlentille qui influe sur le champ et la PSF d'une imagerie.

— La taille de la microlentille qui définit le champ.

— Le nombre de microlentilles qui influe sur la précision de l'échantillonnage du front d'onde.

On peut définir l'ouverture numérique d'une microlentille comme étant égale à :

$$ON \simeq \frac{D}{2f}$$

avec D le côté d'une microlentille carrée, et f sa focale.

Augmenter le nombre de microlentilles permet d'être plus précis sur la mesure du front d'onde mais divise le signal de fluorescence issu de l'échantillon pour un même nombre de pixels considérés sur le capteur. De plus, comme la corrélation utilisée ici est coûteuse en temps, un grand nombre de microlentilles pénalise la cadence de mesure.

La prise en considération de l'ensemble des contraintes du cahier des charges en biologie et les éléments disponibles nous ont permis de dimensionner un analyseur de front d'onde avec 23×17 microlentilles de $300 \times 300 \mu\text{m}^2$ de large d'une focale de 5.1 mm. Le rapport focale/diamètre de nos lentilles est égal à 17, ceci induit une profondeur de champ d'environ $300 \mu\text{m}$. La limite de diffraction d'une microlentille est d'environ $8.5 \mu\text{m}$.

Dimensionnement du capteur

Le capteur doit échantillonner la tache de diffraction au moins selon le critère de Shannon, nous considérons ici 2.5 pixels. Pour une demi-tache de $8.5\mu\text{m}$ nous avons donc un maximum possible de $6.8\mu\text{m}/\text{pixel}$.

Le champ est défini à partir d'un grandissement $\times 2$ du microscope sur l'ESSH qui sera détaillé dans le chapitre suivant. Ceci implique d'avoir un champ 40×40 pixels² par imagerie et donc un total de 920×680 pixels². De tels dimensionnements sont communs pour des caméras CMOS ("Complementary Metal Oxide Semiconductor") qui sont de plus légères et compactes donc faciles à intégrer.

Réalisation de l'analyseur

L'assemblage de l'analyseur et les premières mesures ont été faites à Imagine Optic avec comme paramètres finaux :

- Taille sur le capteur : 43×43 pixels
- Taille de pixel : $6.9\mu\text{m}$
- Nombre de microlentilles éclairées par une pupille ronde de 5mm : ~ 220

Les premières caractérisations du capteur ont été réalisées avec l'algorithme barycentrique "standard" d'Imagine Optic qui a permis d'évaluer la précision de l'ESSH à $\lambda/50$. La précision usuelle des analyseurs d'Imagine Optic est de $\lambda/100$ car ils sont optimisés pour un fonctionnement en barycentrique, en effet généralement la tache de diffraction requiert un plus grand échantillonnage pour obtenir cette précision. L'analyseur ESSH n'est donc pas aussi performant qu'un SH dédié à la mesure de front d'onde d'une source ponctuelle mais permet aussi une mesure précise dans une configuration de SH en point source.

La mesure en fraction de λ est expliquée sur la figure 2.3. La microlentille de côté D et de distance focale f intercepte un front d'onde incident avec une amplitude λ . Cette amplitude est liée au décalage qu'on mesure d'après l'équation :

$$\Delta x = \frac{\lambda f}{d}$$

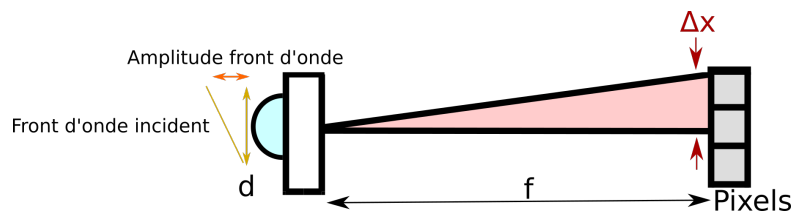


FIG. 2.3 Relation entre l'amplitude du front d'onde incident sur la microlentille au décalage mesuré sur le capteur

Notre principal objectif ici est d'être capable de mesurer un déplacement d'une imagerie par rapport à une autre avec une précision inférieure au critère de Maréchal à $\lambda/14$. Compte-tenu du dimensionnement physique de notre analyseur un décalage de λ sur l'amplitude du front d'onde correspond à 1.25 pixels. Le critère de Maréchal est atteint pour des décalages de 0.09 pixels que nous devons résoudre grâce aux algorithmes qui vont être détaillés dans la partie suivante.

2.2.2 Algorithmes

Suite au dimensionnement physique du capteur, nous avons développé les algorithmes pour la mesure du front d'onde en source étendue. Nous avons évoqué précédemment la précision nécessaire d'un décalage inférieur au dixième de pixel. Il est également important de noter que la vitesse de la boucle, imposée en partie par l'algorithme, est primordiale pour ne pas surexposer l'échantillon et permettre de corriger les aberrations de manière dynamique lors d'une acquisition 3D. Pour les SH classiques l'utilisation du barycentre pour la mesure de front d'onde est optimisée et permet d'atteindre des cadences au-delà de 100Hz. En microscopie, en revanche, il n'est pas nécessaire de corriger aussi vite les aberrations car contrairement aux turbulences atmosphériques, les aberrations sont statiques [19]. D'autre part le temps d'exposition sur la caméra d'imagerie est typiquement de l'ordre de la dizaine de millisecondes pour un marquage fonctionnel ([20]) car le signal varie au cours du temps et d'une centaine de millisecondes pour un marquage structural car celui-ci est fixe [19].

L'objectif est donc de réaliser des boucles d'optique adaptative à 10Hz, ce qui implique un temps d'exposition maximum pour l'analyseur de 100ms.

Le temps d'exposition est ici un paramètre clef pour obtenir suffisamment de signal par imagerie pour reconstruire le front d'onde.

Extraction et découpage

La figure 2.4(b) montre l'image acquise par l'analyseur pour un objet étendu correspondant à l'image (a). La première étape consiste à réaliser un découpage de ces imagerie afin d'obtenir un empilement de l'ensemble de celles-ci et de pouvoir mesurer leurs déplacements relatifs.

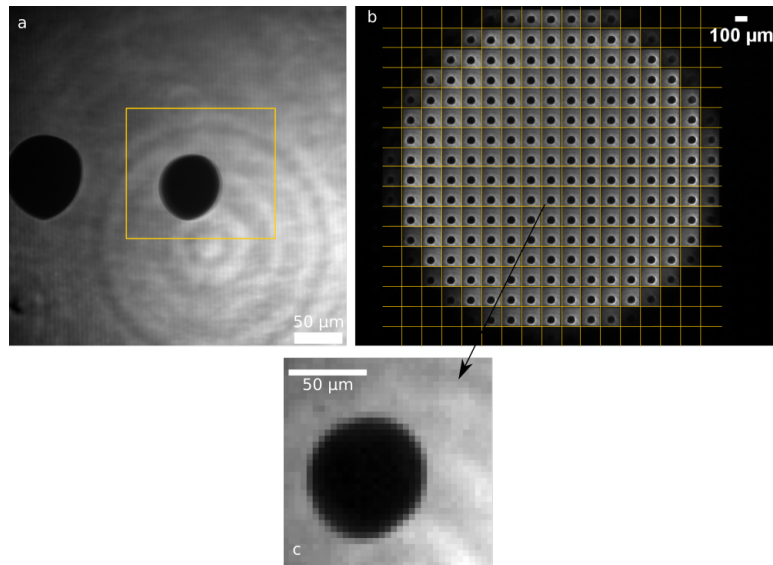


FIG. 2.4 (a) Image d'une bulle d'air dans du marqueur fluorescent entre deux lamelles de microscope. (b) Image acquise par l'ESSH constituée d'environ 224 imagerie avec la grille de découpage. (c) Zoom sur une imagerie

Pour cela nous découpons avec une grille formant les imagerie de 43×43 pixels² comme représenté sur la figure 2.4(b). Afin d'éviter que le diaphragme n'apparaisse

dans la l'imagerie et perturbe la corrélation, un découpage numérique supplémentaire est appliqué pour obtenir finalement des imagerie de 35x35 pixels².

Filtrage

Un filtrage des imagerie est réalisé avant l'étape de corrélation, ceci n'est pas toujours utilisé en astronomie car les scènes sont souvent contrastées et le pic de corrélation est bien défini [18]. En microscopie, le faible signal peut créer un manque de contraste qui induit un pic de corrélation moins bien défini ce qui peut limiter la précision de la mesure. Dans le cas d'une image bruitée par exemple, la corrélation peut se faire non pas entre les structures qui nous intéressent mais entre des bruits basse fréquence. De même, dans le cadre d'un pic de corrélation très étalé, il est possible que le maximum de corrélation soit défini sur plusieurs pixels ce qui limite la précision subpixelique désirée. Enfin, une structure directionnelle induit un pic de corrélation plus étalé dans une direction ce qui limite également la mesure de la position du maximum de corrélation.

Afin d'éviter cela, nous avons ajouté un algorithme de préfiltrage à base de détection de contour pour favoriser les hautes fréquences. Il est d'autant plus nécessaire de filtrer le diaphragme de champ car son apparition dans les imagerie favorise les corrélations entre les bords de celui-ci.

Définition 2.3, Détection de contour

Ce traitement d'image suggère la convolution de l'image par un noyau sensible aux variations rapides d'intensité. Pour un phénomène unidimensionnel cela correspond à une dérivée première ou seconde du signal. De nombreuses méthodes existent, voici les filtres que nous avons essayés :

Laplacien

$$\begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & -4 & 1 \\ 0 & 1 & 0 \end{bmatrix}$$

Laplacien d'une gaussienne (LoG)

$$\begin{bmatrix} -1 & 2 & -1 \\ 2 & -4 & 2 \\ -1 & 2 & -1 \end{bmatrix}$$

Sobel :

Selon x et selon y
 Puis, $S = \sqrt{x^2 + y^2}$

$$x = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$y = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

Ceux-ci agissent sur l'image comme un filtre passe-haut, ce qui permet d'obtenir des images comme figure 2.5 et une carte de corrélation plus étroite. L'intérêt de ce filtrage est d'avoir un pic de corrélation qui soit indépendant des caractéristiques de l'objet et qui ressemble à des taches utilisées dans les algorithmes classiques. Nous avons testé les différents filtres sur une image typique de cerveau de drosophile comme visible en figure 2.5(a).

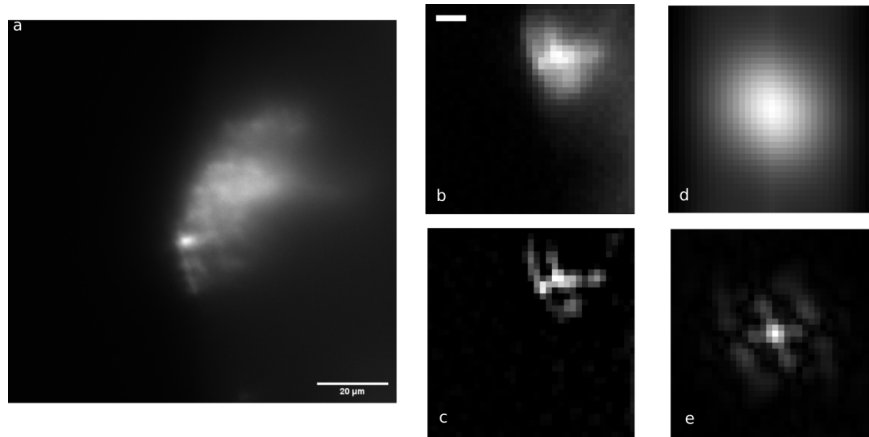


FIG. 2.5 Influence du préfiltrage sur l'image et sur la carte de corrélation; (a) Image de projection neuronales d'un cerveau de drosophile, (b) Imagerie sur l'ESSH, (c) Imagerie avec préfiltrage LoG, (d) Carte de corrélation sans filtrage, (e) Carte de corrélation avec préfiltrage.

Cette figure représente une carte de corrélation sans préfiltrage (d) et avec un LoG (e) pour une image typique de cerveau de drosophile acquis en feuille de lumière. Nous avons conclu de nos simulations que le Laplacien ou le LoG étaient les plus intéressants puisqu'un filtre de Sobel est bien plus long à exécuter à cause des deux convolutions au lieu d'une. D'autre part, le filtre LoG est issu d'une convolution entre un filtre Laplacien (passe-haut) et une Gaussienne (passe-bas), il s'adapte avec la largeur de la gaussienne convoluée au Laplacien. Ceci permet de lisser le filtrage et de minimiser le risque d'obtenir un pic de corrélation issu de pixels liés aux bruits. Le LoG est donc un choix judicieux par son adaptabilité et sa rapidité d'exécution pour un préfiltrage avant la corrélation.

Intercorrélation des imagerie

Les méthodes de corrélations ont été développées et utilisées dans de nombreux domaines de la physique et en particulier pour le recalage d'image, le suivi des particules, les calculs de vitesses...

C'est un calcul lourd et donc long par rapport au calcul de barycentre ce qui risque de limiter la cadence de la boucle d'optique adaptative.

Nous avons testé différentes approches pour calculer les corrélations, que ce soit dans l'espace réel ou dans l'espace de Fourier. Dans ce dernier cas, il s'agit de multiplier les transformées de Fourier des images plutôt que les convoluer entre elles dans l'espace réel. Mais pour des raisons d'implémentation et de simplicité entre les langages informatiques utilisés (simulations en Matlab, implémentation en C++) nous avons choisi la corrélation dans l'espace réel.

Pour rendre cette étape de corrélation plus efficace, nous pouvons limiter le décalage maximal des deux imagerie considérées à ± 8 pixels au lieu ± 17 (sur l'ensemble de l'imagerie 35×35 pixels²). Ceci est pertinent car nous avons vu, après nos expériences sur des échantillons que le maximum de la carte de corrélation était toujours situé dans une zone à ± 8 pixels du centre qui représente des amplitudes de front d'onde de 6.4λ . Cela permet de réduire le nombre de calculs d'un facteur 4.

Estimation de la position du pic de corrélation

Pour estimer avec une précision subpixelique le maximum de la carte de corrélation, il est nécessaire d'utiliser une interpolation. Löfdhal en 2010 [18] a référencé 4 méthodes basées sur une matrice de 3×3 pixels² centrée sur le pic de corrélation comme indiqué sur la figure 2.6.

Table 1. Sub-pixel (s'_x , s'_y) peak-finding algorithms. The estimate of s'_y is obtained in an analogous fashion to s'_x .

Algorithm
1D Parabola fit (PF): $s'_x = x_0 + 0.5 \times \frac{C[x_0 - 1, y_0] - C[x_0 + 1, y_0]}{C[x_0 - 1, y_0] + C[x_0 + 1, y_0] - 2C[x_0, y_0]}$
Gaussian fit (GF): $s'_x = x_0 + 0.5 \times \frac{\ln(C[x_0 - 1, y_0]) - \ln(C[x_0 + 1, y_0])}{\ln(C[x_0 - 1, y_0]) + \ln(C[x_0 + 1, y_0]) - 2 \ln(C[x_0, y_0])}$
Pyramid (PYF): $s'_x = x_0 + 0.5 \times \frac{C[x_0 - 1, y_0] - C[x_0 + 1, y_0]}{\min(C[x_0 - 1, y_0], C[x_0 + 1, y_0]) - C[x_0, y_0]}$
2D Quadratic polynomial fit (QPF) $(s'_x, s'_y) = \left(x_0 + \frac{2a_1a_5 - a_2a_4}{a_4^2 - 4a_3a_5}, y_0 + \frac{2a_2a_3 - a_1a_4}{a_4^2 - 4a_3a_5} \right)$ with polynomial $f(x) = a_0 + a_1x + a_2y + a_3x^2 + a_4xy + a_5y^2$.
Centre of Gravity (CoG) $s'_x = x_0 + \frac{C[x_0 - 1, y_0] - C[x_0 + 1, y_0]}{3 \min(C[x_0 - 1, y_0], C[x_0 + 1, y_0]) - (C[x_0, y_0] + C[x_0 + 1, y_0] + C[x_0 - 1, y_0])}$

FIG. 2.6 Méthodes de détection subpixeliques utilisées, issues de [14] pour mesurer le déplacement s' du maximum de la carte de corrélation en $C[x_0, y_0]$

Ces simulations ont été effectuées pour l'imagerie solaire et ne sont donc pas nécessairement compatibles pour les imageries de microscopie. Nous avons décidé de tester les méthodes suivantes :

1. *CoG* : Centre de gravité, centroïde, méthode utilisée dans le calcul du SH classique.
2. *1DPar* : Modèle parabolique
3. *Pyram* : Modèle pyramidal (triangulaire)
4. *Gauss* : Modèle Gaussien

Notre objectif est d'estimer quelle méthode d'interpolation est la plus précise et adaptée à nos données. Afin de comparer les 4 méthodes présentées nous les avons appliquées à une simulation réalisée à partir d'une image typique d'un cerveau de drosophile acquis en microscopie à feuille de lumière (algorithme 2.1) :

```

im ← load                                ▷ Chargement image
im ← Flou(im, σ)                          ▷ Diffraction
im ← Sousech(im, 50)                      ▷ Sous-échantillonnage d'un facteur 50
for i ← 1, 200 do
    im(:, :, i) ← tran(im, rand(x, y) * 4 - 2)    ▷ Translation -2 à 2 pixels
end for
for i ← 1, 200 do
    C(i) ← FindShift(im(:, :, 1), im(:, :, i))    ▷ Calcul déplacement
end for

```

Algorithme 2.1 Simulation du fonctionnement du ESSH pour une image de cerveau de mouche sur la caméra d'imagerie

Les trois premières étapes de l'algorithme 2.1 sont représentées figure 2.7 nous prenons une image directement issue d'un microscope sur un cerveau de drosophile. Nous définissons la zone vue par l'analyseur ($130 \times 130 \mu\text{m}^2$) nous simulons le passage par les microlentilles puis enfin nous sous-échantillons sur les 43×43 pixels² du capteur.

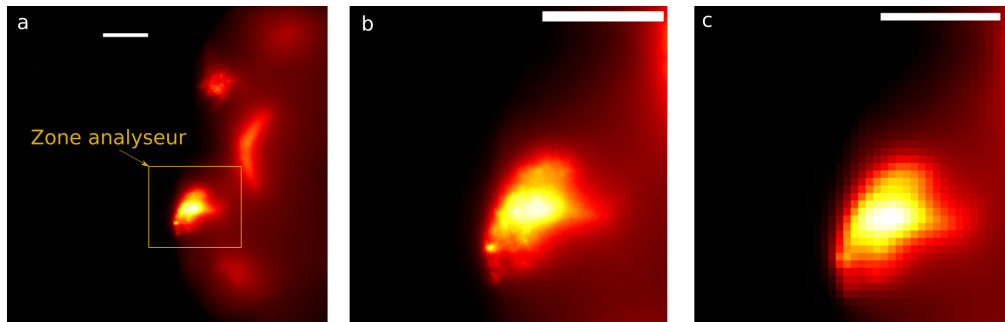


FIG. 2.7 Étapes de simulation sur un cerveau de drosophile issu de Neuro-PSI. Neurones du cycle circadien marqués en GFP. (a) chargement de l'image et définition de la zone vue par l'analyseur, (b) zoom sur la zone d'intérêt vue par l'analyseur, (c) Sous-échantillonnage. Barre d'échelle = $20 \mu\text{m}$

Nous avons simulé ensuite 200 déplacements allant maximum entre ± 2 pixels en translation selon x et y.

Enfin, dans le calcul *FindShift* de l'algorithme 2.1, nous faisons le préfiltrage, la corrélation et l'estimation du pic de corrélation à l'aide des différents calculs de détection subpixeliques pour ces 200 tirages. Les résultats sont présentés dans la figure 2.8.

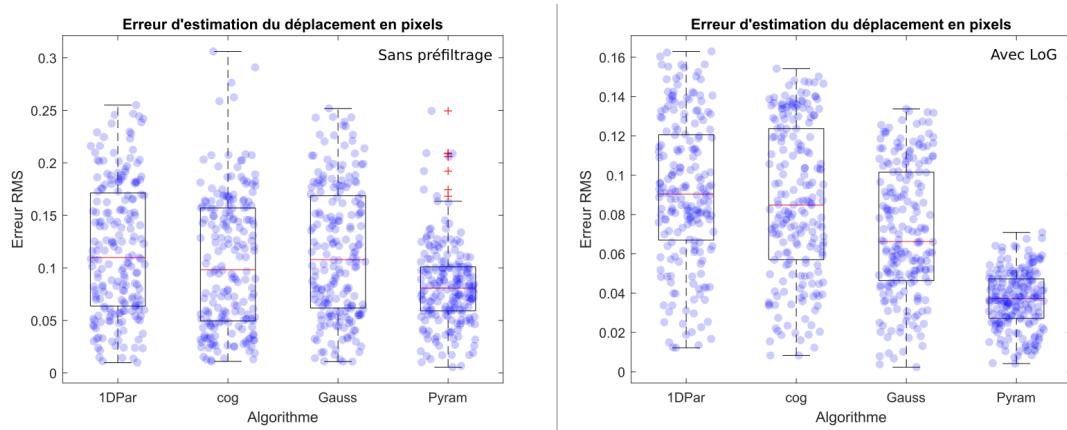


FIG. 2.8 Mesure de l'erreur RMS pour 200 tirages de déplacements aléatoires avec ou sans préfiltrage

Nous voyons que les méthodes présentées dans notre simulation montrent des résultats précis au dixième de pixel néanmoins l'algorithme "Pyram" se détache grâce à une variabilité moindre et une meilleure précision jusqu'à 0.04 pixels en moyenne avec l'utilisation d'un préfiltrage de type LoG. Les méthodes 1DPar et Gauss ont montré, par ailleurs, sur nos modélisations des temps de calculs respectivement de 20% et 50% supérieurs à celui du Pyramidal. Le préfiltrage par un LoG apporte un gain en précision de 50 à 100% sur les différentes méthodes pour ce type d'échantillon représentatif des expériences à mener. D'après cette simulation nous pouvons donc sur notre analyseur obtenir par ces algorithmes une précision à $\sim \lambda/25$ ce qui est au-delà du critère de Maréchal à $\lambda/14$. Nous avons décidé d'utiliser les algorithmes LoG+Pyram.

Cette simulation sur ce type d'échantillon semble équivalente aux performances actuelles des développements menés en source étendue pour l'astronomie, néanmoins elle souffre des mêmes biais référencés dans la littérature qui limite autour de 0.05 pixels la précision [12, 14]. Ces biais sont liés notamment à l'utilisation de valeurs entières de pixels qui induisent des erreurs systématiques ou des erreurs d'échantillonnage. Dans le futur il sera possible d'améliorer la mesure grâce à la réduction des biais de mesure en passant par des méthodes itératives. Celles-ci ne favorisent pas la vitesse d'acquisition toutefois il serait intéressant de faire des essais en prenant par exemple plusieurs imagerie de référence ou en ajoutant un biais sur l'imagerie de référence puis le soustraire après les corrélations.

Enfin, les pixels de la caméra sont actuellement fusionnés 2 à 2 et l'utilisation de tous les pixels permettrait d'augmenter l'échantillonnage et donc d'apporter une mesure plus précise. En revanche ceci nécessitera plus de signal par imagerie.

Le premier analyseur Haso4 Wide a été monté chez Imagine Optic en juin 2018 et mesure $7 \times 4 \times 4 \text{cm}^3$ (figure 2.9)

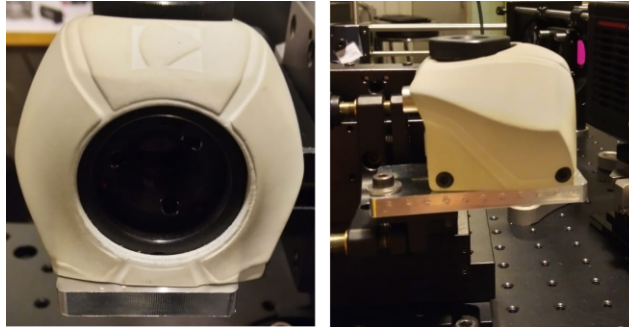


FIG. 2.9 Photographie du premier modèle HASO₄ "Wide" utilisé dans cette thèse

2.3 Caractérisation du capteur

Dans cette section je vais présenter les protocoles de caractérisation de l'analyseur de front d'onde en source étendue, les résultats obtenus et des simulations supplémentaires.

2.3.1 Montage pour la caractérisation du capteur

Protocole expérimental

Puisque la précision de la mesure du front d'onde pilote l'efficacité de correction du front d'onde par la boucle d'OA, une caractérisation de l'analyseur en source étendue est nécessaire. Toutefois, l'évaluation directe de la qualité de notre mesure est difficile car ce développement ne possède pas de référence à Imagine Optic. Par conséquent nous avons décidé de comparer l'ESSH avec un Shack-Hartmann "standard" en barycentrique (Haso3, Imagine Optic) en mesurant le front d'onde issu respectivement de plusieurs ou bien d'une bille fluorescente grâce à des diaphragmes de champ différents (figure 2.10).

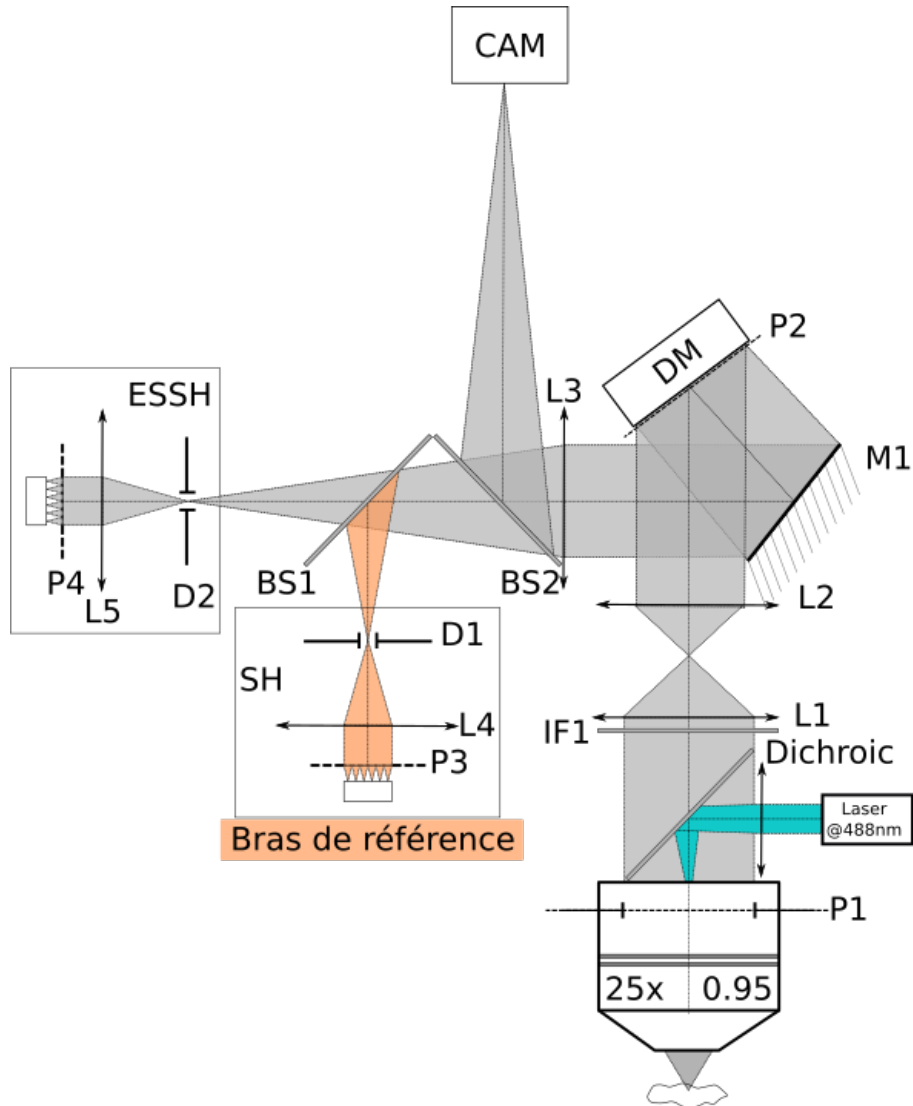


FIG. 2.10 Montage pour évaluer les performances de l'analyseur en source étendue en le comparant à un analyseur classique, L1-5, lentilles; IF, filtres interférentiels; M, miroir; DM, miroir déformable; D1-2, diaphragmes de champ; BS1-2, lame séparatrices (50/50); CAM, caméra. P1-4 plan pupillaires conjugués [6]

Le microscope présenté en figure 2.10 fonctionne en épifluorescence, un laser à 488nm illumine l'échantillon à travers un objectif 25x ouvert à 0.95 (Immersion à eau, Leica). La fluorescence est collectée via le même objectif et un relai de lentilles (L1/L2) permet de conjuguer le plan focal arrière de l'objectif (P1) avec le miroir déformable (DM, P2). L'image est réalisée sur la caméra (Hamamatsu ORCA Flash V2) par la lentille L3 et la réflexion sur la lame séparatrice (BS2). Enfin, le front d'onde est mesuré par le SH, bras de référence orange, et également par l'ESSH (en transmission de la lame BS1).

Grâce aux deux diaphragmes de champ (D1 et D2) il est possible de mesurer directement une source ponctuelle isolée sur le SH de référence et plusieurs sources ponctuelles formant une source étendue sur l'ESSH. Le SH pilote la boucle d'OA et donc le DM.

L'expérience consiste à envoyer sur le miroir des commandes pour obtenir des fronts d'ondes correspondant à des modes de Zernike purs et à évaluer sur l'ESSH et le SH la différence de mesure. Il faut prendre en considération auparavant les aberrations

différentielles entre les deux analyseurs générées par les chemins optiques différents. Pour ce faire, une référence du front d'onde pour chaque analyseur est acquise avant chaque acquisition et soustraite afin d'éliminer les aberrations différentielles.

Les billes fluorescentes utilisées ($2\mu\text{m}$, $\lambda_{em} = 515\text{nm}$, Thermofisher) peuvent être considérées comme ponctuelles car en-dessous de la limite de diffraction pour le SH et l'ESSH.

Les billes sont disposées entre deux lamelles de verre. La lamelle avant l'objectif induit des aberrations, car celui-ci n'est pas corrigé d'une lamelle, mais les mesures étant relatives, ces aberrations peuvent être considérées comme un décalage commun aux deux analyseurs. Nous avons fait varier les valeurs des modes de Zernike entre $\pm 200\text{nm}$, ce qui correspond à l'amplitude des aberrations générées par des échantillons biologiques à plusieurs dizaines de micromètres de profondeur en fluorescence à 1 photon et que nous avons, plus tard, mesurées dans nos expériences [22].

Résultats de la caractérisation

Les mesures d'un même front d'onde issues du SH classique et du ESSH sont présentées en figure 2.11. Le graphique représente la différence de mesure de chaque aberration du 3ème ordre entre les deux analyseurs en fonction de l'amplitude de l'aberration générée par le miroir.

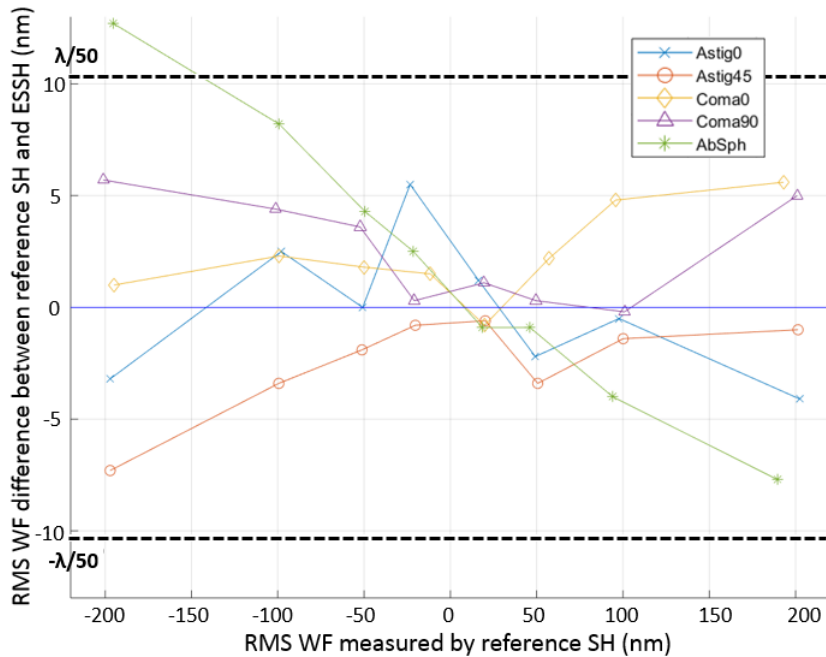


FIG. 2.11 Graphique présentant la différence de mesure de front d'onde entre le SH et l'ESSH pour des aberrations du 3ème ordre de 0 à $\pm 200\text{nm}$ RMS

Nous voyons que la différence entre les valeurs des aberrations considérées ici est inférieure à 10nm sur la totalité des mesures effectuées excepté pour l'aberration sphérique à -200nm . Le front d'onde est mesuré par le SH classique avec une précision à $\lambda/100$ et permet donc d'évaluer la précision du ESSH $\lambda/50$. Une mesure à $\lambda/50$ satisfait le critère de Maréchal.

Nous pouvons attribuer une partie de l'erreur entre les deux mesures aux différences de taille de pupilles et à la position du centre des pupilles pour estimer les aberrations en termes de Zernike, en particulier pour l'aberration sphérique, composante

sensible à la taille de la pupille.

Les résultats expérimentaux en comparaison avec le SH montrent une très bonne précision de la mesure en source étendue. Cependant, ceci a été évalué sur des billes fluorescentes contrastées et ponctuelles dans le champ du ESSH. Des simulations complémentaires ont été effectuées pour des structures variables dans un échantillon étendu.

2.3.2 Discussion sur l'influence des structures de l'objet sur la mesure du front d'onde

La mesure de front d'onde en source étendue utilise la corrélation entre les imagerie formées par les microlentilles et dépend donc de la structure spatiale du signal dans ces imagerie. Nous avons ici évalué la précision du ESSH en fonction des fréquences spatiales de l'échantillon en utilisant l'algorithme 2.1 et des échantillons cette fois-ci simulés. Les échantillons sont créés à partir de couronnes dans l'espace de Fourier, des plus basses fréquences aux plus hautes permises, soit jusqu'à la fréquence de coupure de l'ESSH comme représenté sur la figure 2.12. La fréquence de coupure est définie par $f_c = \frac{2ON}{\lambda} \simeq 0.12\mu\text{m}^{-1}$.

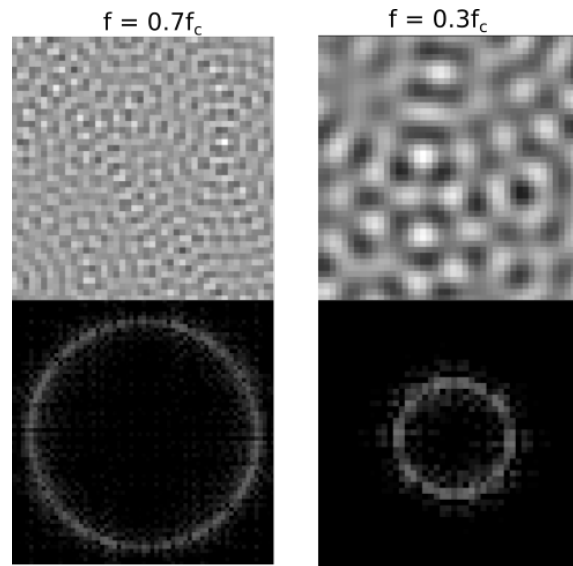


FIG. 2.12 Représentation des images simulées et de leurs transformées de Fourier ($43 \times 43 \text{ pixels}^2$) utilisées dans l'étude de l'influence des fréquences spatiales de l'échantillon sur la mesure de front d'onde

Une imagerie enregistrée par l'analyseur ESSH est simulée pour une taille de couronne dans l'espace de Fourier variable. Elle est tout d'abord convoluée à un filtre Laplacien puis translatée de ± 1 pixels et corrélée à l'image de départ, de référence. L'estimation de la position du pic de corrélation se fait à l'aide de la méthode d'interpolation subpixelique pyramidale.


```

im ← FRing(n, fc)           ▷ Création couronne à n * fc n ∈ [0, 1]
for i ← 1, 20 do
    im(:, :, i) ← tran(im, rand(x, y) * 4 - 2)   ▷ Translation -2 à 2 pixels
end for
for i ← 1, 200 do
    C(i) ← FindShift(im(:, :, 1), im(:, :, i), 'LoG + Pyram')   ▷ Calcul
    déplacement
end for

```

Algorithme 2.2 Déplacements aléatoires sur des images issues de couronnes dans l'espace de Fourier

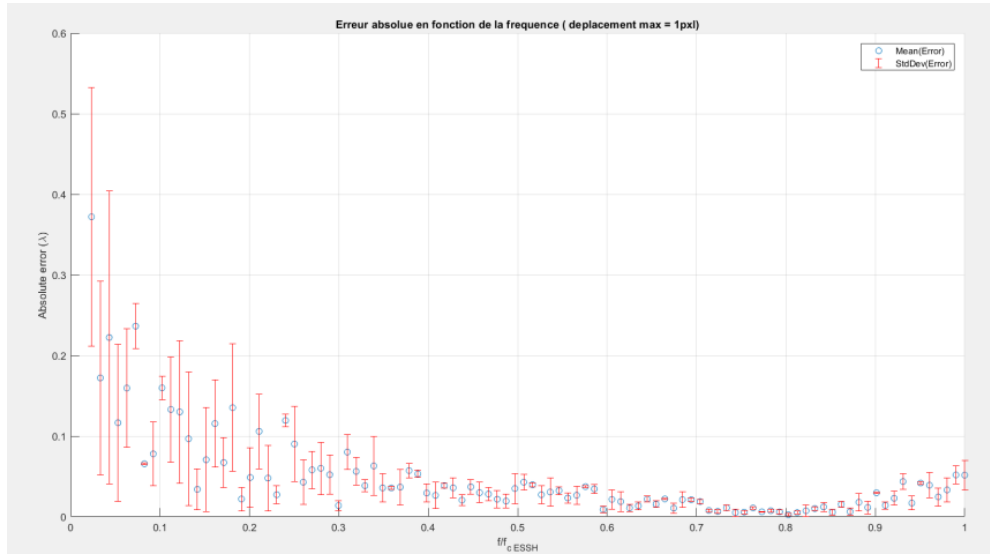


FIG. 2.13 Moyenne de l'erreur de la mesure de déplacement (en portion de λ) pour 20 tirages de déplacements aléatoires entre ± 1 pixel en fonction de la fréquence spatiale de l'échantillon, la barre d'erreur représente l'écart-type

Sur la figure 2.13 nous pouvons voir que la moyenne de l'erreur pour 20 déplacements aléatoires est minimale pour des fréquences spatiales entre $0.6f_c$ et $0.8f_c$. Ces fréquences correspondent à des structures cellulaires d'environ 10 micromètres, soit l'équivalent des corps cellulaires ou regroupements d'axones dans le cadre de la neuroimagerie de la drosophile adulte. Nous retrouvons d'ailleurs une précision similaire à notre simulation effectuée précédemment visible en figure 2.8. L'écart-type est minimal pour cette même plage de fréquence ce qui représente une robustesse de la mesure en plus de sa précision moyenne.

Cette section nous a permis de réaliser une caractérisation du capteur sur sa capacité de correction et sur le type de fréquences spatiales auquel il est le plus sensible. Nous pouvons conclure que le dimensionnement de notre analyseur est donc adapté à la neuroimagerie de fluorescence chez la drosophile adulte.

2.4 Premiers résultats sur échantillons biologiques

Pour mener des premières expériences sur échantillons biologiques, nous avons utilisé des cellules imagées sur le même microscope que montré en figure 2.10 duquel est retiré le bras de référence.

2.4.1 Description de l'échantillon biologique

Les cellules mesurent quelques dizaines de micromètres latéralement avec une épaisseur inférieure à 10 micromètres. Comme nous n'utilisons ici pas de microscope à sectionnement optique et que l'analyseur à une grande profondeur de champ les aberrations sont mesurées sur toute l'épaisseur alors que la caméra d'imagerie à une plus faible profondeur de champ égale à 750nm.

2.4.2 Protocole

Pour réaliser cette expérience nous avons tout d'abord calibré la boucle d'OA entre l'ESSH et le DM.

Pour cela nous utilisons un protocole d'étalonnage via le logiciel WaveTune qui permet de générer une matrice d'interaction et de commande pour piloter le miroir. Une fois ceci réalisé, nous pouvons vérifier sur un échantillon test de billes la capacité de notre ESSH à corriger les aberrations initialement présentes dans le microscope. Nous enregistrons la forme de miroir ce qui permet d'éliminer les aberrations statiques.

La figure 2.14(a) montre l'image d'une cellule corrigée des aberrations statiques du microscope sur la caméra scientifique et une imagerie en (c). L'image (b) représente l'ensemble de l'image acquise sur l'analyseur de front d'onde constituée de toutes les imagerie formées par les microlentilles.

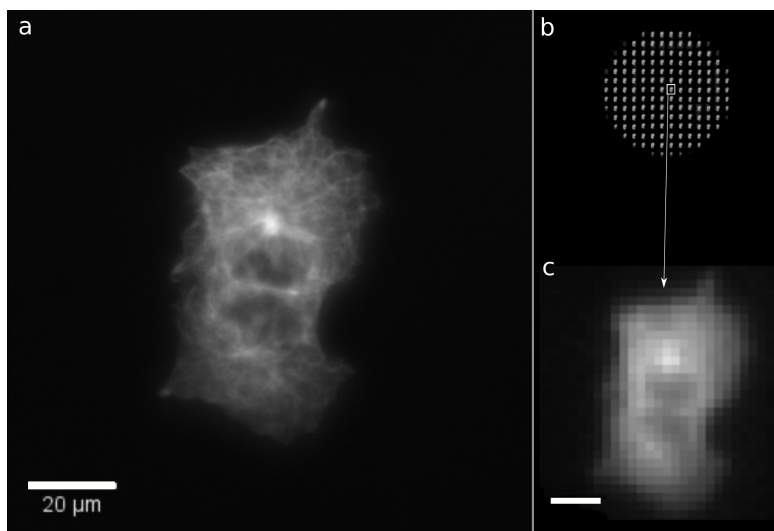


FIG. 2.14 Cellules *COS7* où la tubuline est marquée avec *Alexa488* (a) Caméra d'imagerie (b) Image sur le capteur *ESSH*, (c) Zoom sur une imagerie du capteur. Barre d'échelle : $20\mu\text{m}$

Pour travailler sur des cellules vivantes, nous avons ensuite utilisé des cellules HeLa. Celles-ci sont marquées en fluorescence sur les mitochondries avec le "MitoTracker-Green" (MTG, Thermofisher). Nous procédons au même protocole qu'auparavant.

2.4.3 Résultats

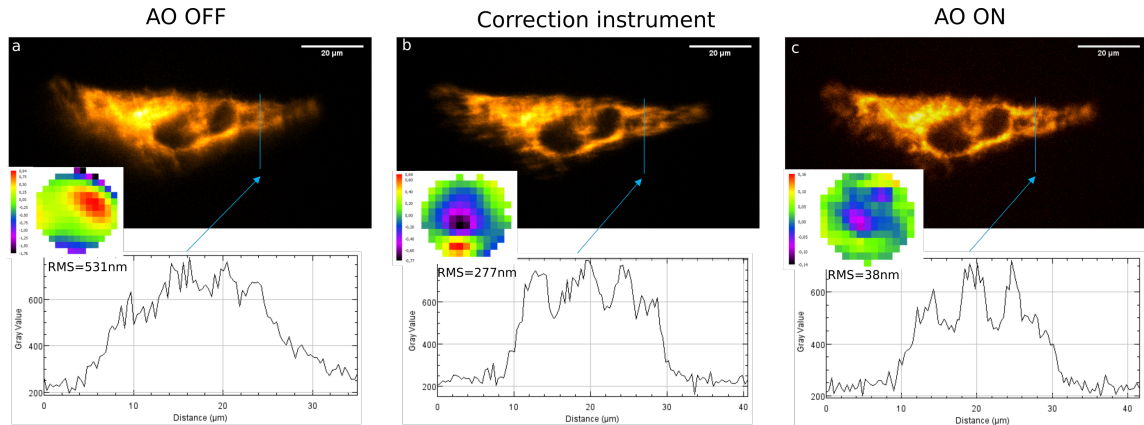


FIG. 2.15 Cellules HeLa marquée au MTG sans correction, avec correction de l'instrument, et correction complète. 36 modes de correction, gain de 0.2, barre d'échelle 20 μm

Les résultats sont présentés en figure 2.15. L'image (a) est obtenue sans optique adaptative *i.e* avec les aberrations du microscope et de la boucle d'OA ajoutée entre le microscope et la caméra. L'image (b) est obtenue après correction des aberrations statiques du microscope. Le front d'onde mesuré est alors de 277nm RMS. Ceci correspond aux aberrations induites par l'échantillon. L'image (c) est obtenue après correction des aberrations par la boucle d'OA et le front d'onde mesuré est de 38nm RMS. La quantité d'aberration mesurée RMS est réduite d'un facteur 7 et correspond à une diminution des aberrations de $\lambda/2$ à $\lambda/14$, le critère de Maréchal. Les performances en termes de correction du front d'onde correspondent à celles attendues d'après nos simulations et notre dimensionnement.

Les résultats sur l'image sont visibles, l'image apparaît plus nette et contrastée comme en témoigne les profils entre les figures 2.15(b) et (c). La correction montre une augmentation du contraste sur les profils d'environ 40%. Ce résultat encourageant a été en 2019 le premier, à notre connaissance, acquis en microscopie en utilisant de l'optique adaptative avec un analyseur en source étendue.

Nous avons décrit dans ce chapitre ici la réalisation et la caractérisation d'un analyseur de Shack-Hartmann en source étendue pour l'imagerie d'échantillon biologiques en microscopie de fluorescence. C'est un premier développement très encourageant et nous allons par la suite utiliser cette nouvelle technique de mesure et de correction des aberrations induites par l'échantillon sur un microscope à sectionnement optique pour permettre de corriger des échantillons plus épais et plus aberrants.

2.5 Conclusion et perspectives

La première année de thèse a été consacrée au développement et à la caractérisation d'un nouvel analyseur en source étendue ainsi que son implémentation dans

une boucle d'optique adaptative dans un microscope de fluorescence. Une première expérience a montré une précision de mesure du front d'onde et une correction de ce dernier aboutissant à un gain en contraste sur un échantillon vivant de 50%. Les simulations ont montré une sensibilité et un dimensionnement adapté aux structures cellulaires d'intérêt dans le cerveau de la drosophile.

Notre analyseur ESSH ne nécessite pas d'étoile guide mais un plan guide. Ce couplage avec un système d'imagerie à sectionnement optique est compatible avec les microscopes communément utilisés en neuroimagerie tels que les microscopes multiphotoniques ou les microscopes à feuille de lumière.

Ce premier prototype ouvre la voie à de nouvelles explorations pour améliorer ses performances. D'une part, l'amélioration des méthodes de corrélation pour gagner en temps de calcul, des méthodes de préfiltrage et de la détection subpixelique de la position du pic de corrélation pour la précision de mesure du front d'onde. Mais comme nous l'avons vu, ces paramètres dépendent également de l'échantillon, et, par conséquent, chaque échantillon a sa propre configuration optimale. Ainsi, l'apprentissage de critères par rapport à l'imagette reçue ou par rapport à l'image caméra pour paramétrer l'ESSH permettraient d'obtenir une convergence plus rapide de nos algorithmes.

D'autre part, l'utilisation comme image de référence d'une imagette centrale de l'analyseur n'est pas forcément idéale. Nous avons actuellement choisi ce développement pour simplifier la mise en place mais il est possible que l'imagette centrale soit à l'origine d'un biais de mesure dû à son illumination par exemple ; l'imagette centrale n'est pas nécessairement la mieux éclairée de la pupille. Des comparaisons en modifiant la position de l'imagette de référence nous ont permis de mettre en évidence la dépendance de la mesure à cette référence à cause des défauts locaux de certaines imagettes. C'est un travail qui pourrait être développé en automatisant le choix de la référence en fonction d'un critère d'intensité ou de fréquences spatiales. Il serait également possible d'utiliser l'image issue de la caméra d'imagerie comme image de référence puisqu'elle a une résolution et un contraste meilleurs. Un sous-échantillonnage numérique pourrait apporter de la précision et de la robustesse.

Bibliographie

- [1] P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Lorientte, and A. Fragola. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *Journal of Biomedical Optics*, 16(7), 2011.
- [2] Tsung-Li Liu, Srigokul Upadhyayula, Daniel E. Milkie, Ved Singh, Kai Wang, Ian A. Swinburne, Kishore R. Mosaliganti, Zach M. Collins, Tom W. Hiscock, Jamien Shea, Abraham Q. Kohrman, Taylor N. Medwig, Daphne Dambournet, Ryan Forster, Brian Cunniff, Yuan Ruan, Hanako Yashiro, Steffen Scholpp, Elliot M. Meyerowitz, Dirk Hockemeyer, David G. Drubin, Benjamin L. Martin, David Q. Matus, Minoru Koyama, Sean G. Megason, Tom Kirchhausen, and Eric Betzig. Observing the cell in its native state : Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science*, 360(6386) :eaaq1392, April 2018. Citation Key Alias : liu_observing_2018-2.
- [3] V. Michau, G. Rousset, and J. Fontanella. Wavefront sensing from extended sources. *Real Time and Post Facto Solar Image Correction*, 1 :124–128, 1993.
- [4] Jerome Mertz, Hari Paudel, and Thomas G. Bifano. Field of view advantage of conjugate adaptive optics in microscopy applications. *Applied Optics*, 54(11) :3498, April 2015.
- [5] Keelan Lawrence, Yang Liu, Savannah Dale, Rebecca Ball, Ariel J. VanLeuven, Andrew Sornborger, James D. Lauderdale, and Peter Kner. Scene-based Shack-Hartmann wavefront sensor for light-sheet microscopy. In *Adaptive Optics and Wavefront Control for Biological Systems IV*, volume 10502, page 105020B. International Society for Optics and Photonics, February 2018.
- [6] Antoine Hubert, Fabrice Harms, Rémy Juvéanal, Pauline Treimany, Xavier Levecq, Vincent Lorientte, Georges Farkouh, François Rouyer, and Alexandra Fragola. Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star. *Optics Letters*, 44(10) :2514, May 2019.
- [7] Yusuke Ashida, Yusuke Honma, Noriaki Miura, Takatoshi Shibuya, Hayao Kikuchi, Yosuke Tamada, Yasuhiro Kamei, Atsushi Matsuda, and Masayuki Hattori. Imaging performance of microscopy adaptive-optics system using scene-based wavefront sensing. *Journal of Biomedical Optics*, 25(12), December 2020.
- [8] Zhentao Zhang, Nazim Bharmal, Tim Morris, and Yonghui Liang. Laboratory quantification of a plenoptic wavefront sensor with extended objects. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 497(4) :4580–4586, 2020.
- [9] *Adaptive Optics in Solar Observations*, 1987.
- [10] Thomas R Rimmele and Richard R Radick. Solar adaptive optics at the national solar observatory. In *Adaptive Optical System Technologies*, volume 3353, pages 72–81. International Society for Optics and Photonics, 1998.
- [11] V. Michau, J.-M. Conan, T. Fusco, M. Nicolle, C. Robert, M.-T. Velluet, and E. Piganeau. Shack-Hartmann wavefront sensing with extended sources. page 63030B, San Diego, California, USA, August 2006. Citation Key Alias : michau_shack-hartmann_2006-1.

- [12] Martin Rais, Jean-Michel Morel, Carole Thiebaut, Jean-Marc Delvit, and Gabriele Facciolo. Improving wavefront sensing with a Shack–Hartmann device. *Applied Optics*, 55(28) :7836, October 2016. Citation Key Alias : rais_improving_2016-2.
- [13] M Rais, J-M Morel, C Thiebaut, J-M Delvit, and G Facciolo. Improving the accuracy of a Shack-Hartmann wavefront sensor on extended scenes. *Journal of Physics : Conference Series*, 756 :012002, October 2016. Citation Key Alias : rais_improving_2016-3.
- [14] Narsireddy Anugu, Paulo J. V. Garcia, and Carlos M. Correia. Peak-locking centroid bias in Shack-Hartmann wavefront sensing. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 476(1) :300–306, May 2018. arXiv : 1801.06836.
- [15] Max Born and Emil Wolf. *Principles of Optics : Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light (7th Edition)*. Cambridge University Press, 7th edition, 1999.
- [16] Na Ji. Adaptive optical fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 14(4) :374–380, April 2017.
- [17] D Gratadour, LM Mugnier, and D Rouan. Sub-pixel image registration with a maximum likelihood estimator-application to the first adaptive optics observations of arp 220 in the l' band. *Astronomy & Astrophysics*, 443(1) :357–365, 2005.
- [18] M. G. Löfdahl. Evaluation of image-shift measurement algorithms for solar Shack-Hartmann wavefront sensors. *Astronomy & Astrophysics*, 524 :A90, December 2010.
- [19] Mélanie Pedrazzani, Vincent Loriette, Paul Tchenio, Sakina Benrezzak, Daniele Nutarelli, and Alexandra Fragola. Sensorless adaptive optics implementation in widefield optical sectioning microscopy inside in vivo drosophila brain. *Journal of biomedical optics*, 21(3) :036006, 2016.
- [20] A Masson, M Pedrazzani, S Benrezzak, P Tchenio, T Preat, and D Nutarelli. Micromirror structured illumination microscope for high-speed in vivo drosophila brain imaging. *Optics express*, 22(2) :1243–1256, 2014.
- [21] Gerard Rousset. Wave-front sensors. *Adaptive optics in astronomy*, 1 :91, 1999.
- [22] M Schwertner, M J Booth, and T Wilson. Characterizing specimen induced aberrations for high NA adaptive optical microscopy. *Optics Express*, 12(26) :13, 2004.

Chapitre 3

Implémentation d'une boucle d'OA en source étendue sur un microscope à feuille de lumière

Sommaire

3.1	La microscopie à feuille de lumière pour l'imagerie du vivant	62
3.1.1	État de l'art de la microscopie des tissus	62
3.1.2	L'apport de l'optique adaptative en microscopie à feuille de lumière	69
3.2	Réalisation d'un AO-LSFM en source étendue	72
3.2.1	L'implémentation d'un bras d'OA en LSFM	72
3.2.2	Réalisation du porte échantillon	74
3.3	Caractérisation du microscope	75
3.3.1	Performances du AO-LSFM	75
3.3.2	La zone isoplanétique	82
3.4	Limitations liées aux échantillons volumétriques	84
3.5	Conclusion et perspectives	86

Nous avons vu précédemment que l'analyseur de front d'onde en source étendue nécessite un plan guide. Ce plan guide peut être obtenu à l'aide d'un microscope à sectionnement optique. Nous avons décidé d'utiliser un microscope à feuille de lumière qui présente des avantages quant à sa rapidité d'exécution pour imager en trois dimensions des échantillons vivants avec une phototoxicité et un photoblanchiment limités. Dans ce chapitre je vais présenter le développement de ce microscope et la mise en œuvre d'une boucle d'optique adaptative avec notre nouvel analyseur en source étendue.

3.1 La microscopie à feuille de lumière pour l'imagerie du vivant

Je vais ici introduire la microscopie pour l'imagerie du vivant à sectionnement optique, sa mise en place et les développements récents. Puis je m'attarderai sur les techniques de microscope à feuille de lumière (LSFM) et l'utilisation de l'optique adaptative (OA) dans celles-ci.

3.1.1 État de l'art de la microscopie des tissus

Dans l'objectif permanent de comprendre les systèmes biologiques, la microscopie a évolué pour s'adapter aux conditions nécessaires à l'imagerie de ces échantillons. Les phénomènes à observer peuvent être rapides (de l'ordre de quelques millisecondes si l'on étudie la propagation d'un signal nerveux), mais également sensibles à la longueur d'onde désirée, sur de larges champs ou à des profondeurs importantes dans le tissu.

Les microscopes ont depuis longtemps été utilisés soit dans une configuration de transmission, soit de réflexion. Les microscopes de fluorescence, en particulier, permettent, grâce aux longueurs d'ondes mises en jeu, de séparer le faisceau d'excitation de celui d'émission via un miroir dichroïque et des filtres interférentiels. Pour des raisons pratiques, la réflexion est majoritairement utilisée puisque le même objectif sert à la fois pour illuminer l'échantillon et pour collecter la lumière issue de celui-ci. Nous allons ici expliquer en quoi le LSFM est avantageux pour le suivi en neuroimagerie par rapport à d'autres techniques de microscopie, quels sont les LSFM actuels et quelles sont les limites qu'ils rencontrent.

Les microscopies à sectionnement optique

En imagerie du vivant et notamment en neuroimagerie, il est nécessaire d'avoir à la fois un grand champ de vue, pour observer plusieurs neurones en fonctionnement, et une grande vitesse d'acquisition, pour suivre les processus biologiques en jeu. Un microscope plein champ de fluorescence peut tout à fait répondre à cette problématique mais ne pourra être efficace qu'en surface de l'échantillon. En effet, en profondeur, puisque l'échantillon est totalement illuminé, le signal issu de l'ensemble du volume va s'additionner à l'image d'intérêt du plan de mise au point comme représenté figure 3.1. En d'autres termes, le rapport signal sur fond (SBR) va diminuer.

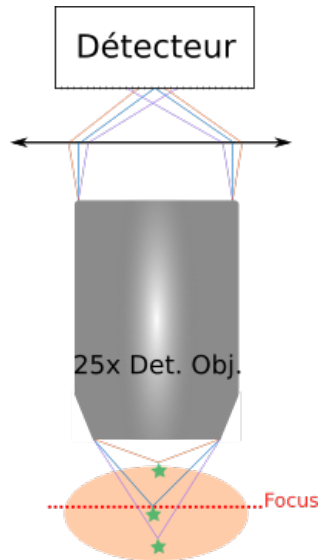


FIG. 3.1 *Influence d'émetteurs multiples à diverses profondeurs en microscopie*

Pour éliminer le signal issu des plans hors du plan de mise au point, il est nécessaire de discriminer les photons qui ne servent pas à la formation de l'image. Pour cela, il existe des techniques instrumentales et des techniques numériques. C'est ce qu'on appelle le sectionnement optique.

Pour réaliser un sectionnement optique directement dans le microscope, les approches de microscopies à balayage comme la microscopie confocale, développée notamment à partir des années 1980 par C. SHEPPARD, sont très souvent utilisées. Dans ce dernier microscope, par le biais d'un diaphragme dont la taille approche la limite de diffraction devant le détecteur, l'émission de fluorescence des plans hors du plan de mise au point de l'objectif va être éliminée. En effet, dans le cadre d'émetteurs multiples présentés en figure 3.1, les rayons violets et marrons sont filtrés par le diaphragme du microscope confocal. Le SBR est alors augmenté dans ce cas car les émetteurs qui ne participent pas à la formation de l'image sont filtrés. Toutefois ce gain a un coût en cadence d'acquisition puisque pour imager un grand champ, il faut balayer le diaphragme sur l'ensemble de ce dernier. À cela s'ajoute le photoblanchiment puisque l'ensemble de l'échantillon est éclairé sur sa dimension axiale quelle que soit la profondeur du plan de mise au point (voir 3.3). Plus l'observation se fait en profondeur, plus la puissance d'illumination nécessaire sera grande pour compenser les phénomènes d'absorption et diffusion du tissu en augmentant ainsi la phototoxicité.

L'utilisation d'un disque rotatif troué, proposée en 2002, appelé disque de Nipkow, permet la détection de beaucoup plus de points au même instant pour augmenter la cadence d'acquisition [1]. La multiplication des trous permet de limiter la phototoxicité et le photoblanchiment de l'échantillon par rapport au système confocal classique. En revanche, l'utilisation du disque n'est pas efficace en ce qui concerne l'utilisation de la lumière incidente. Bien que des développements permettent d'augmenter le rendement [2], la profondeur de pénétration de la lumière reste limitée puisque la puissance de la lumière par pixel reste faible.

Enfin, dans les années 1990, les microscopies non-linéaires ont été introduites permettant de dépasser cette limite de profondeur tout en limitant le photoblanchiment de l'échantillon [3]. Ces développements englobent à la fois l'imagerie de fluorescence

multiphotonique ainsi que les imageries de signaux d'harmoniques [4, 5]. Cette absorption de plusieurs photons n'a lieu que là où la densité d'énergie est suffisante, dans le volume focal. Cela limite l'émission hors du plan focal. Il est alors nécessaire de balayer l'échantillon pour obtenir une image à des cadences similaires à celles du microscope confocal.

Pour gagner en cadence d'acquisition et suivre des processus dynamiques, la microscopie à illumination structurée (SIM), introduite en 1997 par l'équipe de T. WILSON, permet un sectionnement optique grâce à la modulation du signal d'excitation par une grille [6]. La fluorescence émise dans le plan focal de l'objectif possède alors l'empreinte de la grille et grâce à un traitement des images il est possible de discriminer le plan de mise au point du reste, c'est une technique de sectionnement optique. Néanmoins elle reste basée sur un microscope plein champ avec une impossibilité d'aller en profondeur dans l'échantillon. En effet, imager une grille sur un échantillon s'avère difficile en profondeur car les aberrations de l'échantillon vont dégrader la qualité de l'image de la grille, ce qui rend la démodulation et donc le sectionnement optique moins précis.

L'ensemble de ces techniques montre que le sectionnement optique induit généralement un coût en terme de cadence d'acquisition ou de complexité. Nous voyons ici qu'il existe un besoin en microscopie du vivant pour l'étude de phénomène dynamiques dans des échantillons épais. La microscopie à feuille de lumière (LSFM) peut y répondre avec une illumination uniquement du plan d'intérêt comme représenté en figure 3.2.

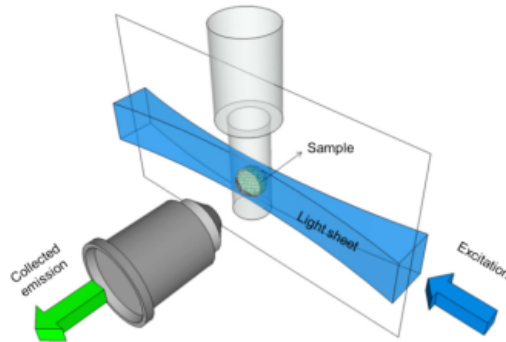


FIG. 3.2 Principe de fonctionne d'un LSFM d'après [7]

En effet, c'est, d'une part, une technique dite "plein champ", où tous les pixels du plan focal de l'objectif sont illuminés et imagés simultanément, ce qui permet une cadence d'acquisition importante. D'autre part, parce que l'illumination est perpendiculaire à la détection, un sectionnement optique intrinsèque est induit. Ceci limite la lumière issue des plans hors du plan de mise au point et la puissance d'excitation comme représenté figure 3.3. Il y a donc une phototoxicité et un photoblanchiment de l'échantillon plus faibles.

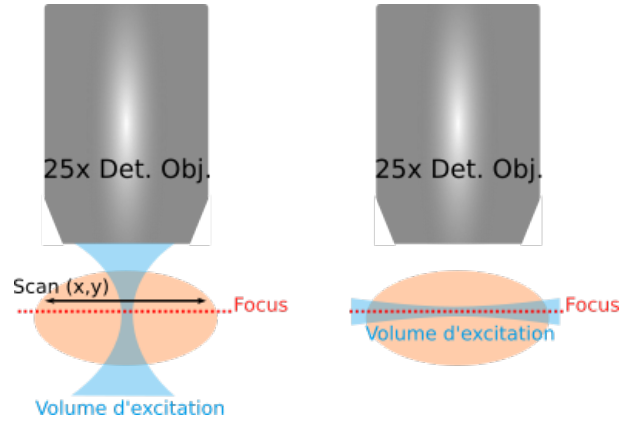


FIG. 3.3 Comparaison entre microscope conventionnel à balayage et LSFM

Bien que décrit dans la littérature scientifique dès 1902, il aura fallu attendre près d'un siècle pour qu'il suscite un intérêt dans la communauté de la microscopie de fluorescence notamment grâce à l'émergence de la protéine GFP ("Green fluorescence protein") et l'utilisation d'animaux modifiés génétiquement pour étudier des processus dynamiques quand le microscope confocal était inadapté [8, 9, 10]. Depuis, de nombreuses méthodes basées sur le LSFM ont été développées pour s'adapter à des problématiques spécifiques.

Un microscope à feuille de lumière se compose tout d'abord de deux éléments bien distincts que sont le bras d'illumination et le bras d'excitation. L'échantillon va donc être éclairé par le côté via, généralement, un second objectif, dit objectif d'excitation. Pour réaliser ce montage il y a donc besoin pour l'échantillon d'une "chambre" transparente. Par exemple une cuve composée de parois en verre afin d'immerger l'échantillon dans de l'eau ou dans un gel d'agarose. La feuille de lumière a initialement été créée avec une lentille cylindrique qui permet de focaliser les rayons du faisceau dans une direction seulement, et donc de générer une feuille [10]. Les éléments clés de cette feuille sont son épaisseur et son évolution autour du plan focal image de la lentille cylindrique, en d'autres termes sa profondeur de champ. Cette dernière doit correspondre au champ d'observation défini par l'objectif de détection et la caméra.

La largeur d'une feuille de lumière peut se calculer à partir de l'optique des faisceaux gaussiens puisque nous utilisons un rayonnement cohérent issu d'un laser pour illuminer l'échantillon. Le rayon du faisceau noté w est minimum au niveau de l'origine $w = w_0$. Ainsi, l'épaisseur minimale de la feuille obtenue en focalisant un faisceau avec un objectif d'ouverture numérique ON peut s'écrire ([7]) :

$$2w_0 = \frac{2n\lambda}{\pi ON}$$

où λ est la longueur d'onde du faisceau laser d'excitation

La zone axiale pour laquelle le rayon du faisceau est inférieur à $\sqrt{2}w_0$, est notée Z_R . Elle peut être calculée à partir de l'ouverture numérique de la lentille :

$$Z_R = \frac{2nw_0}{ON}$$

La figure 3.4 permet de résumer ces différents paramètres pour une deux objectifs perpendiculaires, d'excitation et de détection de focales respectivement égales à f et f_{obj} .

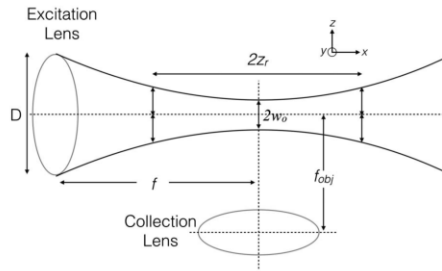


FIG. 3.4 Représentation des paramètres lors de la focalisation d'un faisceau gaussien (extrait de [7])

Pour une illumination à $\lambda = 500\text{nm}$ nous aurons donc pour deux objectifs d'excitation d'ouvertures numériques égales à 0.1 et 1 nous aurons :

- $ON = 0.1 \Rightarrow w_0 = 1\mu\text{m} \quad Z_R \sim 63\mu\text{m}$
- $ON = 1 \Rightarrow w_0 = 0.32\mu\text{m} \quad Z_R \sim 0.6\mu\text{m}$

Les équations et l'exemple ci-dessus montrent que w_0 et Z_R dépendent de l'ouverture numérique et de la longueur d'onde d'excitation : une forte ouverture numérique permet d'obtenir un waist très fin mais aussi une extension axiale réduite. Le microscope à feuille de lumière idéal fait correspondre $2w_0$ et $2Z_R$ de l'illumination à, respectivement, la profondeur de champ et la taille du champ objet de l'objectif de détection. Or, les performances actuellement visées correspondent à une feuille très fine (w_0 inférieure à $1\mu\text{m}$) et un champ de l'ordre de plusieurs centaines de μm , ce qui n'est pas possible en focalisant un faisceau gaussien avec une lentille d'ouverture numérique donnée. C'est pourquoi de nombreuses techniques avancées ont été proposées ces quinze dernières années.

Les techniques de microscopie à feuille de lumière

Le premier montage de référence de LSFM, appelé SPIM ("Selective Plane Illumination Microscopy") a été développé par l'équipe de E. STELZER en 2004 [10].

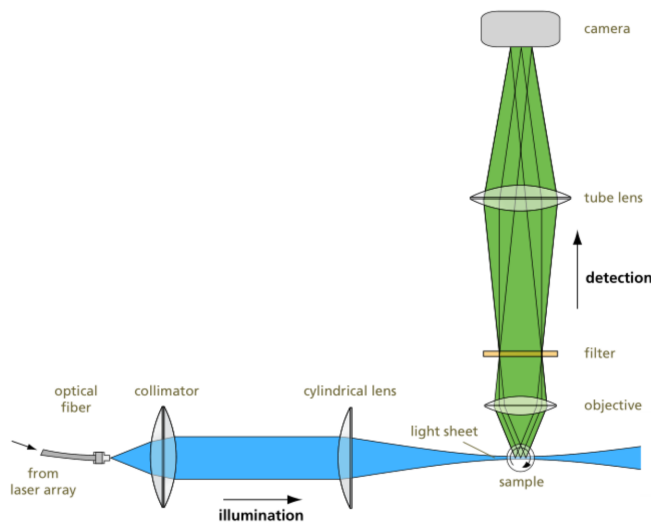


FIG. 3.5 Principe de fonctionne d'un microscope SPIM (extrait de [10])

Il se compose d'un bras d'excitation et d'un bras d'illumination perpendiculaires. Pour former la feuille, une lentille cylindrique convergente est utilisée. Cette dernière focalise le faisceau selon un axe et, grâce à une distance focale adaptée, forme une feuille de lumière de l'ordre de la dizaine de micromètres d'épaisseur. Afin de réduire l'épaisseur de la feuille, il est possible d'utiliser en plus de la lentille cylindrique un objectif de microscope.

Les résultats obtenus sur un échantillon vivant, comme le montre la figure 3.6, apportent un sectionnement optique comme en microscopie confocale et permet donc l'observation d'échantillons épais avec un bon contraste.

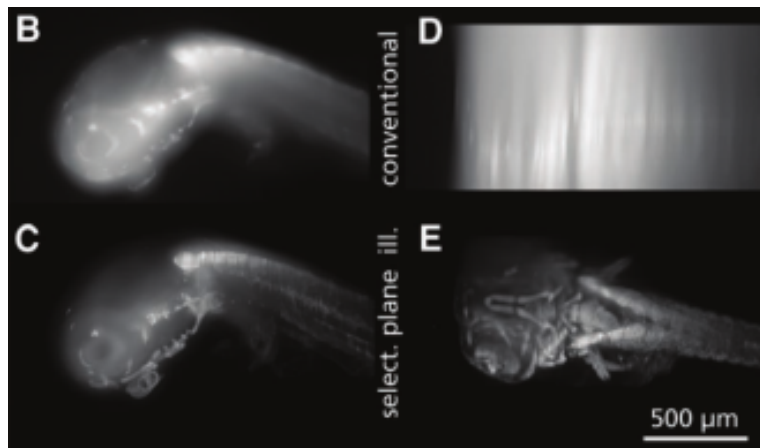


FIG. 3.6 *Embryon de medaka en microscopie conventionnelle (B,D) et en SPIM (C,E) (extrait de [10])*

Cette méthode a également été utilisée pour l'imagerie d'organes et de cellules agrégées [11, 12].

Pour augmenter l'efficacité d'illumination et par conséquent la qualité de l'image, l'utilisation d'un miroir galvanométrique permettant le balayage du faisceau à haute cadence a été proposée sous le nom de "Digital scanned light sheet microscopy" (DSLM) [13]. En balayant suffisamment vite le laser, il est possible d'obtenir une feuille de lumière virtuelle ce qui augmente l'efficacité d'illumination (chaque zone de l'échantillon est balayée avec la même intensité lumineuse). Ceci est d'autant plus intéressant que quelques années plus tard, cette technique a été combinée avec le mode "rolling shutter" des caméras d'imagerie scientifique en synchronisant le balayage du faisceau laser et la lecture des lignes de pixels [14]. Ceci augmente le SBR car les photons issus des plans hors du plan de mise au point sont filtrés, de la même manière qu'en microscopie confocale.

L'utilisation de deux objectifs à 45° par rapport à la normale de l'échantillon a solutionné le problème important de l'illumination à travers une chambre [15]. Cette configuration, appelée "Inverted SPIM", représentée figure 3.7, favorise l'accessibilité pour des échantillons épais posés sur une lamelle [16]. De même, la méthode "open-top" représentée sur la figure 3.7 complète les possibilités d'illumination des échantillons pour des zones d'intérêts situées en-dessous, et à proximité de la lamelle [17].

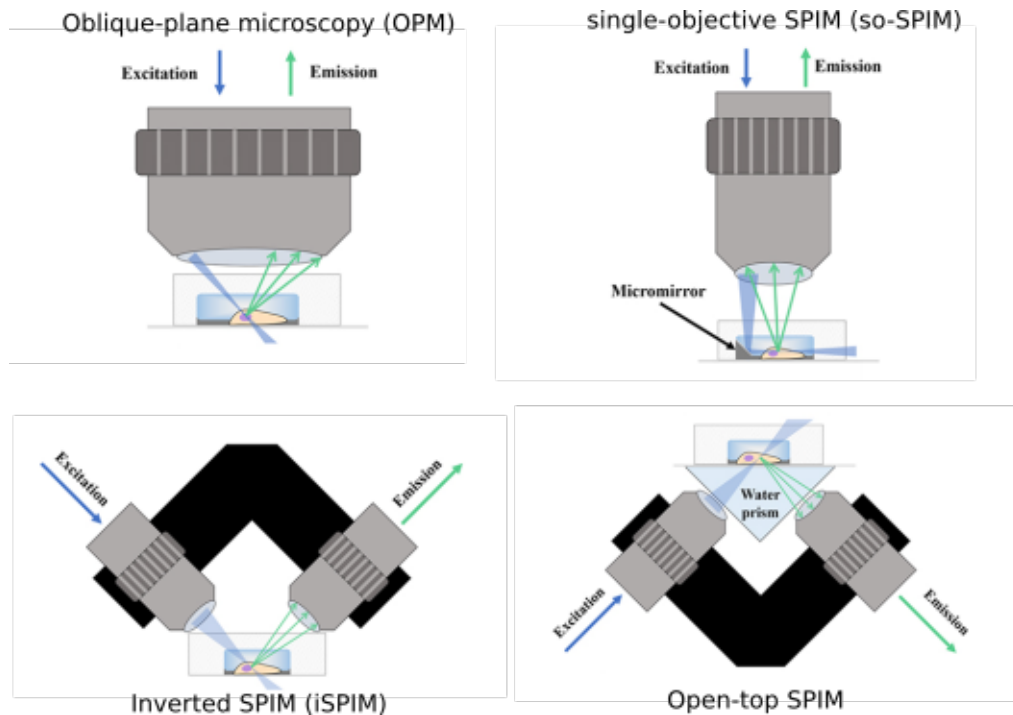


FIG. 3.7 Exemples de configurations utilisées en LSFM (adapté de [18])

L'utilisation de LSFMs a également été rendue possible pour faire le suivi dynamique d'échantillons moins épais et placés entre deux lamelles de microscope tout en limitant le photoblanchiment. L'utilisation d'un objectif de détection à très grande ouverture numérique est couplée à une illumination avec un laser fibré par le côté avec un angle faible par rapport à l'objectif ou en passant par ce même objectif ("Oblique Plane Microscopy") comme indiqué par exemple sur la figure 3.7 [19, 20]. Dans ce cas, le faisceau d'illumination doit être tilté ou alors une configuration originale de la cuve peut-être envisagée comme dans le cas du so-SPIM [21]. Dans ce dernier montage, un micromiroir est directement placé dans la cuve permet de diriger le faisceau d'illumination perpendiculairement à la détection (voir figure 3.7).

En plus de l'ensemble de ces techniques liées aux objectifs, l'état de l'art sur le type de faisceau permettant de former la feuille de lumière est vaste.

Comme nous l'avons précisé avant, pour des faisceaux gaussiens il existe un compromis entre sectionnement optique et champ d'observation. Couvrir un grand champ de $400\mu\text{m}$ de côté implique une épaisseur de 5 à $6\mu\text{m}$ pour un laser à 488nm . Or, la profondeur de champ d'un objectif de détection $25\times$ $ON=1$ à immersion dans l'eau est inférieure au micromètre et donc, inférieure à l'épaisseur d'échantillon éclairée. Pour réduire le bruit de fond lié à la feuille épaisse deux possibilités ont été majoritairement étudiées.

Premièrement, le "remote focusing" qui va par exemple à l'aide d'une lentille de focale variable modifier la position du plan focal image de l'objectif d'excitation. Ainsi, la position du waist peut être balayée rapidement le long de l'échantillon sur le champ vu par l'objectif de détection. De fait, il est possible de balayer axialement la feuille sur une épaisseur $\sim w_0$ sur un champ désiré [22, 23].

Deuxièmement, la mise en forme du faisceau d'illumination en utilisant un modula-

teur spatial de lumière (SLM) ou un masque de phase générant ainsi des faisceaux de Bessel [24, 25], entre-autres [26, 27]. Ces différentes modulations permettent d'obtenir des résolutions axiales et latérales totalement différentes d'un faisceau gaussien. Le "lattice light-sheet" notamment a montré une très haute résolution spatiale et temporelle en utilisant une superposition cohérente de faisceaux de Bessel [28]. La feuille de lumière utilisée est dans ce cas inférieure de l'ordre de grandeur de la profondeur de champ de l'objectif sur un champ de plusieurs dizaines de microns.

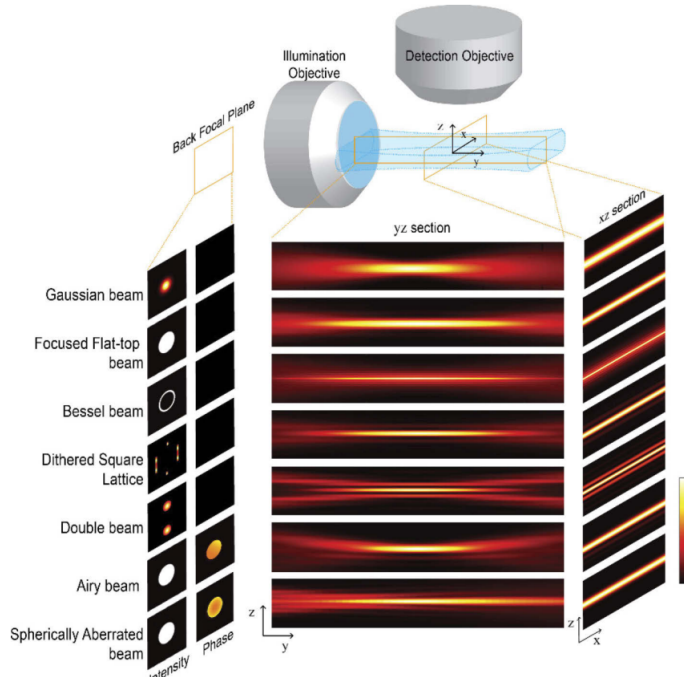


FIG. 3.8 Exemples de configurations utilisées en LSFM (extrait de [29])

Ces différentes configurations de LSFM ont permis d'adapter le microscope à feuille de lumière aux contraintes des divers échantillons observés : cellules, embryons, petit animal fixé ou vivant. Mais quelle que soit la configuration, les performances d'imagerie en profondeur seront toujours limitées par les aberrations induites par l'échantillon [30].

3.1.2 L'apport de l'optique adaptative en microscopie à feuille de lumière

Quelques équipes de recherche ont travaillé sur l'utilisation d'OA pour garder une feuille la plus fine possible dans l'échantillon. De plus, dans certaines microscopes à feuille de lumière complexes, lors de l'imagerie d'échantillons épais, le faisceau d'illumination peut avoir un angle important avec la surface ce qui induit des aberrations supplémentaires.

OA à l'excitation

Du fait de la faible ouverture numérique de l'objectif d'excitation par rapport à l'objectif de détection, celui-ci est moins sensible aux aberrations [31]. Mais nous avons vu précédemment que de nombreux développements ont été faits pour générer des feuilles de lumières originales grâce à un SLM ou un masque de phase. Pour

aller plus loin il a été référencé un SLM combiné à un analyseur de front d'onde pour mesurer et corriger les aberrations à l'excitation [32]. L'avantage d'une telle technique dans un microscope à feuille de lumière est d'utiliser l'objectif d'illumination comme un second objectif de détection pour quantifier les aberrations grâce aux photons émis en épifluorescence. Ainsi, le signal issu de l'échantillon n'est pas consommé aux dépens de la détection et la correction peut se faire rapidement grâce à la mesure directe. L'intérêt est d'obtenir une finesse du faisceau proche axialement pour améliorer le sectionnement optique. Cependant l'ensemble des photons collectés par l'analyseur du front d'onde viendront de l'ensemble des plans illuminés. Par conséquent la mesure sera une moyenne de l'ensemble des aberrations. Par ailleurs, la boucle n'est pas rétroactive car la correction et la mesure sont sur deux faisceaux différents (illumination et détection), il est donc privilégié une correction par anticipation sur un faisceau et non sur une feuille de lumière. Cette méthode ajoute une étape de calcul en amont et reste complexe dans la mise en place pour évaluer la correction dans l'échantillon.

L'équipe d'E. BETZIG a montré en 2018 l'utilisation d'un analyseur à l'excitation corrigeant l'étoile guide virtuelle réalisée à l'aide d'une excitation à deux photons [33]. Cette analyse ne se base non plus seulement sur un faisceau mais sur un point. Par conséquent en balayant ce point sur la zone d'intérêt de la feuille de lumière (en particulier ici un lattice light-sheet) il est possible d'obtenir une correction adaptée sur l'ensemble du plan d'intérêt. L'objectif d'excitation est utilisé cette fois-ci encore une fois pour détecter le signal en épifluorescence où le faisceau est descanné et émis sur un analyseur. Les résultats montrent la capacité à retrouver les performances idéales d'une feuille extrêmement fine du lattice light-sheet, et donc d'atteindre la résolution nominale. En revanche, ceci induit beaucoup de difficultés techniques car la feuille de lumière doit être exactement dans le même plan que celui qui est corrigé, au risque, sinon, de détériorer l'image fortement, il est donc nécessaire d'avoir des dispositifs supplémentaires de maintien du focus.

Nous voyons que la correction via l'OA à l'excitation n'est pas très répandue et peut vite devenir complexe en implémentation, malgré cela, les résultats sont intéressants pour optimiser l'épaisseur de la feuille le long de la traversée de l'échantillon.

OA à la détection

Le premier développement de l'OA pour la LSFM a été réalisé en mesure indirecte ("sensorless") [34]. Il a non seulement permis de corriger les aberrations de l'échantillon mais aussi celles du tube qui maintient le poisson-zèbre. Malheureusement des difficultés ont été relevées quant au choix de la métrique et au positionnement de la région d'intérêt.

Pour les techniques d'OA basé sur la mesure directe du front d'onde il existe une difficulté majeure en imagerie LSFM *in vivo*, par exemple chez le poisson-zèbre, la drosophile ou le ver *C. Elegans*, due à l'introduction d'une étoile guide qui perturbe l'échantillon. Malgré cela, l'utilisation d'émetteurs fluorescents dans des échantillons de cellules tumorales en sphéroïdes a montré un gain significatif en profondeur jusqu'à 200 microns [35]. Les auteurs ont toutefois explicitement précisé que cela peut perturber la mesure et que des techniques d'implémentations autres seront utilisées, typiquement des étoiles directement à l'intérieur de l'échantillon qui pourront être corrigées par des techniques de corrections locales comme réalisées au laboratoire en

2011 [36].

L'équipe de R. FIOŁKA et K. DEAN, notamment à l'origine de systèmes de "remote-focusing" ont implémenté de l'optique adaptative pour pré-compenser l'aberration sphérique dans leurs acquisitions avec un LSFM parallélisé (pLSFM) qui permet d'acquérir des volumes rapidement. Sur des billes la compensation de l'aberration sphérique permet d'augmenter l'intensité jusqu'à 98% [37].

Comme alternative, le groupe d'E. BETZIG, dans le même montage optique que dans le paragraphe précédent, l'utilisation d'un étoile guide virtuelle à partir d'une excitation à deux photons et de coupler la boucle d'OA à l'excitation à un montage lattice light-sheet et l'OA à l'excitation[33]. Ce montage comprend donc deux dispositifs d'OA, l'un permettant l'augmentation de la résolution axiale (à l'excitation) et l'autre l'augmentation de la résolution latérale (à la détection) en utilisant la même source à deux photons dans chacun des bras via un miroir galvanométrique.

Ce montage montre un gain significatif grâce à l'OA en résolution spatiale et en signal mais reste très complexe d'utilisation pour des expériences de routine en biologie comme le montre la figure 3.9. Il requiert de plus un investissement en temps et un coût financier important. Enfin le système est optimisé pour une champ d'observation de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$. De plus grands champs nécessitent des durées d'acquisition longues et des quantités de données compliquées à gérer. Par exemple, l'image de la figure 3.10 fut acquise en 11 minutes et pèse 620GB.

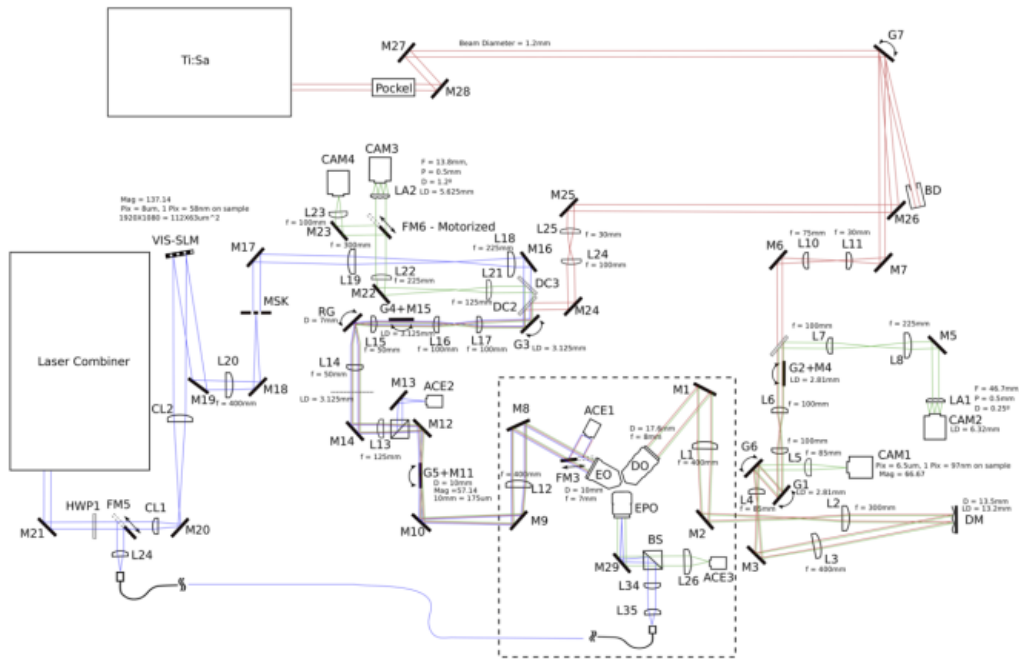


FIG. 3.9 Schéma du montage du "Lattice light-sheet" de l'équipe d'E. BETZIG avec le module d'optique adaptative (issu de [33])

La microscopie à feuille de lumière est donc en pleine expansion et de nombreux développements récents ont permis d'améliorer les performances spatiales, temporelles et mécaniques des microscopes. A l'heure actuelle, l'optique adaptative en mesure directe à la détection n'a été que peu implémentée, du fait de la difficulté à créer une étoile guide virtuelle à deux photons ou de l'incompatibilité d'une imagerie non-invasive avec l'introduction dans l'échantillon de billes fluorescentes. Néanmoins, des

résultats ont démontré l'apport significatif de l'OA en signal et en résolution spatiale comme le montre la figure 3.10.

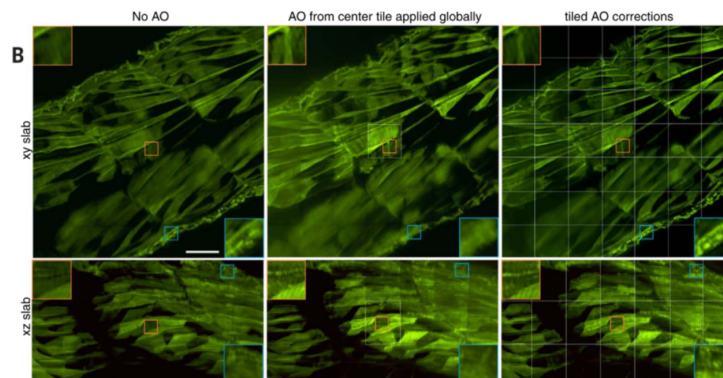


FIG. 3.10 *Queue du poisson-zèbre à 96hpf, projections du maximum d'intensité, sans OA (gauche), avec OA uniquement au centre de l'image (centre), avec OA sur l'ensemble de l'image en corrigeant zone par zone. Barre d'échelle 30 μ m. Extrait de [33]*

Notre approche d'OA basée sur la mesure du front d'onde en source étendue pour corriger les aberrations à la détection en LSFM est donc pertinente et permettra d'obtenir une correction précise et rapide du front d'onde pour aboutir à un gain en résolution et signal.

3.2 Réalisation d'un AO-LSFM en source étendue

Dans cette section je décris la réalisation d'un microscope à feuille de lumière puis son couplage à une boucle d'optique adaptative. Le dessin de la cuve, le pilotage du microscope et la caractérisation des performances sont également traités. Enfin, je discuterai les difficultés liées à la mesure du front d'onde dans des échantillons épais, notamment liées à la largeur de la feuille.

3.2.1 L'implémentation d'un bras d'OA en LSFM

Afin de garantir une correction optimale du front d'onde nous avons décidé d'implémenter un système d'optique adaptative en boucle fermée à la détection, comme dans le chapitre précédent. Le miroir déformable (DM) doit alors être monté en amont de l'analyseur.

Schématisation et réalisation du microscope AO-LSFM

La boucle d'optique adaptative a pour vocation d'être installée à Neuro-PSI. Nous avons par conséquent choisi de reproduire le montage de leur microscope feuille de lumière (LSFM de chez PhaseView) en se basant sur le montage du SPIM avec un miroir galvanométrique pour balayer la feuille comme représenté en figure 3.11.

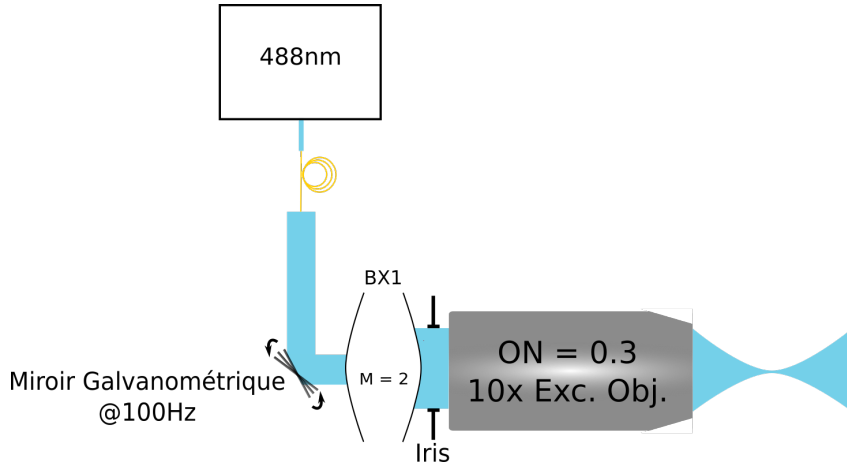


FIG. 3.11 Bras d'illumination du AO-LSFM composé d'un laser fibré, d'un miroir galvanométrique, d'un télescope X2 et d'un objectif (Olympus) avec un diaphragme au niveau du plan focal arrière

Il y a de nombreux avantages à utiliser cette technique. D'une part, elle se compose de peu d'éléments optique, ce qui facilite l'installation, l'alignement et le coût. D'autre part, elle est très répandue et référencée. Une étude comparative des techniques d'illumination a montré que pour des champs larges et des échantillons sensibles il est préférable d'utiliser un faisceau gaussien [29].

Comme représenté sur la figure 3.11 un laser à 488nm, élargi et collimaté, est balayé sur un diaphragme placé dans le plan focal arrière de l'objectif d'excitation (Olympus, 10X, ON=0.3, air). Ce diaphragme permet modifier la taille du waist du faisceau et celle de la zone de Rayleigh, qui caractérisent la zone de Rayleigh.

À la détection, un objectif de grande ouverture numérique (Leica, 25X, ON=0.95, eau) suivi du miroir déformable (mirao52e, Imagine Eyes) et d'une lame séparatrice permet d'imager l'échantillon sur la caméra scientifique (Hamamatsu ORCA Flash V2) et de réaliser la mesure du front d'onde, comme représenté en figure 3.12.

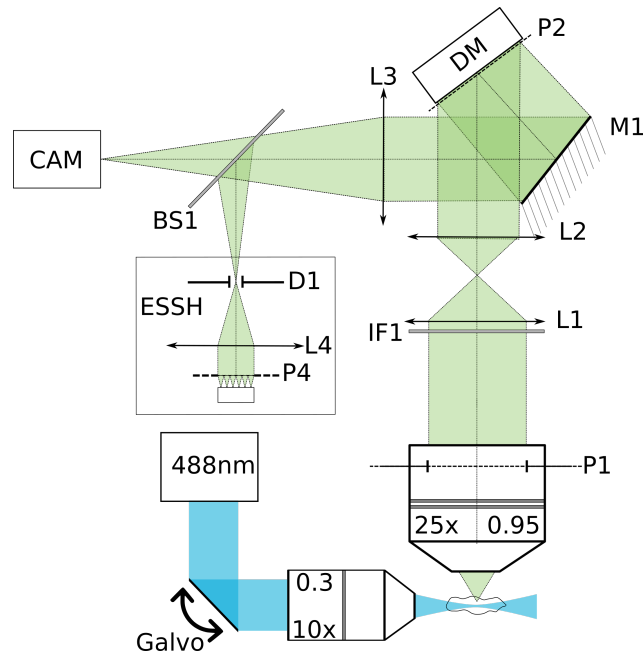


FIG. 3.12 Schéma du AO-LSFM à une couleur

Une platine piézoélectrique (Newport) permet de déplacer l'échantillon selon les axes X,Y et Z $100\mu\text{m}$ afin de réaliser des acquisitions volumétriques. Le champ d'observation total de la caméra d'imagerie vaut $350\times 350\mu\text{m}^2$ et celui de l'ESSH $130\times 130\mu\text{m}^2$.

Dans une seconde version, nous avons utilisé deux sources lasers couplées dans une même fibre monomode afin de disposer de deux longueurs d'onde d'excitation. Cette version bi-couleur du montage permettra de dédier un marquage fluorescent à la mesure du front d'onde et ainsi préserver le marquage d'intérêt pour l'imagerie scientifique.

La lame séparatrice est alors remplacée par un miroir dichroïque et des filtres interférentiels adaptés sont ajoutés dans chacun des bras comme représenté à la figure 3.13.

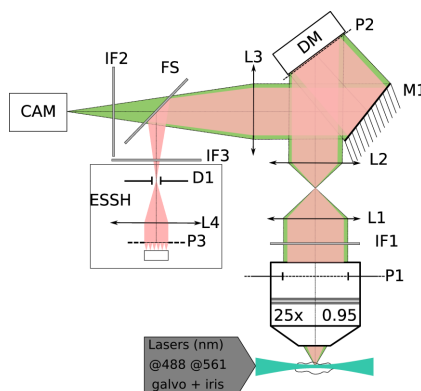


FIG. 3.13 Schéma du AO-LSFM à deux couleurs

Pilotage de l'instrument

Le microscope AO-LSFM est composé d'éléments (laser, boucle d'OA, caméra) qui possèdent des logiciels de pilotage spécifiques. Au cours de cette thèse il a été nécessaire de développer un programme capable de piloter et synchroniser l'ensemble des composants. Le diagramme fonctionnel de l'expérience est présenté en annexe figure 3.27. L'ensemble de ces éléments est géré par PYTHON 2.7.18.

3.2.2 Réalisation du porte échantillon

En microscopie à feuille de lumière, dans une configuration SPIM, l'échantillon est illuminé par un faisceau de manière horizontale. Par conséquent il est nécessaire de développer un porte-échantillon dédié. Nous utilisons ici un objectif d'excitation à air et un objectif de détection à eau. Nous avons donc choisi d'utiliser une cuve porte-échantillon vitrée afin d'illuminer l'échantillon et latéralement à travers une lamelle de verre et de collecter la fluorescence en plongeant l'objectif de détection directement dans la cuve. Un second élément s'installe dans la cuve et permet d'y glisser une lamelle de microscope de 9mm de diamètre. Sur la figure 3.14 la partie gauche représente la cuve en ABS (Acrylonitrile butadiène styrène) réalisée à l'imprimante 3d à l'atelier de l'ESPCI et la partie droite le support en inox, réalisé par l'atelier GREM à Paris, à insérer dans la cuve.

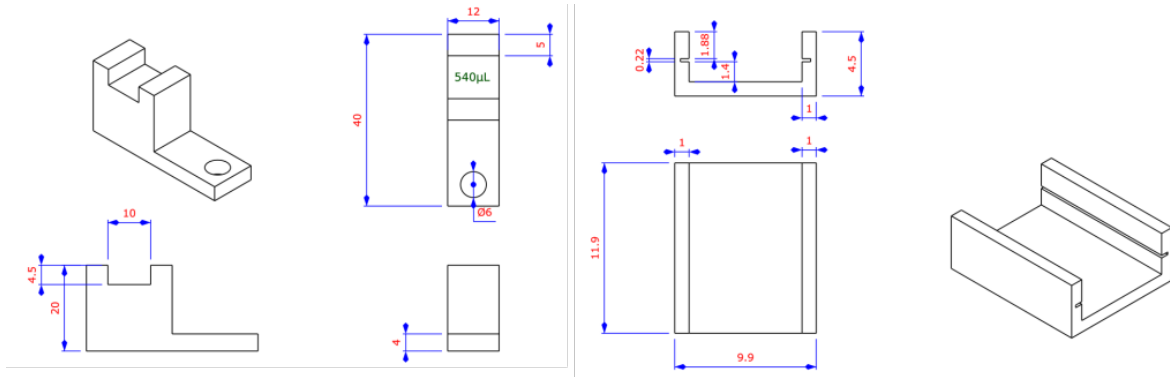


FIG. 3.14 Dessins de la cuve et du support de lamelle. Cuve imprimée en 3d et support en inox, distances en mm.

Ce porte-échantillon nous permet d'utiliser un gel d'agarose sur une lamelle ou directement de l'agarose en enlevant le support. Le volume maximal est de 540 μ L, pour minimiser la dilution lors de l'ajout de substances comme par exemple lors de la stimulation de l'activité neuronale.

3.3 Caractérisation du microscope

Après une caractérisation de la feuille de lumière, nous évaluerons la qualité de la correction du front d'onde et le gain apporté par la boucle d'OA à l'émission sur des échantillons tests.

3.3.1 Performances du AO-LSFM

Échantillons tests et protocoles de mesure

Pour évaluer la taille de la feuille de lumière, nous utilisons un échantillon fluorescent homogène en mélangeant de la fluoréscéine peu concentrée à un gel d'agarose à 1.5%. En mesurant le profil du faisceau suivant son axe de propagation nous pouvons caractériser l'épaisseur de la feuille.

Pour quantifier la qualité de la correction du front d'onde dans l'image, nous utilisons un échantillon test composé de billes de polystyrène fluorescentes de tailles variées (Thermofisher) qui émettent à $\lambda = 505\text{nm}$ dispersées dans de l'agar à 1.5% (4 μ L de billes diluées au 1/5000ème de la solution commerciale avec 20 μ L d'agarose).

Le gel est placé à l'étuve à une température de 60 degrés, ce qui permet un refroidissement rapide pour figer les billes en suspension dans la goutte d'agar. L'agarose possède le même indice optique que l'eau et donc n'induit pas d'aberrations. Toutefois la proportion d'agarose ne doit pas excéder 2% pour éviter de générer de la diffusion par des particules d'agarose non dissoutes et ainsi élargir la feuille de lumière.

Pour évaluer la réponse impulsionnelle du microscope (PSF) nous avons utilisé des billes de 500nm. Celles-ci sont légèrement plus grandes que la PSF théorique de 330nm mais permettent un échantillonnage correct sur la caméra scientifique et une mesure précise. En effet, sur la caméra 2.85 pixels correspondent à 500nm, ce qui

nous permet de satisfaire le critère de Nyquist.

Pour la mesure de front d'onde, nous avons dû utiliser des billes plus grosses et plus brillantes afin d'obtenir un signal suffisant sur l'analyseur. Les billes utilisées pour la boucle d'OA et l'étalonnage de l'ESSH en LSFM mesurent $2\mu\text{m}$ et émettent à 505nm lorsque nous utilisons une lame séparatrice, ou à 605nm pour le montage bi-couleur avec le miroir dichroïque. Nous avons également utilisé des billes de polystyrène remplies de "quantum dots" (protocole en annexe).

Définition 3.1, Quantum dots

Nanocristaux de semi-conducteurs de taille nanométrique qui possèdent un spectre d'absorption très large et un spectre d'émission étroit dont la longueur d'onde moyenne est fixée par la taille de la nanoparticule.

Leur particularité réside dans la brillance importante et le photoblanchiment limité comparé aux fluorophores organiques [38])

Ceci nous permet d'utiliser des billes qui peuvent émettre à plusieurs longueurs d'ondes tout en étant excitées à une seule et même longueur d'onde.

Caractérisation de la feuille de lumière

En l'absence de balayage du faisceau d'excitation, il est possible de mesurer la largeur du faisceau à partir de l'image en fluorescence qu'il génère dans un échantillon homogène. Nous utilisons un gel d'agarose mélangé à une solution peu concentrée de fluorescéine. Nous avons tout d'abord essayer de travailler avec une feuille la plus fine possible, cela revient à illuminer l'ensemble du plan focal arrière de l'objectif d'excitation. D'après les équations des faisceaux gaussiens, la largeur du faisceau est de $2w_0 = 1\mu\text{m}$ et $2Z_R = 3.2\mu\text{m}$. L'image de la feuille sur la caméra et les courbes associées de la largeur et du profil axial du faisceau sont présentés en figure 3.15. Nous avons tracé $2w_{0exp}$ qui représente la taille minimale du faisceau expérimental, et Z_{Rexp} qui représente la longueur de Rayleigh expérimentale pour laquelle la taille du faisceau est inférieure à $2\sqrt{2}w_{0exp}$.

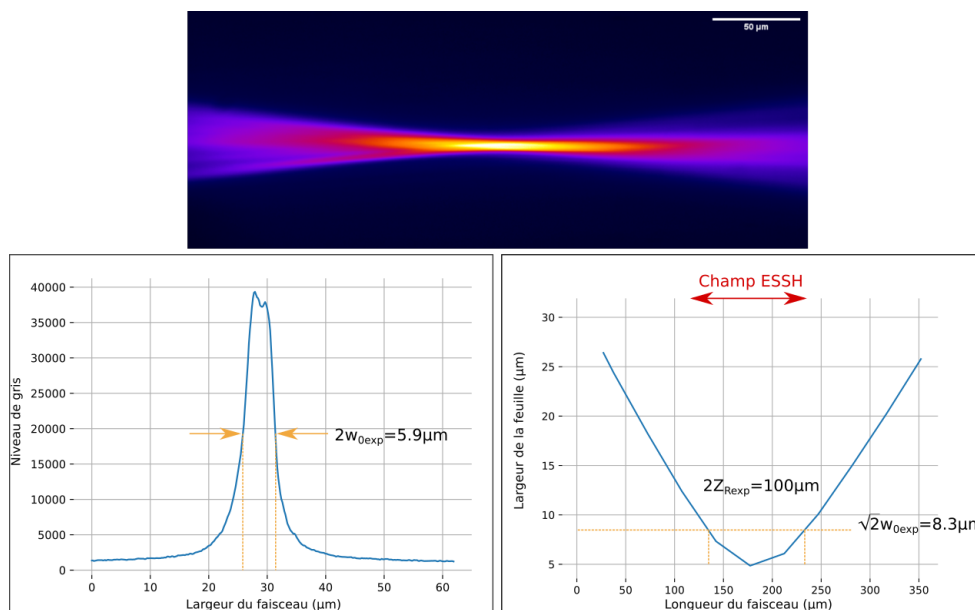


FIG. 3.15 *Caractéristiques du faisceau de lumière*

Dans ce premier cas nous voyons tout d'abord sur la figure 3.15 que la zone de Rayleigh est inférieure au champ de notre analyseur de front d'onde. De plus, sur les bords du champ caméra la taille du faisceau augmente de plus de 400%. La taille du faisceau est, elle, plus large que prédit à cause des interfaces air/verre/eau de la cuve avant l'arrivée dans le gel d'agar.

Afin d'obtenir une zone de Rayleigh expérimentale égale ou supérieure au champ de l'analyseur de front d'onde et un faisceau moins divergent pour limiter la fluorescence issue des plans hors du plan de mise au point, nous avons placé un diaphragme de champ dans le plan focal arrière de l'objectif. Ceci limite l'ouverture numérique du microscope et induit une augmentation de la zone de Rayleigh [7]. La figure 3.16 présente la largeur du faisceau et le profil axial issus de l'image acquise sur la caméra.

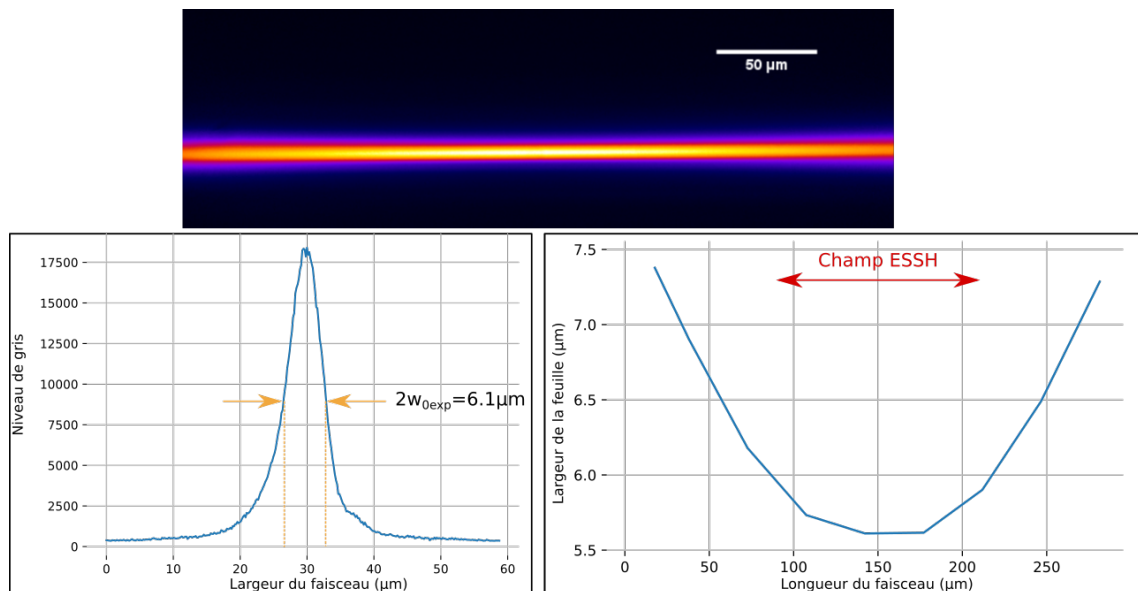


FIG. 3.16 *Caractéristiques de la feuille latérales et axiales en utilisant un diaphragme dans le plan focal arrière de l'objectif*

La largeur du faisceau $2w_{0exp}$ est, cette fois, légèrement plus élevée que précédemment avec $2w_{0exp} = 6.1\mu\text{m}$. En revanche la zone de Rayleigh est de l'ordre de grandeur du champ d'observation de la caméra d'imagerie avec une augmentation de la taille du faisceau sur les bords de 40%. En ce qui concerne le champ d'observation de l'analyseur de front d'onde, le faisceau varie de moins de 10%.

Nous avons privilégié cette deuxième configuration puisqu'elle apporte peu d'élargissement sur la zone vue par l'analyseur de front d'onde et donc un sectionnement optique stable sur l'ensemble du champ. De plus, sur l'ensemble du champ de la caméra d'imagerie cela favorise un meilleur SBR et limite le blanchiment de zones non imagées.

Résultats des mesures en AO-LSFM sur des billes

Afin de s'assurer du bon fonctionnement de la boucle d'OA et de mesurer la qualité de la correction, nous observons, avant et après, un échantillon de billes fluorescentes

calibrées en tailles. Les billes utilisées pour cette expérience émettent dans le vert pour la caméra d'imagerie et mesurent 500nm, celles pour la correction du front d'onde émettent dans le rouge et mesurent 2 μ m. Rappelons que la zone imagée par l'analyseur est plus petite que le champ vu par la caméra. Il correspond aux carrés bleus dans l'image sur la figure 3.17(a) et (cd) et il est représenté figure 3.17(b). Avant correction, le miroir est éteint, cette forme génère des aberrations importantes et ceci accentue le gain visuel sur les billes avant et après correction dans la figure 3.17. Sur l'image caméra, volontairement saturée et avec une palette de couleur adaptée, il est possible de voir les deux types de billes figure 3.17 (a) et (c). Un zoom sur ces dernières permet de mettre en évidence quelles sont les billes vues par l'analyseur pour réaliser la correction.

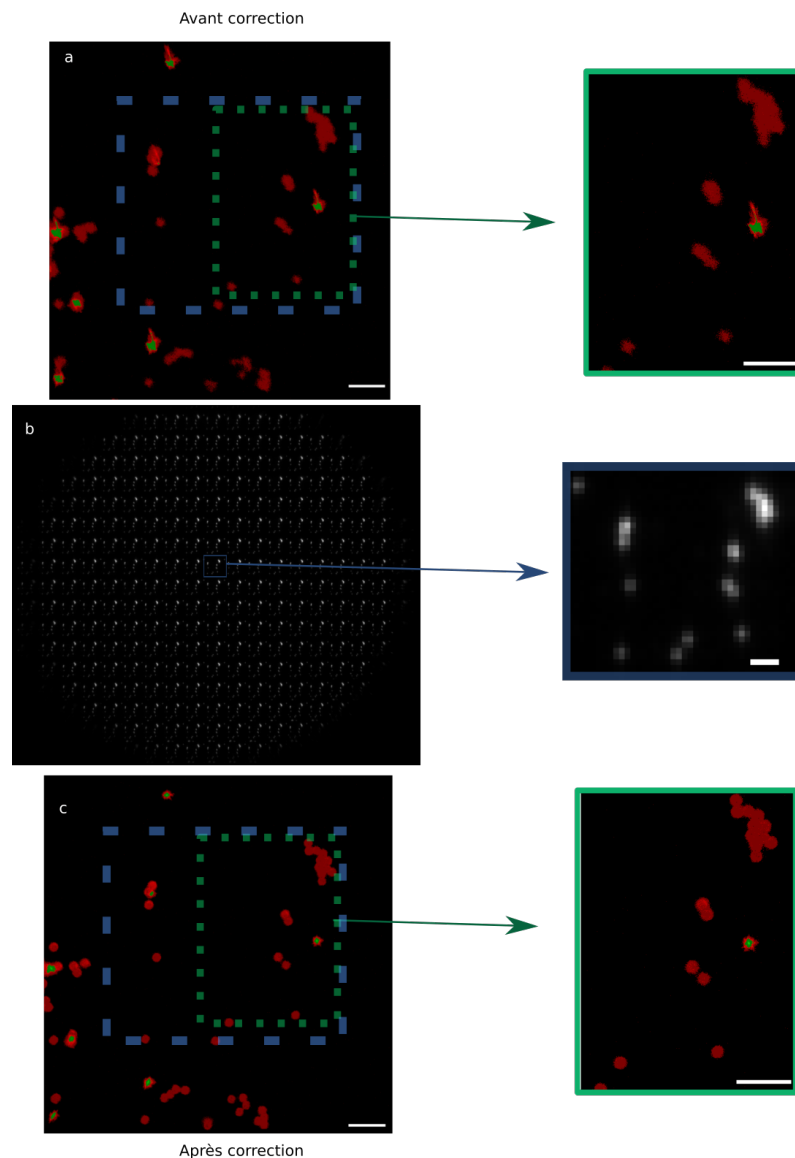


FIG. 3.17 Images avant et après correction de billes rouges (2 μ m) et vertes (500nm), barre d'échelle 20 μ m, (a) ROI sur la caméra avec zone vue par l'ESSH en rouge (b) Zoom sur une imagerie de l'ESSH, (c) Image du capteur ESSH, (d) ROI sur la caméra après correction avec zone vue par l'ESSH en rouge, (e) Zoom sur la correction

En réalisant un profil latéral (XY) sur une bille de 500nm nous pouvons évaluer la PSF de notre microscope. De la même manière en utilisant un empilement 3d il

est possible de réaliser un profil axial (XZ) de la bille. Les résultats sont présentés figure 3.18 et nous pouvons mesurer une largeur à mi-hauteur (FWMH) de $0.54\mu\text{m}$ latéralement et de $1.53\mu\text{m}$ axialement.

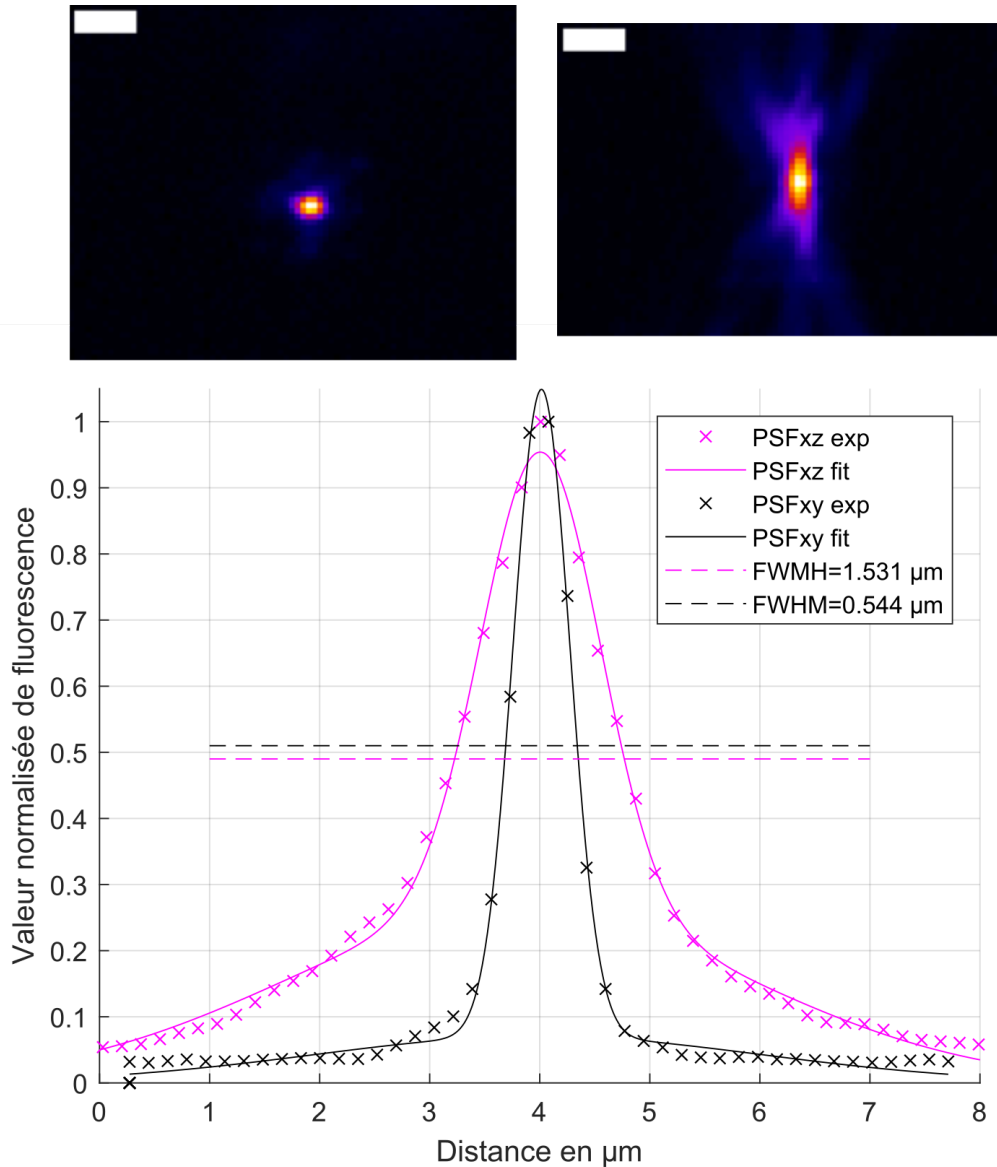


FIG. 3.18 Profils d'intensité latéral et axial d'une bille à la caméra d'imagerie après correction du front d'onde

Les billes injectées de quantum dots sont plus grosses, environ $4\mu\text{m}$ et permettent d'évaluer la qualité de la correction sur la caméra. Nous pouvons à partir de ces images corriger les aberrations différentielles induites par la portion de chemin optique différente entre l'analyseur de front d'onde et la caméra. En effet, un miroir dichroïque à 45 degrés est responsable d'aberrations (en particulier d'astigmatisme) qu'il est nécessaire de corriger. La figure 3.19 représente une bille de $4\mu\text{m}$ chargée de quantum dots avant et après correction.

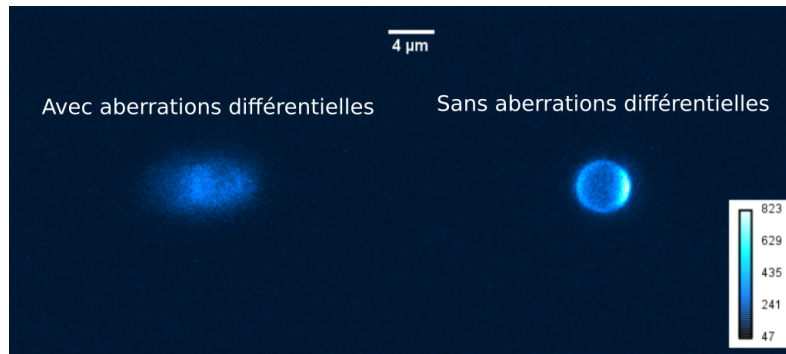
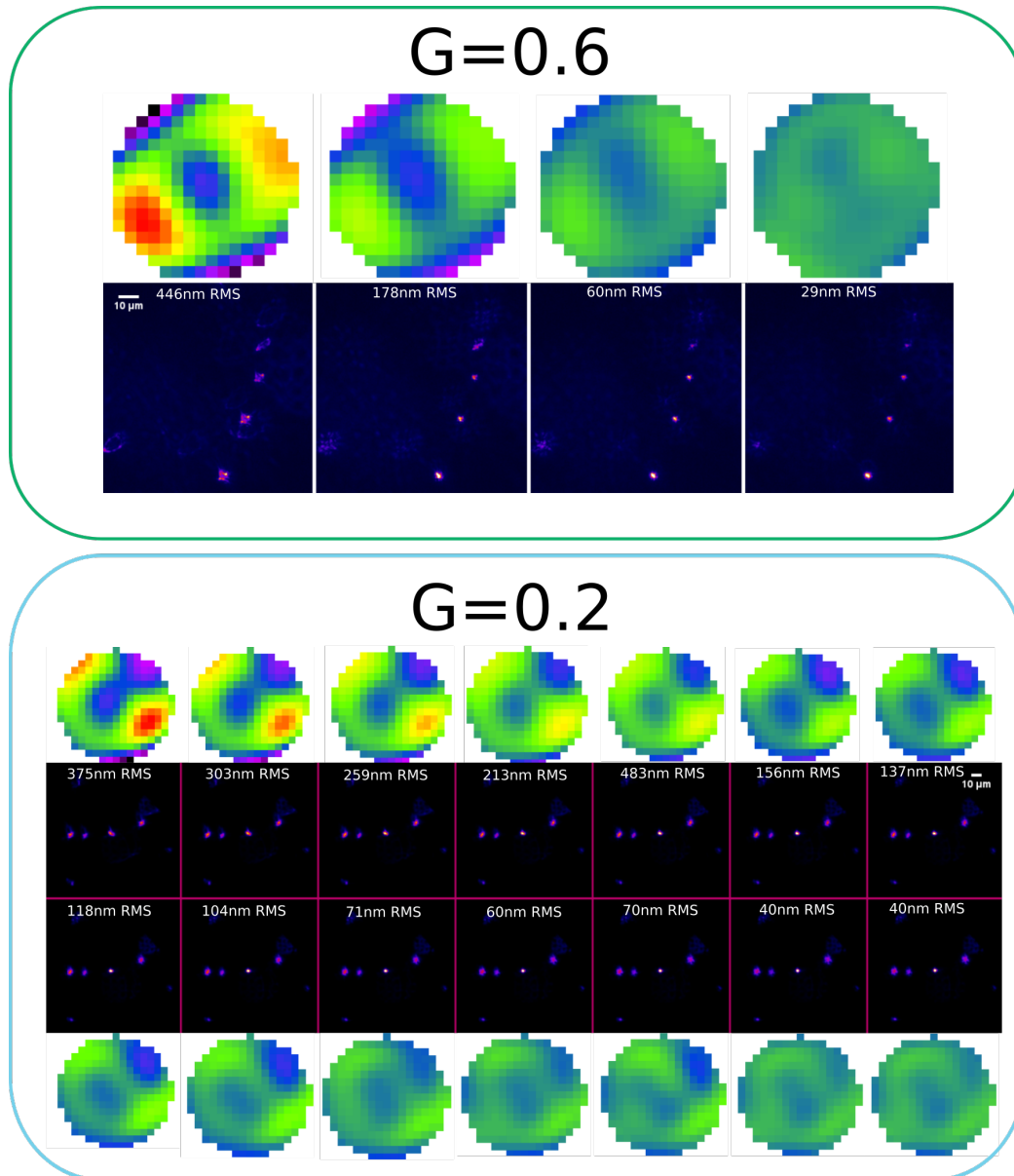


FIG. 3.19 Correction sur une bille chargée en QD de $4\mu\text{m}$

Nous avons étudié l'influence du gain de la boucle d'optique adaptative sur la correction. Des mesures sont présentées en figure 3.20 ; pour des gains égaux à 0.6 et 0.2, nous avons enregistré l'image caméra et le front d'onde correspondant à chaque itération de correction de la boucle jusqu'à atteindre un front d'onde dont l'écart au front d'onde idéal est inférieur à 40nm RMS. Comme attendu un gain plus élevé permet de converger plus vite vers une correction optimale. Cet aspect est crucial si le marquage photoblanchit ou dans le cas d'une imagerie dynamique. En revanche ceci est vrai tant que le SBR des imageries de l'analyseur est grand mais dans le cas contraire, un gain élevé peut amener une divergence de la boucle.

FIG. 3.20 Correction sur une bille chargée en QD de $4\mu\text{m}$

Enfin, dans un dernier point, nous nous sommes intéressés à la qualité de la correction suivant le nombre de modes utilisés par le miroir déformable et suivant la position de la bille dans le champ d'observation. Pour cela nous évaluons le ratio entre le maximum d'intensité d'une image théorique d'une bille et celui de l'image d'une bille sur la caméra. Nous calculons la convolution d'une bille de polystyrène de la taille de celles utilisées dans l'expérience par la PSF théorique du microscope et, pour un même nombre de photons nous avons évalué le ratio des maxima d'intensité mesuré et théorique. Ceci est réalisé pour chaque bille puis tracé en fonction de la distance au centre de l'image caméra, qui correspond également au centre du champ de l'analyseur de front d'onde. Dans la figure 3.21 sont représentés les ratios d'intensité maximum entre la bille imagée et la bille théorique avant et après correction en fonction de la distance en micromètres au centre de la zone où le front d'onde est corrigé pour des nombres de modes de miroir utilisés pour corriger le front d'onde variables. La graphique montre que plus le nombre de modes est élevé, meilleure est la correction pour une bille située dans la zone de correction. Au-delà de la zone où

le front d'onde est mesuré, le gain demeure mais n'est pas toujours aussi élevé pour un même nombre de modes.

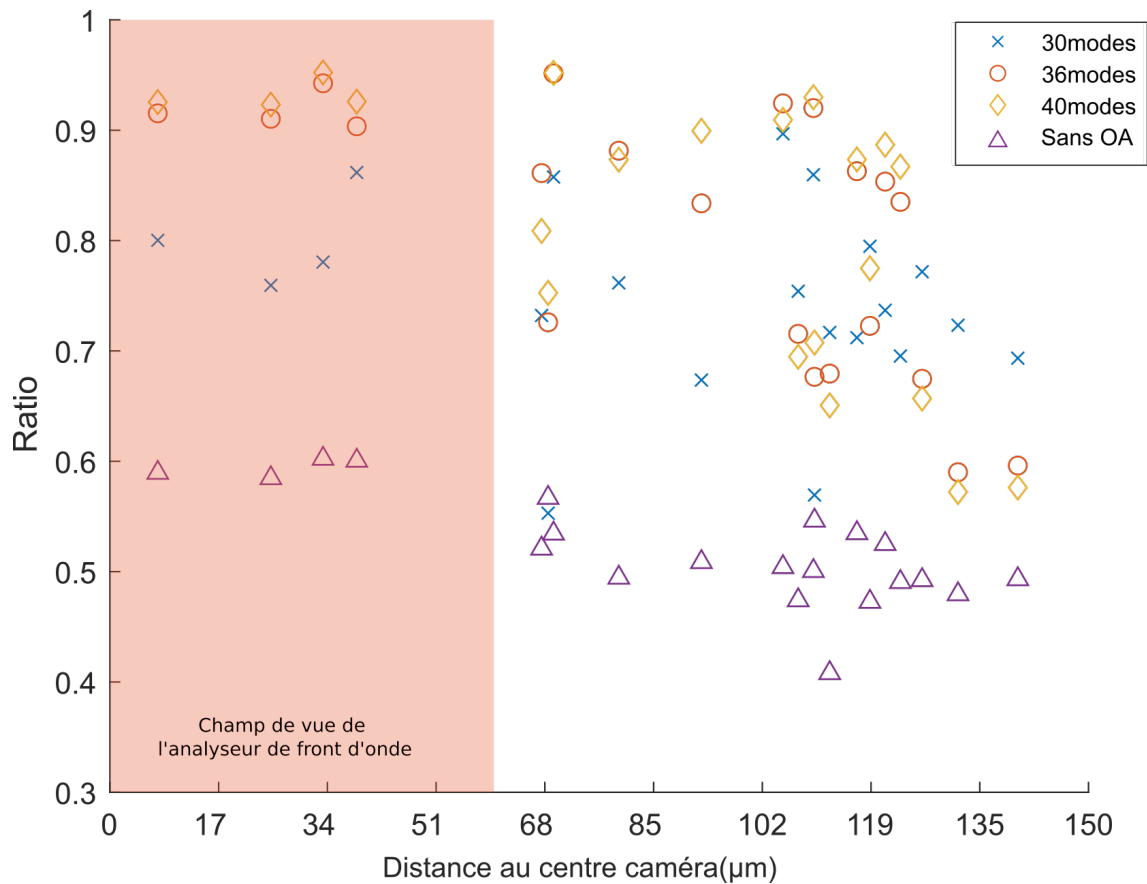


FIG. 3.21 Équivalent d'un rapport de Strehl pour des billes de $2\mu\text{m}$ dans l'agar en fonction de la distance au centre de la caméra pour différentes corrections

3.3.2 La zone isoplanétique

L'analyseur de front d'onde image une zone plus petite que le champ caméra (environ 1/10 de la surface caméra). Par conséquent, la mesure du front d'onde et donc la correction sont réalisées seulement sur la zone de l'échantillon placée au centre de la caméra. Usuellement, les analyseurs de front d'onde classiques corrigent un point source. Dans notre cas la boucle d'OA corrige une zone étendue correspondant au champ vu par l'analyseur. Si ce champ est composé d'une particule source unique cela revient à une correction classique (à la une différence d'algorithme de calcul du front d'onde près). En revanche dans le cas de sources étendues, les aberrations étant variables dans le plan, la mesure du front d'onde est une moyenne des fronts d'ondes issus de toutes les sources qui composent la zone analysée. La correction apportée ne sera donc pas optimisée pour chacun des points mais pour l'ensemble du champ vu par l'analyseur.

Intérêt de l'étude

Notre objectif est d'évaluer la zone isoplanétique en premier lieu avec un échantillon de billes. Pour cela, nous utilisons la découpe numérique et nous la rendons variable. Dans un premier temps nous pouvons simplement comparer la mesure en déplaçant

l'échantillon. Puis, lors d'une correction, nous allons regarder l'évolution du rapport d'intensité maximale entre une bille de l'expérience et une bille théorique par rapport à la distance à la zone vue par l'analyseur. En figure 3.22 est représentée une image de billes dans un gel d'agarose avec différents champs de vue possibles pour l'analyseur.

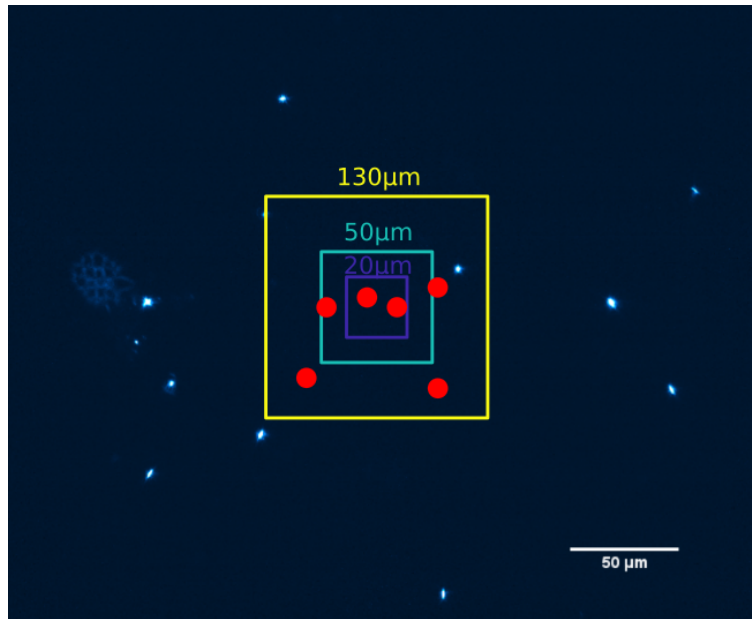


FIG. 3.22 Représentation de zones de correction par l'analyseur sur le champ caméra dans un échantillon de billes. Les points rouges représentent des billes supplémentaires pour représenter un échantillon "idéal"

Enfin, en adaptant cette méthode sur un échantillon biologique, nous pouvons alors envisager d'évaluer la zone isoplanétique et si celle-ci est inférieure au champ de vue, d'adapter le champ de correction suivant la volonté de corriger localement quelques cellules par exemple ou alors une zone plus étendue.

Perspectives

Les expériences sur les billes n'ont pas encore été possibles mais cependant, lors d'expériences sur des échantillons biologiques, nous avons pu voir qu'une correction sur une zone pouvait améliorer la qualité de l'image également sur une zone éloignée et non vue par l'ESSH comme montré en figure 3.23.

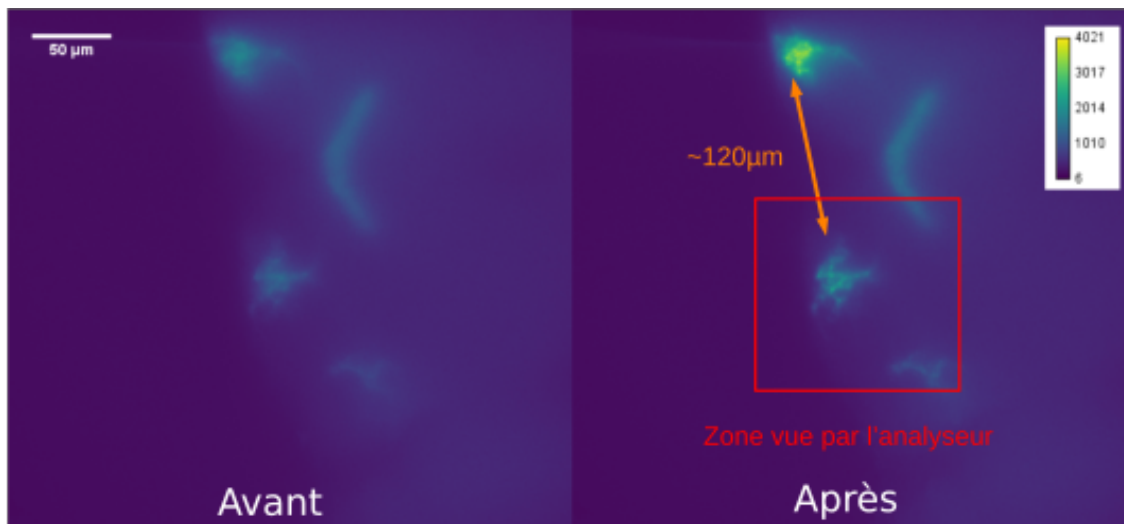


FIG. 3.23 Visualisation de l'extension de la correction sur une zone éloignée du champ corrigé

Nous voyons un gain sur des zones éloignées de 120 à 150 μm . Nous discuterons ces résultats à nouveau dans le chapitre suivant.

Nous voyons qu'il reste donc beaucoup d'études possibles directement dans un échantillon vivant pour voir l'influence de la taille du champ de correction sur la qualité de correction.

3.4 Limitations liées aux échantillons volumétriques

Comme discuté au chapitre précédent, la faible ouverture numérique des micro-lentilles de l'analyseur de front d'onde est à l'origine d'une grande profondeur de champ. L'ESSH doit donc être couplé à du sectionnement optique, c'est pourquoi nous avons choisi le développement d'un microscope à feuille de lumière. Dans ce cas le sectionnement optique est induit par l'épaisseur du faisceau d'illumination. La caméra d'imagerie a une profondeur de champ inférieure à 1 μm et la feuille de lumière a une épaisseur de 5 à 6 μm dans notre montage. En conséquence notre ESSH détecte un signal sur une profondeur de l'épaisseur de la feuille et n'intègre pas le même signal que celui de la caméra. De plus, dans le cas d'un échantillon biologique aberrant et diffusant cette épaisseur de feuille est accrue et donc la différence de signal intégrée entre l'analyseur et la caméra plus importante.

Illustration du problème

Lorsqu'un élément, non aberrant, est dans le plan de mise au point, chaque micro-lentille intercepte un front d'onde avec le même angle. En revanche si ce même élément est hors du plan de mise au point, chaque micro-lentille intercepte un front d'onde qui a un angle différent. Ceci implique des déplacements d'imagette en imagette qui peuvent être importants. La figure 3.24 résume le problème lié à une grande profondeur de champ représentée entre les flèches violettes par la distance d . Nous considérons le plan de mise au point par le trait en pointillés rouges. L'élément gris dans le plan de mise au point est centré sur chaque imagette alors que l'élément

rouge, hors du plan de mise au point se déplace. Certaines imagettes sont donc composées d'éléments hors du plan de mise au point et d'autres non ce qui peut amener des erreurs de mesure.

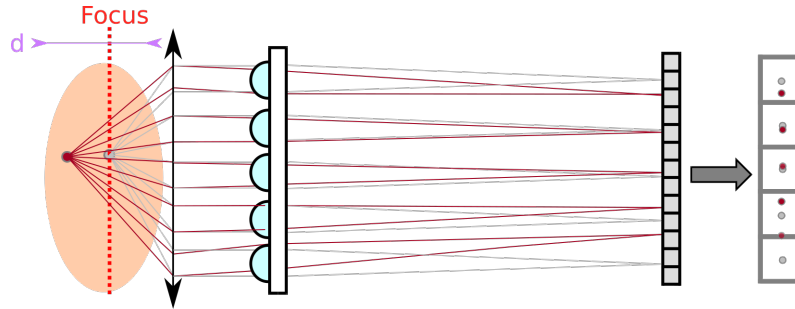


FIG. 3.24 Illustration de l'influence d'une grande profondeur de champ sur l'ESSH. d représente la profondeur de champ

Cet effet est référencé, il est à l'origine de l'utilisation des caméras plénoptiques [39]. Cette utilisation permet de reconstruire des échantillons en volume en une seule image au prix d'une résolution plus faible que les caméras ou microscopes classiques.

Ceci peut-être problématique d'une part si le signal hors du plan de mise au point est supérieur à celui au plan de mise au point et, d'autre part, comme notre mesure se base sur une source étendue, le déplacement important des éléments qui composent la source étendue influe sur la qualité de la mesure du front d'onde.

Pour illustrer cela, nous avons pris un échantillon de billes de $2\mu\text{m}$ dans un gel d'agar. L'image caméra est présentée en figure 3.25. La zone d'observation de l'analyseur de front d'onde se situe dans le carré vert. Nous voyons que deux billes sont dans le plan de mise au point, et donc dans la profondeur de champ de la caméra et nous pouvons distinguer des tâches représentatives des billes hors du plan de mise au point en saturant la palette de couleurs.

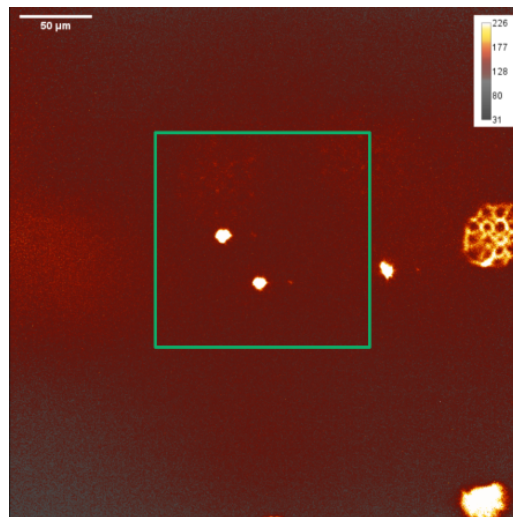


FIG. 3.25 Image caméra et zone vue par l'analyseur de front d'onde dans ce plan (carré vert)

Les imagettes sur l'analyseur de front d'onde sont représentées en figure 3.26. Entre une imagette à gauche de la pupille et une à droite nous voyons que les billes dans

les cercles verts et marrons disparaissent ou apparaissent. À l'inverse les deux billes centrales dans le point de mise au point sont communes à toutes les imagettes car elles sont situées dans le plan de mise au point.

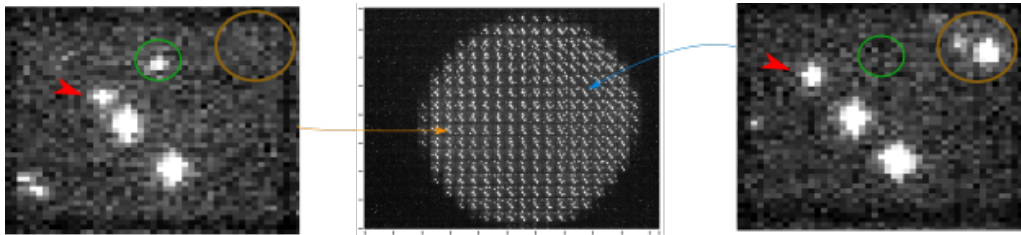


FIG. 3.26 Influence d'un échantillon épais de billes sur les imagettes

Lors d'une boucle sur l'échantillon présenté en figure 3.26, nous avons pu voir qu'au bout de plusieurs itérations où la boucle converge, un élément peut voir son signal rehaussé et être pris en compte dans la mesure.

En définitive, il est nécessaire de prendre en considération cette erreur de mesure et de limiter au maximum le sectionnement optique de notre microscope à l'aide d'une feuille extrêmement fine ou bien à l'aide d'un échantillon marqué peu densément.

Perspectives de correction en 3D

Dans l'attente de pouvoir limiter le sectionnement optique intrinsèquement, des échantillons peu denses sont donc à privilégier. Néanmoins nous avons essayé plusieurs approches pour corriger cet effet grâce à un seuillage adaptatif. En effet l'apparition de ces éléments peut être éliminée en considérant qu'ils ne sont présents que sur un nombre limités d'imagettes. Comme nous l'avons vu, une bille visible sur la caméra, et donc dans la profondeur de champ de la caméra, reste centrée sur toutes les imagettes de l'analyseur. Une seconde bille hors du plan de mise au point, elle, pourra être éliminée en utilisant un masque basé sur l'image issue de la caméra ou bien de la somme des imagettes.

Nous n'avons pas pu encore implémenter cette méthode pour faire des expériences compte-tenu des contraintes logicielles et les résultats réalisés à partir d'imagettes traitées numériquement après acquisition sont encourageants. Ceci sera étudié dans les futurs thèses de notre groupe.

3.5 Conclusion et perspectives

La boucle d'OA en source étendue appliquée à un microscope à feuille de lumière montre de très bonnes perspectives de correction sur des ensembles de billes et permet de converger vers une mesure de front d'onde inférieure à 40nm RMS. Cette valeur est en-dessous du critère de Maréchal et la simplicité de mise en place et d'utilisation est intéressante pour l'adaptabilité sur les différents montages de microscope à feuille de lumière. Par ailleurs, dans des développements futurs, il serait possible d'adapter un analyseur en source étendue pour évaluer le front d'onde à l'excitation et corriger également à l'aide d'un miroir déformable ou d'un SLM la feuille de lumière pour améliorer la finesse du faisceau et donc le sectionnement optique.

En effet, nous avons vu que l'analyse en source étendue est très sensible aux échantillons volumétriques et qu'un sectionnement optique de la taille de la profondeur de

champ de la caméra scientifique permet d'éviter des erreurs de mesure. Pour utiliser des échantillons biologiques il est donc important de ces étapes préliminaires d'utilisation de ce type d'analyseur, de privilégier des marquages peu denses afin d'avoir une fluorescence localisée en épaisseur.

À l'heure actuelle, nous privilégions l'utilisation d'un système de "remote-focusing" combiné à un objectif d'excitation à immersion au laboratoire pour améliorer le sectionnement optique. Nous avons également commencé à étudier l'utilisation de l'ESSH à l'excitation.

Enfin des développements seraient intéressants pour l'évaluation de la zone isoplanétique, ceci permettrait une adaptabilité de la correction.

Annexes

Diagramme fonctionnel du pilotage

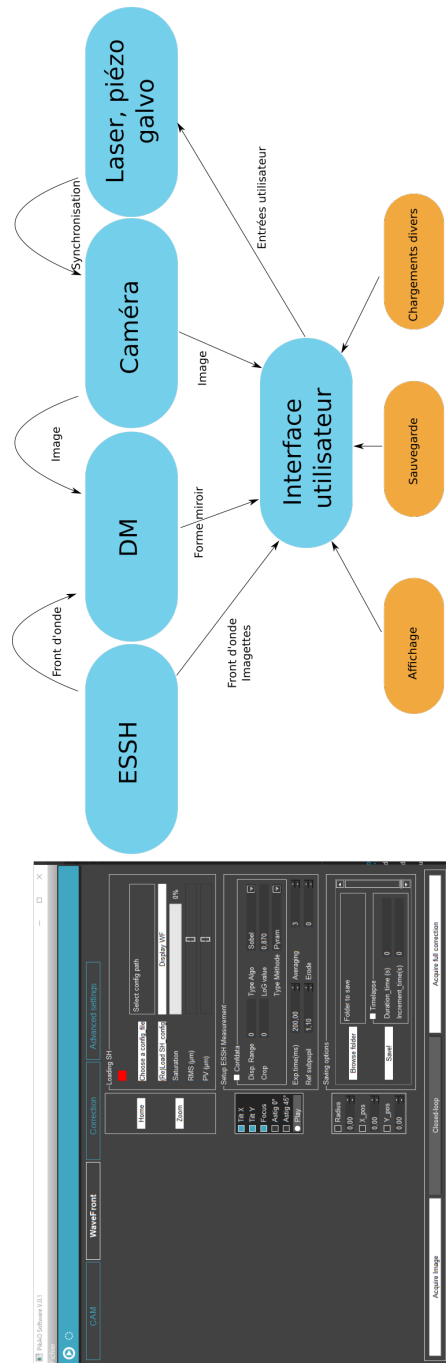


FIG. 3.27 Diagramme fonctionnel du logiciel développé sous Python pour piloter l'instrument

Réalisation de billes de polystyrène multicolores

Notre laboratoire spécialisé dans la synthèse de nanoparticule nous permet de bénéficier d'un savoir-faire dans les possibilités de concevoir des sondes inorganiques. Afin de satisfaire à notre besoin de particules de taille micrométriques brillantes nous avons suivi un protocole d'insertion de QDs dans des billes de polystyrène de 4 μ m.

- Premièrement nous gonflons les particules de polystyrène dans un mélange butanol/chloroforme afin d'obtenir une largeur de pores qui permet aux QDs de pénétrer dans la bille.
- Dans le chloroforme toujours, pendant une nuit le mélange initial est agité avec une solution comprenant les QDs désirés.
- En repassant dans l'éthanol les pores se referment et les billes sont piégées.
- Nous effectuons plusieurs lavages afin d'éliminer les QDs restants dans la solution.

Différents types de QDs peuvent être mélangés pour obtenir une bille de polystyrène qui émet à plusieurs longueurs d'onde tout en étant excitée à 488nm (dans notre cas). En fonction de la couleur, la taille varie, en conséquence le temps d'agitation est à adapter. Pour les billes vertes, plus petites, quelques heures suffisent alors que pour les rouges il faut une nuit. L'émission globale est moins intense qu'avec des fluorophores organiques car il y a beaucoup moins de nanoparticules que de molécules dans une bille de polystyrène.

Bibliographie

- [1] Akihiko Nakano. Spinning-disk confocal microscopy—a cutting-edge tool for imaging of membrane traffic. *Cell structure and function*, 27(5) :349–355, 2002.
- [2] José-Angel Conchello and Jeff W Lichtman. Optical sectioning microscopy. *Nature methods*, 2(12) :920–931, 2005.
- [3] Winfried Denk, James H Strickler, and Watt W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science*, 248(4951) :73–76, 1990.
- [4] Chris Xu, Warren Zipfel, Jason B Shear, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Multiphoton fluorescence excitation : new spectral windows for biological nonlinear microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20) :10763–10768, 1996.
- [5] Yici Guo, PP Ho, H Savage, D Harris, P Sacks, S Schantz, Feng Liu, N Zhadin, and RR Alfano. Second-harmonic tomography of tissues. *Optics Letters*, 22(17) :1323–1325, 1997.
- [6] Mark AA Neil, Rimas Juškaitis, and Tony Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics letters*, 22(24) :1905–1907, 1997.
- [7] Omar E. Olarte, Jordi Andilla, Emilio J. Gualda, and Pablo Loza-Alvarez. Light-sheet microscopy : a tutorial. *Advances in Optics and Photonics*, 10(1) :111, March 2018. Citation Key Alias : olarte_light-sheet_2018-1.
- [8] Henry Siedentopf and Richard Zsigmondy. Über sichtbarmachung und größenbestimmung ultramikroskopischer teilchen, mit besonderer anwendung auf golddrubingläser. *Annalen der Physik*, 315(1) :1–39, 1902.
- [9] Arne H Voie, DH Burns, and FA Spelman. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning : Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *Journal of microscopy*, 170(3) :229–236, 1993.
- [10] Jan Huiskens, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, 2004.
- [11] Peter J Verveer, Jim Swoger, Francesco Pampaloni, Klaus Greger, Marco Marcello, and Ernst HK Stelzer. High-resolution three-dimensional imaging of large specimens with light sheet-based microscopy. *Nature methods*, 4(4) :311–313, 2007.
- [12] Francesco Pampaloni, Emmanuel G Reynaud, and Ernst HK Stelzer. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nature reviews Molecular cell biology*, 8(10) :839–845, 2007.
- [13] Philipp J Keller, Annette D Schmidt, Joachim Wittbrodt, and Ernst HK Stelzer. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *science*, 322(5904) :1065–1069, 2008.

- [14] Eugen Baumgart and Ulrich Kubitscheck. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Optics Express*, 20(19) :21805, September 2012.
- [15] Yicong Wu, Alireza Ghitani, Ryan Christensen, Anthony Santella, Zhuo Du, Gary Rondeau, Zhirong Bao, Daniel Colón-Ramos, and Hari Shroff. Inverted selective plane illumination microscopy (ispim) enables coupled cell identity lineaging and neurodevelopmental imaging in *caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(43) :17708–17713, 2011.
- [16] Yicong Wu, Peter Wawrzusin, Justin Senseney, Robert S Fischer, Ryan Christensen, Anthony Santella, Andrew G York, Peter W Winter, Clare M Waterman, Zhirong Bao, et al. Spatially isotropic four-dimensional imaging with dual-view plane illumination microscopy. *Nature biotechnology*, 31(11) :1032–1038, 2013.
- [17] Ryan McGorty, Harrison Liu, Daichi Kamiyama, Zhiqiang Dong, Su Guo, and Bo Huang. Open-top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens. *Optics Express*, 23(12) :16142, June 2015.
- [18] Ignacio Albert-Smet, Asier Marcos-Vidal, Juan José Vaquero, Manuel Desco, Arrate Muñoz-Barrutia, and Jorge Ripoll. Applications of light-sheet microscopy in microdevices. *Frontiers in Neuroanatomy*, 13 :1, 2019.
- [19] Makio Tokunaga, Naoko Imamoto, and Kumiko Sakata-Sogawa. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature Methods*, 5(2) :159–161, February 2008.
- [20] C Dunsby. Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy. page 11, 2008.
- [21] Remi Galland, Gianluca Grenci, Ajay Aravind, Virgile Viasnoff, Vincent Studer, and Jean-Baptiste Sibarita. 3D high- and super-resolution imaging using single-objective SPIM. *Nature Methods*, 12(7) :641–644, July 2015.
- [22] Kevin M Dean, Philippe Roudot, Erik S Welf, Gaudenz Danuser, and Reto Fiolka. Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy. *Biophysical journal*, 108(12) :2807–2815, 2015.
- [23] Per Niklas Hedde and Enrico Gratton. Selective plane illumination microscopy with a light sheet of uniform thickness formed by an electrically tunable lens. *Microscopy research and technique*, 81(9) :924–928, 2018.
- [24] Florian O Fahrbach and Alexander Rohrbach. A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams. *Optics express*, 18(23) :24229–24244, 2010.
- [25] Teng Zhao, Sze Cheung Lau, Ying Wang, Yumian Su, Hao Wang, Aifang Cheng, Karl Herrup, Nancy Y Ip, Shengwang Du, and MMT Loy. Multicolor 4d fluorescence microscopy using ultrathin bessel light sheets. *Scientific reports*, 6(1) :1–6, 2016.

- [26] Cristian Gohn-Kreuz and Alexander Rohrbach. Light needles in scattering media using self-reconstructing beams and the sted principle. *Optica*, 4(9) :1134–1142, 2017.
- [27] Tom Vettenburg, Heather IC Dalgarno, Jonathan Nylk, Clara Coll-Lladó, David EK Ferrier, Tomáš Čižmár, Frank J Gunn-Moore, and Kishan Dholakia. Light-sheet microscopy using an airy beam. *Nature methods*, 11(5) :541–544, 2014.
- [28] Bi-Chang Chen, Wesley R. Legant, Kai Wang, Lin Shao, Daniel E. Milkie, Michael W. Davidson, Chris Janetopoulos, Xufeng S. Wu, John A. Hammer, Zhe Liu, Brian P. English, Yuko Mimori-Kiyosue, Daniel P. Romero, Alex T. Ritter, Jennifer Lippincott-Schwartz, Lillian Fritz-Laylin, R. Dyche Mullins, Diana M. Mitchell, Joshua N. Bembenek, Anne-Cecile Reymann, Ralph Böhme, Stephan W. Grill, Jennifer T. Wang, Geraldine Seydoux, U. Serdar Tulu, Daniel P. Kiehart, and Eric Betzig. Lattice light-sheet microscopy : Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science*, 346(6208) :1257998, October 2014.
- [29] Elena Remacha, Lars Friedrich, Julien Vermot, and Florian O. Fahrbach. How to define and optimize axial resolution in light-sheet microscopy : a simulation-based approach. *Biomedical Optics Express*, 11(1) :8, January 2020.
- [30] Philipp J. Keller and Misha B. Ahrens. Visualizing Whole-Brain Activity and Development at the Single-Cell Level Using Light-Sheet Microscopy. *Neuron*, 85(3) :462–483, February 2015.
- [31] Na Ji. Adaptive optical fluorescence microscopy. *Nature Methods*, 14(4) :374–380, April 2017.
- [32] Dean Wilding, Paolo Pozzi, Oleg Soloviev, Gleb Vdovin, and Michel Verhaegen. Adaptive illumination based on direct wavefront sensing in a light-sheet fluorescence microscope. *Optics Express*, 24(22) :24896, October 2016.
- [33] Tsung-Li Liu, Srigokul Upadhyayula, Daniel E. Milkie, Ved Singh, Kai Wang, Ian A. Swinburne, Kishore R. Mosaliganti, Zach M. Collins, Tom W. Hiscock, Jamien Shea, Abraham Q. Kohrman, Taylor N. Medwig, Daphne Dambournet, Ryan Forster, Brian Cunniff, Yuan Ruan, Hanako Yashiro, Steffen Scholpp, Elliot M. Meyerowitz, Dirk Hockemeyer, David G. Drubin, Benjamin L. Martin, David Q. Matus, Minoru Koyama, Sean G. Megason, Tom Kirchhausen, and Eric Betzig. Observing the cell in its native state : Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science*, 360(6386) :eaaq1392, April 2018. Citation Key Alias : liu_observing_2018-2.
- [34] Cyril Bourgenot, Christopher D. Saunter, Jonathan M. Taylor, John M. Girkin, and Gordon D. Love. 3D adaptive optics in a light sheet microscope. *Optics Express*, 20(12) :13252, June 2012. Citation Key Alias : bourgenot_3d_2012-1.
- [35] Raphael Jorand, Gwénaële Le Corre, Jordi Andilla, Amina Maandhui, Céline Frongia, Valérie Lobjois, Bernard Ducommun, and Corinne Lorenzo. Deep and Clear Optical Imaging of Thick Inhomogeneous Samples. *PLoS ONE*, 7(4) :e35795, April 2012.

- [36] P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Loriette, and A. Fragola. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *Journal of Biomedical Optics*, 16(7), 2011.
- [37] Kevin M. Dean, Philippe Roudot, Erik S. Welf, Theresa Pohlkamp, Gerard Garrelts, Joachim Herz, and Reto Fiolka. Imaging subcellular dynamics with fast and light-efficient volumetrically parallelized microscopy. *Optica*, 4(2) :263, February 2017.
- [38] Xiaohu Gao, Warren CW Chan, and Shuming Nie. Quantum-dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *Journal of biomedical optics*, 7(4) :532–537, 2002.
- [39] G. Lippmann. Épreuves réversibles. photographies intégrales. *Compte rendues de l'Académie des sciences*, 146(9) :446–451, 1908.

Chapitre 4

Optique adaptative en source étendue pour l'imagerie du cerveau de *drosophila melanogaster* en microscopie à feuille de lumière

Sommaire

4.1	Présentation de l'échantillon	96
4.1.1	Zones et structures d'intérêt	96
4.1.2	Etat de l'art de l'imagerie chez la drosophile	97
4.1.3	Les limites et les besoins	102
4.2	Utilisation d'un marquage structural	105
4.2.1	Montage à 1 couleur	105
4.2.2	Le montage AO-LSFM bicouleur	109
4.3	Configuration de la correction en source étendue	113
4.3.1	Mesure du front d'onde	113
4.3.2	Paramètres de la boucle	117
4.3.3	Discussion	123
4.4	Apport de l'optique adaptative dans le cadre d'un mar-	
	quage fonctionnel	123
4.4.1	Matériels et méthodes	123
4.4.2	Résultats sur les neurones d'horloge	124
4.4.3	Résultats sur les neurones du sommeil	125
4.4.4	Discussion	128
4.5	Conclusion et perspectives	128

J'ai montré dans le chapitre précédent que l'optique adaptative (OA) en source étendue couplée à la microscopie à feuille de lumière permet de corriger les aberrations et d'apporter un gain en signal et résolution pour des échantillons de billes en 3D. Dans ce chapitre nous souhaitons utiliser ce montage pour la neuroimagerie, en particulier de la drosophile adulte.

Dans un premier temps je présenterai l'échantillon et les zones du cerveau que nous avons imagé et décrirai les performances actuelles de la neuroimagerie chez la drosophile.

Dans un second temps je décrirai les expériences menées et les résultats obtenus en imagerie structurelle puis fonctionnelle pour l'étude de l'activité cérébrale. Pour cette dernière application, je détaillerai l'intérêt d'un double marquage fluorescent de l'échantillon couplé au montage AO-LSFM bi-couleur pour optimiser la correction des aberrations et la qualité de l'image scientifique.

4.1 Présentation de l'échantillon

Les connaissances importantes des comportements complexes de *Drosophila Melanogaster* sont un critère de choix pour son utilisation comme modèle, notamment sur les maladies neurodégénératives [2]. C'est un modèle animal communément utilisé en neurologie du fait de la petite taille de son cerveau d'environ $300 \times 300 \times 200 \mu\text{m}^3$ et des facilités de reproduction. Son cerveau est composé d'environ 10000 neurones dont la taille varie entre 5 et 10 μm , ce qui démontre une forte densité de cellules. La microscopie optique est donc particulièrement adaptée car elle permet d'obtenir des images en champ large compatible avec le cerveau entier, et avec une résolution spatiale à l'échelle de la cellule individuelle à la surface du cerveau ou à de faibles profondeurs [1].

L'étude des réseaux de neurones chez la drosophile ajoutée à la possibilité de la modifier génétiquement favorise des études spécifiques [3].

4.1.1 Zones et structures d'intérêt

L'équipe de F. ROUYER à Neuro-PSI (UMR9197 Gif-sur-Yvette) s'intéresse, chez la drosophile, aux rythmes veille/sommeil gérés par l'horloge circadienne qui concerne environ 150 neurones [4, 5, 6]. Notre collaboration étroite a guidé l'application de l'AO-LSFM à l'étude de cet ensemble de neurones.

Ces neurones sont divisés en sous-groupes situés dans différentes parties du cerveau qui communiquent pour induire le comportement de réveil/sommeil chez la drosophile. De nombreuses questions demeurent sur la propagation de l'information au sein de ce réseau de neurones et comment la synchronisation s'effectue entre ces sous-groupes.

Un sous-groupe de cet ensemble, spécifiquement impliqué dans le sommeil, se compose uniquement d'une quinzaine de cellules représentées figure 4.1.

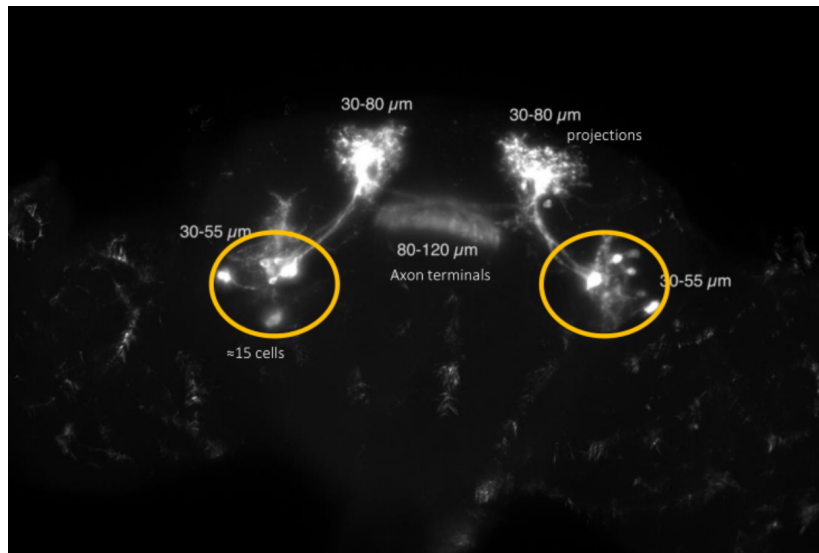


FIG. 4.1 Structures neuronales dans un cerveau de drosophile adulte impliquées dans le cycle du sommeil et exprimant GFP ($23E10-GAL4 > UAS-CD8-GFP$), projection d'un empilement sur $130\mu\text{m}$ acquis en microscopie confocale

Ce sous-groupe se divise en trois zones représentées sur la figure 4.1. Tout d'abord les corps cellulaires dans le cercle jaune qui se situent entre 30 et $55\mu\text{m}$ de profondeur et mesurent entre 5 et $10\mu\text{m}$. Ceux-ci forment des projections neuronales jusqu'à une zone d'arborisation située entre 30 et $80\mu\text{m}$ de profondeur. Cette zone est dense et les structures d'intérêt mesurent seulement quelques micromètres. Enfin, les terminaisons axonales regroupent les deux hémisphères du cerveau en formant une "arche" dense s'étalant de 80 à $120\mu\text{m}$.

Nous nous intéresserons majoritairement dans ce chapitre à cet ensemble de cellules et leurs projections.

4.1.2 Etat de l'art de l'imagerie chez la drosophile

La drosophile est un organisme extrêmement connu et caractérisé depuis plus d'un siècle, son génome a été séquencé en 2000 [7] et de nombreux outils génétiques ont été développés pour contrôler l'expression de ses gènes [8].

Marquage cellulaire

Le système d'expression UAS/GAL4¹, très couramment utilisé, permet un contrôle spatial de l'expression d'un gène. Ces modifications sont initiées par l'utilisation d'un transgène, un fragment d'ADN. Un croisement entre une espèce codant pour la protéine GAL4 avec une autre portant une séquence UAS inactive, induit un génome qui exprime la séquence GAL4 dans la zone cellulaire désirée [8]. De cette manière il est possible d'obtenir la synthèse de protéines fluorescentes variées dans les structures d'intérêt. Une protéine majeure que je vais présenter ici est la GFP (Green Fluorescent Protein).

La découverte de la protéine GFP, récompensée par le prix Nobel de Chimie en

1. Upstream Activation Sequence/GAL4

2008, a été une avancée majeure pour le marquage de spécifique d'échantillons biologiques. Cette protéine est issue de la méduse *Aequorea Victoria* et, comme son nom l'indique, est fluorescente. Grâce à l'ingénierie biochimique cette molécule a tout d'abord été rendue plus sensible et stable puis a donné naissance à de nombreuses protéines dérivées qui émettent leur fluorescence dans une large gamme de longueurs d'onde (figure 4.2).

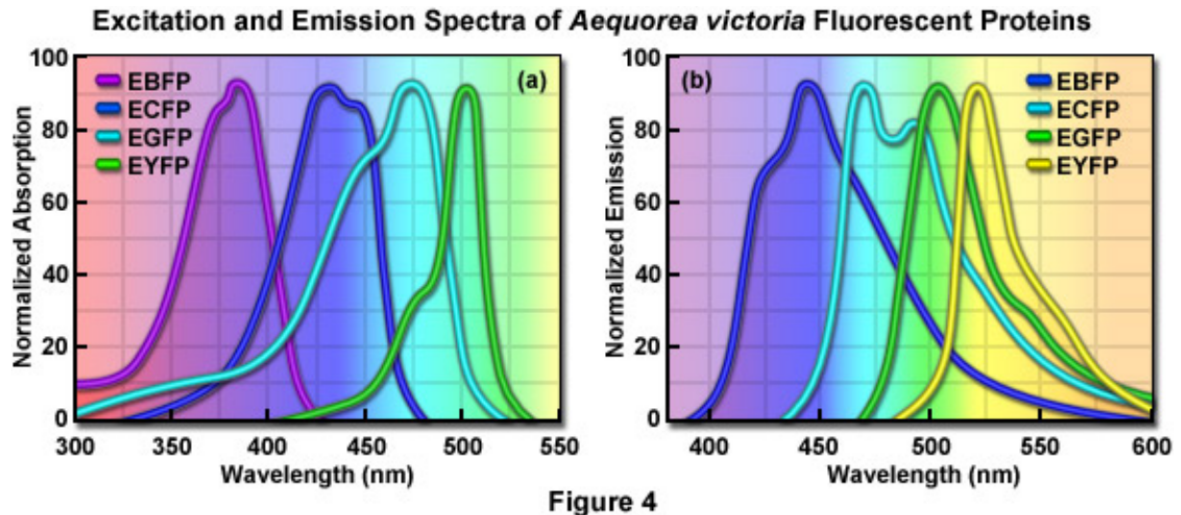


FIG. 4.2 Spectres d'absorption (a) et d'émission (b) pour les protéines fluorescentes dérivées de la GFP²

Ces développements ont permis la création de nombreuses autres protéines fluorescentes et de nouvelles stratégies de marquage telles que le "Brainbow" où chaque neurone est marqué avec une combinaison aléatoire de trois fluorophores [9, 10]. Il est alors possible de distinguer chaque neurone grâce à sa signature spectrale.

Dans nos expériences, nous utilisons la protéine EGFP ("enhanced GFP") dont les spectres d'absorption et d'émission sont présentés respectivement en turquoise et en vert sur la figure 4.2. L'absorption est maximale autour de 490nm et l'émission de fluorescence autour de 510nm.

L'imagerie fonctionnelle

Les neurobiologistes ne s'intéressent pas seulement à l'imagerie structurale du cerveau mais aussi à l'activité neuronale. En effet, les neurones sont des structures cellulaires dotées d'activité biochimique et électrique. En particulier les ions calcium (Ca^{2+}) à l'intérieur de la cellule sont des messagers impliqués dans les comportements physiologiques et notamment neuronaux. Au repos, la concentration en ions à l'intérieur de la cellule est plus faible qu'à l'extérieur. Le passage d'un potentiel d'action dans le neurone correspond à une entrée d'ions calcium dans le cytoplasme. Une seconde avancée majeure dans le marquage fonctionnel des neurones a donc été réalisée par l'introduction de molécules dont la fluorescence varie avec la concentration en calcium, elles deviennent alors capables de refléter l'activité neuronale. Il existe de nombreux marqueurs calciques dont le plus répandu dérivé de la GFP

2. Issu de <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/probes/jellyfishfps.html> , Avril 2021

est la GCaMP, sensible à la concentration en ions calcium. Une première version, développée en 2001, a une fluorescence qui augmente d'un facteur 4.3 entre les deux états de conformation [11].

L'imagerie fonctionnelle est généralement utilisée dans deux situations :

Une première consiste à observer l'émission de pics d'activité ("spikes") liés à une activité spontanée ou induite par une stimulation (olfactive, visuelle...). Ce type d'activité s'étudie à des cadences d'imagerie de plusieurs dizaines de Hertz et met en jeu des variations de concentration en ions calcium faibles, donc des variations de fluorescence faibles et rapides.

Une seconde situation correspond à l'activation volontaire du signal GCaMP en utilisant une solution de chlorure de potassium (KCl). Ceci a pour effet de libérer des ions calcium dans le cytoplasme et d'activer la GCaMP qui émet alors un signal plus intense pendant la durée de la régulation. Cette méthode peut être notamment utilisée pour étudier la réaction à une perturbation physiologique. La cadence d'imagerie mise en jeu dans ce cas là est plus faible (quelques Hertz) et l'émission de signal plus intense.

Depuis son émergence, l'imagerie fonctionnelle est en constante évolution et a donné naissance à une variété importante de sondes fluorescente de type GCaMP. Le travail porte majoritairement sur la variation de fluorescence entre deux états ou sur la dynamique de cette variation de fluorescence notamment avec la GCaMP6 et ses dérivées (6s pour slow, 6m pour medium et 6f pour fast) [12].

L'acquisition de signaux GCaMP, liés à l'activité spontanée nécessite une cadence d'imagerie d'environ 20Hz afin de percevoir les variations de fluorescence. Les variations d'intensité de fluorescence évoluent suivant la protéine utilisée mais sont calculées de la manière suivante :

$$\frac{\Delta F}{F_0} = \frac{F - F_0}{F_0}$$

où F_0 est la fluorescence de base moyennée sur une durée de quelques secondes avant l'activité. Ce rapport est compris entre 1 et 5% suivant les différents types de GCaMP actuelles en conditions réelles d'imagerie [12].

Un des derniers développements majeurs à l'heure actuelle, publié en 2019, porte sur la jGCaMP7 (janelia GCaMP), et ses dérivées ("bright", "slow", "fast") [13]. Nous avons représenté en figure 4.3 les principales caractéristiques et les comparaisons entre la GCaMP6 et la jGCaMP7 d'après les figures de [13].

La figure 4.3 permet de voir que la nouvelle jGCaMP7 promet des variations bien plus importantes de fluorescence en cas d'activité jusqu'à un facteur 2 à 4. Ces expériences ont été menées sur la drosophile en microscopie à deux photons. En particulier, la 7b montre une fluorescence de base près de 50 fois supérieure à 6f. Ceci apparaît comme une avancée importante qui pallie la faible émission de fluorescence en dehors de l'activité. Toutefois, cette nouvelle protéine date de 2019 et il y a, à l'heure actuelle, encore peu de retours sur son utilisation.

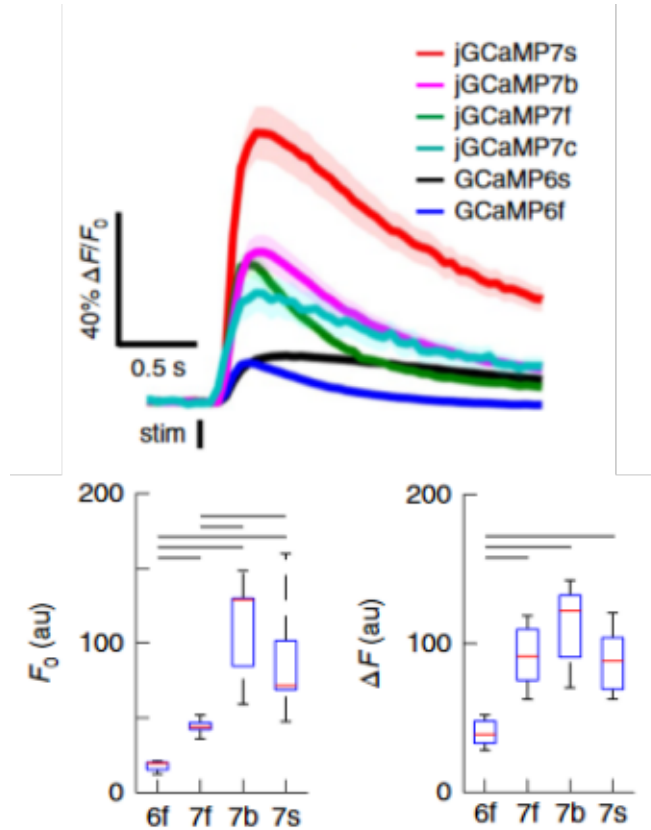


FIG. 4.3 (Haut) Variation de fluorescence induite après un potentiel d'action (Bas) Fluorescence de base et variation de fluorescence pour diverses protéines GCaMP acquises en microscopie 2 photons (adapté de [13])

Techniques d'imagerie actuelles chez la drosophile

Les microscopies les plus utilisées actuellement pour la neuroimagerie, y compris en profondeur, que ce soit pour de l'imagerie structurale ou fonctionnelle, sont la microscopie non-linéaire et la microscopie à feuille de lumière. Ces techniques photoblanchissent modérément l'échantillon (pour des SBR équivalents dans d'autres systèmes d'imagerie) grâce notamment à leur sectionnement optique et permettent une haute résolution spatio-temporelle. Enfin, elles permettent l'imagerie tridimensionnelle (3d) essentielle en neuroimagerie où l'on souhaite suivre l'activité de réseaux de neurones. Toutefois, il est à noter qu'une grande partie des études en microscopie sur la drosophile portent sur son développement à l'état larvaire et non à l'état adulte. En d'autres termes, les performances des nouvelles microscopies sont bien plus souvent évaluées sur des larves que sur des adultes, bien que de nombreux groupes s'y intéressent [14]. Dans le cas de l'adulte la majorité des études sont réalisées avec un microscope à 2 photons ([15]) ou un microscope confocal voire multiconfocal (spinning-disk) bien que ce dernier soit limité pour des études en profondeur. Il a été également montré de l'imagerie en profondeur superrésolue avec de l'illumination structurée jusqu'à $50\mu\text{m}$ combinée à de l'optique adaptative en mesure indirecte ("sensorless") [16]. La correction n'est pas possible à de plus grandes profondeurs à cause de la déformation trop importante de la grille. De plus, l'approche "sensorless" nécessite dans le cadre de cet article 400 images pour une durée d'exposition d'une minute, ce qui n'est pas compatible avec une étude dynamique.

Dans le cas de la microscopie non-linéaire, si l'on souhaite imager la GFP, la longueur d'onde du faisceau d'excitation est de l'ordre de 900-1000nm pour le deux photons (2P) et de 1300nm pour le trois photons (3P). Ces hautes longueur d'ondes où la diffusion et l'absorption sont plus faibles permettent d'observer plus en profondeur dans le tissu [17]. En imagerie fonctionnelle en microscopie 2 photons, il a été montré une méthode proche de l'optique adaptative dans un échantillon 3d de $50 \times 80 \times 20 \mu\text{m}^3$ acquis à une vitesse de 2 volumes par seconde [18]. Cette méthode "sensorless" utilise un miroir déformable pour réaliser un contrôle de la mise au point (le focus) et ainsi balayer axialement à haute cadence l'échantillon, tout en corrigeant les aberrations mesurées au préalable. Cette rapidité d'acquisition a permis une étude dynamique de l'échantillon et d'observer les cellules de Kenyon. Aucune précision n'est apportée sur la profondeur de ces images mais la littérature indique que l'ensemble de ces cellules, impliquées dans le comportement olfactif de la drosophile, comprend environ 2500 cellules jusqu'à $67 \mu\text{m}$ de profondeur [19].

La microscopie à feuille de lumière est également très répandue pour l'imagerie de la drosophile. Dans le cadre du cycle circadien notamment P. TAGHERT a publié plusieurs articles où il utilise le microscope OCPI (Objective-coupled planar Illumination) développé par T. HOLY [20]. Cette technique d'illumination, dérivée de la microscopie à feuille de lumière, couple l'objectif de détection à la fibre optique d'illumination de sorte à ne jamais mouvoir l'échantillon comme indiqué sur la figure 4.4. Ceci, en plus d'une illumination à 45° , permet l'acquisition 3d d'un échantillon complet en moins de 2s (200 images par secondes) et rend possible la détection de signaux d'activité en GCaMP [21, 22].

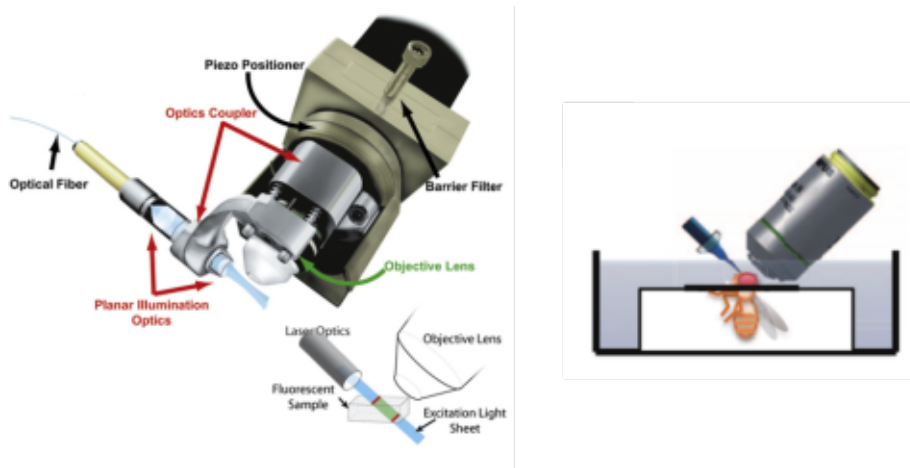


FIG. 4.4 (Gauche) Principe du microscope OCPI, la feuille de lumière est générée en sortie de la fibre optique et cette dernière est couplée à l'objectif de microscope. (Droite) Représentation du porte échantillon pour l'étude de la drosophile adulte (adapté de [20, 21])

Ces différentes études montrent des approches d'imagerie dynamique performantes pour du suivi temporel.

La figure 4.5 montre le suivi sur 24h de groupes de cellules impliqués dans le cycle circadien.

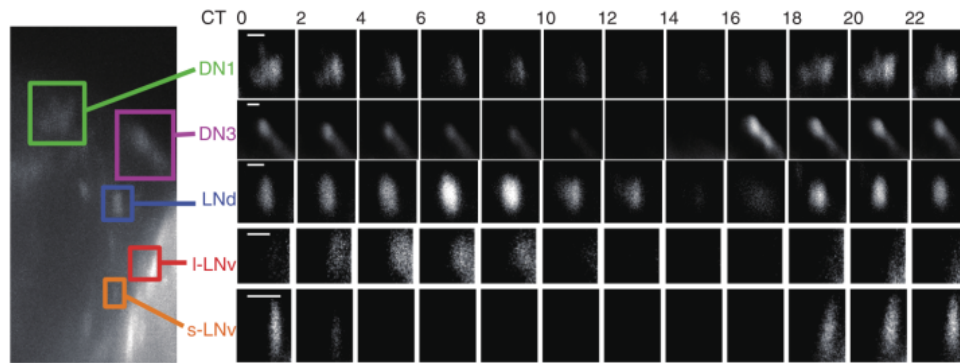


FIG. 4.5 5 groupes de cellules étudiés et les variations de fluorescence liées à *GCaMP6s* associées au cours du temps. Barre d'échelle $20\mu\text{m}$ (extrait de [21])

La figure 4.5 permet de mettre en évidence les variations d'intensité du signal et jusqu'à l'extinction de certains groupes de cellules. Néanmoins comme on peut le voir, la qualité d'imagerie de groupes de cellules ne permet pas de résoudre distinctement les cellules ou les projections qui participent à l'activité neuronale.

Dans ces deux articles de référence, [21, 22], il a été présenté des enregistrements de la totalité du réseau de neurones impliqué dans le cycle circadien pendant une journée. De nombreuses études biologiques sont désormais possibles grâce à ces montages mais la limitation du signal et de la résolution spatiale restent critiques pour des études quantitatives et plus détaillées d'un point de vue physiologique.

4.1.3 Les limites et les besoins

Les difficultés liées à la neuroimagerie chez la drosophile

La microscopie confocale ou à illumination structurée pour l'imagerie sont non seulement limitées l'absorption et la diffusion des tissus mais aussi par l'autofluorescence.

Définition 4.1, Autofluorescence

Phénomène de fluorescence issu de l'excitation de molécules naturellement présentes dans l'échantillon. La majorité des tissus biologiques sont fluorescents en particulier dans le visible.

L'utilisation de microscopies non-linéaires permet de limiter fortement l'autofluorescence des plans hors du plan de mise au point grâce à une excitation dans la fenêtre spectrale de 650-1300nm où les tissus biologiques absorbent moins. Les puissances nécessaires élevées peuvent néanmoins créer un échauffement à la surface de l'échantillon et ainsi le dégrader.

La microscopie à feuille de lumière permet également de réduire l'autofluorescence issue des plans hors du plan de mise au point pour améliorer le rapport signal sur fond (SBR) sur la caméra.

Une autre difficulté dans l'image du cerveau de la drosophile vient de la diffusion car celui-ci apparaît blanchâtre ce qui révèle une importante diffusion de la lumière. Cette diffusion, comme les aberrations, naît des hétérogénéités du milieu mais à des

ordres beaucoup plus élevés. La correction de la diffusion est complexe et fait actuellement l'objet de nombreuses recherches notamment en utilisant des méthodes de mise en forme du faisceau avec un modulateur spatial de lumière (SLM) [?]. Mais à l'heure actuelle, ces approches ne sont pas applicables à l'imagerie dynamique du vivant.

Enfin, une des principales difficulté de l'imagerie chez la drosophile réside dans son système respiratoire. En effet, le système respiratoire des insectes est composé de trachées et diffère de celui de la souris ou du poisson zèbre basée sur le système sanguin³. Ce système d'oxygénation spécifique est divisé en réseaux trachéens le long des organes [24]. La trachée est composée d'un ensemble de micro-trachées de quelques microns [25]. C'est un élément responsable d'une grande partie de la diffusion et des aberrations [26]. Dans un récent article de 2019, HSU *et al.* ont montré qu'en imagerie confocale le contraste devient insuffisant à partir de 40 μ m de profondeur et en 2 photons autour de 120 μ m. Ces profondeurs sont inférieures à celles chez la souris ou le poisson-zèbre. Pour confirmer que la perte de contraste est due à la trachée, dans ce même article, les cerveaux ont été dégazés ; en d'autres termes l'air présent dans la trachée a été aspiré après fixation du cerveau. Ceci permet de limiter les aberrations et la diffusion, et le contraste est nettement amélioré. La présence de microtrachées à l'intérieur du cerveau a été également montrée à l'aide d'un contraste de 3ème harmonique (THG) issu des interfaces entre deux milieux d'indice optique différents. La figure 4.6 représente ces différentes expériences *in vivo* et démontre la perte de contraste rapide due, en partie, au système trachéen.

3. On considère ici chez le poisson-zèbre à l'état adulte et non à l'état larvaire

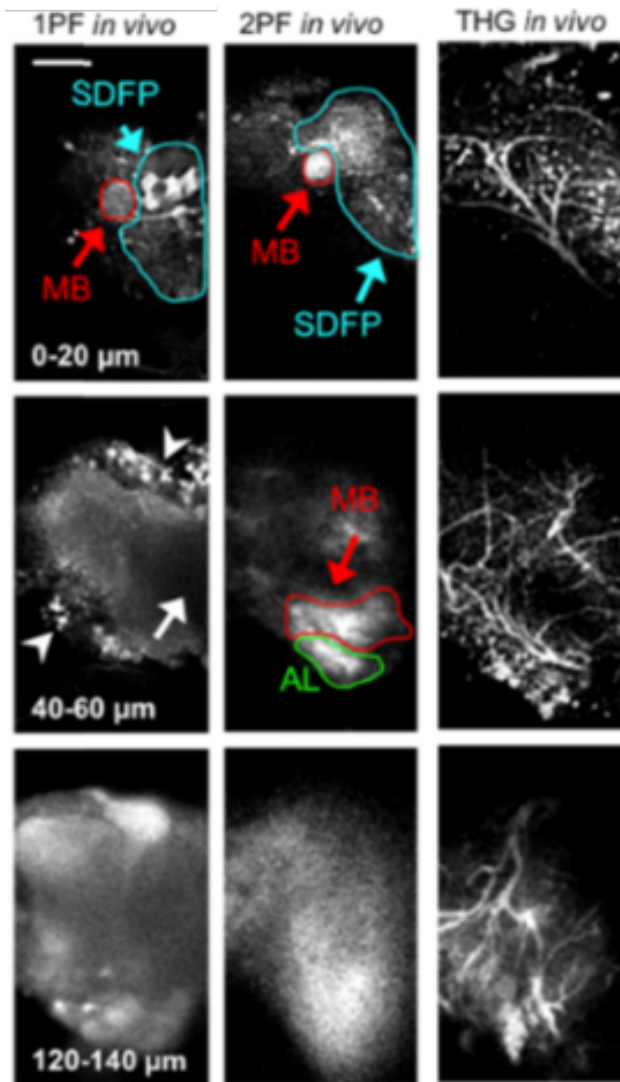


FIG. 4.6 Cerveau de la drosophile adulte marquée en GFP selon différentes modalités d'imagerie à différentes profondeurs. Les images sont des projections du cerveau sur une épaisseur de $20\mu\text{m}$. MB : "Mushroom Bodies", SDFP : "Superior Dorsofrontal Protocerebrum", AL : "Antennal Lobe"(extrait de [26])

C'est pourquoi nous imagerons pour commencer sur des cerveaux fraîchement disséqués auxquels a été retiré le système de trachée extérieur. Les microtrachées montrées par la figure 4.6, elles, restent présentes.

Comme expliqué précédemment les études de performances des microscopes sont principalement faites sur des larves. L'état larvaire simplifie la mise en place de l'échantillon car il n'est pas nécessaire de faire une dissection pour extraire le cerveau ou d'ouvrir une fenêtre au sommet de la tête. De plus, le système trachéen est moins développé ce qui peut favoriser un meilleur SBR [27]. Aussi, il existe peu d'applications en microscopie avancée pour la drosophile adulte et les méthodes, parfois complexes, ne sont pas toujours adaptées à l'imagerie *in vivo*. Enfin, un compromis doit systématiquement être fait entre la qualité d'image et la dynamique d'acquisition. Ainsi, certaines études montrent des très bonnes résolutions en profondeur dans le cerveau de la drosophile, de quelques micromètres mais ne permettent pas de suivre l'activité neuronale et à l'inverse, l'OCPI, par exemple, offre une cadence d'ac-

quisition compatible avec l'enregistrement de l'activité neuronale mais au détriment de la résolution spatiale.

Les besoins pour l'imagerie fonctionnelle du cerveau de drosophile

La neuroimagerie fonctionnelle de la drosophile nécessite donc d'utiliser un microscope à sectionnement optique, car le cerveau est un échantillon épais. Ce sectionnement optique permet de diminuer le signal de fond issu de la fluorescence et l'autofluorescence des plans hors du plan de mise au point. Il est également nécessaire d'être adapté au vivant et donc d'être peu invasif : éclairer avec de faibles puissances lumineuses ou utiliser des marqueurs avec des rendements de fluorescences élevés. Malheureusement, la variation de fluorescence de GCaMP liée à l'activité est faible et constitue une difficulté majeure de l'imagerie fonctionnelle.

C'est pourquoi augmenter le signal de fluorescence permettrait d'apporter de la robustesse dans l'analyse de résultats sur le comportement. Des apports ont été faits avec les nouvelles sondes GCaMP. La correction des aberrations induites par l'échantillon permet d'augmenter le signal de façon significative et constitue donc une voie prometteuse pour repousser les limites de la neuroimagerie fonctionnelle par exemple pour la visualisation de pic d'activités.

Le développement de ce microscope AO-LSFM original a donc pour objectif d'apporter un gain en signal et en résolution pour la neuroimagerie fonctionnelle chez la drosophile adulte, dans l'ensemble du cerveau. Le AO-LSFM a montré une robustesse de mesure et de correction du front d'onde. Il devra permettre d'acquérir des images sur du long terme même en profondeur où le SBR sur l'analyseur en source étendue sera faible.

4.2 Utilisation d'un marquage structurel

Ces premières expériences visent à démontrer l'intérêt de l'optique adaptative en source étendue pour la neuroimagerie et à estimer le gain dans les images de structures marquées avec GFP à des profondeurs variées. Nous avons travaillé systématiquement avec des neurones impliqués dans le cycle du sommeil chez la drosophile adulte.

4.2.1 Montage à 1 couleur

Les premières expériences ont été réalisées avec un marquage structurel GFP afin de faciliter la mise en œuvre du protocole d'acquisition et de correction et de valider le fonctionnement dans des conditions d'imagerie *in vivo*. Le montage est similaire aux expériences du chapitre précédent avec les billes comme représenté sur la figure suivante :

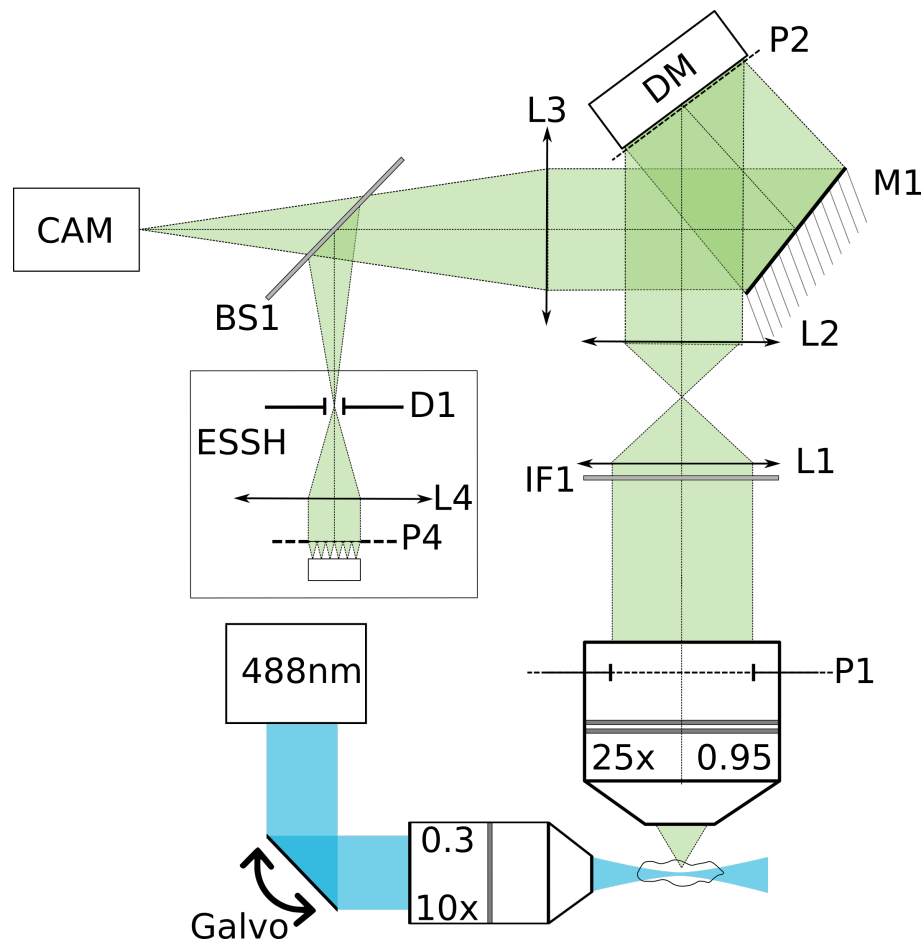


FIG. 4.7 Schéma du montage AO-LSFM à une couleur

Expériences

Les mouches expriment la protéine GFP dans les neurones impliqués dans le cycle du sommeil et l'imagerie est réalisée sur des cerveaux *ex vivo*, qui nécessitent donc une dissection précise. Pour cela nous travaillons sous une loupe binoculaire avec des pinces chirurgicales pour extraire le cerveau après une mise à 0°C du tube pendant 5 minutes pour endormir les mouches. Toute la procédure se déroule dans un liquide d'immersion sucré pour que le cerveau ne se dessèche pas. Lors de la dissection, il est nécessaire de retirer un maximum de trachée puisqu'elle est responsable de diffusion, d'absorption et d'auto fluorescence, comme indiqué précédemment. Cette étape est complexe car les pinces peuvent abimer la surface du cerveau et induire des pertes de signal de fluorescence voire même une déstructuration des zones à étudier. Le cerveau est ensuite placé en immersion dans la cuve. Afin de fixer le cerveau à la lamelle de microscope celle-ci est d'abord traitée à la phénylalanine. Ceci permet, par liaison chimique, de maintenir l'échantillon en place lors de l'ajout du liquide d'immersion. Le marquage GFP dans le cerveau demeure après dissection pendant environ 24h si le cerveau est immergé. Néanmoins, le marquage du cerveau est photosensible, donc le signal diminue. Nous avons donc privilégié l'imagerie de cerveaux fraîchement disséqués.

Le savoir-faire pour réaliser de bonnes dissections nécessite beaucoup de pratique que nous avons acquise dans les deux premières années de cette thèse. Nous avons également bénéficié souvent de l'aide de G. FARKOUH, doctorant à NeuroPSI, pour

réaliser de meilleures dissections, essentielles à la réussite de l'expérience.

La puissance d'illumination dans l'échantillon utilisée pour ces expériences varie entre 0.5 et 2mW. Le temps d'exposition sur la caméra scientifique est de 200ms et de 100ms sur l'ESSH. L'analyseur de front d'onde reste performant même dans des conditions de rapport signal à bruit faible grâce à l'utilisation de la corrélation, et permet de mesurer le front d'onde pour des valeurs de saturation de la caméra faibles typiquement jusqu'à 5% .

Avant de corriger les aberrations, la forme du miroir chargée est celle qui corrige les aberrations statiques du montage afin de ne mesurer sur l'ESSH que les aberrations induites par l'échantillon. Pour les boucles d'OA, les paramètres typiques sont une correction de 36 à 42 modes avec un gain égal à 0.6. Des détails sur la boucle d'OA seront donnés plus tard dans ce chapitre.

Résultats

Des mesures des aberrations en profondeur dans un cerveau sont représentées en figure 4.8. Le front d'onde mesuré et les modes de Zernike mesurés sur celui-ci sont présentés en bleu pour des corps cellulaires à 30 μ m de profondeur et en rouge pour les projections à 70 μ m de profondeur.

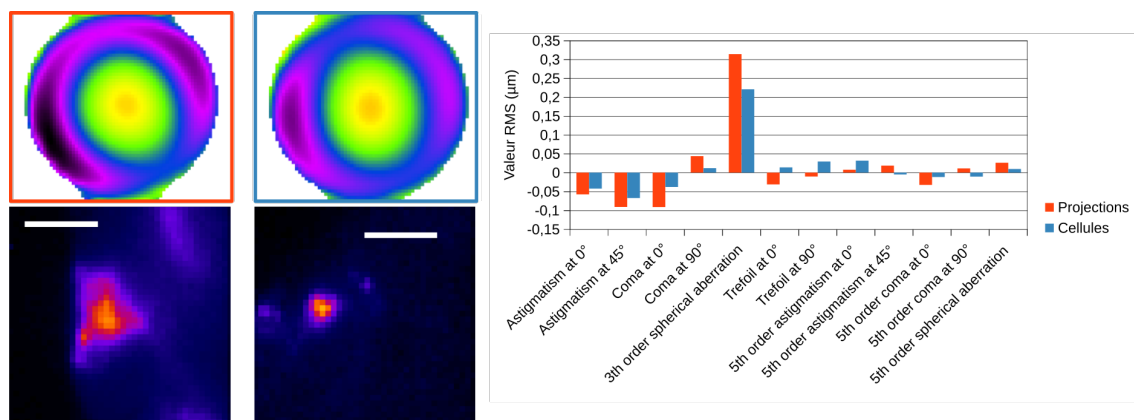


FIG. 4.8 (Gauche) Fronts d'ondes et imagerie pour des corps cellulaires (bleu) et projections (rouge), barre d'échelle 50 μ m. (Droite) : Valeurs RMS des 15 premiers modes de Zernike associées au fronts d'ondes présentés, à 30 μ m, cellules (bleu); et à 70 μ m, projections (rouge).

Les imagerie sur la figure 4.8 montrent des structures très différentes mais des fronts d'ondes relativement similaires. Les modes de Zernike nous permettent de confirmer que les aberrations sont semblables à l'exception de l'aberration sphérique, par ailleurs majoritaire (histogramme figure 4.8), et qui, comme attendu, augmente avec la profondeur.

La correction des aberrations est présentée en figure 4.9. L'image présentée mesure environ 200x150 μ m², la zone d'intérêt où le front d'onde est mesuré est constituée de projections neuronales en bas à gauche. Les images enregistrées par la caméra sont comparées avant et après la correction du front d'onde afin de quantifier le gain. Des profils d'intensité sont réalisés sur la zone de projection où est effectuée la mesure des aberrations et montrent une augmentation à la fois du signal et du contraste.

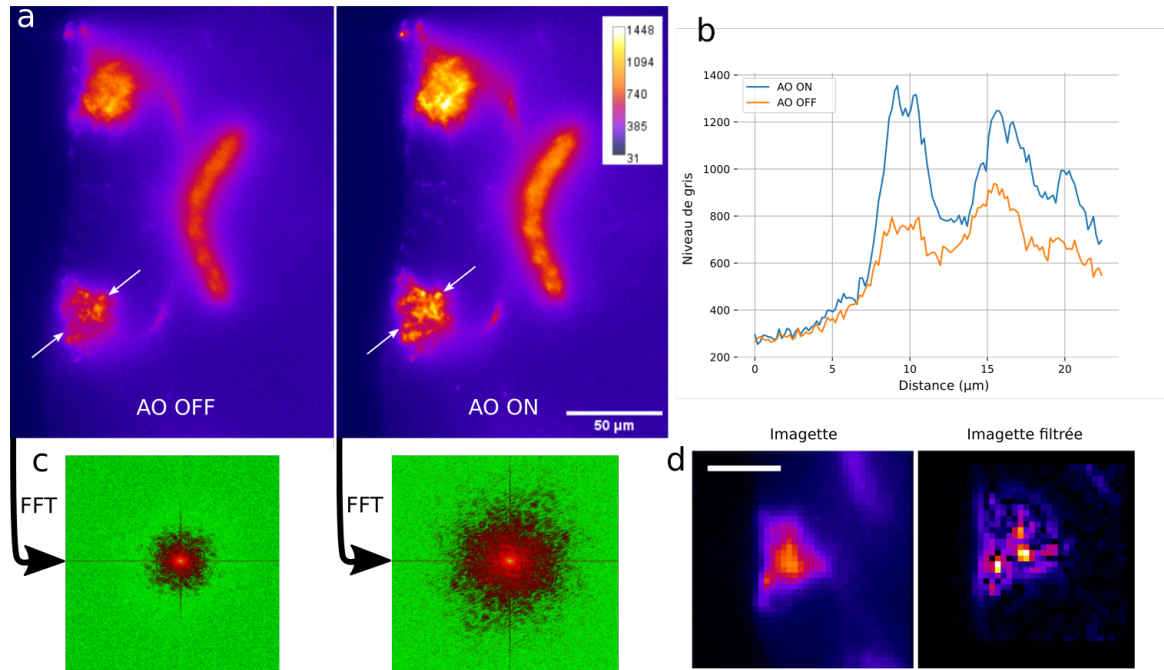


FIG. 4.9 (a) Comparaison des images caméra sans et avec correction à 42 modes sur la zone de projection (b) Profils tracés entre les flèches blanches des images caméra (c) Transformée de Fourier de l'image caméra avant et après OA (d) Imagette de référence de l'ESSH avant et après préfiltrage de type LoG

Le signal de fond est commun aux deux profils (de 0 à 5 μm) alors que le pic d'intensité autour de 8 μm subit une augmentation d'environ 70% après correction. Le signal de fond entre les pics d'intensité vers 13 μm est lui seulement augmenté de 20%, et montre bien l'amélioration du contraste.

Les profils montrent également une augmentation de la résolution car les pics sont plus fins. Ce gain en résolution spatiale est visible dans les images au niveau des terminaisons axonales (a). Ceci est confirmé par la transformée de Fourier (figure 4.9(c)) élargie après correction, qui représente une augmentation du signal haute fréquence dans l'image.

Ces résultats prometteurs ont été reproduits avec succès dans les zones des corps cellulaires et des projections sur plusieurs dizaines de drosophiles.

Discussion

Nous avons démontré que l'ESSH permet de mesurer les aberrations à différentes profondeurs dans le cerveau de la drosophile illuminé par une feuille de lumière. L'aberration sphérique est majoritaire dans les différentes zones étudiées et croît avec la profondeur d'imagerie. Notre valeur de front d'onde mesurée est moyennée sur le champ d'une imagette et sur l'épaisseur de la feuille de lumière. Cette feuille est, de plus, épaissie par la diffusion et les aberrations de l'échantillon. Pour minimiser cela, nous plaçons l'échantillon de sorte à exciter les structures d'intérêt en minimisant la propagation du faisceau d'excitation dans le cerveau. Malgré cela, la valeur des aberrations mesurées varie beaucoup d'un échantillon à l'autre et justifie pleinement l'utilisation d'une boucle d'OA pour les corriger efficacement.

Les premières expériences d'optique adaptative en source étendue sur le cerveau de la drosophile sont extrêmement encourageantes. Nous distinguons un net élargissement de la transformée de Fourier et un gain significatif en signal et résolution sur l'image et les profils. Ces résultats sont reproductibles et ont été répétés pour caractériser la boucle d'OA.

Enfin, l'objectif reste l'utilisation de l'AO-LSFM en imagerie fonctionnelle. Or, en imagerie fonctionnelle les photons issus des neurones activés sont peu nombreux et émis pendant un temps court, c'est pourquoi ils ne doivent participer qu'à la formation de l'image. En conséquence, nous devons utiliser un second marquage fluorescent pour la correction du front d'onde qui peut être un marquage structurel comme précédemment.

Nous avons, dans un premier temps, continué de travailler avec un marquage structurel afin d'évaluer les performances de nouveau et de montrer les capacités de correction en bicouleur.

4.2.2 Le montage AO-LSFM bicouleur

L'intérêt de ce montage est de pouvoir réaliser la mesure de front d'onde tout en préservant les photons d'intérêt pour l'imagerie scientifique. Nous reprenons ici la démarche et le montage bi-couleur décrits au chapitre précédent 4.11.

Changements apportés sur l'échantillon et le montage

Les mouches utilisées sont issues d'un croisement pour exprimer à la fois GFP et mCherry. Le marquage mCherry est structurel et permet de faire la boucle d'OA. Son absorption est centrée sur 587nm et son émission à 610nm. La figure 4.10 présente chacun des marquages et leur fusion.

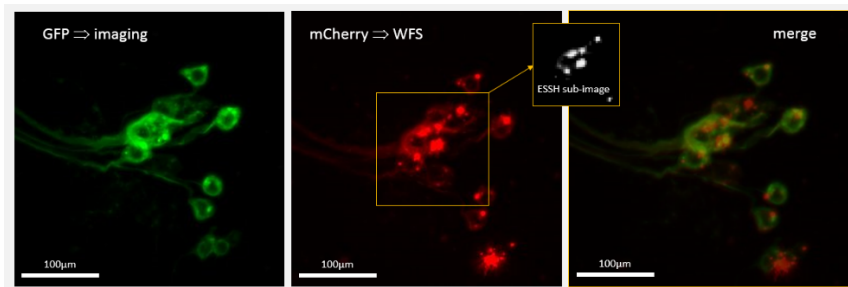


FIG. 4.10 Exemple bicouleur sur les structures cellulaires d'intérêt. Réalisé à NeuroPSI par G. Farkouh en microscopie confocale sur un échantillon clarifié

Ce type de double marquage est déjà couramment utilisé en neuroimagerie pour localiser les cellules et enregistrer une référence pour le signal calcique donné par la GCaMP. En effet, lors d'expériences sur 24h, il est nécessaire d'enregistrer un signal de fluorescence de référence pour discriminer *a posteriori* les variations dues à l'activité neuronale du signal GCaMP de celles dues aux mouvements.

Il est primordial que les deux marquages soient sur les mêmes cellules pour assurer une correction des aberrations correcte comme on peut le voir sur la figure 4.10. Dans le cas contraire, il y a un risque de mesurer les aberrations dans un plan différent et par exemple de ne pas apporter de gain à l'image. Il n'est toutefois pas obligatoire

que les structures soient strictement les mêmes à condition qu'elles soient éloignées de moins de la distance isoplanétique.

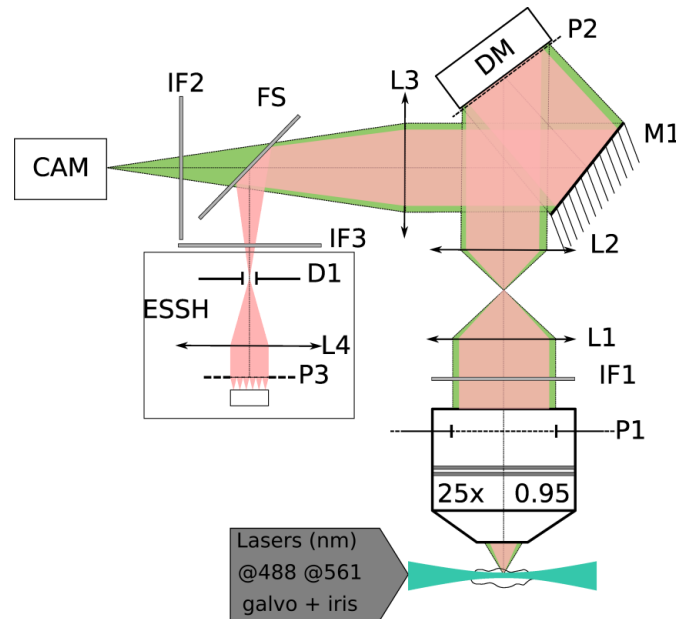


FIG. 4.11 Schéma du montage bicouleur, (FS) pour "frequency splitter"

La figure 4.12 représente le dimensionnement du microscope ainsi configuré et les chemins optiques en jeu.

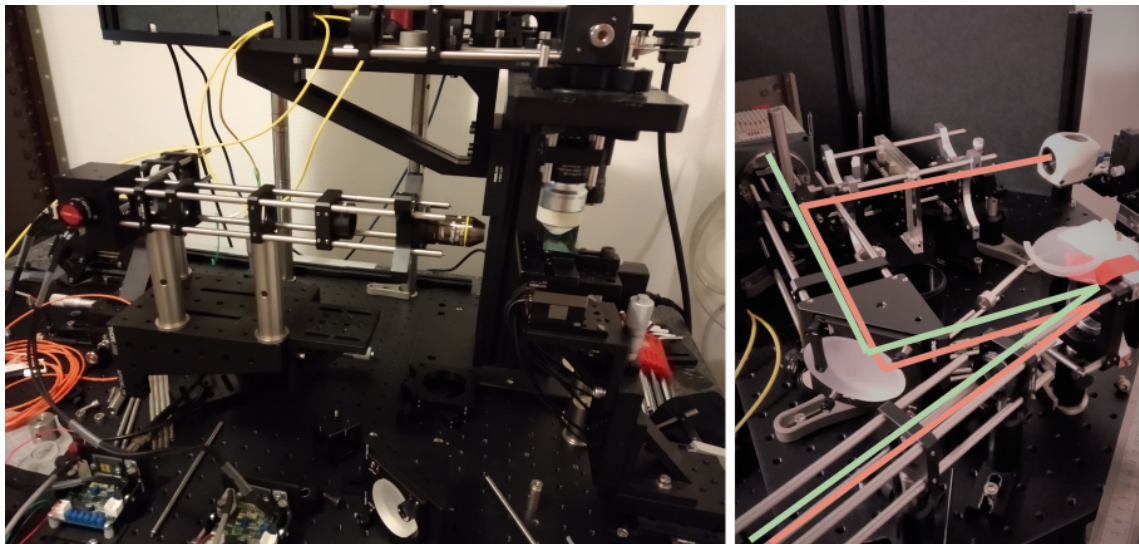


FIG. 4.12 Photographie du montage, à gauche : bras d'excitation en feuille de lumière, à droite : chemin optique pour l'imagerie et la correction du front d'onde

Comme précédemment nous imageons les corps cellulaires des neurones impliqués dans le cycle du sommeil situés entre 30 et 50 μ m de profondeur puis les projections de ces cellules entre 30 et 80 μ m de profondeur. Les boucles d'optique adaptative sont réalisées avec 36 et 42 modes de correction avec un gain égal à 0.6. Les aberrations corrigées sont uniquement celles induites par l'échantillon.

Résultats

Les images des cellules à $30\mu\text{m}$ de profondeur (figure 4.13) montrent une augmentation du signal et de la résolution après correction du front d'onde.

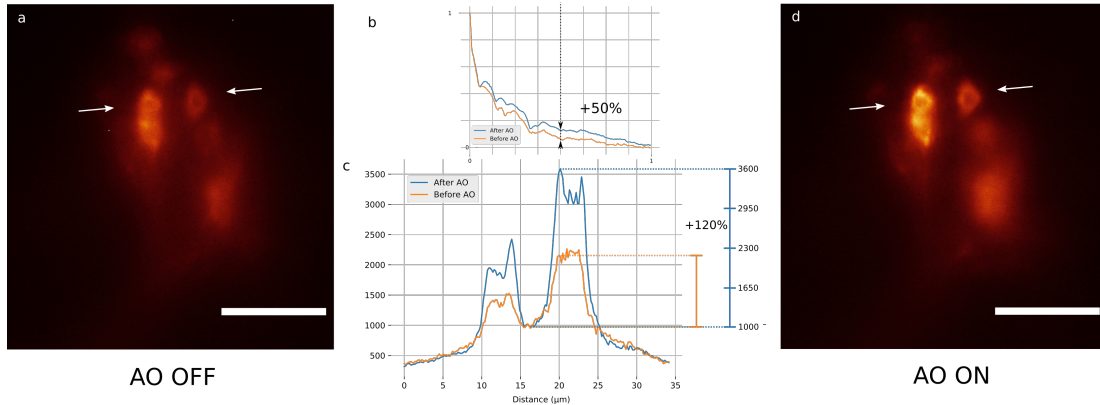


FIG. 4.13 (a) Cellules à $30\mu\text{m}$ de profondeur sans optique adaptative et (d) avec. Barre d'échelle $20\mu\text{m}$. (b) Transformée de Fourier radiale. (c) Profil entre les flèches blanches sur les images.

Pour mettre en évidence et quantifier ce gain nous avons tracé un profil (c) entre les flèches blanches des images (a-d). Le contraste est multiplié par 2 pour deux points situés respectivement dans la cellule et en dehors de celle-ci. L'image corrigée permet de mieux discerner le marquage cytoplasmique de GFP du noyau. Pour mesurer l'augmentation de résolution nous calculons la transformée de Fourier radiale en moyennant les valeurs de la transformée de Fourier sur des couronnes de pixels de rayon variable. Sur les courbes associées tracées en fonction de la fréquence spatiale, l'augmentation du signal est visible et atteint jusqu'à 50% d'augmentation. À basse fréquence, le gain apporté est nul puisque les aberrations dégradent majoritairement le signal haute fréquence.

En ce qui concerne le front d'onde, la correction permet de passer de 256nm RMS à 34nm RMS (figure 4.14).

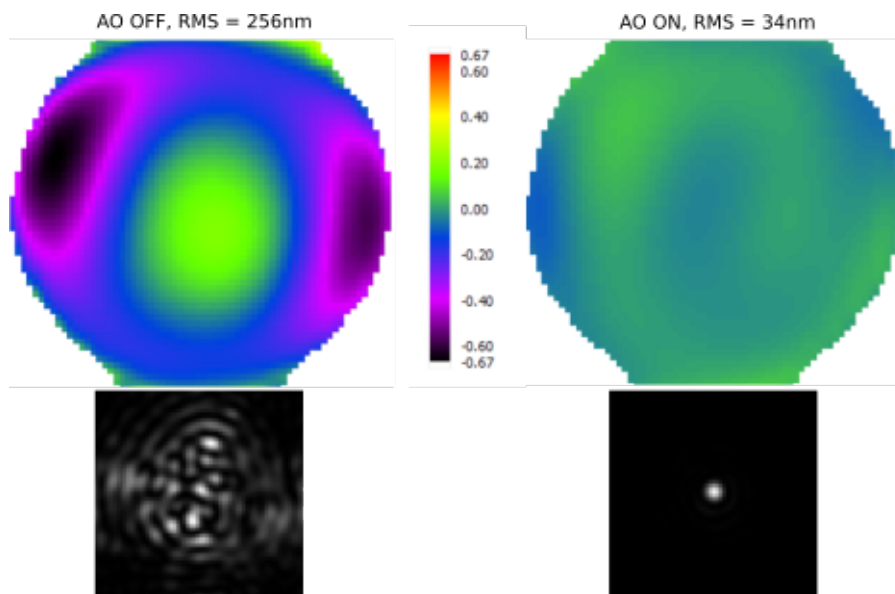


FIG. 4.14 Front d'onde et PSF associée avant et après correction des cellules en figure 4.13

Comme on peut le reconnaître sur le front d'onde avant correction, il y a une composante majoritaire d'aberration sphérique (200nm), d'astigmatisme 0° (-167nm) dans la PSF associée à partir de ce front d'onde qui est calculé. L'aberration sphérique, elle, est responsable de la dégradation en résolution dans toutes les directions et aussi d'une perte de mise au point. Le rapport de Strehl pour une telle tâche sans correction des aberrations induites par l'échantillon est de 0.05. Après correction ce rapport atteint 0.95 qui traduit une correction optimale, au-delà du critère de Maréchal.

Plus en profondeur, entre 60 et 70 μ m, la correction du front d'onde dans la zone des projections apporte un gain significatif comme on peut le voir sur la figure 4.15.

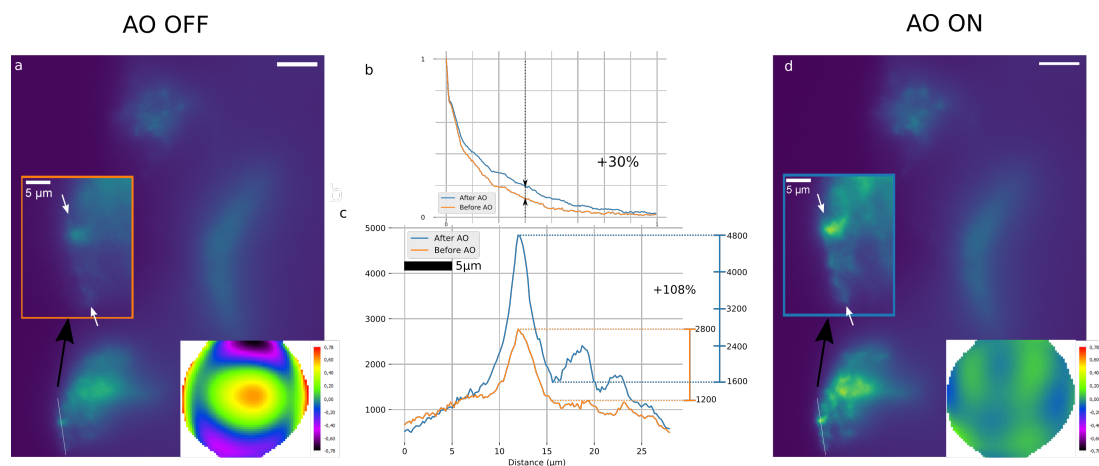


FIG. 4.15 Projections à 70 μ m de profondeur sans optique adaptative (a) avec (d) et fronts d'ondes associés. Barre d'échelle 20 μ m. (b) Transformée de Fourier radiale. (c) Profil entre les flèches blanches sur les images

Les profils (c) confirment une augmentation du signal et un contraste augmenté d'un facteur 2. Ils révèlent également un gain en résolution avec des pics à 18 et 22 μ m qui correspondent aux structures du bas de la zone de projections. La transformée de Fourier nous permet de confirmer, encore une fois, cette augmentation de contraste allant jusqu'à 30%.

Discussion

Ces expériences permettent de confirmer les performances de la boucle d'optique adaptative sur le montage AO-LSFM pour la neuroimagerie d'un échantillon *ex vivo* et montrent la possibilité de corriger à l'aide d'un second marquage pour préserver le signal. Ceci nous permet d'envisager l'utilisation de l'AO-LSFM pour corriger les aberrations de l'échantillon en imagerie fonctionnelle. La mesure en source étendue permet d'obtenir un front d'onde corrigé avec un RMS inférieur à 40nm pour 36 modes et un gain égal à 0.6 en 5 à 6 itérations. Pour un temps d'exposition sur l'analyseur de 100ms cela correspond donc à 600ms pour corriger les aberrations dans un plan. À titre de comparaison, l'utilisation d'un algorithme 3N dans le cadre d'une boucle "sensorless" nécessite 40 images, donc ici 4 secondes.

La répétabilité de ces expériences a permis d'étudier quelques paramètres clés liés à la boucle d'optique adaptative que nous allons détailler dans la prochaine section.

4.3 Configuration de la correction en source étendue

L'utilisation d'un échantillon biologique avec un marquage structurel est nécessaire afin d'optimiser et de configurer la boucle pour un marquage fonctionnel. Je développerai ici les différents paramètres que nous avons étudiés.

4.3.1 Mesure du front d'onde

Dans cette première partie nous allons nous intéresser à la mesure du front d'onde dans le cerveau de la drosophile en étudiant l'influence de l'épaisseur de la feuille et l'isoplanétisme.

Influence de l'épaisseur de la feuille

L'échantillon fait en moyenne $200\mu\text{m}$ d'épaisseur et les microlentilles de l'analyseur intègrent la totalité du signal sur cette épaisseur car elles ont une faible ouverture numérique. Le front d'onde mesuré représente donc une moyenne des fronts d'onde sur cette épaisseur. Le sectionnement optique est par conséquent un paramètre clef ici pour garantir une mesure du front d'onde sur une épaisseur correspondant à la profondeur de champ sur la caméra scientifique. En effet, nous avons vu dans la section précédente que l'aberration sphérique notamment évolue avec la profondeur dans le cerveau de la drosophile, il est donc nécessaire de distinguer ces plans pour une meilleure correction.

Comme discuté précédemment, nous optimisons la feuille de telle sorte que l'ensemble du champ de vue des imagettes soit illuminé avec un feuille de lumière d'épaisseur constante. Mais la diffusion à l'intérieur de l'échantillon ne permet pas d'obtenir l'épaisseur mesurée dans la fluorescéine de $5\mu\text{m}$. Dans le cerveau de la drosophile, l'épaisseur est d'environ 15 à $20\mu\text{m}$. Le signal est donc moyenné sur une épaisseur qui peut correspondre à l'ensemble d'une zone d'intérêt.

De fait, nous considérons l'ensemble de ce volume comme étant égal à $20\mu\text{m}$ et chaque microlentille va imager une projection de ce volume. Or, pour chaque plan la valeur de focus n'est pas la même. Il en découle donc sur les imagettes, notamment aux extrémités de la pupille, une déformation liée à la composante de focus de chacun des plans comme visible sur la figure 4.16. Dans cette figure, nous avons considéré les terminaisons axonales, zone très dense d'environ $40\mu\text{m}$ d'épaisseur. Les quatre imagettes sont sélectionnées pour évaluer les déformations en fonction de leur position dans la pupille par rapport à l'imagette de référence (violet).

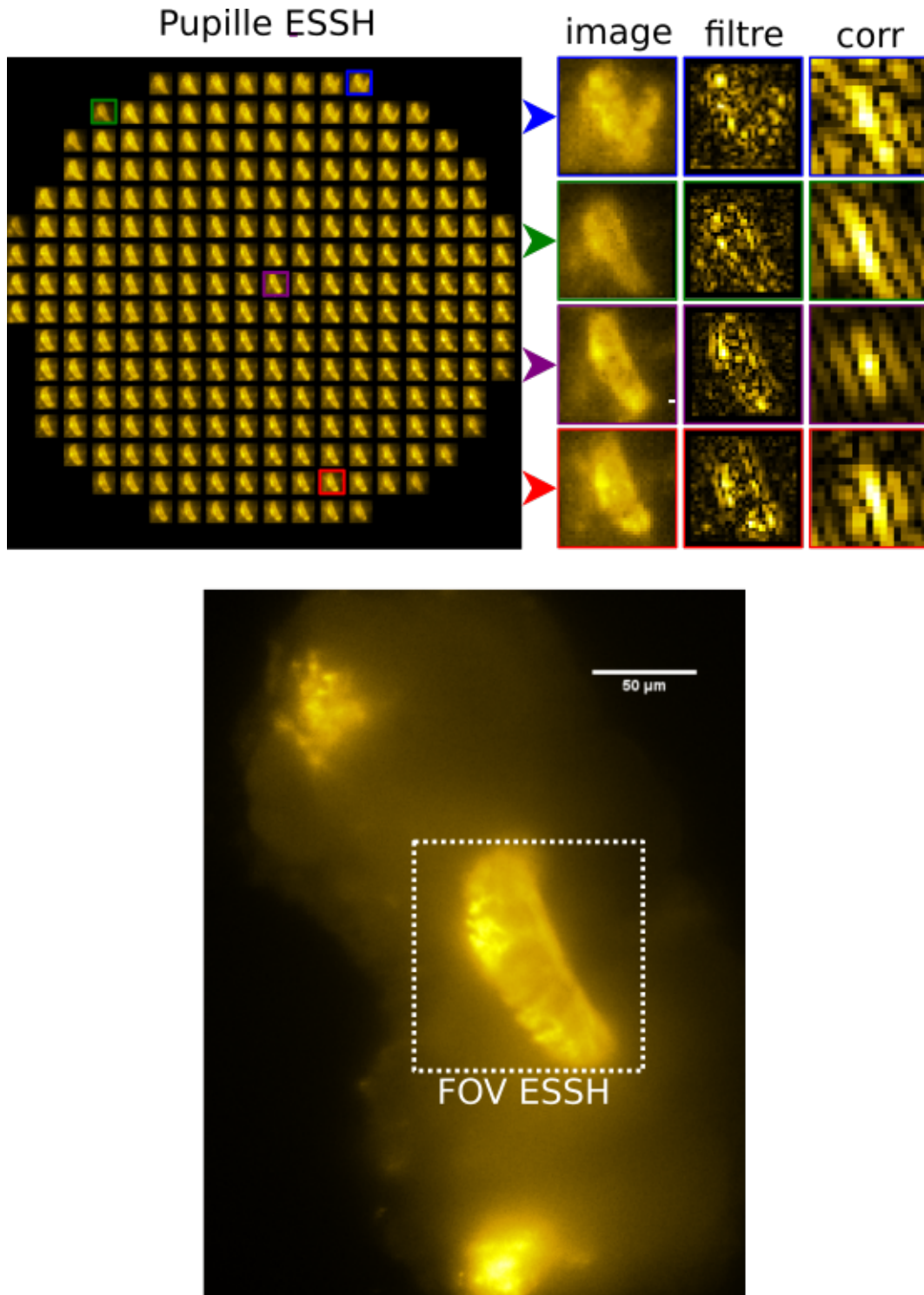


FIG. 4.16 (Haut) Image sur l'ESSH et zoom sur les imgettes encadrées, après filtrage puis la carte de corrélation. (Bas) Image plein champ acquise sur la caméra scientifique. Cerveau de *drosophila* fraîchement disséqué avec un double marquage GFP/mCherry, neurones du sommeil

La comparaison des images entourées en bleu, vert et rouge par rapport à celle en violet montre des déformations qui, après préfiltrage, peuvent induire des cartes de corrélations bruitées. Ce bruit dans les cartes de corrélation est responsable d'une imprécision de mesure du front d'onde. L'imgette bleue est ici tellement déformée que l'imgette filtrée ne ressemble à aucune autre.

Pour mieux comprendre ce phénomène nous allons nous appuyer sur la figure 4.17. La partie haute déjà vue au chapitre précédent représente l'image par la matrice de microlentilles de deux éléments superposés dont l'un est dans le plan focal objet (rond gris) et l'autre située en dessous (rond rouge). Il en résulte sur le capteur un rond gris placé dans le centre de chaque imagerie et un rond rouge qui se déplace en raison du défaut de mise au point. Celui-ci apparaît toujours net sur l'imagerie puisqu'il est dans la profondeur de champ des microlentilles égale à d . Cette variation de position du point rouge peut poser problème dans le cas notamment où il participe à la mesure du front d'onde.

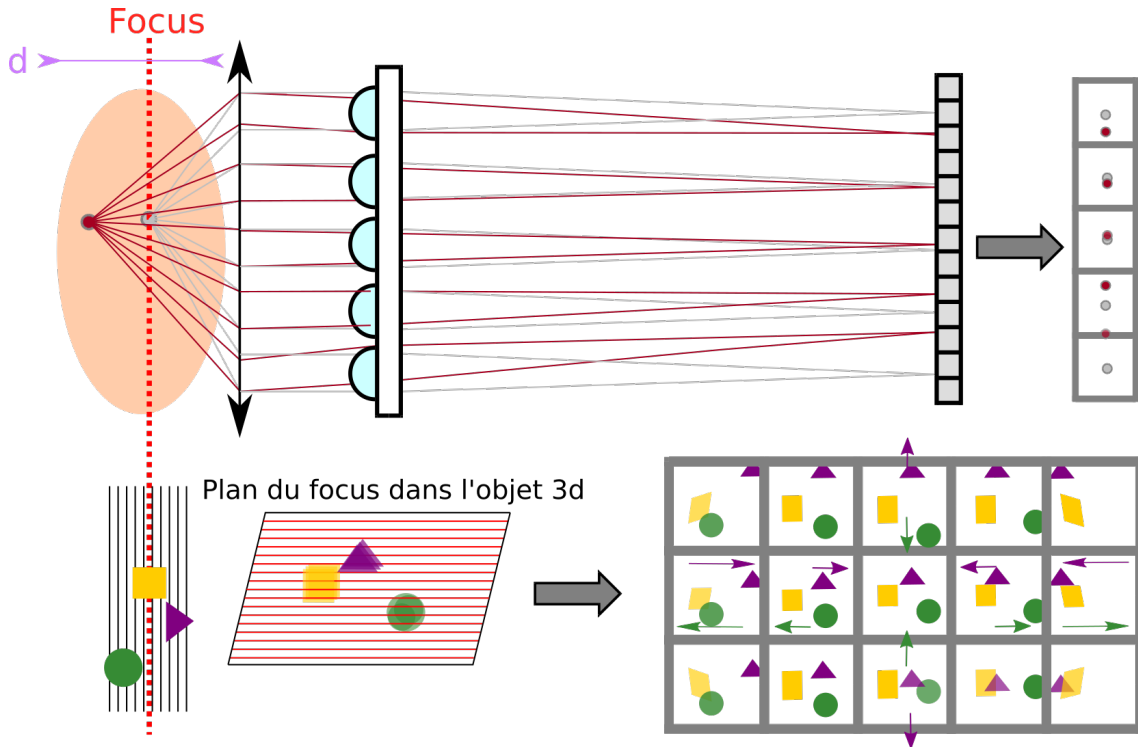


FIG. 4.17 Illustration de l'effet 3D de l'échantillon biologique sur la mesure du front d'onde

La partie basse de la figure 4.17 représente cette fois-ci un échantillon composé de trois éléments étendus latéralement et axialement. Tous ces objets sont vus nets sur l'analyseur. Néanmoins les images des objets situés dans les plans extrêmes (le rond vert et le triangle violet) subissent un effet de focus (et respectivement defocus) important. Ainsi, au centre de l'analyseur cette effet sera négligeable mais en s'écartant de celui-ci, une déformation va apparaître entre la partie haute et la partie basse. Ceci est d'autant plus vrai selon les diagonales où l'effet des deux axes se cumule pour aboutir à une déformation importante.

À cela s'ajoute la possibilité de recouvrement entre le signal d'intérêt et un signal hors focus. Ce qui apparaît d'ailleurs très clairement sur l'imagerie bleue de la figure 4.16 où un élément apparaît à droite qui n'est ni visible sur l'imagerie de référence ni sur l'image scientifique. La possibilité que le signal se superpose alors entre ces deux composantes peut aboutir à des erreurs de mesure. On voit d'ailleurs que les imageries autour de celle en bleu sont également concernées par l'apparition d'un élément hors du plan de mise au point. De la même manière, à gauche de la pupille un élément dans plusieurs imageries apparaît en bas à gauche.

Ceci peut avoir des conséquences importantes sur la mesure du front d'onde. En effet, la déformation subie par l'imagerie est susceptible d'induire un mauvais calcul de pente comme on le voit sur les cartes de corrélations de la figure 4.16 qui sont bruitées et contiennent des pics secondaires.

Il est nécessaire de limiter la pupille de l'ESSH, une grande pupille est utile pour mesurer avec plus de précision le front d'onde mais la déformation et le manque de signal sur les pupilles de bords sont susceptibles d'introduire des erreurs de mesure.

Par ailleurs, cet effet de l'épaisseur de la feuille est une difficulté pour la mesure de focus. En effet, certaines structures, et typiquement les terminaisons axonales que l'on voit représentées sur la figure 4.16 sont très épaisses (environ 40 μ m). La mesure de focus est donc une moyenne de toutes ces composantes et une variation faible de signal peut provoquer une variation brutale de la mesure.

Rapport signal sur fond et vitesse de boucle

Le rapport signal sur fond est un paramètre important pour la mesure et la correction du front d'onde et dépend du temps d'exposition et de la puissance du laser d'illumination.

La vitesse maximale logicielle de la boucle actuelle est de 10Hz. Cela correspond à un temps d'exposition sur l'analyseur de 100ms pour une image et, dans le cas de 3 images moyennées, à 33ms. Pour compenser un manque de signal il est possible d'augmenter la puissance du laser. Mais la puissance d'illumination ne doit ni échauffer l'échantillon, ni être phototoxique ni favoriser un photoblanchiment rapide du marquage mCherry.

Nous avons évalué la capacité de l'analyseur à mesurer en source étendue les aberrations dans des conditions d'illumination défavorables. Pour cela nous utilisons un double marquage GFP/mCherry et nous imageons, avec des temps d'exposition et des puissances d'illumination décroissantes, des neurones à 30 μ m de profondeur. Nous avons tracé sur la figure 4.18 la valeur RMS d'une partie des aberrations du troisième ordre en fonction du SBR en échelle logarithmique. Les mesures ont été effectuées avec un temps d'exposition maximum de 200ms pour 1mW et minimum de 20ms pour 300 μ W. Les saturations respectives sur l'analyseur étaient de 68% et 2%.

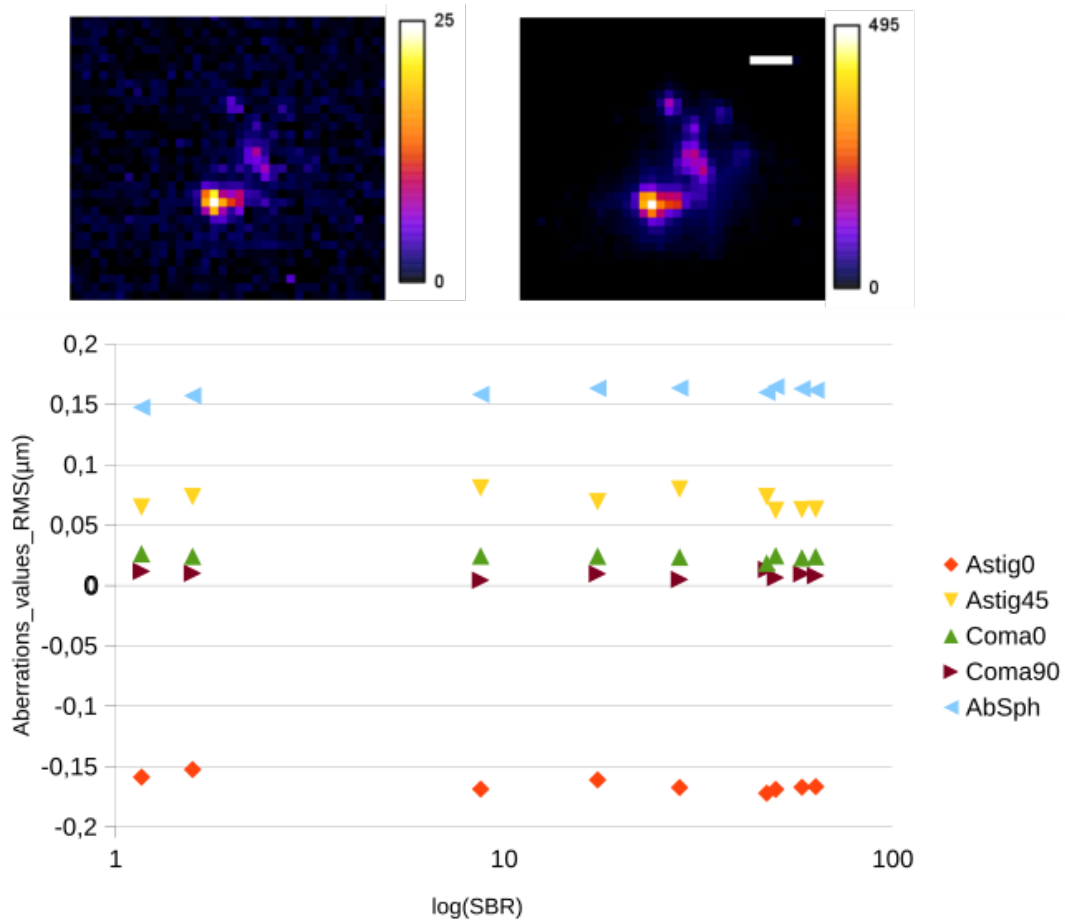


FIG. 4.18 (Haut) Imagettes en illumination défavorable (Bas) Graphique des valeurs des aberrations du troisième ordre en fonction du logarithme du SBR calculé sur l'image

Ce graphique montre que la mesure des aberrations (Astigmatisme, Coma et Aberration Sphérique) dans l'échantillon, pour des temps d'expositions variés est constante pour des SBR de 1.16 à 63 en valeur logarithmique. Ceci nous permet de déduire que la mesure est robuste même dans des conditions d'illumination faibles et que, dans le cadre de l'imagerie fonctionnelle, l'ajout d'optique adaptative en source étendue n'entraînera pas une augmentation du photoblanchiment ou de la phototoxicité dans l'échantillon. En définitive, nous sommes ici limités par le temps de calcul du front d'onde à 10Hz pour mesurer le front d'onde car, dans le cadre du marquage mCherry, nous avons pu atteindre une cadence d'acquisition à 50Hz pour 300 μ W d'illumination.

4.3.2 Paramètres de la boucle

Dans cette partie je vais discuter le problème du focus, et des paramètres de boucles tels que le gain et le nombre de modes.

Le focus

Comme discuté précédemment, le focus est difficile à quantifier si la feuille est épaisse à cause des effets 3d. L'analyseur peut faire une mesure de focus qui ne correspond pas à celui souhaité sur la caméra d'imagerie et induire des déplacements du focus au cours de la correction du front d'onde comme représenté figure 4.19.

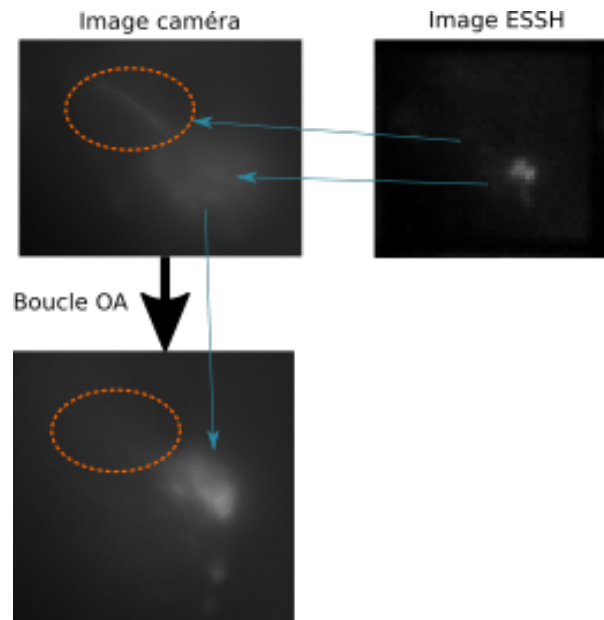


FIG. 4.19 Exemple de correction sur une zone non vue par l'ESSH

Sur cette figure, nous souhaitons corriger les aberrations sur la projection axonale vue par la caméra (ellipse en pointillés). L'ESSH accumule le signal majoritairement sur une zone qui n'est pas dans le plan de la caméra car celle-ci est brillante. Lors de la mesure la corrélation se fera sur une zone qui n'est pas dans le plan de la caméra car celle-ci est plus brillante. Lors de la correction le miroir convergera donc vers un autre plan. Il est donc nécessaire de filtrer ce déplacement de focus.

Dans un premier temps nous avons acquis des images en volume grâce au miroir avant et après correction afin de pouvoir comparer les mêmes plans malgré le defocus induit par la correction du front d'onde.

Dans un second temps nous avons défini une cible de focus mesurée dès le début de la boucle à ajouter à la cible préalablement enregistrée lors de la calibration. Cela permet à la boucle d'OA de converger vers une valeur de focus qui prend en considération un décalage initial.

Mais ces deux méthodes ne permettent pas de pallier les éventuelles variations de focus notamment lors d'une acquisition dynamique où le signal pourrait émerger d'une zone hors focus pour la caméra mais être captée par l'analyseur de front d'onde.

Le filtrage du focus au sens de Zernike pendant la correction n'est pas possible dans la configuration actuelle de la boucle mais des stratégies sont à l'étude, notamment en utilisant à la place de la base des modes de miroir celle des modes de Zernike.

Gain

Le gain de la boucle est un paramètre important pour la rapidité de la convergence. Nous avons effectué des boucles sur les cellules situées à $30\mu\text{m}$ de profondeur avec des paramètres de gain variables et effectué un suivi temporel du RMS du front d'onde (figure 4.20)

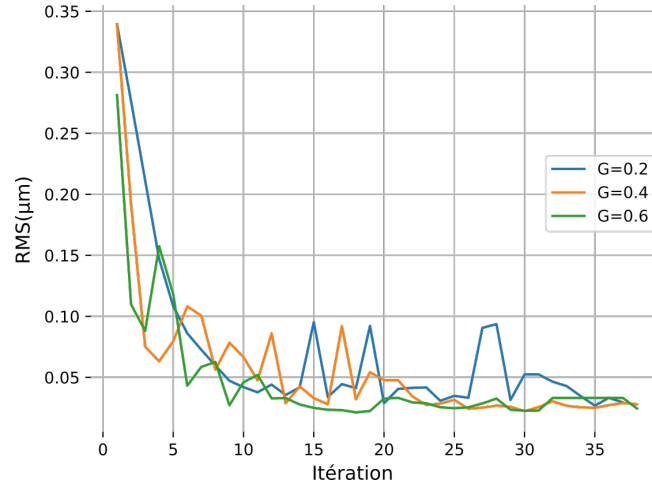


FIG. 4.20 Évolution du RMS à différentes gains pour une correction à 42 modes

Comme attendu, un gain plus fort permet d'atteindre une correction stable plus rapidement. Un paramètre de gain élevé favorise des grandes amplitudes de variations sur les toutes premières itérations comme on peut le voir sur le graphique. La correction optimale est atteinte après 5 à 10 itérations et nous n'avons jamais eu de problème de convergence de la boucle d'OA en restant à $G = 0.6$. En revanche pour des valeurs plus élevées, le gain en temps n'est pas significatif mais la boucle est plus instable. En effet, le gain modifie l'amplitude de la correction apportée et peut être responsable d'une divergence de la boucle en cas de perturbation de la mesure par exemple par une fluorescence hors focus. La mesure est alors bruitée et le gain étant fort, la correction sera mauvaise.

Modes de miroir

Le nombre de modes de miroir impliqués dans la correction en optique adaptative est un paramètre majeur pour la stabilité de la boucle. Plus il est élevé, plus les hautes fréquences sont susceptibles d'être corrigées. Toutefois, comme discuté auparavant, un nombre trop important de modes favorise la divergence de la boucle car les modes élevés sont plus susceptibles d'injecter du bruit.

La boucle d'OA que nous utilisons corrige les aberrations en termes de modes de miroir qui sont différents des modes de Zernike. Cette façon de corriger est généralement utilisée en optique adaptative car la base de modes du miroir est plus naturelle, et permet une correction plus rapide essentielle pour certaines applications qui le nécessitent. Certaines équipes de recherche en microscopie utilisent de l'OA basée sur la mesure directe du front d'onde en modes de Zernike quand le paramètre vitesse de correction est moins contraignant.

Dans cette étude nous avons corrigé les aberrations sur des projections à $70\mu\text{m}$ de profondeur en corrigeant 16 ou 36 modes de miroir. La figure 4.21 représente un

histogramme des valeurs absolues des aberrations en μm pour les 15 premiers modes de Zernike.

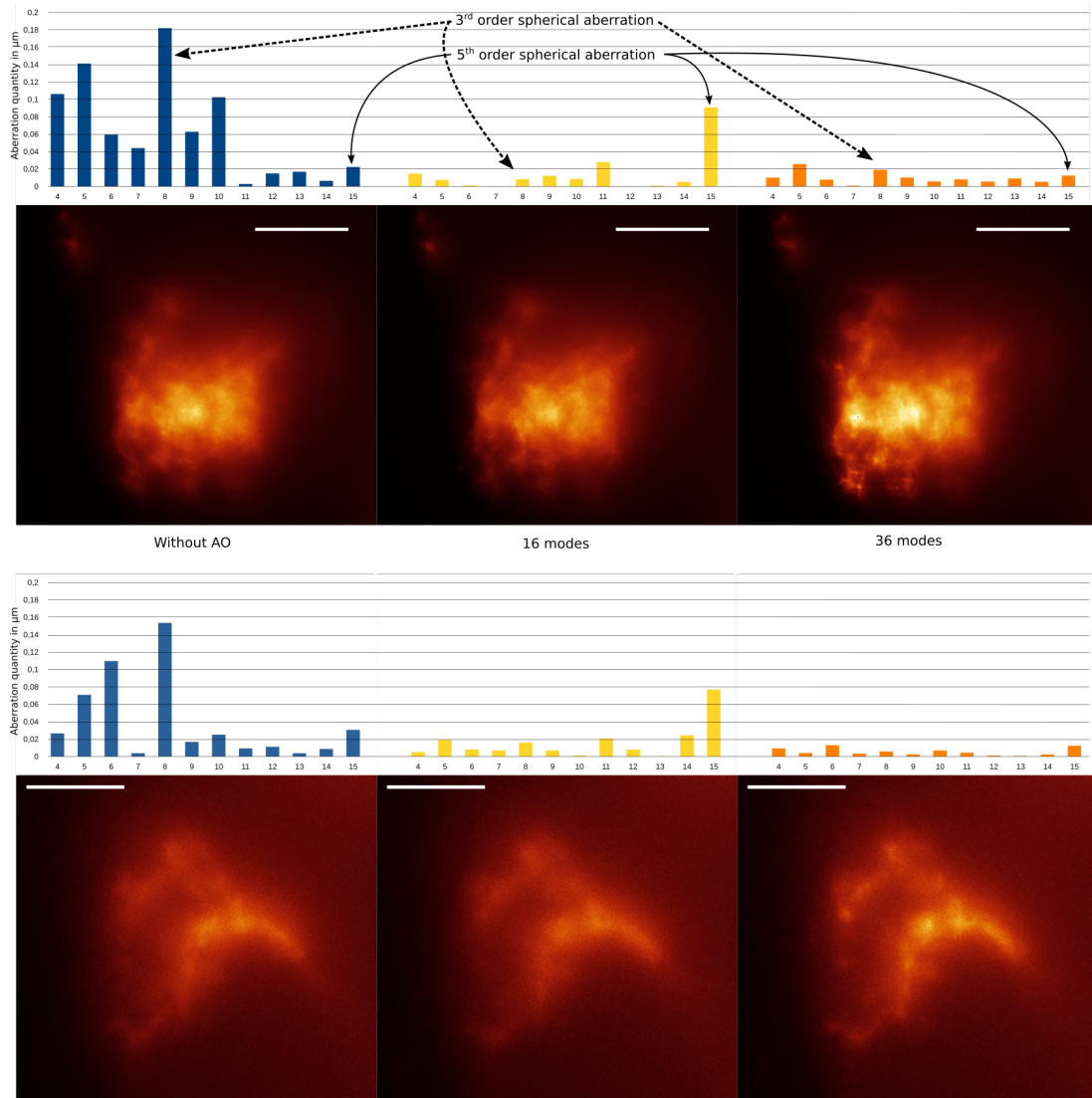


FIG. 4.21 Influence du nombre de modes de miroir utilisés dans la correction sur des projections à $70\mu\text{m}$ de profondeur, valeur absolue de la mesure en fonction du coefficient de Zernike, cerveau fraîchement disséqué, barre d'échelle $20\mu\text{m}$

La figure ci-dessus montre qu'une correction avec 16 modes de miroir corrige efficacement l'aberration sphérique du 3ème ordre (numéro 8), majoritaire au départ mais aussi les autres aberrations présentes au départ. En revanche, il apparaît une aberration sphérique du 5ème ordre qui n'était pas présente. Ceci est clairement dû à la correction basée sur les modes de miroir et non les modes de Zernike. La quantité d'aberration sphérique du 5ème ordre est néanmoins 2 fois inférieure à celle de l'aberration sphérique du 3ème ordre. Malgré cela le gain sur l'image n'est pas suffisant en terme de résolution et signal alors qu'à 36 modes la totalité des aberrations présentées sont corrigées et le gain sur l'image corrigée est visible.

D'après cette étude, une correction des aberrations avec un nombre trop faible de modes ne permet pas d'obtenir un gain significatif dans nos échantillons. De plus, comme la correction utilise les modes de miroir, il est nécessaire de corriger suffisamment de modes pour éviter l'apparition d'aberrations au sens de Zernike d'ordres

supérieurs.

Dans le futur, nous souhaitons utiliser les modes de Zernike pour générer la correction et la forme de miroir correspondant, et aussi, comparer les performances des corrections dans ces deux bases en microscopie.

L'isoplanétisme

Nous avons développé dans le chapitre précédent une discussion autour de l'isoplanétisme que nous avons essayé de caractériser avec des billes dans l'agarose. Lors de l'imagerie, la connaissance de la zone isoplanétique latérale de l'échantillon est nécessaire afin d'estimer quelle partie de l'image est concernée par une amélioration due à l'OA. En revanche, les zones éloignées hors de la zone isoplanétique doivent être examinées avec attention du fait d'une correction alors inadaptée. L'état de l'art sur la zone isoplanétique dans les échantillons vivants est limité mais quelques études ont montré qu'elle se situe entre 20 et 150 μm [32, 33, 34]. Pour corriger les aberrations sur des champs larges, les aberrations sont généralement évaluées par zone de 30 à 50 μm et l'image grand champ est ensuite reconstruite. Ceci est particulièrement adapté aux techniques à balayage.

Dans notre cas, lors de la mesure, nous moyennons le front d'onde sur le champ de vue de l'analyseur, de 130x130 μm^2 . Les zones que nous étudions étant situées dans chaque hémisphère du cerveau de la drosophile et la caméra d'imagerie visualisant un champ de 350x350 μm^2 nous pouvons évaluer l'influence d'une correction d'hémisphère sur l'autre. Le positionnement du cerveau doit permettre d'illuminer en feuille de lumière les deux zones dans le même temps. Celles-ci sont nécessairement dans le même plan, il est donc primordial de positionner le cerveau horizontalement. La figure 4.22 représente une correction de la zone de projections sur un cerveau possédant un double marquage.

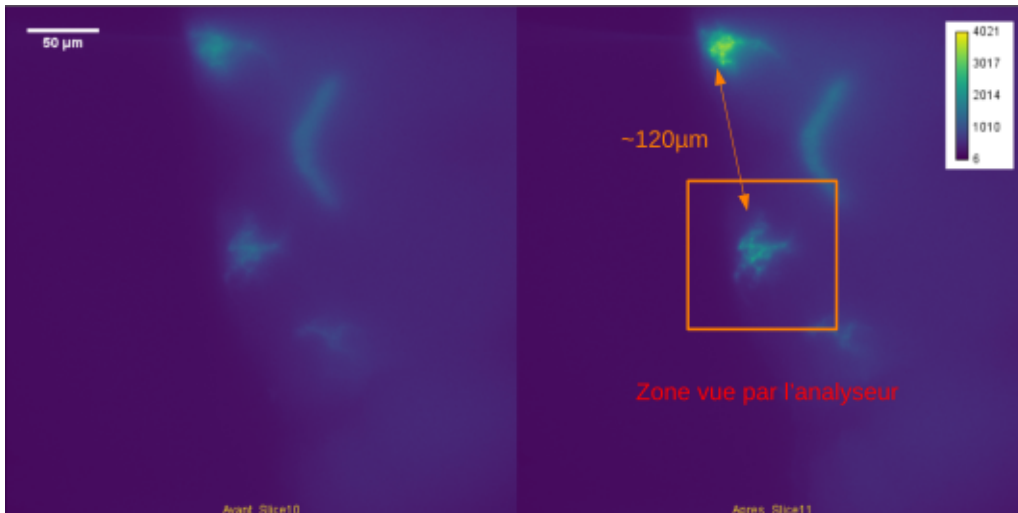


FIG. 4.22 Influence de la correction des projections à 70 μm sur l'ensemble du champ caméra

Visuellement sur cette image, nous voyons un gain significatif à plus de 120 μm au-delà du champ de correction du ESSH. Cette extension de la correction a été observée plusieurs fois et dans plusieurs images de ce manuscrit (figures 4.15, 4.9) et confirme

que la zone isoplanétique dans le cerveau *ex vivo* de la drosophile adulte est au moins égale à $120\mu\text{m}$.

L'analyseur en source étendue pourrait, en jouant sur la taille du champ de vue, corriger les aberrations sur un champ variable et ainsi adapter la correction à la taille de la zone isoplanétique.

La zone isoplanétique axiale doit également être étudiée car les variations de mesure dans l'épaisseur peuvent être suffisamment faibles pour qu'une forme de miroir puisse corriger selon un volume d'intérêt. L'aberration sphérique dépend de l'épaisseur de tissu traversé. Pour cela, des acquisitions volumétriques sont effectuées sur des cellules neuronales impliquées dans le cycle du sommeil à $30\mu\text{m}$ de profondeur en corrigeant dans un plan au centre de la cellule. La figure 4.23 représente la correction d'une cellule dans les plans XY et YZ.

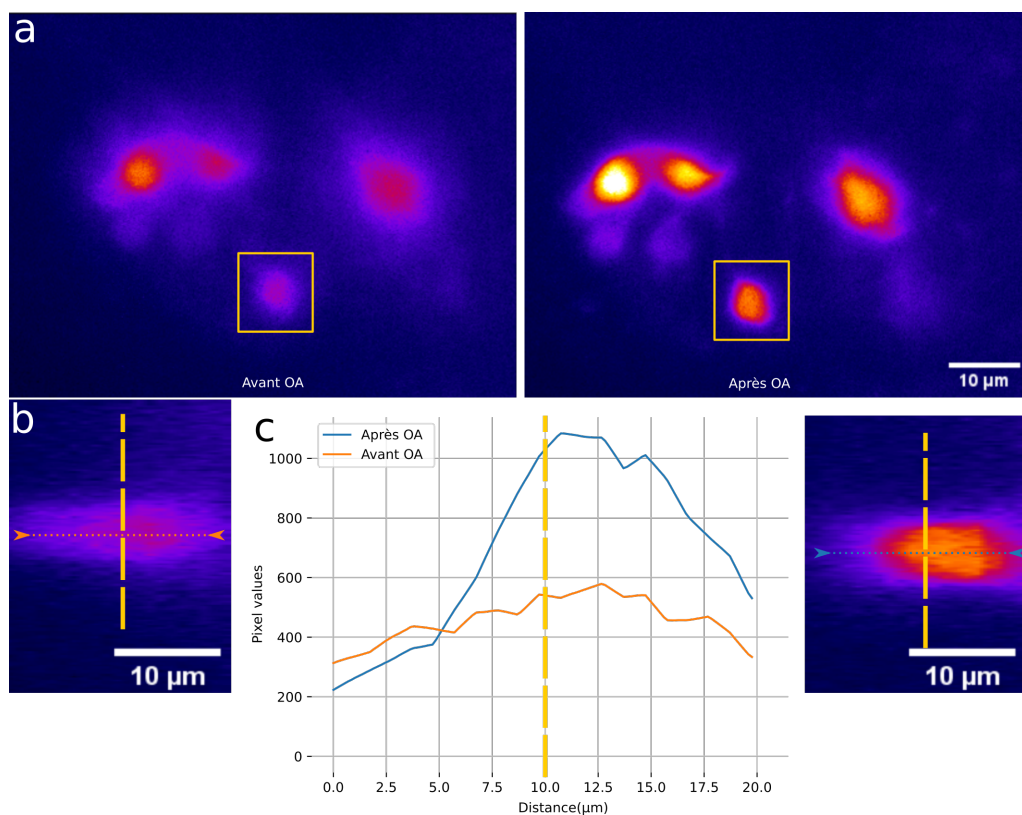


FIG. 4.23 (Haut) Cellules à $30\mu\text{m}$ de profondeur marquées en *jGCaMP7* avant et après correction, le cadre jaune délimite la cellule d'intérêt. (Bas) Plan YZ de la cellule d'intérêt avant et après correction et profils associés entre les flèches. Le trait jaune désigne le plan Z de correction avant balayage dans cet axe.

La figure 4.23(a) montre un gain important sur les cellules avant et après correction. Nous voyons que la correction dans le plan YZ (4.23(b)) améliore sur l'ensemble du profil de $20\mu\text{m}$ la distribution d'intensité de fluorescence (4.23(c)). Le signal est réhaussé sur les extrémités à $10\mu\text{m}$ de plus que le plan de correction. Ceci signifie que pour ce type d'échantillon, marqué en mCherry, une seule forme de miroir améliore la mesure sur une étendue axiale de $\pm 10\mu\text{m}$. À terme cela signifie pour l'imagerie *in vivo* en épaisseur que les corrections peuvent être effectuées à un échantillonnage moins important que celui de l'imagerie scientifique en appliquant une nouvelle correction,

par exemple, tous les 20 μm . Ceci induit sur l'épaisseur de la drosophile 10 formes de miroirs différentes qui peuvent être pré-enregistrées lors d'une acquisition préalable. Considérant dans les conditions les plus pessimistes qu'une boucle converge après 10 itérations avec un temps d'exposition de 100ms, ceci nécessite alors 10 secondes pour estimer et pré-corriger l'ensemble du cerveau. Dans les conditions courantes de nos expériences, ceci prend moins de 3 secondes. Cette vitesse est importante car on peut imaginer que pour des acquisitions sur le long terme, les aberrations peuvent évoluer, notamment dans le cas de l'imagerie du développement d'une larve, mais également si on considère les mouvements possibles etc. . Aussi, établir de manière rapide et précise les aberrations comme nous le faisons ici est crucial pour l'imagerie fonctionnelle.

Nous devons tout de même rappeler ici que la feuille de lumière est d'une épaisseur de 5 μm dans la fluorescéine mais de 15 à 20 μm dans l'échantillon. En conséquence, le front d'onde que nous mesurons est évalué sur une épaisseur proche de la zone balayée en figure 4.23. La correction est donc moyennée sur 20 μm . Des mesures complémentaires réalisées avec une feuille plus fine sont donc nécessaire afin de quantifier si une mesure sur une épaisseur plus fine apporterait un gain plus élevé.

4.3.3 Discussion

Les différents points abordés dans cette section nous ont permis d'évaluer comment optimiser la boucle pour réaliser de l'imagerie fonctionnelle chez la drosophile. Nous avons pu établir un protocole pour maintenir le focus, nous avons également déterminé les zones isoplanétiques de l'échantillon éclairé avec notre microscope à feuille de lumière et enfin nous avons établi les conditions d'illumination nécessaires pour permettre une mesure de front d'onde en source étendue robuste.

À titre de comparaison, nous souhaitons réaliser une correction de front d'onde avec une approche d'OA en mesure indirecte. Nous pourrions utiliser le même double marquage et deux caméras d'imagerie et ainsi faire un comparatif quantitatif sur le gain et le temps nécessaire pour atteindre la correction optimale.

4.4 Apport de l'optique adaptative dans le cadre d'un marquage fonctionnel

Dans cette section nous allons présenter les résultats issus de corrections de front d'onde sur des cerveaux de drosophile fraîchement disséqués marqués avec GCaMP/m-Cherry. Bien que le marquage nécessaire pour l'optique adaptative soit le même, quantifier le gain sur une image acquise avec GCaMP n'est pas garanti car le niveau de fluorescence est bien plus faible que GFP.

4.4.1 Matériels et méthodes

Nous avons effectué des expériences avec deux types de GCaMP, la GCaMP6s et la jGCaMP7. Nous avons débuté avec la première car les souches de mouches étaient disponibles mais le signal de base en fluorescence est faible et nous avons donc essayé

par la suite de travailler avec jGCaMP7 censée être plus brillante mais encore peu utilisée par nos partenaires à NeuroPSI.

Les expériences ont été menées sur deux types de mouches, un marquage avec les neurones du sommeil et un marquage avec les neurones d'horloge. Nous avons utilisé un marquage différent de celui utilisé précédemment en GFP car la lignée était déjà disponible. En effet, les neurones d'horloges sont davantage étudiés que ceux du sommeil quand il s'agit d'imagerie fonctionnelle. De plus, les neurones du sommeil sont moins sensibles à l'activation.

Nous avons utilisé la GCaMP à la fois pour son émission de fluorescence de base et mais également pour l'activation des canaux calciques en injectant une solution de chlorure de potassium. Les neurones du sommeil ne sont pas toujours réceptifs à cette activation c'est pourquoi nous avons également fait des essais sur les neurones d'horloge.

4.4.2 Résultats sur les neurones d'horloge

Le marquage des neurones d'horloge est beaucoup plus dense que celui des neurones du sommeil comme on peut le voir sur la figure 4.24 où ont été combinés les signaux issus de GCaMP et ceux de mCherry dans leurs couleurs respectives.

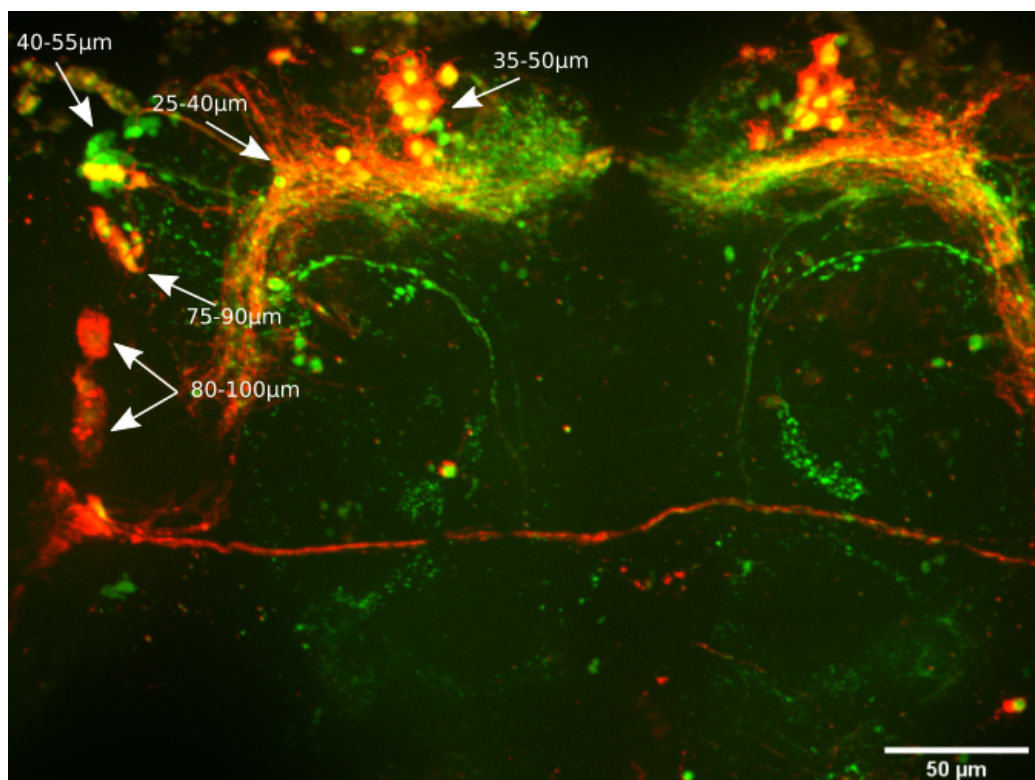


FIG. 4.24 *Projection d'une acquisition sur un cerveau clarifié doublement marqué en GCaMP6s et mCherry pour les neurones d'horloge. (Acquis à Neuro-PSI par G. FARKOUH)*

Les structures impliquées dans ce comportement sont nombreuses et à des profondeurs très variables. Nous avons utilisé l'OA en source étendue afin de corriger le front d'onde mesuré sur des neurones d'horloges activés. Les comparaisons entre les images avant et après correction sont présentées figure 4.25.

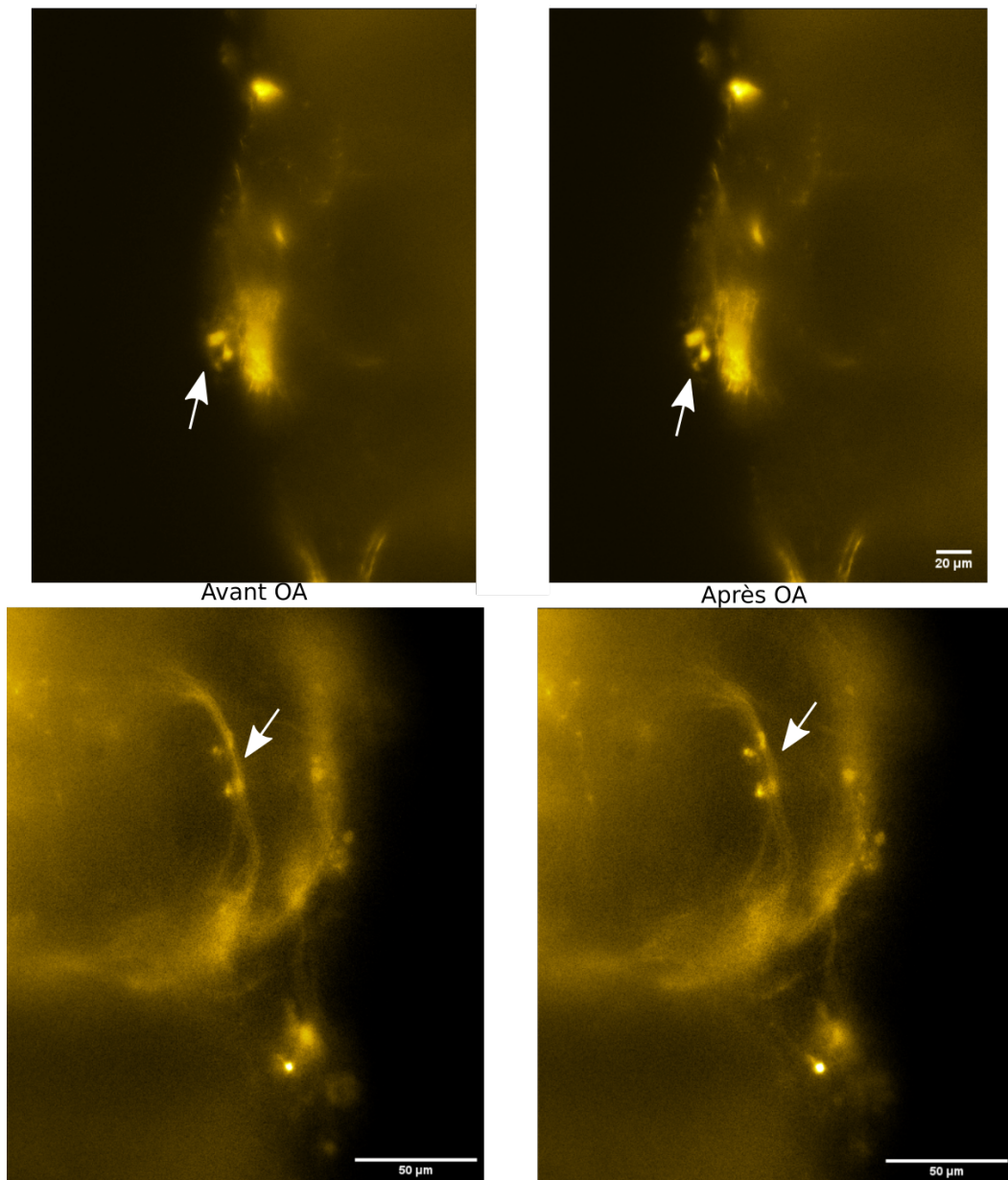


FIG. 4.25

Le gain visuel apporté par l'OA est présent mais moins important que dans les expériences réalisées avec GFP. Nous avons supposé que cela est lié à la forte densité du marquage avec des structures d'intérêt dans des zones différentes et à des profondeurs différentes. L'analyseur voit un champ de $130 \times 130 \mu\text{m}^2$ sur une épaisseur de feuille d'environ 15 à $20 \mu\text{m}$ donc le front d'onde mesuré est moyenné sur un volume important. Ceci peut conduire à une correction pour tout qui n'est pas optimale plus localement et n'apporte donc pas un gain très important.

4.4.3 Résultats sur les neurones du sommeil

Une nouvelle lignée marquée en GCaMP6s/mCherry a été réalisée sur les neurones du sommeil. Dans cette expérience, les neurones sont activés avec une solution de chlorure de potassium à 30mM et la zone de correction est située sur les projections.

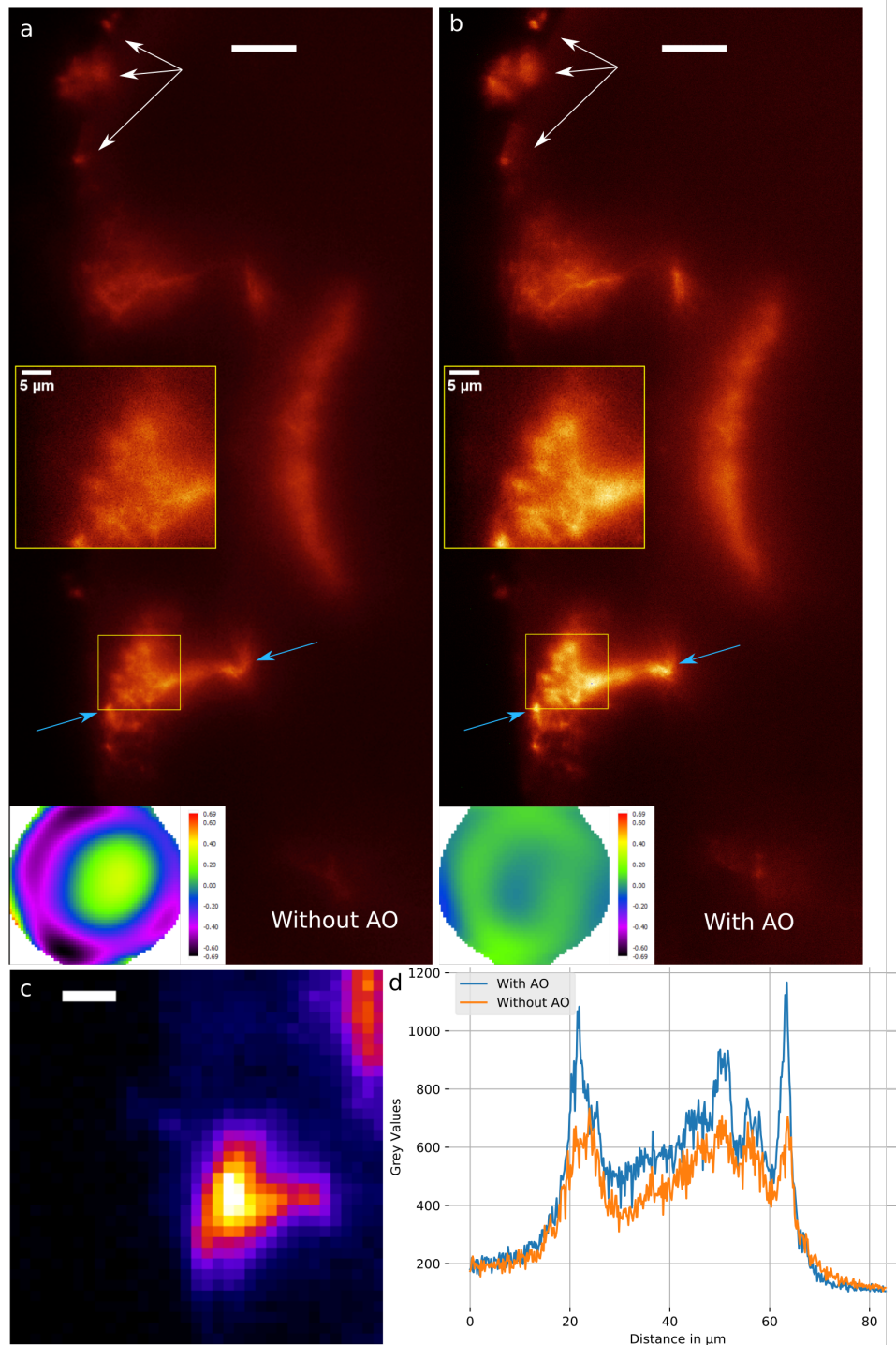


FIG. 4.26 (Haut) Correction sur une zone d'arborisation à $70\mu\text{m}$ de profondeur et front d'onde associé. (Bas) Imagerie de référence sur l'ESSH et profils. Barre d'échelle $20\mu\text{m}$

Nous retrouvons ici un gain significatif confirmé par les profils (d), cohérent avec les gains obtenus avec GFP, c'est-à-dire un contraste augmenté de 70% sur les zones les plus brillantes (profil (d) entre 60 et $65\mu\text{m}$). Sur le profil (d) entre 70 et $80\mu\text{m}$ la courbe bleue (après OA) est en-dessous de la courbe orange (avant OA), ce qui signifie une augmentation du rapport signal sur fond. Par ailleurs, l'imagerie de référence (c) représente le champ où sont mesurées les aberrations et l'image scientifique (b) montre un gain à une distance d'environ $200\mu\text{m}$ du centre du champ d'une imagerie. Ceci montre, une fois de plus que la zone isoplanétique dans le cerveau

de la drosophile est supérieure à $130\mu\text{m}$ et offre la possibilité de corriger de grands champs avec une seule forme de miroir.

Les résultats de la figure 4.27 sur les corps cellulaires ont déjà été présentés dans le paragraphe 4.3.2 sur la zone isoplanétique axiale. Les expériences ont été menées avec jGCaMP7b pour obtenir un signal de fluorescence plus important qu'en GCaMP6s. Il n'y a ici aucune activation et l'image enregistre l'émission de fluorescence spontanée de GCaMP. Le temps d'exposition étant égal à 100ms, l'activité spontanée des neurones n'est pas résolue.

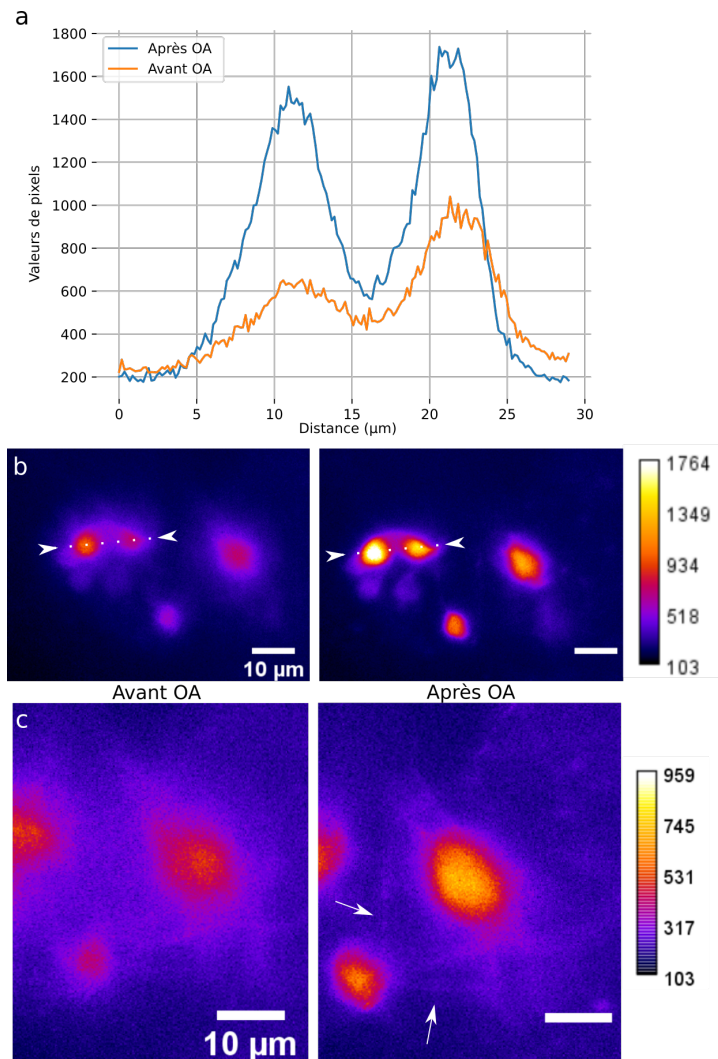


FIG. 4.27 Cellules à $30\mu\text{m}$ de profondeurs marquées en jGCaMP7b sans/avec boucle d'OA en mCherry. (Haut) Profil effectué avant après entre les flèches blanches sur l'image du milieu (Milieu) Image avant/après correction et échelle de couleur associée (Bas) Zoom et saturation de la partie droite de l'image. Barre d'échelle $10\mu\text{m}$

Le profil (a) tracé sur les deux cellules les plus à gauche en (b) montre un gain en résolution et en contraste qui facilite la discrétisation des cellules. Nous voyons également que les cellules situées en-dessous dans des plans hors du plan de mise au point sont mieux résolues. Le gain en résolution est essentiel pour segmenter en 3d en cas d'acquisition volumétrique. Enfin, la dernière image (c) montre après saturation de l'échelle de couleurs qu'il est possible de résoudre des structures fines

après correction. Ces structures sont des projections entre les neurones et intéressent particulièrement nos collaborateurs biologistes.

4.4.4 Discussion

Nous avons montré que l'optique adaptative en source étendue apporte également un gain significatif pour l'imagerie d'un marquage fonctionnel même dans des conditions de sectionnement optique modéré. Ces résultats préliminaires sont très encourageants pour passer à plus grande échelle, en d'autres termes, réaliser des acquisitions à haute cadence et en volume, pour des expériences de routine en biologie.

Nous n'avons pas encore réussi à mettre en évidence des résultats suffisants lors de l'activation de GCaMP. L'objectif des mesures en activation était de pouvoir améliorer à grande profondeur et, après correction, faire apparaître distinctement les neurones marqués. Malheureusement les neurones du sommeil sont peu sensibles à l'activation et les neurones d'horloge ont un signal très dense qui ne nous a pas permis de faire des mesures du front d'onde apportant une correction suffisante sur les zones profondes. Nous avons remarqué toutefois, que lors de l'activation par l'ajout d'une solution saline dans la cuve, l'indice de réfraction est changé et cela induit une variation de la mise au point. La mesure des aberrations permettrait de corriger en direct le focus et de le maintenir. Cette variation est transitoire, le temps que la solution devienne homogène dans l'ensemble de la cuve : le focus revient généralement à une valeur proche de sa valeur de départ. Nous espérons donc pouvoir, pour ces expériences d'activation, maintenir le focus et apporter un gain permettant de résoudre des structures en profondeur.

Les expériences sur les neurones d'horloge méritent d'être poursuivies dans des conditions plus favorables avec un meilleur sectionnement optique ou bien un champ adapté et modulable. Ceci nécessite un microscope à feuille de lumière plus performant et/ou une adaptation du logiciel pour modifier en direct le champ vue par l'ESSH à l'aide d'une découpe numérique.

Le travail sur jGCaMP7b a montré une augmentation significative du signal malgré une intensité de fluorescence "naturelle" de la GCaMP plus faible que la GFP. Ce gain est très important en biologie puisque la plupart des études sont menées sans activation par KCl. La possibilité de discrétiser les cellules et les projections est essentielle et nous souhaitons continuer ce développement avec une lignée jGCaMP7b sur les neurones d'horloge pour réaliser un suivi de l'émission de GCaMP et enregistrer ses variations représentatives d'une activité neuronale.

4.5 Conclusion et perspectives

Nous avons démontré dans ce chapitre que l'OA en source étendue apporte un gain significatif en signal et en résolution spatiale du cerveau de drosophile adulte fraîchement disséqué sur un microscope à feuille de lumière. Le marquage bicouleur permet d'optimiser le budget photons et de pouvoir en permanence maintenir la correction avec la boucle d'optique adaptative tout au long de l'expérience même en l'absence de signal sur la caméra scientifique. Grâce à une étude détaillée de la boucle et de la mesure nous avons mis en évidence les paramètres clés pour aboutir

à une correction optimale avec un marquage structurel ou fonctionnel, que ce soit en terme de rapidité de convergence ou du nombre de modes corrigés. L'étude de la zone isoplanétique a également montré des résultats encourageants sur l'optimisation du champ de vue à prendre en considération à la fois latéralement mais aussi axialement chez la drosophile.

Ces résultats préliminaires mais prometteurs ont été acquis durant les derniers mois de ma thèse. Les expériences à venir chez la drosophile se feront grâce à un prototype dorénavant installé chez nos partenaires à Neuro-PSI, visible en figure 4.15. J'aurai l'occasion de faire des expériences de routine en biologie avec nos partenaires et un stagiaire au cours des semaines à venir.

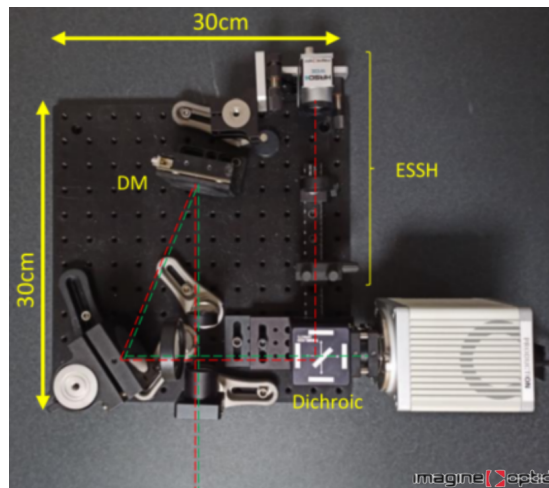


FIG. 4.28 Prototype de module d'OA en source étendue développé par Imagine Optic actuellement en utilisation à NeuroPSI

Les études menées sur la mesure de focus, et l'effet 3d dans les imagerie de front d'onde en source étendue permettront des développements futurs, par exemple en utilisant la caméra de l'ESSH comme pour une acquisition plénoptique. Une étude a été menée sur la drosophile à l'aide d'un microscope plénoptique et, malgré la perte de résolution, le signal 3d est acquis avec une seule image ce qui permettrait de discriminer les zones d'intérêt dans les imagerie de manière rapide [35].

Des premières études ont été effectuées sur le poisson-zèbre mais le sectionnement optique était insuffisant pour aboutir à une mesure suffisamment fine des aberrations et amener un gain exploitable en biologie. Nous continuons actuellement d'y travailler avec une nouvelle collaboration avec le groupe de G. SUMBRE initiée lors de ma deuxième année.

Un nouveau microscope LSFM couplé à l'OA en source étendue est en cours de construction par M. MERCIER qui réduira l'épaisseur de la feuille à quelques centaines de nanomètres, pour atteindre au maximum dans l'échantillon 1 à 2 μ m. Ceci permettra une meilleure précision de la mesure du front d'onde et d'apporter un gain dans des échantillons plus denses. Pour cela, un objectif d'excitation plus ouvert et à immersion est utilisé. Ceci requiert également beaucoup de travail supplémentaire sur la cuve pour optimiser la géométrie du système et les volumes des échantillons en jeu.

Bibliographie

- [1] Ann-Shyn Chiang, Chih-Yung Lin, Chao-Chun Chuang, Hsiu-Ming Chang, Chang-Huain Hsieh, Chang-Wei Yeh, Chi-Tin Shih, Jian-Jheng Wu, Guo-Tzau Wang, Yung-Chang Chen, et al. Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in drosophila at single-cell resolution. *Current biology*, 21(1) :1–11, 2011.
- [2] Valérie Goguel, Anne-Laure Belair, Derya Ayaz, Aurélie Lampin-Saint-Amaux, Niki Scaplehorn, Bassem A Hassan, and Thomas Preat. Drosophila amyloid precursor protein-like is required for long-term memory. *Journal of Neuroscience*, 31(3) :1032–1037, 2011.
- [3] Chi-Tin Shih, Olaf Sporns, Shou-Li Yuan, Ta-Shun Su, Yen-Jen Lin, Chao-Chun Chuang, Ting-Yuan Wang, Chung-Chuang Lo, Ralph J Greenspan, and Ann-Shyn Chiang. Connectomics-based analysis of information flow in the drosophila brain. *Current Biology*, 25(10) :1249–1258, 2015.
- [4] Christine Dubowy and Amita Sehgal. Circadian Rhythms and Sleep in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 205(4) :1373–1397, April 2017.
- [5] André Klarsfeld, Marie Picot, Carine Vias, Elisabeth Chélot, and François Rouyer. Identifying specific light inputs for each subgroup of brain clock neurons in drosophila larvae. *Journal of Neuroscience*, 31(48) :17406–17415, 2011.
- [6] Alexandra Saint-Charles, Christine Michard-Vanhée, Faredin Alejevski, Elisabeth Chélot, Antoine Boivin, and François Rouyer. Four of the six drosophila rhodopsin-expressing photoreceptors can mediate circadian entrainment in low light. *Journal of Comparative Neurology*, 524(14) :2828–2844, 2016.
- [7] Mark D Adams, Susan E Celniker, Robert A Holt, Cheryl A Evans, Jeannine D Gocayne, Peter G Amanatides, Steven E Scherer, Peter W Li, Roger A Hoskins, Richard F Galle, et al. The genome sequence of drosophila melanogaster. *Science*, 287(5461) :2185–2195, 2000.
- [8] Joseph B Duffy. Gal4 system in drosophila : a fly geneticist's swiss army knife. *genesis*, 34(1-2) :1–15, 2002.
- [9] Jean Livet, Tamily A Weissman, Hyuno Kang, Ryan W Draft, Ju Lu, Robyn A Bennis, Joshua R Sanes, and Jeff W Lichtman. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166) :56–62, 2007.
- [10] Stefanie Hampel, Phuong Chung, Claire E McKellar, Donald Hall, Loren L Looger, and Julie H Simpson. Drosophila brainbow : a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nature methods*, 8(3) :253–259, 2011.
- [11] Junichi Nakai, Masamichi Ohkura, and Keiji Imoto. A high signal-to-noise ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature biotechnology*, 19(2) :137–141, 2001.

- [12] Tsai-Wen Chen, Trevor J Wardill, Yi Sun, Stefan R Pulver, Sabine L Renninger, Amy Baohan, Eric R Schreiter, Rex A Kerr, Michael B Orger, Vivek Jayaraman, et al. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature*, 499(7458) :295–300, 2013.
- [13] Hod Dana, Yi Sun, Boaz Mohar, Brad K Hulse, Aaron M Kerlin, Jeremy P Hasseman, Getahun Tsegaye, Arthur Tsang, Allan Wong, Ronak Patel, et al. High-performance calcium sensors for imaging activity in neuronal populations and microcompartments. *Nature methods*, 16(7) :649–657, 2019.
- [14] Raghav K Chhetri and Philipp J Keller. Functional imaging with light-sheet microscopy. *Handbook of Neurophotonics*, page 21, 2020.
- [15] Johannes D Seelig, M Eugenia Chiappe, Gus K Lott, Anirban Dutta, Jason E Osborne, Michael B Reiser, and Vivek Jayaraman. Two-photon calcium imaging from head-fixed drosophila during optomotor walking behavior. *Nature methods*, 7(7) :535–540, 2010.
- [16] Mélanie Pedrazzani, Vincent Loriette, Paul Tchenio, Sakina Benrezzak, Daniele Nutarelli, and Alexandra Fragola. Sensorless adaptive optics implementation in widefield optical sectioning microscopy inside in vivo drosophila brain. *Journal of biomedical optics*, 21(3) :036006, 2016.
- [17] Fritjof Helmchen and Winfried Denk. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature methods*, 2(12) :932–940, 2005.
- [18] Mantas Žurauskas, Oliver Barnstedt, Maria Frade-Rodriguez, Scott Waddell, and Martin J. Booth. Rapid adaptive remote focusing microscope for sensing of volumetric neural activity. *Biomedical Optics Express*, 8(10) :4369, October 2017.
- [19] Felipe Delestro, Lisa Scheunemann, Mélanie Pedrazzani, Paul Tchenio, Thomas Preat, and Auguste Genovesio. In vivo large-scale analysis of Drosophila neuronal calcium traces by automated tracking of single somata. *Scientific Reports*, 10(1) :7153, December 2020.
- [20] Terrence F Holekamp, Diwakar Turaga, and Timothy E Holy. Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy. *Neuron*, 57(5) :661–672, 2008.
- [21] Xitong Liang, Timothy E Holy, and Paul H Taghert. Synchronous drosophila circadian pacemakers display nonsynchronous ca^{2+} rhythms in vivo. *Science*, 351(6276) :976–981, 2016.
- [22] Xitong Liang, Timothy E Holy, and Paul H Taghert. A series of suppressive signals within the drosophila circadian neural circuit generates sequential daily outputs. *Neuron*, 94(6) :1173–1189, 2017.
- [23] Douglas S Richardson and Jeff W Lichtman. Clarifying tissue clearing. *Cell*, 162(2) :246–257, 2015.
- [24] Sandrine Heusser and Henri-Gabriel Dupuy. *Atlas de biologie animale*. Dunod, 2015.

- [25] Greg J Beitel and Mark A Krasnow. Genetic control of epithelial tube size in the drosophila tracheal system. *Development*, 127(15) :3271–3282, 2000.
- [26] Kuo-Jen Hsu, Yen-Yin Lin, Ann-Shyn Chiang, and Shi-Wei Chu. Optical properties of adult drosophila brains in one-, two-, and three-photon microscopy. *Biomedical optics express*, 10(4) :1627–1637, 2019.
- [27] Prashanth R Rao, Li Lin, Hai Huang, Arjun Guha, Sougata Roy, and Thomas B Kornberg. Developmental compartments in the larval trachea of drosophila. *Elife*, 4 :e08666, 2015.
- [28] Werner Spalteholz. *Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang : Über Knochenfärbung*. S. Hirzel, 1914.
- [29] Ann-Shyn Chiang, Wei-Yong Lin, Hsin-Ping Liu, Maciej A Pszczolkowski, Tsai-Feng Fu, Shu-Ling Chiu, and Glenn L Holbrook. Insect nmda receptors mediate juvenile hormone biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1) :37–42, 2002.
- [30] Nicolas Renier, Zhuhao Wu, David J Simon, Jing Yang, Pablo Ariel, and Marc Tessier-Lavigne. idisco : a simple, rapid method to immunolabel large tissue samples for volume imaging. *Cell*, 159(4) :896–910, 2014.
- [31] Etsuo A Susaki, Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Fumiaki Kishino, Takehiro Tawara, Tomonobu M Watanabe, Chihiro Yokoyama, Hirotaka Onoe, Megumi Eguchi, Shun Yamaguchi, et al. Whole-brain imaging with single-cell resolution using chemical cocktails and computational analysis. *Cell*, 157(3) :726–739, 2014.
- [32] Tsung-Li Liu, Srigokul Upadhyayula, Daniel E. Milkie, Ved Singh, Kai Wang, Ian A. Swinburne, Kishore R. Mosaliganti, Zach M. Collins, Tom W. Hiscock, Jamien Shea, Abraham Q. Kohrman, Taylor N. Medwig, Daphne Dambournet, Ryan Forster, Brian Cunniff, Yuan Ruan, Hanako Yashiro, Steffen Scholpp, Elliot M. Meyerowitz, Dirk Hockemeyer, David G. Drubin, Benjamin L. Martin, David Q. Matus, Minoru Koyama, Sean G. Megason, Tom Kirchhausen, and Eric Betzig. Observing the cell in its native state : Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science*, 360(6386) :eaaq1392, April 2018. Citation Key Alias : liu_observing_2018-2.
- [33] Jung-Hoon Park, Lingjie Kong, Yifeng Zhou, and Meng Cui. Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics. *Nature methods*, 14(6) :581–583, 2017.
- [34] Jun Zeng, Pierre Mahou, Marie-Claire Schanne-Klein, Emmanuel Beaurepaire, and Delphine Débarre. 3d resolved mapping of optical aberrations in thick tissues. *Biomedical optics express*, 3(8) :1898–1913, 2012.
- [35] Sophie Aimon, Takeo Katsuki, Tongqiu Jia, Logan Grosenick, Michael Broxton, Karl Deisseroth, Terrence J Sejnowski, and Ralph J Greenspan. Fast near-whole-brain imaging in adult drosophila during responses to stimuli and behavior. *PLoS biology*, 17(2) :e2006732, 2019.

Conclusion générale

Conclusion

Ces trois années de thèse ont permis, à partir d'une idée originale et d'une collaboration entre des équipes de recherche académique et une entreprise, de développer un instrument original jusqu'alors jamais utilisé en microscopie, de le combiner à un microscope monté au laboratoire et enfin de réaliser un prototype désormais installé chez nos partenaires biologistes. Mon travail s'est situé à l'interface entre ces différentes équipes afin de développer un outil qui réponde aux besoins des neurobiologistes. Cette thèse s'est déroulée en trois temps que je vais énumérer dans cette conclusion.

Une première partie de ce travail a permis, au sein d'Imagine Optic, de dimensionner un analyseur de front d'onde de Shack-Hartmann en source étendue et de développer des algorithmes dédiés. Cet analyseur jusqu'alors jamais dimensionné pour la microscopie optique a nécessité une étude du travail déjà réalisé en astronomie et de nombreuses simulations. Nous avons pu aboutir à la production de cet analyseur et réaliser des premières caractérisations en parallèle des simulations, puis de mettre en évidence une très bonne précision de mesure à $\lambda/50$ et une bonne sensibilité en particulier pour les échantillons biologiques qui nous intéressent. Ceci a nécessité un travail sur les algorithmes issus de l'état de l'art en astronomie et des adaptations pour nos échantillons biologiques comme par exemple l'utilisation d'un préfiltrage des imagerie acquises par l'analyseur. Ce premier développement a permis la publication d'un article dans *Optics Letters* en annexe.

Dans un second temps j'ai développé un microscope à feuille de lumière au LPEM pour le coupler à une boucle d'OA basée sur ce nouvel analyseur. Ce montage a permis de caractériser les performances de cette nouvelle approche d'OA en épifluorescence puis en feuille de lumière sur des échantillons tests de billes puis sur des échantillons vivants (cellules, cerveaux de drosophiles). Pendant cette période nous avons travaillé sur différents protocoles de marquages des drosophiles, avec une puis deux couleurs, ce qui a nécessité des adaptations de l'instrument. Cette nouvelle approche bicouleur a permis de réaliser des expériences d'imagerie fonctionnelle dans un cerveau activé par une solution de chlorure de potassium mais également dans des cerveaux exprimant la GCaMP standard dont l'intensité de fluorescence est bien plus faible que celle de GFP. Ce dernier point est important pour les biologistes qui utilisent GCaMP généralement dans des conditions où les variations de fluorescence liées à l'activité sont très faibles. Nos expériences ont montré un gain significatif en contraste et résolution pour ce type d'imagerie et nous sommes actuellement en cours de rédaction d'un nouvel article sur ces résultats.

Dans le même temps, lors de ma deuxième année, j'ai initié une collaboration avec une équipe de l'IBENS pour débiter l'imagerie du poisson-zèbre dont les premiers résultats prometteurs demandent une investigation plus poussée, soit sur le type de marquage, soit sur l'efficacité du sectionnement optique.

Enfin, un prototype basé sur les expériences menées au cours de cette thèse a été développé à Imagine Optic et est installé actuellement à Neuro-PSI. Il est interfacé par un logiciel de pilotage de la boucle d'OA en Python dont j'ai initié le développement au laboratoire. Ce prototype sera utilisé pour des expériences de routine en biologie avec une boucle d'OA basée sur la mesure de front d'onde en source étendue, invisible pour l'utilisateur et amenant un gain significatif en signal et en résolution spatiale que nous avons montré pour des marquages structurels et fonctionnels dans des cerveaux *ex vivo* de drosophile adulte.

Perspectives

Mon projet actuel est d'ores et déjà en évolution au laboratoire grâce à l'arrivée de Mathias Mercier, nouveau doctorant, qui a pour objectif d'améliorer la feuille de lumière en utilisant à la fois un objectif d'excitation à immersion à grande ouverture numérique et une technique de "remote focusing" [1]. L'utilisation de cette technique permettrait d'obtenir un meilleur sectionnement optique et pourrait limiter les effets 3d dont nous avons discuté dans cette thèse et ainsi améliorer la qualité de mesure du front d'onde dans des échantillons épais.

Dans cette thèse nous avons majoritairement travaillé avec la drosophile mais il serait intéressant d'imager le ver *C. Elegans* dont les aberrations sont un frein à l'étude fonctionnelle [2]. L'imagerie du poisson-zèbre, organisme le plus utilisé en microscopie à feuille de lumière, serait également intéressante, j'ai initié quelques expériences mais les marquages d'intérêt très denses de nos collaborateurs n'ont pas encore permis de mettre en évidence un gain. Un meilleur sectionnement optique et un marquage plus localisé sont des pistes de développement sur ce type d'échantillon.

Nous avons pendant plusieurs mois travaillé à la clarification des cerveaux de drosophile. Notre idée principale était de réduire la diffusion de la feuille et ainsi améliorer le sectionnement optique du microscope. Malheureusement les corrections après clarification n'ont pas donné de résultats probants. Ceci peut être dû à l'homogénéisation de l'indice optique créée par le liquide de clarification (RapiClear 1.47). Il est envisagé dans le futur de réitérer ces protocoles de clarification sur des échantillons plus épais comme le cerveau de souris afin de corriger en profondeur des aberrations plus importantes pour apporter un gain significatif à l'image.

Au-delà de cette thèse, l'analyseur de front d'onde en source étendue a été utilisé par Sophia Imperato, doctorante au laboratoire, qui a réalisé des mesures de coefficients de diffusion en utilisant les imagettes issues de l'ESSH et a également pu mesurer des aberrations induites par des tranches de cerveau de souris fixées. Cet analyseur est en cours d'installation sur un microscope à deux photons pour la neuroimagerie chez la souris.

Bibliographie

- [1] Kevin M Dean, Philippe Roudot, Erik S Welf, Gaudenz Danuser, and Reto Fiolka. Deconvolution-free subcellular imaging with axially swept light sheet microscopy. *Biophysical journal*, 108(12) :2807–2815, 2015.
- [2] J. Van Krugten, K.-K. H. Taxis, and Erwin J.G. Peterman. Imaging adult *C. elegans* live using light-sheet microscopy. *Journal of Microscopy*, September 2020.

Article

Optics Letters

Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star

ANTOINE HUBERT,^{1,2,*} FABRICE HARMS,² RÉMY JUVÉNAL,² PAULINE TREIMANY,² XAVIER LEVECO,²
VINCENT LORIETTE,¹ GEORGES FARKOUH,³ FRANÇOIS ROUYER,³ AND ALEXANDRA FRAGOLA¹

¹Laboratoire Physique et Etudes des Matériaux, ESPCI Paris, PSL Research University, CNRS, Sorbonne Université, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France

²Imagine Optic, 91400 Orsay, France

³Institut des Neurosciences Paris-Saclay, Univ. Paris-Sud, CNRS, Université Paris-Saclay, 91190 Gif-Sur-Yvette, France

*Corresponding author: antoine.hubert@espci.fr

Received 21 March 2019; revised 18 April 2019; accepted 19 April 2019; posted 22 April 2019 (Doc. ID 362202); published 10 May 2019

We propose an adaptive optics light-sheet fluorescence microscope (AO-LSFM) for closed-loop aberrations' correction at the emission path, providing intrinsic instrumental simplicity and high accuracy when compared to previously reported schemes. The approach is based on direct wavefront sensing, i.e., not on time-consuming iterative algorithms, and does not require the use of any guide star, thus reducing instrumental complexity and/or sample preparation constraints. The design is based on a modified Shack–Hartmann wavefront sensor providing compatibility with extended sources such as images from optical sectioning microscopes. We report an AO-LSFM setup based on such sensors, including characterization of the sensor performance, and demonstrate for the first time to the best of our knowledge a significant contrast improvement on neuronal structures of the *ex vivo* adult drosophila brain in depth. © 2019 Optical Society of America

<https://doi.org/10.1364/OL.44.002514>

When targeting reliable diagnosis and efficient therapy of neurological diseases, understanding brain functions is of key importance. Neuroimaging now benefits from spectacular breakthroughs in biochemistry and microscopy, thanks to the availability of new genetically encoded reporters such as GCaMP and of advanced optical sectioning techniques such as light-sheet or multiphoton microscopy [1–3]. These techniques can provide structural and functional images of neuron networks with high spatiotemporal resolution, on semi-transparent animal models such as ZebraFish or Drosophila larvae [4,5], with minimized phototoxicity in particular in the case of light-sheet microscopy. Still, one major limitation of such techniques when imaging at large depths is the presence of optical aberrations that arise from inhomogeneities of the sample as well as from residual aberrations of the optical setup.

Thus, there have been considerable recent efforts in developing adaptive optics (AO) methods to compensate for optical aberrations in microscopy and provide increased contrast and

resolution in depth [6,7]. Reported approaches mainly differ regarding implemented wavefront (WF) sensing methods, which can be grouped into two categories: indirect WF sensing methods based on iterative algorithms estimating the WF from its impact on image quality, and direct WF sensing methods based on real-time WF measurement from a point source acting as a “guide star”—as originally defined in astronomical AO—in the imaging plane. The former makes use of a merit function such as image intensity or sharpness [8,9], does not require a WF sensor, and still provides image enhancement with moderate scattering conditions. It is however time-consuming, which increases phototoxicity, whereas direct WF sensing, usually based on a Shack–Hartmann (SH) WF sensor, provides the best reliability, speed, and compatibility with *in vivo* imaging [7].

The LSFM, because of its low phototoxicity and speed capabilities, is now increasingly used for both structural and even functional neuroimaging [10]. Only a couple of AO setups using direct WF sensing have been proposed for the LSFM, targeting increased contrast and resolution, and mainly applied to the correction of aberrations at the emission path. Because of the need for a guide star in direct WF sensing, reported setups either make use of fluorescent beads in the sample [11], something practically not compatible with biological studies in particular in neuroscience, or make use of an ultrafast laser to locally induce a fluorescent source through a nonlinear multiphoton process and a scan/descan acquisition geometry [12], which corresponds to significant instrumental complexity and cost. Recently, Lawrence *et al.* [13] proposed an AO light-sheet setup using a scene-based SH WF sensor as originally developed in astronomy and Earth observation [14,15] but failed to provide an aberrations correction. This approach avoids the need for a guide star, providing simple AO implementation based on direct WF sensing.

In this Letter, we report for the first time AO-LSFM images of neuronal structures involved in sleep behavior in the *ex vivo* adult drosophila brain, showing significant image quality improvement in depth, using closed-loop AO correction of aberrations at the emission path without the use of a guide star.

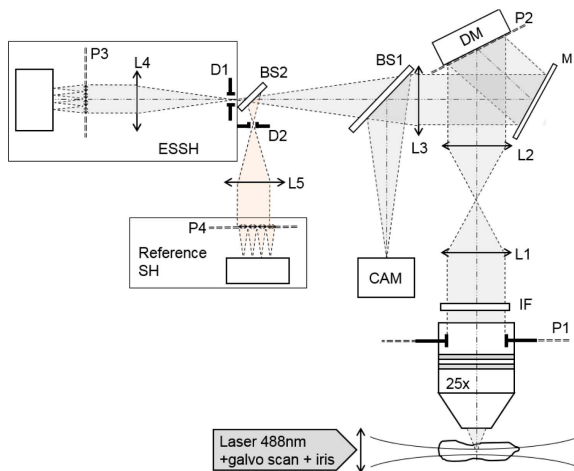


Fig. 1. Optical setup. L1-5, relay lenses; IF, interference fluorescence filter; M, mirror; DM, deformable mirror; D1-2, field diaphragms; BS1-2, 50:50 nonpolarizing beamsplitters; CAM, imaging camera. P1-4 are conjugated pupil planes.

We describe our experimental setup, including detailed design and performance characterization of the specific SH WF sensor providing compatibility with extended sources. We discuss the impact of the characteristics of the sample on AO performance such as WF sensing accuracy and anisoplanatism, and provide strategies to further enhance the technique regarding photometry and extension of the corrected field-of-view (FOV).

Our optical setup is presented in Fig. 1 and is composed of a light-sheet excitation module and an AO loop included in the emission path. The conventional light-sheet illumination module includes a 488 nm laser source (Cobolt), a 10× NA 0.3 objective lens (Olympus) with a 1 mm diameter diaphragm at the pupil plane to generate a pencil beam, a galvanometer mirror (Thorlabs) used to scan the beam over the FOV, and a custom sample chamber filled with a sample medium with a 0.17 mm thick coverslip as the optical interface. This illumination setup creates a Gaussian beam with 7 μm thickness full width at half-maximum (FWHM) and a Rayleigh range of 160 μm, both measured in the object plane. The design of the AO part corresponds to a closed-loop configuration with the deformable mirror (DM) (Mirao52e, Imagine Eyes) prior to the custom, extended-source SH sensor (ESSH). Imaging is performed with a 25× NA 0.95 water-immersion objective lens (Leica) and a sCMOS camera (Hamamatsu Orca Flash v2). A conventional SH (Imagine Optic Haso3 First, 32 × 40 microlenses, λ/100 accuracy) is also included as a reference SH sensor for performance assessment.

The ESSH WF sensor is made of a 17 × 23 microlens array, each microlens defining a 43 × 43 pixels area on a global shutter scientific CMOS camera with 6.9 μm per pixel, a conjugation lens, and an adjustable, square-shaped field diaphragm to avoid crosstalk between subimages formed by adjacent microlenses. The illumination beam scan rate is significantly higher than the ESSH camera acquisition rate. The focal length/diameter ratio of each microlens is $f_{mic}/D_{mic} = 17$, corresponding to a low numerical aperture (NA), and each subimage is sampled just above the diffraction limit to provide a good tradeoff

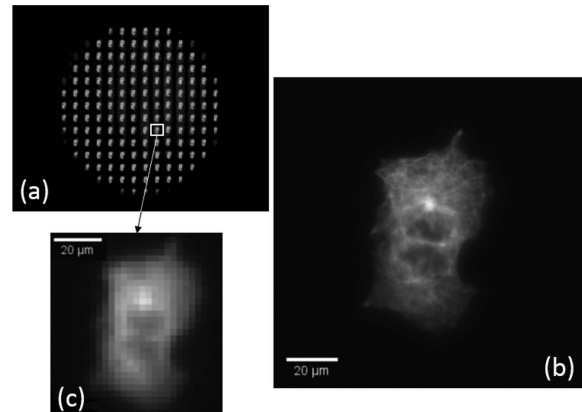


Fig. 2. (a) Raw ESSH image of a HeLa cell (GFP—tubulin). (b) Image on scientific camera. (c) Zoom on one ESSH subimage.

between the FOV defined by the size of a microlens and the measurement accuracy. WF slopes are directly computed from the positions of intercorrelation peaks between subimages, as previously reported in the field of astronomy [16,17]. Each microlens defines a 132 × 132 μm FOV in the object plane, and the reconstructed WF, using a conventional zonal method, is representative of an average aberration map over this FOV. Figure 2 shows a raw ESSH image of a fluorescent live cell and comparative images from one microlens and from the LSM camera.

Since WF measurement accuracy is driving AO performance, characterization of the custom ESSH sensor is required. For this purpose, we use the reference SH sensor to drive the DM, such that a set of pure Zernike modes of known amplitudes is generated, taking into account aberrations of the optical setup as well as differential aberrations between the two WF sensing paths. A sample made of sparse 2 μm fluorescent beads (ThermoFischer, λ = 515 nm emission) deposited between two coverslips is used to provide both a guide star for the SH sensor by selecting one bead at the center of the FOV using field diaphragm D2 and an extended source for the ESSH by using its field diaphragm D1 of larger extent. Static aberrations of the optical system are first measured and corrected before adding known aberrations. Figure 3 shows the WF difference between measurements from the two sensors as computed using Zernike coefficients, demonstrating a relative accuracy better than λ/50 over a range of ±200 nm rms of induced 3rd-order aberrations. Since the two sensors have a significant difference in spatial resolution and since the two WF measurement paths have different magnifications, the calculation of the Zernike pupil size and center for each sensor is likely to exhibit some relative inaccuracy: this probably explains the increasing residual WF difference with a larger-generated WF amplitude, particularly for a spherical aberration that is very sensitive to pupil edge effects. However, these results demonstrate good accuracy of the ESSH, adapted to AO-based imaging.

Since the ESSH method is based on imaging, WF measurement accuracy is also driven by the characteristics of the image of the sample through microlenses, whereas the conventional SH approach benefits from diffraction-limited images of a mandatory point source. In particular, the spatial frequency

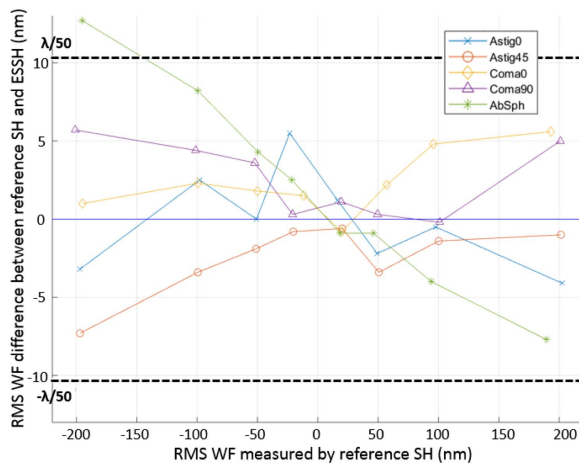


Fig. 3. ESSH WF measurement accuracy for 3rd-order aberrations as compared to the reference SH.

content of subimages formed by the ESSH impact the geometry of intercorrelation peaks and as a consequence their localization accuracy, which drives the WF measurement accuracy. Each microlens of the ESSH acts as a low-pass filter in the Fourier domain, with a NA of $NA_{\text{mic}} \approx D_{\text{mic}}/2f_{\text{mic}} \approx 0.03$ as compared to the NA of 0.95 of the microscope objective. Intercorrelations of subimages of the ESSH are thus based on low spatial frequencies of the object. To characterize the impact of this parameter, we simulated an object with variable 2D spatial frequency—generated from a random set of 2D sine patterns, we computed the corresponding image through a microlens, sampled in accordance with our ESSH design, calculated its positioning error for a given image shift, and converted it to the proportional WF error at the level of a microlens.

The results are presented in Fig. 4: expected accuracy is $<\lambda/20$ over the whole spatial frequency range of a microlens, except for very low frequencies corresponding to very smooth patterns that fail to provide accurate intercorrelation, but that can easily be rejected by high-pass prefiltering of subimages.

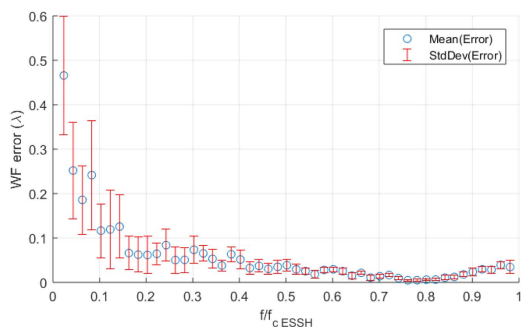


Fig. 4. WF error as a function of the sample normalized spatial frequency (f_{cESSH} = cutoff frequency of a microlens). Each point (blue dot) is the average WF error computed from a set of 10 sine patterns randomly generated—to take into account sampling effects—and a corresponding set of 10 image shifts randomly distributed over a range describing a WF error of $\pm\lambda$. Error bars are thus calculated from 100 measurements.

Moreover, for highest spatial frequencies, typically corresponding to the fluorescent beads used in the previous experiment, the expected accuracy reaches up to $<\lambda/50$, consistently with the results of Fig. 3. WF sensing based on ESSH is likely to fail for objects solely containing high spatial frequencies, in particular higher than the cutoff frequency of a microlens. When studying samples where structures of interest are very small, this suggests that an additional labeling, for example structural, might be beneficial to the reported approach—all the more that such labeling can be done at a given emission wavelength that can be specifically used for WF measurement, thus avoiding the need to share photons between the WF sensing and the imaging path, as done in the present straightforward setup.

To demonstrate image quality improvement of the reported AO-LSFM setup, we imaged a freshly dissected adult *Drosophila* brain, with sleep neurons expressing green fluorescent protein [GFP (23E10-GAL4 > UAS-CD8-GFP)], without any sample processing such as fixation and clarification. Figure 5 shows raw AO-LSFM images of cells bodies of the ExF12 neuronal group of the dorsal fan-shaped body [18] at a depth of approximately 40 μm without and with AO, without any deconvolution applied. In this experiment, static aberrations of the optical setup as well as differential aberrations between the imaging camera and the WF sensing path have been pre-compensated, so that comparative images provide only the effect of correcting aberrations arising from the sample. The AO loop is running at approximately 2 Hz in the experiment, currently limited by the amount of signal available for the ESSH, since the fluorescence signal is shared between imaging and WF sensing in this first version of the setup. WF residual drops from 80 to 25 nm rms through the AO process, based on the correction of the first 30 modes of the interaction matrix. This residual approximately corresponds to $\lambda/20$, below the Marechal criterion for a diffraction-limited image.

Intensity profiles along cellular structures show clear contrast and resolution enhancement using AO. On a small cell body of about 10 μm in diameter, profiles (pink line in Fig. 5) show a 50% increase in contrast, while on a larger cell, profiles (green line in Fig. 5) show that AO correction provides a sharper cell contour. The FWHM of the profiles without and with AO decreases from 12 to 9 μm , suggesting a significant resolution increase already at moderate depth. The ESSH FOV is marked using a dotted square in Fig. 5: structures outside this area do not fully benefit from AO correction.

In the ESSH method applied to microscopy, as previously explained, NA_{mic} is much smaller than NA_{obj} . The depth of focus (DoF) of a microlens is thereby significantly larger than the DoF of the objective, so that each microlens provides an in-focus image of the sample over a huge axial extent. Therefore, to provide an accurate WF measurement corresponding to the imaging plane, optical sectioning is a mandatory feature to be used with ESSH, for intercorrelations to be done on structures of the sole imaging plane. This corresponds to providing a “guide plane,” instead of a guide star for SH. This constraint is however far more acceptable since modern microscopy techniques such as the LSFM now rely on optical sectioning to provide 3D imaging with an enhanced SNR. Also, we showed that, due to the use of low spatial frequencies of the sample in the ESSH approach, a supplementary structural labeling is beneficial to robust WF sensing and photometry. This constraint is also more acceptable for biologists than using beads,

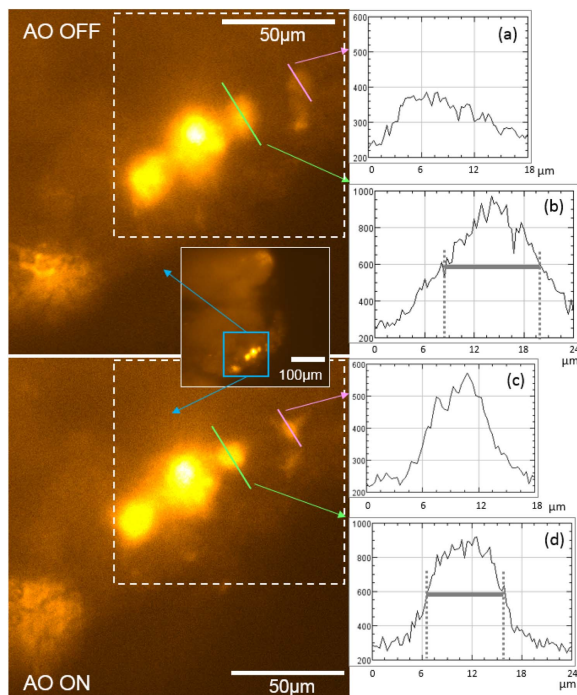


Fig. 5. GFP-expressing ExF12 neurons of the dorsal fan-shaped body around 40 μm deep inside a freshly dissected adult drosophila brain, without (top) and with (bottom) AO. (a)–(d) Intensity profiles of cell bodies along the pink and green lines showing SNR and resolution enhancement with AO. Insert: $350 \times 350 \mu\text{m}^2$ full FOV image. Dotted square: ESSH/AO correction FOV.

such labeling being already widely used for anatomical mapping, in conjunction or not with specific functional reporters, in particular in neuroimaging. We will implement dual-labeling sample preparation and corresponding detection in the next version of our AO-LSFM setup.

Sampling of subimages in ESSH is a key design parameter: each subimage defines the WF measurement FOV, and minimal sampling is required to ensure accurate intercorrelation, so that more pixels per microlens are necessary when compared to conventional SH. As a result, ESSH usually provides less WF sampling than SH or requires the use of megapixels cameras. This might be seen as a limitation when targeting high-order aberrations' characterization. In particular, this design parameter needs to be carefully considered in conjunction with the DM used, to ensure that the spatial correction modes of the DM, depending on the geometry, are sampled enough by the WF sensor. In our setup, the DM exhibits eight actuators along a diameter corresponding to 14 microlenses of the ESSH, which provides proper sampling of the WF regarding DM spatial capabilities.

Anisoplanatism is a practical limitation of AO when targeting aberration-corrected images of complex samples over a large FOV. A typical size of the isoplanetic patch for brain samples has been estimated to 30–150 μm [12,19,20], depending on the sample, imaging depth, and optical setup. We used these results to define the FOV of a microlens ($132 \times 132 \mu\text{m}^2$) in our design, as a preliminary tradeoff favoring the corrected image size. Assessment of the optimal isoplanetic patch will be achieved as a

next step. Also, since the targeted FOV is typically $>400 \mu\text{m}$, sequential WF measurements with a transverse motion of the diaphragm followed by DM compensation can provide characterization and correction of aberrations of the full FOV of the objective, at the expense of supplementary acquisition time.

The reported setup provides a new, simple AO method to compensate for aberrations at the emission path in the LSFM. We demonstrated a SNR and contrast enhancement when imaging GFP neurons tens of microns deep inside a live *Drosophila* brain. A full AO correction, including strategies at the excitation path, will be implemented as a next step of our instrumental development.

Funding. Agence Nationale de la Recherche (ANR) (INOVAO 2018); IDEX Paris-Saclay, Initiative de Recherche Stratégique 206 (BrainScopes); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM).

Acknowledgment. We thank A. Fourgeaud (ESPCI) for providing custom mechanical parts and L. Bourdieu (ENS-IBENS) for fruitful discussion. F. Rouyer is supported by INSERM.

REFERENCES

1. S. Chamberland, H. H. Yang, M. M. Pan, S. W. Evans, S. Guan, M. Chavarha, Y. Yang, C. Salesses, H. Wu, J. C. Wu, T. R. Clandinin, K. Toth, M. Z. Lin, and F. St-Pierre, *eLife* **6**, e25690 (2017).
2. A. M. Packer, L. E. Russell, H. W. P. Dalgleish, and M. Häusser, *Nat. Methods* **12**, 140 (2015).
3. T.-W. Chen, T. J. Wardill, Y. Sun, S. R. Pulver, S. L. Renninger, A. Baohan, E. R. Schreiter, R. A. Kerr, M. B. Orger, V. Jayaraman, L. L. Looger, K. Svoboda, and D. S. Kim, *Nature* **499**, 295 (2013).
4. W. C. Lemon, S. R. Pulver, B. Höckendorf, K. McDole, K. Branson, J. Freeman, and P. J. Keller, *Nat. Commun.* **6**, 7924 (2015).
5. X. Liang, T. E. Holy, and P. H. Taghert, *Science* **351**, 976 (2016).
6. M. J. Booth, *Light Sci. Appl.* **3**, e165 (2014).
7. N. Ji, *Nat. Methods* **14**, 374 (2017).
8. N. Olivier, D. Débarre, and E. Beaufreire, *Opt. Lett.* **34**, 3145 (2009).
9. M. Pedrazzani, V. Loriette, P. Tchenio, S. Benrezzak, D. Nutarelli, and A. Fragola, *J. Biomed. Opt.* **21**, 036006 (2016).
10. P. J. Keller and M. B. Ahrens, *Neuron* **85**, 462 (2015).
11. R. Jorand, G. L. Corre, J. Andilla, A. Maandhui, C. Frongia, V. Lobjois, B. Ducommun, and C. Lorenzo, *PLoS ONE* **7**, e35795 (2012).
12. T.-L. Liu, S. Upadhyayula, D. E. Milkie, V. Singh, K. Wang, I. A. Swinburne, K. R. Mosaliganti, Z. M. Collins, T. W. Hiscock, J. Shea, A. Q. Kohman, T. N. Medwig, D. Damboumet, R. Forster, B. Cunniff, Y. Ruan, H. Yashiro, S. Scholpp, E. M. Meyerowitz, D. Hockemeyer, D. G. Drubin, B. L. Martin, D. Q. Matus, M. Koyama, S. G. Megason, T. Kirchhausen, and E. Betzig, *Science* **360**, eaaq1392 (2018).
13. K. Lawrence, Y. Liu, R. Ball, A. J. VanLeuven, J. D. Lauderdale, and P. Kner, in *Imaging and Applied Optics (3D, AO, AIO, COSI, DH, IS, LACSEA, LS&C, MATH, pcAOP)* (Optical Society of America, 2018).
14. V. Michau, G. Rousset, and J.-C. Fontanella, in *Real Time and Post Facto Solar Image Correction*, R. R. Radick, ed. (1993), p. 124.
15. V. Michau, J.-M. Conan, T. Fusco, M. Nicolle, C. Robert, M.-T. Velluet, and E. Piganeau, in *Atmospheric Optical Modeling, Measurement, and Simulation II* (2006), Vol. **6303**.
16. M. Rais, J.-M. Morel, C. Thiebaut, J.-M. Delvit, and G. Facciolo, *Appl. Opt.* **55**, 7836 (2016).
17. N. Anugu, P. J. V. Garcia, and C. M. Correia, *Mon. Not. R. Astron. Soc.* **476**, 300 (2018).
18. J. M. Donlea, D. Pimentel, and G. Miesenböck, *Neuron* **81**, 860 (2014).
19. J. Zeng, P. Mahou, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaufreire, and D. Débarre, *Biomed. Opt. Express* **3**, 1898 (2012).
20. J.-H. Park, L. Kong, Y. Zhou, and M. Cui, *Nat. Methods* **14**, 581 (2017).

Sujet : Optique adaptative en source étendue pour la microscopie à feuille de lumière en neuroimagerie

Résumé : L'utilisation de la microscopie de fluorescence à feuille de lumière pour la neuroimagerie a permis l'acquisition à haute cadence résolution d'échantillons vivants. Toutefois, l'imagerie en profondeur souffre toujours d'aberrations qui détériorent la qualité. Ceci combiné aux faibles variations de fluorescences représentatives de l'activité neuronale empêche la cartographie tridimensionnelle de réseaux de neurones. Des développements en optique adaptative grâce à la mesure du front d'onde et la correction des aberrations sur les microscopes à feuille de lumière ont montré un gain significatif mais ceux-ci reposent sur des méthodes itératives coûteuses en temps ou bien sur des montages complexes nécessitant une étoile-guide virtuelle. Cette thèse rapporte le développement original d'un analyseur de front d'onde basé sur l'image. Les performances de cet analyseur sont caractérisées et sa capacité à mesurer des aberrations sur un microscope à feuille de lumière développé durant cette thèse est démontrée. L'imagerie en profondeur de structures cellulaires en profondeur dans le cerveau de *Drosophila Melanogaster* corrigée des aberrations est présentée. L'apport de l'optique adaptative est discuté et les paramètres de la boucle sont évalués. Enfin, l'imagerie fonctionnelle basée sur l'utilisation de marqueurs calciques est réalisée sur des structures à des profondeurs variées dans le cerveau de la drosophile, un gain significatif en signal et résolution grâce à notre nouvel analyseur est démontré. Ce type de développement permettra d'améliorer la qualité d'image et les mesures quantitatives associées notamment dans le cadre de l'analyse de l'activité cérébrale.

Mots clés : optique adaptative, fluorescence, microscopie à feuille de lumière, drosophila melanogaster, source étendue, Shack-Hartmann

Subject : Adaptive optics on extended scene for light-sheet microscopy

Abstract: When targeting neuroimaging of neuronal networks in live specimens with high temporal and spatial resolution, Light-Sheet Fluorescence Microscopy has demonstrated its capability to provide enhanced signal to background ratio while decreasing toxicity and photobleaching. However, imaging neuronal networks is still a challenge since fluorescence variations induced by neuronal activity is weak and imaging depth is still limited by aberrations. Adaptive optics has shown its ability to increase signal, resolution and imaging depth in light-sheet fluorescence microscopy through direct or indirect wavefront sensing but the latter are time consuming or impose complex implementation with a virtual guide-star. This thesis relates an original development of a wavefront sensor for extended scenes. This sensor performances are specified and its ability to compute aberrations on a light-sheet fluorescence microscope built during this thesis is demonstrated. Adaptive optics in depth imaging of neuronal structures inside *Drosophila Melanogaster* is performed. The contribution of this sensor is discussed and keys parameters of the adaptive optics loop are studied. Finally, functional imaging based on calcium markers is performed at several depth inside drosophila brain with a significant gain and resolution's enhancement thanks to our new wavefront sensor. This development could improve image quality and quantitative measurements associated to neuronal activity on a daily basis.

Keywords : adaptive optics, fluorescence, light-sheet microscopy, drosophila melanogaster, extended-scene, Shack-Hartmann

