



HAL
open science

Intégration de l'optique adaptative sur un microscope à feuille de lumière 'lattice' pour l'imagerie super-résolue en profondeur

Maxime Malivert

► **To cite this version:**

Maxime Malivert. Intégration de l'optique adaptative sur un microscope à feuille de lumière 'lattice' pour l'imagerie super-résolue en profondeur. Physique [physics]. Université de Bordeaux, 2023. Français. NNT : 2023BORD0325 . tel-04483324

HAL Id: tel-04483324

<https://theses.hal.science/tel-04483324>

Submitted on 29 Feb 2024

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 PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES PHYSIQUES ET DE L'INGÉNIEUR N°209

SPÉCIALITÉ LASERS, MATIÈRE ET NANOSCIENCES

Par Maxime MALIVERT

**INTÉGRATION DE L'OPTIQUE ADAPTATIVE SUR UN
MICROSCOPE À FEUILLE DE LUMIÈRE « LATTICE » POUR
L'IMAGERIE SUPER-RÉSOLUE EN PROFONDEUR**

Sous la direction de : Mathieu Ducros

Soutenue le 23 novembre 2023

Membres du jury :

Mme FRAGOLA, Alexandra / Professeur des universités / Université Paris-Saclay
Mme DANGLOT, Lydia / CR INSERM, Directrice Scientifique de Neurimag / IPNP
M. CHOQUET, Daniel / DR CNRS / IINS
Mme. BAYER, Emmanuelle / DR CNRS / LBM
M. COLOMBELLI, Julien / Directeur plateforme imagerie / IRB Barcelona
M. GALLAND, Rémi / CR CNRS / IINS
M. HARMS, Fabrice / Responsable Scientifique / Imagine Optic

Rapportrice
Rapportrice
Examinateur
Examinatrice
Examinateur
Invité
Invité

Titre : Intégration de l'optique adaptative sur un microscope à feuille de lumière « lattice » pour l'imagerie super-résolue en profondeur

Résumé :

La microscopie de fluorescence est devenue un outil indispensable pour les études biologiques en permettant d'observer des structures d'intérêts de manière spécifique et contrastée au sein d'échantillons fixés ou vivant. Parmi ces techniques, le sectionnement optique offert par la microscopie à feuille de lumière jouit d'un grand avantage en minimisant le bruit de fond et en réduisant phototoxicité/photoblanchiment. La microscopie à feuille de lumière « lattice » (LLSM) maximise ses caractéristiques en utilisant une feuille de lumière, d'épaisseur constante sur un plus grand champ de vue. Ainsi, elle offre la possibilité d'imager la fluorescence à l'intérieur d'échantillons épais jusqu'à environ 30 μm , avec une très grande résolution spatiale, temporelle et une très faible phototoxicité.

Toutefois, comme d'autres techniques de microscopie, elle souffre de deux problématiques liées à la nature de la lumière, qui dégradent la qualité des images acquises. (1) Les aberrations optiques, induites par les interfaces et l'inhomogénéité des échantillons, croissantes avec la profondeur d'imagerie, perturbent le front d'onde et donc la résolution finale de l'image. (2) La limite de diffraction contraint la résolution à ~200 nm minimum et empêche donc l'observation de structures de taille inférieure à cette limite.

Pour contrer ces phénomènes, nous avons décidé de combiner la LLSM avec deux méthodes complémentaires : (1) l'optique adaptative pour minimiser les aberrations optiques en profondeur d'échantillons épais et (2) la microscopie à super-résolution à travers une technique de microscopie par localisation de molécules uniques (SMLM), nommée DNA-PAINT, pour atteindre des résolutions nanométriques. Plus particulièrement, notre méthode, nommée AIO, s'appuie sur les images enregistrées par la caméra, à travers : une refocalisation de la feuille de lumière (AF) et une correction par mesure indirecte du front d'onde, nommée (3N+).

Cette méthode, dont le paramétrage a été étudié au cours de cette thèse, améliore la résolution et le contraste des images en résolution limitée par diffraction et en SMLM. (1) En résolution « classique », l'AIO permet de récupérer un front d'onde plan avec une erreur inférieure à 50 nm RMS et en moins de 40 secondes. La correction des aberrations optimise également le processus de déconvolution en restaurant la PSF du système. Ce gain est illustré à travers l'imagerie d'épines dendritiques à 40 μm sous la surface de tranche de cerveaux organotypiques et l'acquisition de structures sub-micrométrique dans la deuxième couche cellulaire de racines d'Arabidopsis. (2) En super-résolution, nous avons démontré l'application d'un protocole DNA-PAINT jusqu'à ~50 μm sous la surface de tranches de cerveaux et l'intérêt de l'optique adaptative pour améliorer la densité de détection et la précision de localisation en reconstruction SMLM.

Mots clés :

Microscopie à feuille de lumière « lattice » (LLSM), Optique adaptative, Microscopie à super-résolution, Microscopie par localisation de molécules uniques (SMLM)

Title : Adaptive optics integration in lattice light-sheet microscope for depth super-resolution imaging

Abstract :

Fluorescence microscopy has become an indispensable tool for biological studies, allowing observation of structures of interest. Used on both fixed or living samples, it provides great specificity and high-contrast. Among these techniques, the optical sectioning offered by light-sheet microscopy (LSFM or SPIM) is a game-changer. It maximises image contrast whilst avoiding too rapid fluorescence loss of the samples. Lattice light-sheet microscopy (LLSM) improves these characteristics by using a thinner light-sheet over a larger field of view. As a result, it offers the possibility of fluorescence imaging inside thick samples down to around 30 μm . In addition, it allows with very high spatial and temporal resolution whilst almost obviating phototoxicity.

As other microscopy techniques, it suffers from two drawbacks, both linked to the nature of the light, impairing the image's quality. (1) Multiple interfaces and the inhomogeneity of samples induce optical aberrations that increase with imaging depth. Hence, disruption of the wavefront highly impairs the final resolution of the image. (2) The diffraction limit constrains the resolution to a minimum of ~ 200 nm and therefore prevents the observation of structures smaller than this limit.

As a workaround to these phenomena, we decided to implement two methods on the LLSM: (1) adaptive optics to minimise optical aberrations in the depth of thick samples and (2) super-resolution microscopy using a single molecule localisation microscopy (SMLM) technique, called DNA-PAINT, to achieve nanometric resolutions. Our method, called AIO, is based on the images recorded by the camera, through refocusing of the light sheet (AF) and correction in response to indirect measurement of the wavefront, called (3N+).

This thesis presents the original design of the method, and the optimization of its parameters. AIO improves the resolution and contrast of diffraction-limited and SMLM resolution images. (1) In "classical" resolution, the AIO enables a plane wavefront to be recovered with an error of less than 50 nm RMS and in less than 40 seconds. Correcting aberrations also optimises the deconvolution process by restoring the system's PSF. This gain is illustrated by the imaging of dendritic spines at 40 μm below the surface of organotypic brain slices and the acquisition of the second cell layer of Arabidopsis roots. (2) In super-resolution, we demonstrated the application of a DNA-PAINT protocol down to ~ 50 μm below the surface of brain slices and the value of adaptive optics for improving detection density and localisation accuracy in SMLM reconstruction.

Keywords :

Lattice light-sheet microscopy, Adaptive Optics, Super-resolution microscopy, Single-molecule localization microscopy

Unité de recherche

[Bordeaux Imaging Center, UAR 3420, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux]

Remerciements

Tout d'abord, je souhaite adresser mes remerciements à Mathieu Ducros, ingénieur de recherche au sein du Bordeaux Imaging Center et mon directeur de thèse. Jamais je n'aurai pensé que mon arrivée sur la plateforme en 2018, dans le cadre d'un stage, m'aurait emmené cinq ans plus tard à la conclusion de cette thèse. Merci pour l'opportunité que tu m'as offerte et pour la confiance que tu m'as accordée pendant toute cette période. Merci pour ta pédagogie, ton écoute et ta bienveillance. Grâce à toi, je pense avoir évolué autant sur le plan professionnel que sur le plan humain.

Comment ne pas associer cette aventure à tous mes collègues du Bordeaux Imaging Center, tout ce travail je le dois à la bonne humeur qui règne sur la plateforme et à l'expertise de chacun d'entre vous. Merci à Magali Mondin pour son écoute, son aide précieuse pour la préparation d'échantillons, les manipulations et l'analyse des résultats en SMLM, et pour ton soutien dans notre défense commune de la cuisine du Sud-Ouest. Merci à Mónica Fernández Monreal, pour tes conseils, tes explications pour essayer de me faire comprendre la biologie, pour ta bonne humeur et nos discussions animées. Merci à mon MJ, Fabrice Cordelières, pour ton aide sur le traitement d'images, tes remarques et conseils sur mon travail et pour m'avoir fait découvrir le JDR à travers notre partie qui dure depuis presque deux ans. Merci à Sébastien Marais, pour ton aide sur Imaris et ImageJ, ton énergie, ta bonne humeur, et tes blagues. Merci à Jérémie Teillon, pour ton aide dans l'alignement du microscope et nos discussions autour du café. Merci aux nouveaux arrivants, Noémie Pied-Marais et Guillaume Maucort. Enfin, merci Christel Poujol, pour ta bienveillance, tes conseils, et ta gestion de cette joyeuse troupe.

Je tiens également à remercier Daniel Choquet, directeur du Bordeaux Imaging Center, de l'IINS et directeur de recherche à l'IINS pour l'intérêt apporté à ce projet. Ton soutien aura permis au projet d'aboutir et d'ouvrir, je l'espère, de nouvelles perspectives d'expériences pour le BIC et l'IINS.

Un énorme merci à Imagine Optic, pour le financement et l'intérêt que vous avez porté au projet dès nos premières discussions. Merci à Samuel Bucourt et Xavier Levecq pour votre confiance et pour m'avoir donné l'opportunité de découvrir la belle entreprise qu'est Imagine Optic. Merci d'avoir toujours été l'écoute et arrangeant, notamment lors de la proposition de contrat avant le début de cette thèse. J'adresse un grand remerciement à mes interlocuteurs privilégiés chez Imagine Optic : Fabrice Harms, Cynthia Veilly, Jérôme Legrand et Audrius Jasaitis. Fabrice, cela a été un grand bonheur de pouvoir collaborer avec toi sur ce projet. Merci pour ton écoute, ton calme, ton expertise et tes conseils précieux. Ton aide a permis de guider le projet tout au long de la thèse. Jérôme, merci pour ton aide dans le développement du logiciel LabVIEW et pour m'avoir mis le pied à l'étrier dans l'apprentissage de ce langage. Nos sessions de débogage auront finalement permis d'obtenir un logiciel robuste et efficace. Cynthia et Audrius,

merci pour votre aide sur ce projet, ainsi que pour les échanges que nous avons pu avoir ces quatre dernières années. Merci à Grégory Clouvel pour sa participation en tout début de projet.

Un grand merci à Angela Getz, qui aura fourni une grande partie des échantillons utilisées dans ce projet. La qualité de ton travail et ton intérêt pour le microscope « lattice » auront grandement contribué à cette thèse. De la même manière, merci à Patrick Ziqiang Li et Emmanuelle Bayer. Votre curiosité et votre confiance dans l'utilisation du système, nous auront permis de tester de nouveaux types d'échantillons dans le cadre de cette thèse.

Je souhaite également remercier, Jean-Baptiste Sibarita, Rémi Galland et les membres de leurs équipes qui m'ont ouvert les portes de leurs « Journal Club ». Les échanges et discussions au cours de ces sessions m'auront permis de faire avancer le projet et aussi de me faire découvrir (non sans difficulté) le machine-learning.

Merci aux stagiaires passés par le BIC au cours de ces trois ans et qui m'auront aidé à faire avancer le projet : Lucie Grezes et Théa Chaya.

Enfin, j'adresse mes sincères remerciements à Alexandra Fragola, Lydia Danglot, Daniel Choquet, Emmanuelle Bayer, Julien Colombelli, Rémi Galland et Fabrice Harms pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à toute ma famille et mes amis pour leurs soutiens pendant ces trois années et pour avoir essayé de comprendre en quoi consisté mon travail.

Merci à toi Maïa, qui m'a soutenu au cours de ces trois ans.

Liste des abréviations

AF : AutoFocus (en) – Focalisation automatique (fr)

AIO : Active Image Optimization (en) – Optimisation active de l'image

AO : Adaptive Optics (en) – Optique adaptative (fr)

ASLM : Axially Swept Light sheet Microscopy (en) - Microscopie à feuille de lumière balayée axialement (fr)

CLSM : Confocal Laser Scanning Microscopy (en) - Microscopie confocale à balayage laser (fr)

DM : Deformable Mirror (en) – Miroir déformable

DSLMS : Digitally Scanned Light sheet Microscopy (en) - Microscopie à feuille de lumière digitalement scannée (fr)

ESSH : Extended-Scene Shack-Hartmann (en) - Analyseur de front d'onde en scène étendue (fr)

FOV : Field Of View (en) – Champ de vue (fr)

HILO : Highly Inclined and Laminated Optical Sheet (en) - Feuille optique hautement inclinée et laminée (fr)

IINS : Interdisciplinary Institute for NeuroSciences (en) – Institut Interdisciplinaire de NeuroSciences (fr)

LLSM : Lattice Light-Sheet Microscopy (en) – Microscopie à feuille de lumière « lattice » (fr)

LSFM : Light-Sheet Fluorescence Microscopy (en) – Microscopie de fluorescence à feuille de lumière (fr)

MIP : Maximum Intensity Projection (en) – Projection d'intensité maximum (fr)

MPM : Multi-Photon Microscopy (en) - Microscopie multiphotonique (fr)

mSPIM : multidirectionnal Single Plane Illumination Microscopy (en)

mesoSPIM : mesoscale Selective Plane Illumination Microscopy (en)

NA : Numerical Aperture (en) – Ouverture Numérique (fr)

OPFOS : Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning (en)

PALM : Photo-Activated Localization Microscopy (en) – Microscopie par localisation photoactivée (fr)

PSF : Point Spread Function (en) – Fonction d'étalement du point (fr)

ROI : Region Of Interest (en) – Région d'intérêt (fr)

SDCM : Spinning-Disk Confocal Microscopy (en) - Microscopie confocale à disque tournant (fr)

SHWFS : Shack-Hartmann WaveFront Sensor (en) – Analyseur de front d'onde Shack-Hartmann (fr)

SIM : Structured Illumination Microscopy (en) - Microscopie par illumination structurée (fr)

SLM : Spatial Light Modulator (en) – Modulateur spatiale de lumière (fr)

SMLM : Single Molecule Localization Microscopy (en) – Microscopie par localisation de molécules uniques (fr)

SPIM : Selective Plane Illumination Microscopy (en) – Microscopie par plan sélectif d'illumination / Microscopie à feuille de lumière (fr)

SR : Super-Résolution

STED : STimulated Emission Depletion (en) - Microscopie par émission stimulée (fr)

TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence (en) - Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (fr)

WFC : WaveFront Corrector (en) – Correcteur de front d'onde (fr)

WFS : WaveFront Sensor (en) – Analyseur de front d'onde (fr)

Tables des matières

Remerciements	4
Liste des abréviations.....	6
Tables des matières	8
Tables des illustrations	10
1. Introduction	12
2. État de l'art.....	16
2.1. De l'épifluorescence à la microscopie à feuille de lumière « lattice ».....	16
2.1.1. Microscopie optique de fluorescence.....	17
2.1.2. Principe de fluorescence appliquée à la microscopie optique	22
2.1.3. Principe général de la microscopie de fluorescence.....	25
2.1.4. Microscopie de fluorescence à sectionnement optique pour l'imagerie 2D ou 3D	25
2.1.5. Microscopie à feuille de lumière	29
2.1.6. Microscopie à feuille de lumière « lattice »	36
2.2. Microscopie de super-résolution, SMLM et DNA-PAINT utilisé dans le cadre du LLSM ...	41
2.2.1. Principe général de la SMLM.....	43
2.2.2. Techniques SMLM.....	45
2.2.3. Résolution en SMLM	49
2.2.4. Applications et problématiques en SMLM	52
2.3. Optique adaptative : principes et applications à la microscopie	57
2.3.1. Propagation de la lumière : front d'onde et aberrations optiques	58
2.3.2. Aberrations optiques en microscopie de fluorescence.....	59
2.3.3. Mesurer et corriger le front d'onde.....	61
2.3.4. Mise en œuvre de l'optique adaptative en microscopie optique	65
2.3.5. Optique adaptative et LSFM.....	74
2.3.6. Optique adaptative et SMLM.....	76
3. Méthodologie.....	79
3.1. Intégration de l'optique adaptative sur le chemin de détection	81

3.1.1. Intégration optique et mécanique	81
3.1.2. Alignement, calibration et corrections des aberrations du système.....	85
3.2. Optimisation active de l'image à l'excitation et à la détection avec le microscope LLSM....	88
3.2.1. Recalage de la feuille de lumière par autofocus	88
3.2.2. Correction des aberrations optiques de l'échantillon par l'optimisation 3N+	90
3.3. Processus d'imagerie comprenant l'optimisation active de l'image.....	92
4. Imagerie d'échantillons épais limitée par diffraction.....	93
4.1. Contexte de l'étude	93
4.2. Résumé des résultats.....	93
4.3. Article	96
4.4. Discussions et perspectives	97
5. Imagerie d'échantillons en super-résolution	100
5.1. Méthode	101
5.1.1. Choix de la technique DNA-PAINT.....	101
5.1.2. Choix du marquage de l'échantillon	102
5.1.3. Correction de dérive et imagerie SMLM	103
5.2. Résultats	105
5.2.1. Imagerie en profondeur et AIO sur signal continu.....	106
5.2.2. Exploration des métriques sur les images SMLM.....	108
5.3. Discussion des résultats	111
6. Discussion et perspectives	114
Bibliographie	120
Annexes	132
Annexe 1 : Description d'un front d'onde dans le formalisme de Zernike.....	132
Annexe 2 : Montage optomécanique de l'AO dans le LLSM - Plan des pièces et degrés de liberté	134
Annexe 3 : Procédure de montage et d'alignement des optiques du bras de détection	137
Annexe 4 : Alignement de la feuille de lumière en routine.....	138
Annexe 5 : Algorithme 3N+.....	139

Tables des illustrations

Figure 1 : Schéma d'optique géométrique de principe d'un microscope optique infini afocal.	17
Figure 2 : Illustration de la tâche d'Airy.	19
Figure 3 : Le diagramme de Jablonski renseigne sur le principe de fluorescence.	22
Figure 4 : Schéma de principe de la microscopie à champs larges.	25
Figure 5 : Schéma de principe de la microscopie à feuille de lumière.	29
Figure 6 : Schéma d'une feuille de lumière gaussienne et dimensions associées.	31
Figure 7 : Représentation des différents faisceaux d'illumination en microscopie « lattice » et comparaison avec la feuille de lumière gaussienne (adapté de Chen et al. [1])	36
Figure 8 : Schéma d'un microscope à feuille de lumière « lattice »	37
Figure 9 : Acquisition volumétrique avec le microscope à feuille de lumière « lattice ».	39
Figure 10 : Principe de fonctionnement de la SMLM.	44
Figure 11 : Principales techniques employées en SMLM.	46
Figure 12 : Effets de la précision de localisation, de la densité de localisation, et des erreurs de liaisons sur la reconstruction SMLM	50
Figure 13 : Principe de représentation de la propagation de la lumière en front d'onde.	58
Figure 14 : Représentation tridimensionnelle des polynômes de Zernike	59
Figure 15 : Principe de fonctionnement d'un analyseur de front d'onde.	62
Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un miroir déformable.	64
Figure 17 : Principe de correction optique adaptative par mesure directe du front d'onde.	66
Figure 18 : Principe de correction optique adaptative par mesure indirecte du front d'onde.	68
Figure 19 : Rôle de l'amplitude appliquée au miroir déformable pour la correction d'une grosse quantité d'aberrations	70
Figure 20 : Représentation 3D du microscope à feuille de lumière « lattice » conçu et monté dans le cadre de cette thèse.	81
Figure 21 : Schéma optique du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative.	82
Figure 22 : Illustration des chemins d'imagerie (en vert) et de calibration (en rouge), sur le bras de détection du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative.	83

Figure 23 : Représentation des degrés de liberté disponibles pour le positionnement du miroir déformable (DM) et de l'analyseur de front d'onde (HASO), par rapport au faisceau de fluorescence.	84
Figure 24 : PSF_{XY} et PSF_{YZ} et valeurs des rayons à $1/e^2$ caractéristiques du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative ($N=5$; masque annulaire - $NA_{min}/NA_{max} = 0,44 / 0,55$).	87
Figure 25 : Représentation schématique des éléments optiques utilisés pour l'optimisation active de l'image sur le microscope à feuille de lumière « lattice »	88
Figure 26 : Principe de l'autofocus (AF) utilisé dans le cadre de l'optimisation de l'image active (AIO).	89
Figure 27 : Principe de l'optimisation 3N+ utilisé dans le cadre de l'optimisation de l'image active (AIO)	90
Figure 28 : A : Infection virale sur des tranches de cerveau organotypiques de souris de type sauvage pour exprimer la GFP sur une petite population de neurones. B : Immunomarquage de la GFP avec des « nanobodies » conjugués à des brins d'ancrage " dock3 ". Les coupes sont incubées avec du Cy3 conjugué au brin d'ADN correspondant au " dock 3 " pour acquérir des images DNA-PAINT.....	102
Figure 29 : Principe de fonctionnement de la correction de dérive implémentée sur le microscope à feuille de lumière « lattice ».....	103
Figure 30 : Démonstration de la SMLM pour l'imagerie de dendrites neuronales au sein de tranches de cerveaux de souris et avec un microscope à feuille de lumière « lattice ».....	105
Figure 31 : Démonstration de la SMLM pour l'imagerie de dendrites neuronales, en profondeur, au sein de tranches de cerveaux de souris et avec un microscope à feuille de lumière « lattice ».....	107
Figure 32 : Illustration des métriques utilisées pour mesurer le contenu fréquentiel des images dans le cadre de la correction 3N+ pour l'imagerie SMLM.	108
Figure 33 : Description de la mesure des coefficients de sensibilité de plusieurs métriques lors de la variation des coefficients de quatorze modes de Zernike (astigmatisme 0° à tetrafoil 90°) lors de l'imagerie SMLM en surface de tranches de cerveaux	110

1. Introduction

La biologie fut très longtemps cantonnée à l'étude des organismes macroscopiques et des espèces. Mais, au milieu du XX^e siècle, les développements autour de la physiologie cellulaire, de la biologie moléculaire ou de la génétique ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension du vivant et permettent de grandes avancées dans les sciences du vivant. Ces progrès n'auraient pu être réalisés sans le développement de nouvelles techniques d'instrumentation et notamment les techniques d'imagerie. La microscopie optique y a pris une place centrale en donnant la possibilité de visualiser des phénomènes qui jusque-là étaient « invisibles » pour l'œil humain.

Dans ce domaine, la microscopie de fluorescence a été développée pour observer de façon spécifique des structures cellulaires dans leur environnement. Bien qu'elle permette d'observer des détails micrométriques, sa résolution spatiale reste limitée par la nature ondulatoire de la lumière, à la limite de diffraction telle que définie par Abbe en 1873. Le développement récent des techniques de super-résolution (SR) a permis d'augmenter le pouvoir de résolution à l'échelle du nanomètre. Les travaux autour de la microscopie par émission stimulée (STED, de l'anglais « STimulated Emission Depletion ») et la microscopie par localisation photo-activée (PALM, de l'anglais « Photo-Activated Localization Microscopy ») ont notamment été récompensés par le prix Nobel de Chimie 2014.

Le PALM fait plus généralement partie d'un groupe d'imagerie super-résolue nommée microscopie de localisation de molécules uniques (SMLM, de l'anglais « Single Molecule Localization Microscopy »). Elle englobe plusieurs techniques d'imagerie ayant en commun d'isoler dans le temps et l'espace un sous-ensemble de fluorophores individuels ciblés à la structure étudiée. Le centroïde de chaque molécule est ensuite localisé avec une précision nanométrique. En répétant ce processus, une reconstruction de la structure avec une résolution de 10nm est théoriquement possible.

Cependant, en SMLM la précision de localisation des molécules est fortement influencée par la quantité de photons récoltés par l'objectif et détectés par la caméra, ainsi que par le bruit de fond. Ainsi, plusieurs prérequis doivent être respectés pour assurer l'efficacité de la méthode. Premièrement, l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique (NA, de l'anglais « Numerical Aperture ») dans le but de maximiser le signal de fluorescence. Ensuite, un fort sectionnement optique permettant de confiner l'illumination à la zone imagée et ainsi de

considérablement réduire le bruit de fond dû à une illumination hors focus. Ce dernier point a initialement limité la SMLM à la surface de l'échantillon. En effet, les techniques de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, de l'anglais « Total Internal Reflection Fluorescence ») et par feuille optique hautement inclinée et laminée (HILO, de l'anglais « Highly Inclined and Laminated Optical Sheet ») sont intrinsèquement limitées à quelques centaines de nanomètres au-delà de la surface de l'échantillon.

Dans ce contexte, le développement des microscopes à feuille de lumière (SPIM, de l'anglais « Selective Plane Illumination Microscopy » ou LSFM, de l'anglais « Light-Sheet Fluorescence Microscopy ») a permis d'envisager l'application de la SMLM sur des échantillons épais. Le principe de la LSFM consiste à éclairer un plan dans l'échantillon avec une feuille de lumière, et d'imager ce plan perpendiculairement au moyen d'un objectif de détection. Dans sa configuration la plus simple, la feuille de lumière est créée à partir d'une lentille cylindrique couplée à un objectif d'excitation. Ce type de microscope se compose donc de systèmes d'excitation et de détection indépendants. En plus d'offrir un fort sectionnement optique, l'imagerie se trouve grandement accélérée par rapport aux méthodes à balayage, et la phototoxicité est diminuée.

La microscopie à feuille de lumière « lattice » / en treillis (LLSM, de l'anglais « Lattice Light-Sheet Microscopy ») [1], développée en 2014 par Eric Betzig et son équipe, a permis d'observer les phénomènes dynamiques au sein d'échantillons vivants avec une très haute résolution spatio-temporelle. L'illumination « lattice » est obtenue par l'oscillation d'un motif en treillis et permet de contrer les propriétés d'un faisceau gaussien : la feuille de lumière est allongée sans modifier son épaisseur. Ainsi, l'épaisseur constante du faisceau (« waist » en anglais), offrant la haute résolution spatiale, est profitable sur un plus grand champ de vue (FOV, de l'anglais « Field Of View »). Combinée à la haute résolution temporelle et à la faible phototoxicité, la LLSM est une technique de choix pour l'imagerie du vivant et l'observation de phénomènes subcellulaires dans le temps.

Toutefois, comme pour l'ensemble des microscopes optiques, la résolution spatiale est rapidement dégradée en profondeur des échantillons. Ce phénomène est induit par l'apparition d'aberrations optiques au sein ou à l'interface de l'échantillon. La propagation de la lumière, souvent illustrée par le concept de front d'onde, est dégradée par les variations d'indice de réfraction et a pour conséquence d'altérer la structure du faisceau d'illumination et/ou de dégrader le faisceau de fluorescence. La distribution des photons récoltés par l'objectif de détection et incidents sur la caméra est plus ou moins perturbée et entraîne finalement une dégradation de la résolution des images acquises. Pour diminuer cette perte de résolution, la microscopie optique a emprunté une technologie développée pour l'astronomie : l'optique adaptative (AO, de l'anglais « Adaptive Optics »). Ce terme regroupe l'ensemble des instruments et des méthodes qui permettent de corriger le front d'onde. Une grande diversité de techniques existe, mais la méthode de correction se base sur la mesure directe, ou indirecte, du front d'onde, suivie d'une modification localisée de la phase de la lumière par un correcteur de front d'onde

(WFC, de l'anglais « Wavefront Corrector »). Les microscopes incluant cette technologie améliorent grandement la résolution lors de l'imagerie en profondeur, dans les limites de la diffraction.

L'objectif de cette thèse est de développer une méthode pour réaliser l'imagerie super-résolue au sein d'échantillons biologiques épais. Pour cela nous avons construit un LLSM sur lequel nous avons employé un protocole de SMLM, nommé DNA-PAINT. Ce LLSM a été adapté de telle sorte à corriger les aberrations optiques de l'échantillon à partir des images acquises par le microscope : (1) un algorithme permet de supprimer le « defocus » de la feuille de lumière et (2) l'AO a été intégré sur le chemin de détection pour corriger les aberrations optiques induites par l'échantillon. Ce processus que nous avons appelé optimisation active de l'image (AIO, de l'anglais « Active Image Optimization ») a permis de corriger les aberrations optiques au sein des échantillons et d'améliorer l'intensité et la résolution des images en microscopie limitée par diffraction d'une part, et la densité de détection et la précision de localisation pour la SMLM, d'autre part.

Le développement de ce système s'inscrit dans la volonté du Bordeaux Imaging Center (BIC) d'offrir des technologies de pointe à la communauté scientifique. Le BIC est une plateforme de microscopie qui met à disposition du matériel et des compétences pour les secteurs public et privé, au niveau national et international. La plateforme travaille au quotidien avec des chercheurs en neurosciences, via la collaboration privilégiée avec l'Institut Interdisciplinaire des NeuroSciences (IINS) et l'ensemble du Bordeaux Neurocampus, mais aussi dans de nombreux autres domaines de la biologie : oncologie, virologie, immunologie, imagerie des plantes, biologie du développement, etc. Dans ce cadre, l'intégration de l'AO pour la SMLM s'est faite de concert avec les utilisateurs du LLSM pour leur offrir plus de possibilités d'imagerie. C'est notamment le cas de l'équipe "Dynamique de l'organisation des synapses" dirigée par Daniel Choquet à l'IINS de Bordeaux. Le développement issu dans cette thèse doit, à terme, permettre une observation de la dynamique de récepteurs uniques à la surface des neurones *in situ* et à l'échelle de la synapse, par exemple avec le suivi de molécules uniques.

Aussi, ce travail a été mené en collaboration avec Imagine Optic, société spécialisée dans l'AO et la métrologie laser. À travers cette collaboration, l'objectif était de démontrer l'utilisation des outils et des méthodes développées par l'entreprise dans le cadre de la microscopie à feuille de lumière. Cette thèse a notamment permis d'approfondir le champ de compétences sur les méthodes de correction basées sur la mesure indirecte des aberrations et leurs utilisations dans le cadre de la SMLM.

Cette thèse a donc pour but de présenter une méthode d'intégration d'AO sur un microscope LLSM pour l'imagerie limitée par diffraction et de super-résolution.

Dans ce manuscrit nous présenterons tout d'abord au Chapitre 2 un état de l'art pour définir les concepts de base utilisés dans ce projet et les publications scientifiques récentes en lien avec notre travail. (1) Une brève revue du fonctionnement et des enjeux de la microscopie optique de fluorescence permettra de mettre en perspective l'utilisation de la microscopie à feuille de lumière. (2) Un focus sur la super-résolution, et plus particulièrement la SMLM, donnera les principes pour contrer la limite de diffraction en microscopie optique. (3) Le cas des aberrations optiques et de leur correction en microscopie sera finalement abordé. Pour la SMLM et l'AO, l'accent sera mis sur leurs utilisations dans le cadre de la microscopie à feuille de lumière.

Ensuite, la méthode d'intégration de l'AO sur le microscope sera abordée dans le Chapitre 3. Nous démontrerons le respect des problématiques liées à l'implémentation d'un miroir déformable (DM, de l'anglais « Deformable Mirror ») et d'un analyseur de front d'onde (WFS, de l'anglais « WaveFront Sensor »), puis justifierons le choix et les principes de correction du defocus sur le chemin d'illumination et des aberrations sur le chemin de détection.

La démonstration de notre méthode sur des acquisitions en régime limité par diffraction a donné lieu à une publication qui constituera l'essentiel du Chapitre 4. Cet article sera précédé d'un résumé des résultats principaux : optimisation et validation de la méthode ainsi que des démonstrations dans des tranches de cerveau et dans des racines de plante. Une brève discussion suivra l'article.

Le Chapitre 5 sera consacré à l'application de notre développement pour l'imagerie SR en utilisant la technique DNA-PAINT sur des échantillons neuronaux fixés. Nous couvrirons la préparation de l'échantillon et la technique employée pour corriger la dérive spatiale sur des acquisitions longues. Nous présenterons enfin les résultats qui démontrent le bénéfice de l'AO pour augmenter la densité et la précision de localisation en profondeur.

Enfin, dans le Chapitre 6, nous conclurons par une discussion sur l'ensemble du travail accompli dans cette thèse, les résultats obtenus, et présenterons les perspectives pour améliorer notre méthode et les possibilités qui s'ouvrent grâce à ce travail.

2. État de l'art

2.1. De l'épifluorescence à la microscopie à feuille de lumière « lattice »

La microscopie de fluorescence repose sur la capacité des molécules fluorescentes, ou fluorochromes, à émettre de la lumière après avoir été excitées par une lumière avec une longueur d'onde spécifique. En marquant des composants cellulaires avec des fluorochromes spécifiques, il est alors possible de suivre leur localisation, leur dynamique et leurs interactions. Chaque technique de microscopie tente de trouver un point d'équilibre entre : (1) la résolution spatiale, (2) la résolution temporelle, (3) la profondeur d'imagerie, (4) la phototoxicité, (5) la technique de montage de l'échantillon.

Poussées par l'objectif d'imager de plus gros volume, plus rapidement, avec une meilleure résolution et sans dégrader les échantillons, de nombreuses techniques ont été développées ces trente dernières années. Les techniques basées sur l'utilisation d'une feuille de lumière (SPIM/LSFM) s'inscrivent dans cette optique, avec une multitude d'architectures offrant leurs avantages et leurs inconvénients. Parmi cette vaste famille, la LLSM s'impose comme une solution très efficace et performante pour imager les mécanismes cellulaires dynamiques en 3D dans des échantillons vivants. Un microscope LLSM monté au BIC en 2017 a permis la réalisation de nombreux travaux de recherche jusqu'à lors impossible en collaboration avec les instituts de la région.

Dans cette première partie, les principes fondamentaux de la microscopie de fluorescence seront rappelés pour ensuite définir les différentes techniques existantes et leurs apports. L'accent sera ensuite porté sur la microscopie SPIM afin d'en comprendre les particularités et les enjeux. Enfin, nous nous intéresserons spécifiquement à la LLSM, son fonctionnement, ses caractéristiques, et le type d'expériences qu'elle permet de réaliser.

2.1.1. Microscopie optique de fluorescence

2.1.1.1. Principe de fonctionnement d'un microscope optique

En microscopie de fluorescence moderne, les systèmes à optique infinie sont généralement utilisés (Figure 1). L'objectif (OB) est conçu pour former une image à l'infini. L'image est par la suite relayée par une lentille de tube (LT) qui forme une image agrandie de l'objet. L'oculaire (OC) permet la visualisation de l'image intermédiaire à l'infini. On peut aussi placer une caméra au plan intermédiaire.

Notons également que le plan de Fourier (le plan focal image de l'objectif)

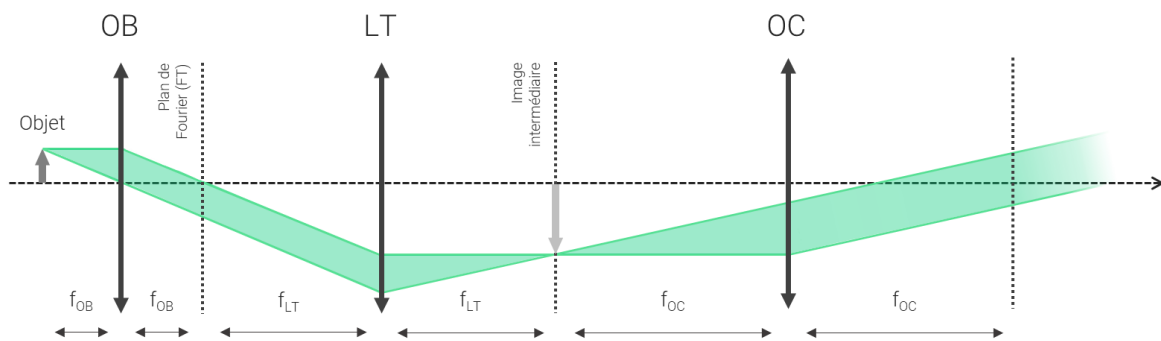


Figure 1 : Schéma d'optique géométrique de principe d'un microscope optique infini afocal. La coïncidence du plan focale de la lentille de tube (LT) et le plan image de l'objectif (OB) permet de rendre le système afocal. Une image intermédiaire de l'objet est créée à distance focale de LT et de l'oculaire (OC).

est accessible (Figure 1). Le plan de Fourier reçoit les informations sur les fréquences spatiales contenues dans l'échantillon. Modifier la phase (ou l'amplitude) de l'onde électromagnétique dans le plan de Fourier permet d'effectuer divers traitements optiques sur les informations fréquentielles et ouvre la voie à des techniques d'imagerie avancées, telle que la correction des aberrations.

2.1.1.2. Objectif en microscopie optique

Dans les microscopes optiques, l'objectif joue un rôle essentiel dans la mise en forme du faisceau d'excitation ou dans la formation de l'image.

- i. La distance de travail correspond à la distance entre la lentille frontale et le plan focal. Ce paramètre permet de définir la position à laquelle doit être placé l'objectif par rapport à l'échantillon et par conséquent, l'épaisseur maximum des échantillons pouvant être imagés par le microscope.
- ii. La distance focale correspond à la distance entre le plan principal objet (système optique composé de plusieurs lentilles) et son plan focal.

- iii. NA (ouverture numérique) est fonction de la distance focale et du diamètre de la pupille d'entrée et est définie par :

$$NA = n \times \sin(\alpha)$$

où α est le demi-angle du cône maximum de collection de la lumière et n , l'indice de réfraction. Elle mesure la capacité d'un objectif à collecter la lumière provenant d'un échantillon. Par exemple, une plus grande NA permet de collecter plus de lumière, améliorant la résolution et l'intensité de l'image.

- iv. La profondeur de champ est la distance, dans l'espace objet, le long de l'axe optique sur laquelle l'échantillon apparaît relativement net dans l'image. Elle est inversement proportionnelle à NA^2 et proportionnelle à la longueur d'onde.
- v. Une correction d'aberrations standards est généralement intégrée dans les objectifs modernes. La succession complexe de lentilles permet entre autres de corriger les aberrations sphériques ou chromatiques.
- vi. Le grandissement transversal est le rapport entre la dimension de l'image et celle de l'objet observé. Il est important de prendre en compte les autres optiques du système pour calculer le grandissement global du microscope.

2.1.1.3. Grandissement d'un microscope optique

Pour un microscope à optique fini, le grossissement est calculé en prenant en compte les grandissements de l'objectif et de l'oculaire :

$$\gamma_{fini} = \gamma_{objectif} \times \gamma_{oculaire}$$

Pour un microscope à optique infini, le grandissement est calculé par le rapport entre les distances focales de la lentille de tube (f_{TL} , Figure 1) et de l'objectif (f_{OB} , Figure 1) :

$$\gamma_{infini} = f_{tube} / f_{objectif}$$

2.1.1.4. Résolution latérale et axiale

En microscopie optique, la résolution est la plus petite distance séparant deux points sources de l'échantillon qui peuvent être séparés distinctement dans l'image.

2.1.1.4.1. Diffraction et tâche d'Airy

La diffraction de la lumière se produit lorsqu'une onde lumineuse rencontre un obstacle, ou une ouverture. Dans le cas d'une ouverture circulaire, la figure de diffraction est nommée tâche d'Airy (Figure 2). L'éclairement résultant est décrit par l'équation de Fraunhofer :

$$E(x) = E_0 \left(\frac{2J_1(\pi x)}{\pi x} \right)^2$$

où $x = d \sin \theta / \lambda$, avec d ; le diamètre de l'ouverture, θ ; l'angle entre l'axe de révolution orthogonal au centre de l'ouverture et la direction de propagation et λ ; la longueur d'onde, J_1 ; la fonction de Bessel de premier ordre et E_0 ; l'éclairement au centre de la figure de diffraction

La première annulation de cette fonction, correspondant au premier anneau d'intensité nulle, se produit à un angle θ_0 , illustré Figure 2 :

$$\theta_0 \approx 1,22 \frac{\lambda}{d}$$

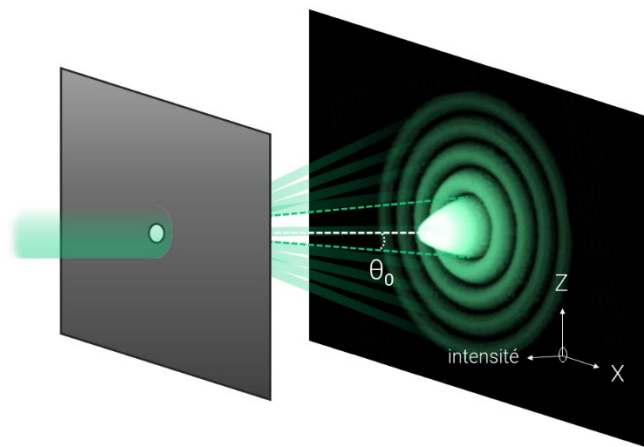


Figure 2 : Illustration de la tâche d'Airy. Une onde électromagnétique plane passe à travers une ouverture circulaire de diamètre faible et la diffraction crée une succession d'anneaux lumineux d'intensité décroissante en partant du centre. La première annulation correspond à l'angle θ_0 .

La pupille d'un objectif agit comme une ouverture circulaire. L'image d'un point source par un microscope peut donc être considérée comme une tâche d'Airy. Ses dimensions sont dépendantes de la capacité de l'objectif à collecter la lumière de ce point source et donc de son NA.

2.1.1.4.2. Fonction d'étalement du point (PSF)

La fonction d'étalement du point (PSF, de l'anglais « Point Spread Function ») décrit la réponse de l'objectif à une source ponctuelle. Elle indique comment la lumière de ce point source est étalée ou dispersée par le système optique pour former une image sur un capteur. La lumière est alors répartie sur une certaine zone autour du point initial, créant une image étalée de la source ponctuelle. Cette « dégradation » de la propagation de la lumière est principalement due à la diffraction, mais des phénomènes tels que les aberrations optiques ou la diffusion peuvent avoir une influence sur la forme de la PSF.

À partir de cette définition, on définit pour tout système optique, l'image I d'un point source comme le produit de convolution entre cet objet O et la PSF :

$$I = O \otimes PSF$$

2.1.1.4.3. Limite de diffraction et résolution

Si la résolution en microscopie est la capacité du système à discerner deux points sources et que chaque point source donne une tache d'Airy, il est aisé de comprendre que la résolution se définit comme la limite théorique avec laquelle il est possible de discerner deux taches d'Airy qui se chevauchent. En microscopie, cette limite est nommée limite de diffraction et est représentée par une distance minimale, en dessous de laquelle les objets sont indiscernables. Une valeur de 200 nm sert de point de référence en microscopie du visible. Pour la représenter, le critère de Rayleigh est le plus souvent utilisé :

$$r_{x,y} = 0,61 \frac{\lambda}{NA}$$

et permet de définir une résolution latérale théorique pouvant aller jusqu'à 200 nm pour la microscopie optique avec source dans le visible.

Pour discriminer deux points sources selon la direction axiale, la distance limite calculée par le critère de Rayleigh est :

$$r_z = 2n \frac{\lambda}{NA^2}$$

et permet de définir une résolution axiale théorique pouvant aller jusqu'à environ 800 nm pour la microscopie optique avec source dans le visible.

2.1.1.5. Contraste, bruit et échantillonnage de l'image

La capacité du microscope à représenter fidèlement la structure d'intérêt ne dépend pas que de la résolution optique. Plusieurs autres aspects peuvent être

limitants comme le contraste, le rapport signal à bruit et l'échantillonnage de l'image numérique.

- i. Le contraste peut être défini comme la capacité à discerner le signal pertinent d'une image du bruit de fond (« background » en anglais). Plus le contraste d'une image est important, plus le niveau de détails perceptibles l'est aussi. Ce paramètre est à la fois lié à l'objet observé et à la caméra. (1) Plus, le signal de fluorescence se démarquera du bruit de fond, meilleur sera le contraste. (2) Plus une caméra aura un offset faible et un nombre de « bits » élevés plus elle pourra représenter fidèlement un signal contrasté. On définit souvent le contraste par le ratio SBR (« Signal to Background Ratio » en anglais).
- ii. Le bruit joue aussi un rôle dans la qualité de l'image observée. Les sources de bruits sont multiples : bruit de coups (fluctuations intrinsèques de la lumière), bruit thermique, électronique, numérique, etc. On utilise souvent le rapport SNR (« signal to noise ratio » en anglais) pour caractériser la quantité de bruit dans un signal.
- iii. L'échantillonnage de l'image par la caméra est aussi décisif dans la bonne reconstruction de l'objet. Chaque pixel de la caméra représente une portion de l'objet observé dont la taille est communément définie par la taille d'un pixel de la caméra, sur le grandissement γ du système optique :

$$taille_{objet/px} = \frac{taille_{px}}{\gamma}$$

Cette taille doit satisfaire le théorème de Shannon-Nyquist : un signal doit être échantillonné à au moins deux fois la plus haute fréquence qu'il contient. En microscopie, cela signifie que pour résoudre une structure convenablement sur une image, la taille $_{objet/pixel}$ doit être inférieure ou égale à la moitié de la résolution du système optique. En cas de sous-échantillonnage, une partie de l'information spatiale collectée (les hautes fréquences de l'image) ne sera pas représentée convenablement. En cas de suréchantillonnage, la distribution de photons sera plus étalée sur l'ensemble du capteur et l'image perdra en intensité. Dans les deux cas, il convient alors de modifier le couple objectif-caméra en prenant en compte le niveau de résolution voulue pour l'expérience.

2.1.2. Principe de fluorescence appliquée à la microscopie optique

2.1.2.1. Principe théorique de la fluorescence

Le processus de fluorescence est le résultat d'une interaction spécifique entre une molécule et une onde électromagnétique incidente. Lorsqu'une molécule fluorescente absorbe une onde électromagnétique, ses électrons sont excités d'un état énergétique fondamental à un état excité plus énergétique. Ces niveaux d'énergie résultent de la nature de la molécule. Le diagramme de Jablonski (Figure 3) représente les niveaux d'énergie électronique (S_0 : singulet fondamental ; S_1 : singulet excité ; T_1 : triplet) d'une molécule au cours de son cycle de fluorescence et les échelles de temps associées.

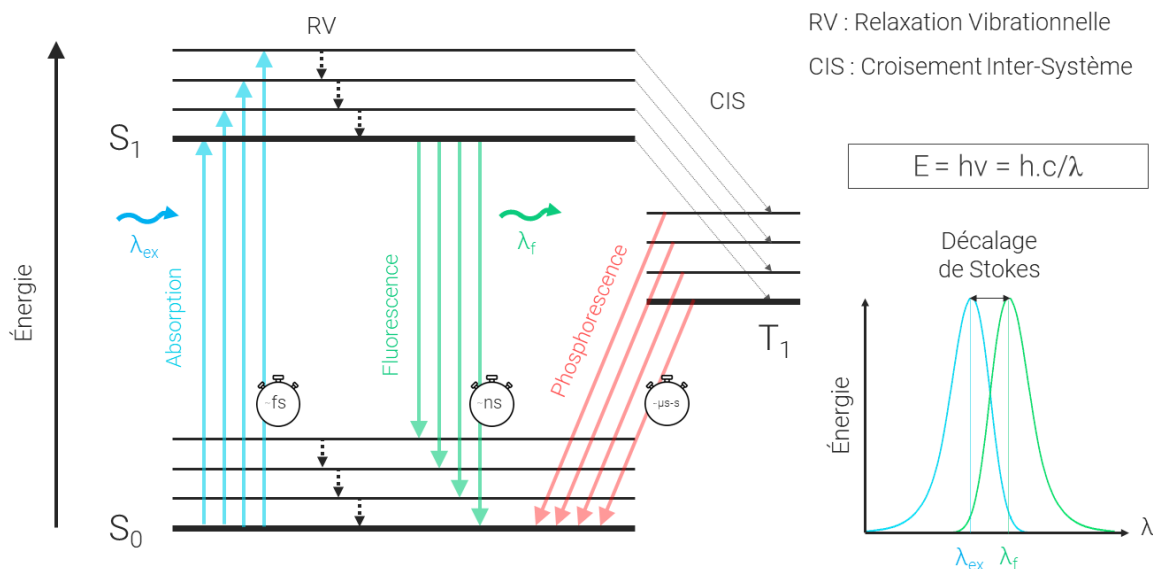


Figure 3 : Le diagramme de Jablonski renseigne sur le principe de fluorescence. Au cours du processus d'absorption des photons (flèches bleues), la molécule acquiert une quantité discrète d'énergie E , inversement proportionnelle à la longueur d'onde λ du photon incident (λ_{ex}). Les niveaux d'énergie des atomes constituant la molécule sont définis par sa structure électronique, c'est-à-dire par la distribution de ses électrons. L'absorption de λ_{ex} induit la transition d'un électron de la molécule à un niveau d'énergie plus important : un état singulet S_1 . La molécule va ensuite se relaxer pour revenir à son état d'énergie fondamental S_0 . Cette transition induit une perte d'énergie matérialisée par l'émission d'un photon d'énergie inférieure au photon incident (λ_f) : la fluorescence (flèches vertes). La différence d'énergie est à l'origine du décalage de Stokes qui permet de séparer optiquement la lumière d'excitation de la lumière d'émission. Des niveaux d'énergie supplémentaires (lignes moins épaisses) sont présents en raison des degrés de liberté de vibration/rotation des électrons. Ces niveaux d'énergie vibrationnels conduisent aux relaxations vibrationnelles (RV). Si l'énergie d'un photon est supérieure à la différence d'énergie entre deux états vibrationnels fondamentaux (S_0 et S_1 par exemple), l'énergie supplémentaire sera évacuée par perte (émission de chaleur, vibrations...), sans émettre de photon. L'électron peut aussi transiter d'un état S_1 à un état triplet, T_1 , par conversion inter-système (CIS). Pour revenir à l'état S_0 , l'électron va subir une transition plus lente, appelée phosphorescence (flèches rouges).

Il est important de noter qu'un fluorophore dans un état triplet est plus réactif et a de grandes chances d'être oxydé. Ce type d'interaction résulte en la perte irréversible des capacités d'absorption et d'émission du fluorophore, et donc

du signal émis par cette molécule. On nomme ce phénomène le photoblanchiment. Le contrôle de cet état triplet est également utilisé dans certaines techniques SMLM.

2.1.2.2. Caractéristiques et photophysique des fluorophores

Le choix d'un fluorochrome doit répondre à plusieurs critères en fonction de l'application visée. Obtenir un signal spécifique, durable et intense pour de l'imagerie fonctionnelle ou structurale est un challenge qu'il est important d'anticiper.

- i. Chaque molécule est caractérisée par un spectre d'absorption et d'émission. En fonction des lasers disponibles et de l'application souhaitée, il convient de choisir les fluorophores adéquats.
- ii. Des paramètres comme l'efficacité d'émission (rendement quantique), l'intensité ou la durée de vie moyenne de l'état excité (temps de déclin), peuvent être déterminants pour choisir un fluorophore.
- iii. Les fluorophores peuvent subir des réactions photochimiques qui peuvent altérer leurs structures chimiques, les rendre moins, voir non fluorescents et donc les photoblanchir. L'environnement et les conditions d'imagerie peuvent aussi influencer le photoblanchiment, l'intensité ou l'absorption d'une molécule : la polarité, le pH, la concentration, la température... Ces modifications limitent la durée d'observation des échantillons marqués et dégradent la qualité de marquage.

2.1.2.3. Techniques de marquage en microscopie de fluorescence

Le marquage d'un échantillon biologique en fluorescence consiste à cibler de manière spécifique une protéine ou un compartiment cellulaire d'intérêt avec un rapporteur fluorescent [2]. On peut opposer deux grandes familles de fluorophores : les protéines fluorescentes, et les fluorophores organiques.

- i. Les protéines fluorescentes permettent d'observer la localisation d'une protéine, mais aussi la dynamique de mécanismes cellulaires en les fusionnant à une protéine d'intérêt ou sous le contrôle d'un promoteur spécifique. Depuis la découverte de la GFP et de ses dérivés dans les années 90, de nombreux développements ont permis de créer des protéines fluorescentes de plus en plus performantes (brillance, stabilité ...), de donner accès à une gamme plus large de longueurs d'onde, ou encore de créer des protéines fluorescentes permettant d'observer des mécanismes physiologiques tels que le flux de calcium [3].

- ii. Les fluorophores organiques synthétiques sont conjugués à des anticorps ou à des ligands qui vont permettre de cibler la protéine ou la structure d'intérêt. De manière générale, les sondes organiques sont plus brillantes et photo-stables que les protéines fluorescentes, ce qui les rend très intéressantes dans le cas d'échantillons complexes, épais, photosensibles ou faiblement marqués. Avec l'essor des techniques de microscopie de SR - et l'exigence demandée quant à la qualité et à la brillance du marquage - des efforts importants sont dédiés au développement de nouvelles sondes afin d'améliorer leurs propriétés photophysiques et de faciliter l'imagerie du vivant à l'aide de fluorophores organiques [4].

En microscopie conventionnelle, l'observation d'échantillons vivants oriente en premier lieu le choix du type de sonde. En effet cette condition a pendant très longtemps limité les possibilités à l'utilisation de protéines fluorescentes de fusion. Grâce à des techniques de transfection, d'infection, d'électroporation ou encore par le recours à la transgénése, les constructions moléculaires contenant la protéine fluorescente choisie peuvent être exprimées dans les cellules ou dans les compartiments d'intérêt. Par opposition, lorsque l'échantillon peut être fixé, on peut alors utiliser des techniques d'immunomarquage ou de marquage avec des fluorophores organiques pour cibler une protéine d'intérêt ou un compartiment (marqueurs de membranes, du cytosquelette, des mitochondries, etc).

Dans ce domaine aussi, l'émergence des nouvelles techniques de microscopie et notamment de la SR a poussé au développement de nouvelles méthodes et outils de marquage [2], parmi lesquels nous ne citerons ici que quelques exemples. (1) En considérant la notion de résolution, les techniques de SMLM permettent d'accéder à des niveaux de résolution latérale de ~10-20 nm, mais le complexe anticorps primaire/secondaire induit à lui seul une distance entre la cible et le rapporteur d'environ 30 nm, ce qui peut biaiser les analyses quantitatives. (2) Pour répondre à cette problématique, le développement d'anticorps issus de camélidés, ou d'anticorps synthétiques types « nanobodies » permet d'accéder au marquage de protéines endogènes sans modifier de manière trop importante la taille des complexes lors du marquage. Enfin, le développement des outils basés sur les « enzymes auto-étiquetables », comme les technologies SNAP-TAG ou HALO-TAG, permet d'associer les avantages de l'expression d'une protéine de fusion avec l'utilisation de fluorophores organiques, facilitant ainsi l'utilisation des techniques de SR sur échantillons vivants.

En conclusion le choix des outils et des méthodes de marquage va dépendre de l'échantillon à observer (vivant ou fixé), de la technique d'imagerie (contrainte par exemple sur la photophysique du fluorophore), et de la disponibilité des outils de marquage (« Existe-t-il un anticorps spécifique de la protéine ciblée ? »). Ce choix doit, dans tous les cas, être pris en considération lors de l'analyse et l'interprétation des résultats, afin d'éviter des biais liés à la technique.

2.1.3. Principe général de la microscopie de fluorescence

La Figure 4 illustre le cas simple de la microscopie de fluorescence en champ large.

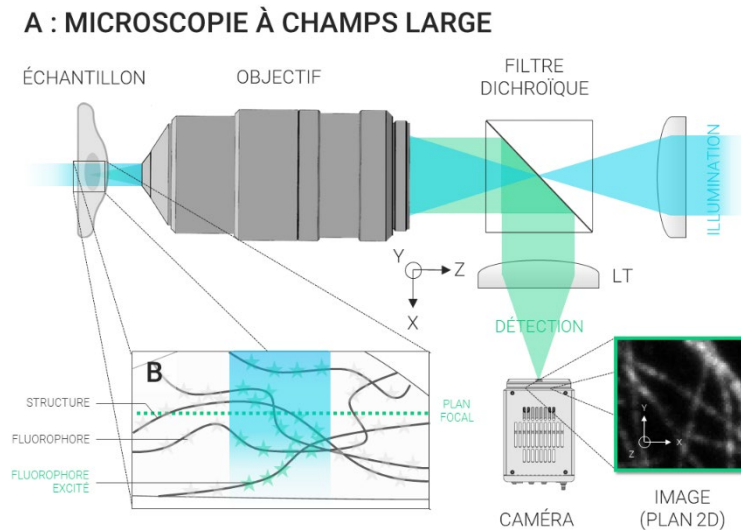


Figure 4 : Schéma de principe de la microscopie à champs larges. Un échantillon est marqué avec un ou plusieurs fluorochromes liés à des structures d'intérêt dans l'échantillon (encadré). Une source lumineuse, de longueur d'onde donnée (ILLUMINATION, en bleu) et spécifique au spectre d'excitation des fluorophores passe à travers un objectif et est projeté à l'infini pour traverser le volume de l'échantillon. L'ensemble des molécules sont excitées, et émettent de la fluorescence (FLUOROPHORE EXCITÉ, encadré B). Le faisceau de détection (DÉTECTION, en vert) résultant est alors transmis à une caméra, par l'intermédiaire de l'objectif. La fluorescence est réfléchié par un filtre dichroïque, qui en amont transmet le faisceau d'excitation. Enfin, la lentille de tube (LT) focalise la fluorescence sur la caméra qui image les fluorophores et donc la ou les structures marquées. L'image résultante est une image 2D qui intègre l'ensemble des points sources intégrés sur toute la profondeur de l'illumination.

Il faut noter que la microscopie de champ large, même si elle a l'avantage d'être rapide et simple, ne permet pas de visualiser des structures à l'intérieur d'échantillons épais. L'ensemble des photons émis dans l'échantillon, collectés par l'objectif et imagés sur la caméra, vont contribuer à former l'image, qu'ils proviennent du plan focal ou pas. On dit que ce microscope ne permet pas de sectionnement optique. De plus, l'effet néfaste du photoblanchiment sera induit sur toute la profondeur de l'échantillon. Typiquement on utilise le microscope en champ large pour observer des échantillons fins tels que des monocouches cellulaires.

2.1.4. Microscopie de fluorescence à sectionnement optique pour l'imagerie 2D ou 3D

La recherche en biologie s'effectue de plus en plus souvent sur des échantillons épais plus représentatifs d'un organisme entier que des cellules en

culture. Pour réaliser une imagerie structurelle ou fonctionnelle en 2D ou 3D sur ces échantillons, il faudra donc employer une méthode de microscopie qui préserve le contraste de l'image même en profondeur. De nombreuses techniques à sectionnement optique proposent des solutions avec leurs lots d'avantages et d'inconvénients.

- i. La microscopie confocale à balayage laser (CLSM, de l'anglais « Confocal Laser Scanning Microscopy ») [5] utilise un faisceau d'excitation, confiné en un point par l'objectif qui scanne l'échantillon en deux dimensions. La fluorescence repasse par l'unité de balayage où il est « descanné » avant d'être focalisé sur un sténopé, de telle sorte à filtrer le signal hors focus. Seule la lumière provenant du plan focal de l'objectif contribue à la formation de l'image sur un détecteur ponctuel. En déplaçant l'échantillon le long de l'axe optique, la reconstruction d'une image 3D est possible. Le sectionnement optique par filtrage offre un fort contraste et une résolution axiale supérieure à la microscopie à champ large. Cependant, cette technique souffre d'une résolution temporelle limitée et d'un fort photoblanchiment par le balayage d'un point d'excitation très énergétique.
- ii. En microscopie confocale à disque tournant [6] (SDCM, de l'anglais « Spinning-Disk Confocal Microscopy »), le chemin d'excitation intègre un disque de sténopés qui divise l'illumination de l'échantillon. Préalablement, un disque de microlentilles focalise la lumière sur les sténopés afin de diminuer les pertes de lumière. Lorsque le disque tourne, le faisceau d'excitation balaye l'échantillon en rangées, construisant l'image. En modifiant la vitesse de rotation du disque, le diamètre ou l'espacement des trous, il est possible d'optimiser la luminosité, le contraste et la qualité de l'image. La fluorescence réémise par l'échantillon est collectée par l'objectif. Elle traverse ensuite le disque qui ne laisse passer que les rayons de fluorescence orthogonaux, provenant du plan focal de l'objectif. La grande vitesse de rotation du disque ainsi que l'excitation à un niveau de lumière relativement bas permet des acquisitions très rapides et limite considérablement le photoblanchiment et la phototoxicité. C'est une alternative plus adaptée à l'imagerie d'échantillons vivants.
- iii. La microscopie multiphotonique [7] (MPM, de l'anglais « Multi-Photon Microscopy ») s'est imposée comme un outil majeur pour l'imagerie cellulaire en profondeur. La MPM profite du principe d'absorption non linéaire : en combinant temporellement, deux photons d'énergie, dont la somme est égale au saut énergétique, le fluorophore va être excité. L'utilisation conjointe d'un laser impulsif et d'un objectif à haut NA permet d'obtenir une densité de photons élevée au point focal et conduit à un haut confinement du processus d'excitation. Tous les photons, même ceux diffusés, sont collectés pour former l'image sans nuire au sectionnement optique et

en améliorant la sensibilité. Cela rend la MPM plus résistante aux propriétés de diffusion de l'échantillon et donc plus adaptée à l'imagerie en profondeur ($> 100 \mu\text{m}$). L'illumination se situe dans la fenêtre optique biologique (proche IR, 700-1300 nm), où la diffusion et l'absorption des tissus sont les plus faibles, ce qui permet une meilleure pénétration du faisceau. En outre, les photons d'excitation interagissent beaucoup moins avec l'échantillon, ce qui diminue la phototoxicité et rend la MPM plus adaptée à l'imagerie du vivant. Néanmoins, le photoblanchiment et la phototoxicité se produisent toujours dans le volume focal.

- iv. La microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF) [8] permet de visualiser une tranche très fine de l'échantillon, à l'interface avec la lamelle. Lorsqu'un faisceau atteint l'interface de deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de la lumière est réfléchiée et une partie est réfractée. Si l'angle d'incidence du faisceau est supérieur à l'angle critique, alors toute la lumière est réfléchiée. Une onde évanescente est toutefois créée sur une très courte distance ($\sim 100\text{-}200 \text{ nm}$) dans le milieu d'indice de réfraction plus faible (l'échantillon). C'est ce principe qui est utilisé pour la microscopie TIRF. La profondeur d'illumination limitée induit une excitation des molécules fluorescentes situées uniquement à proximité immédiate de l'interface (dans la couche d'onde évanescente). Cela limite l'excitation hors plan focal et réduit considérablement le bruit de fond tout en améliorant la résolution axiale. Comme on le verra plus tard, la modalité TIRF est souvent employée pour l'imagerie SMLM.
- v. La microscopie par faisceau hautement inclinée (HILO) [9] est une extension de la microscopie TIRF qui permet d'augmenter la profondeur d'imagerie. Ici, le faisceau d'excitation rentre avec un angle légèrement inférieur à l'angle critique défini auparavant. Ceci a pour effet de créer une illumination oblique avec un sectionnement moins fin qu'en TIRF, mais avec une pénétration pouvant aller jusqu'à $1\text{-}2 \mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle. L'approche HILO est également souvent employée pour l'imagerie SMLM.

Les techniques à sectionnement optique reposent, soit sur des techniques de balayage (CLSM, SDCM, MPM), soit sur des techniques d'imagerie de plan entier (TIRF, HILO) et offrent de nombreux avantages pour l'imagerie 2D hautement résolue. Cependant, de par leurs principes de fonctionnement, toutes ces techniques restent limitées pour l'imagerie 3D rapide à haute résolution. Le Tableau 1 présente les spécifications typiques de ces techniques de microscopie à sectionnement optique.

	$R_{s_{x,y}}$	R_{s_z}	R_T (2D)	Profondeur	Photoblanchiment
CLSM	180 nm	600 nm	1000 ms	< 100 μm	+++
SDCM	200 nm	600 nm	100 ms	< 50 μm	++
MPM	300 nm	1000 nm	1000 ms	800 μm	++
TIRF	200 nm	100 nm	100 ms	100 nm	+
HILO	200 nm	1 μm	100 ms	1 μm	+

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des caractéristiques principales de différentes techniques de microscopie de fluorescence. CLSM : Microscopie confocale. SDCM : Microscopie Spinning-Disk. MPM : Microscopie multiphotons. TIRF : Microscopie TIRF. HILO : Microscopie HILO. RS : Résolution spatiale. RT : Résolution temporelle.

2.1.5. Microscopie à feuille de lumière

Depuis une vingtaine d'années, la LSFM a ouvert de nouvelles perspectives dans l'imagerie 3D en biologie. Près de cent ans après une première publication de Siedentropf et Zsimondy [10], Voie et al. démontraient la première utilisation de la LSFM pour la microscopie de fluorescence avec la technique OPFOS (de l'anglais « Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning ») [11]. Depuis, bien que le principe général de cette technique reste basé sur l'illumination d'une nappe de lumière au plan focal, de nombreuses techniques et architectures ont été développées.

2.1.5.1. Principe de la microscopie à feuille de lumière

En LSFM, les chemins d'excitation et de détection sont généralement dissociés, comme illustré Figure 5.A. Une feuille de lumière est créée (Figure 5.B) en sortie de l'objectif d'excitation (OE), afin d'exciter uniquement une section de l'échantillon. Le plan focal de l'objectif de détection (OD) coïncide avec le plan illuminé dans l'échantillon. Dans le modèle illustré Figure 5.A, chaque acquisition 2D correspondra à la profondeur de champ et au FOV de l'objectif de détection. L'empilement de plans successifs, en modifiant la position de l'échantillon, ou du couple feuille de lumière/plan focal de détection, permet de créer une acquisition 3D.

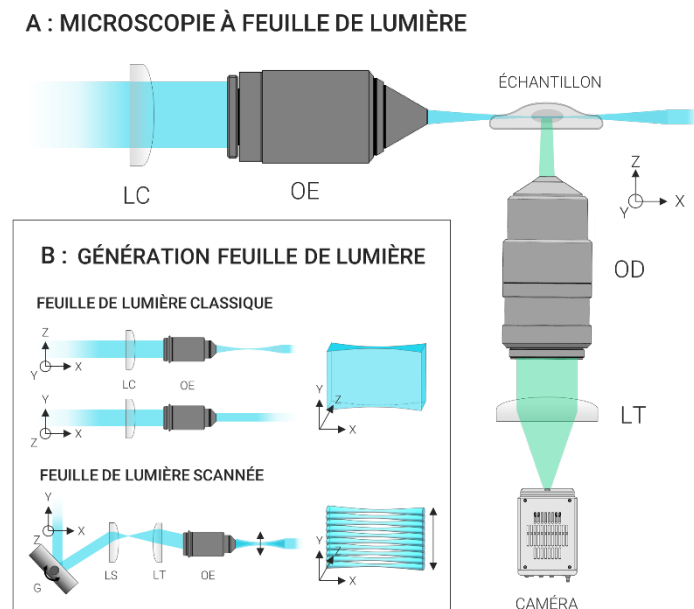


Figure 5 : Schéma de principe de la microscopie à feuille de lumière. **A.** Un objectif d'excitation (OE) et de détection (OD) sont placés orthogonalement autour d'un échantillon. Le chemin optique d'excitation forme l'illumination sous forme de feuille de lumière afin de n'illuminer qu'un plan de l'échantillon. Dans ce cas, une lentille cylindrique (LC) est placée devant l'OE. Le plan focal de l'OD correspond au plan illuminé de l'échantillon. **B.** Plusieurs méthodes permettent de générer une feuille de lumière. La LC, couplée à l'OE permet de générer une feuille de lumière gaussienne. La feuille de lumière scannée consiste à balayer, verticalement, un faisceau focalisé avec un galvanomètre (G) en amont d'un couple lentille de scan (LS) / lentille de tube (LT).

La LSFM présente de nombreux avantages comparés aux autres techniques de sectionnement optique, notamment pour l'imagerie 3D d'échantillons vivants :

- i. Le sectionnement optique est assuré par la feuille de lumière. L'épaisseur de celle-ci aura une incidence sur la résolution axiale du microscope.
- ii. Le confinement de l'illumination dans le plan imagé permet aussi de considérablement diminuer le photoblanchiment des fluorophores et les dégradations causées à l'échantillon, en dehors du plan d'imagerie.
- iii. L'ensemble du plan focal est imagé de manière simultanée. Avec des plans d'excitation et d'imagerie orthogonaux, la LSFM améliore considérablement la vitesse d'imagerie.

La modalité LSFM requiert trois composantes distinctes, mais interdépendantes : (1) la création de la feuille de lumière, (2) la détection de fluorescence et (3) le montage de l'échantillon.

2.1.5.2. Création de la feuille de lumière

Dans le cas le plus simple, la feuille de lumière peut être générée de deux manières, représentées Figure 5.B. Soit, un plan d'illumination est créé à partir d'un relai optique composé d'une lentille cylindrique (LC) et de l'objectif d'excitation (OE) [12]. Soit un faisceau focalisé est balayé le long du plan orthogonal à l'axe optique de l'objectif de détection, à l'aide d'un miroir galvanométrique (G) [13]. En fixant une vitesse de balayage supérieure au temps d'intégration de la caméra, une nappe de lumière est ainsi perçue par la caméra. On distingue donc la microscopie à feuille de lumière statique à la microscopie à feuille de lumière numériquement scannée (DSLMS, de l'anglais « Digitally Scanned Light sheet Microscopy »). La feuille de lumière dynamique apporte une meilleure homogénéité d'illumination, mais est plus sujette aux effets de striations. Ces artefacts apparaissent sous forme de bandes dans les images acquises et sont causés par les interférences (absorption locale et diffusion) au moment où la lumière traverse l'échantillon.

À l'origine, et dans la plupart des systèmes existants aujourd'hui, la feuille de lumière est formée à partir d'un faisceau laser avec un profil d'intensité gaussien. Ce type de faisceau est divergeant selon son axe de propagation. La particularité de ce type de faisceau réside dans la dépendance entre la longueur et l'épaisseur du faisceau. Sa géométrie est communément décrite à travers l'illustration suivante (Figure 6) :

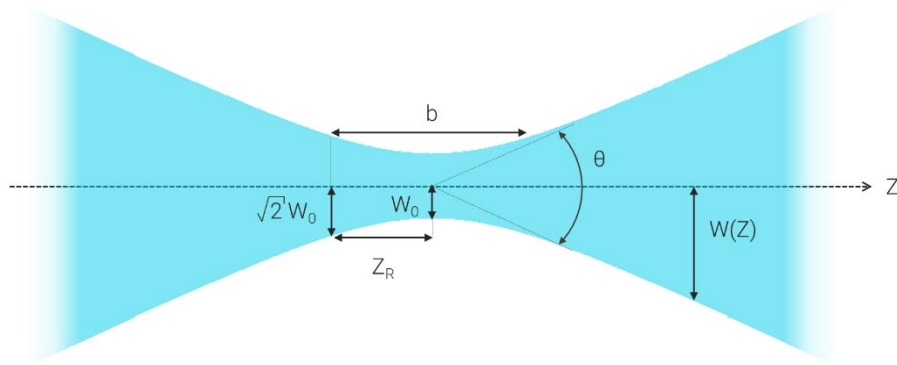


Figure 6 : Schéma d'une feuille de lumière gaussienne et dimensions associées.

La largeur du faisceau w_z , pour une longueur d'onde λ donnée, selon l'axe de propagation z est définie par :

$$w_z = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_0}\right)^2}$$

où, w_0 , aussi nommé « waist », est la demi-largeur minimale du faisceau situé à l'origine (point focal) de la divergence, z ; la distance entre l'origine et la partie du faisceau considéré et z_0 le point d'origine du faisceau défini par :

$$z_0 = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

En LSFM, le « waist » w_0 est défini comme la demi-largeur minimale qui sera utilisée pour le sectionnement optique créée par l'illumination. Ainsi, pour un objectif d'ouverture numérique NA, on peut approximer la largeur du faisceau utile, et donc la résolution axiale, comme :

$$2w_0 = 2 \frac{\lambda}{\pi NA}$$

La longueur de Rayleigh z_r est définie comme la distance à l'origine de la feuille où la largeur peut être considérée constante (inférieur à $\sqrt{2}$ fois le « waist »). Le double de cette valeur, nommé paramètre confocal b , correspond à la longueur de feuille utile pour l'illumination, et donc au FOV :

$$b = 2z_r = 2 \frac{\pi w_0^2}{\lambda} = 2 \frac{\lambda}{\pi NA^2}$$

La conséquence directe est le fait que la longueur de la feuille varie avec son épaisseur. Ainsi si on veut une feuille de lumière de 1mm de long, son épaisseur sera autour de 15 μ m. Par contre si on souhaite une feuille de lumière de 1 μ m

d'épaisseur celle-ci aura une longueur utile de moins de 4 μ m. Il est donc nécessaire de trouver un compromis entre une feuille fine et courte ou épaisse et longue en fonction de l'échantillon et de la résolution souhaitée.

2.1.5.3. Détection de fluorescence en LSFM

En LSFM conventionnelle, le chemin d'imagerie est identique à celui d'un microscope en champ large. On choisira l'objectif d'imagerie principalement en fonction de la résolution latérale souhaitée. La taille de l'échantillon déterminera la distance de travail. Le FOV souhaitable fixera le grandissement du couple objectif-lentille de tube et la taille du capteur sur la caméra.

On prendra aussi soin de ne pas sous échantillonner l'image en choisissant un grandissement et une taille de pixel satisfaisant le critère de Nyquist. Pour de nombreuses applications, une caméra sensible, à faible bruit et rapide est souhaitable. De ce point de vue les caméras sCMOS sont les meilleures candidates.

2.1.5.4. Montage de l'échantillon en LSFM

L'architecture de la LSFM présente à la fois des avantages et des limites pour l'imagerie et le montage des échantillons. La géométrie orthogonale des plans d'imagerie et d'excitation offre la capacité d'imager très rapidement en 3D des échantillons parfois volumineux.

Cependant, l'échantillon doit être monté à la distance de travail de l'objectif d'imagerie (comme sur tout autre microscope) mais doit également être placé au point focal de l'objectif d'illumination, là où la feuille de lumière est la plus fine. De plus, comme l'imagerie volumétrique est principalement réalisée en déplaçant l'échantillon plutôt que les objectifs, l'échantillon doit alors être monté de manière à empêcher tout mouvement lors de sa translation et/ou de sa rotation. La géométrie d'imagerie, l'encombrement et la fixation de l'échantillon ont pour conséquence que les microscopes LSFM sont conçus pour imager des échantillons sur une gamme de taille limitée. On dit parfois que le microscope LSFM est construit « autour de l'échantillon ». Par exemple, si on veut faire de l'imagerie à l'échelle subcellulaire, on utilisera des objectifs à grande ouverture numérique, donc avec des distances de travail courtes, ce qui limitera fortement la taille des échantillons.

Il existe un grand nombre de méthodes de montage selon la taille, le milieu d'immersion, la solidité, la forme, la stabilité de l'échantillon, comme démontré dans la revue de Reynaud et al. [14].

2.1.5.5. Un éventail de techniques adaptées à l'imagerie de divers échantillons

L'ensemble des contraintes liées à la création de la feuille de lumière, les artefacts dus à l'illumination de l'échantillon et à l'encombrement stérique ont conduit au développement de nombreuses techniques LSM.

2.1.5.5.1. Amélioration de la feuille de lumière

Pour contrer le phénomène de striation, Huisken et al. [15] propose avec le mSPIM (de l'anglais « multidirectionnal Single Plane Illumination Microscopy ») d'utiliser deux feuilles de lumière, légèrement pivotantes, provenant de deux objectifs placés de part et d'autre de l'échantillon, dans le but d'homogénéiser l'illumination de l'échantillon et donc de réduire ces artefacts.

Comme développé précédemment, la dépendance longueur-épaisseur du faisceau gaussien est une contrainte majeure en LSM. En effet, il est difficile de garder une résolution axiale optimale sur un grand FOV. Deux méthodes majeures permettent de réduire ce phénomène : (1) les méthodes de balayage axial de la feuille de lumière et (2) l'utilisation des faisceaux non diffractifs.

Les développements concernant le premier point consistent principalement à utiliser une feuille de faible longueur et de faible épaisseur afin d'illuminer l'échantillon avec la partie la plus fine de la feuille, en translatant celle-ci selon son axe de propagation. L'inconvénient majeur de ces méthodes est que la rapidité du système d'imagerie est dégradée, car limitée par le balayage de la feuille.

- i. Gao et al. propose, en 2015 [16], de combiner le balayage d'un faisceau de lumière très fin et court le long de son axe de propagation, avec un balayage le long du plan orthogonal à l'axe optique de l'objectif de détection, comme en DSLM. L'image est ensuite reconstruite en combinant l'ensemble des FOV. Cette méthode offre la capacité d'imager un grand FOV avec une très bonne résolution axiale, mais réduit la vitesse d'acquisition et augmente le photoblanchiment de l'échantillon en raison de l'exposition répétée.
- ii. La microscopie à feuille de lumière balayée axialement (ASLM de l'anglais « Axially Swept Light sheet Microscopy ») proposée par Dean et al. [17] modifie le concept de DSLM en combinant le déplacement de la feuille de lumière selon son axe de propagation avec le « rolling-shutter » d'une caméra sCMOS. Concrètement, seuls les pixels dans l'axe du paramètre confocal de la feuille sont activés, ce qui permet de profiter de la zone imagée avec la meilleure résolution axiale, et ceci sur un très large FOV grâce à l'utilisation de lentille cylindrique. Là encore, le balayage axial de la feuille de lumière, s'appuyant généralement sur des techniques de « remote focusing » est coûteux en temps, car généralement basé sur l'utilisation d'actionneurs

piézoélectriques. Des améliorations récentes utilisant un miroir galvanométrique ont montré une amélioration sensible de la vitesse de balayage [18]. Par ailleurs, l'utilisation de fortes ouvertures numériques pour l'illumination réduit sensiblement l'avantage de faible phototoxicité de l'illumination par une feuille de lumière.

- iii. Le meso-SPIM [19] (de l'anglais « mesoscale Selective Plane Illumination Microscopy ») combine également ASLM et DSLM en balayant un faisceau gaussien faiblement focalisé selon l'axe de propagation et l'axe vertical. Ce système permet d'imager sur un très grand FOV et est idéal pour l'imagerie d'échantillons clarifiés de plusieurs cm^3 .

La seconde méthode consiste à mettre en œuvre des faisceaux non diffractifs, qui, sur une distance donnée, présentent une divergence plus faible que les faisceaux gaussiens, c'est-à-dire conservent une épaisseur homogène sur cette distance.

- i. Planchon et al. [20], puis Gao et al. [21] démontrent tous deux l'utilisation du faisceau de Bessel pour l'imagerie de fluorescence. Ce faisceau, scanné le long du plan focal de l'objectif de détection, permet d'obtenir une bonne résolution axiale ($\approx 600 \text{ nm}$) sur un FOV de l'ordre de $50 \mu\text{m}$.
- ii. Vettenburg et al. [22] montre que l'utilisation d'un faisceau d'Airy permet d'obtenir une finesse de feuille d'environ 850 nm sur un FOV d'un peu moins de $100 \mu\text{m}$.

Cependant, la création de ces faisceaux est accompagnée de lobes latéraux importants qui dégradent le sectionnement optique et donc le contraste de l'image. L'illumination « lattice » utilisée dans le LLSM, présentée dans la partie suivante, permet de réduire l'énergie présente dans les lobes latéraux.

2.1.5.5.2. Architecture des microscopes à feuille de lumière

Parallèlement, de nombreuses nouveautés architecturales ont été imaginées pour profiter de la maximisation du sectionnement optique sur une zone plus étendue, afin d'imager des échantillons de forme, de taille et composition différente.

L'imagerie multivue consiste à imager un même échantillon sous plusieurs angles de vues et de combiner les images 3D acquises à différentes positions. Le principal effet est de s'affranchir des effets de striations croissant le long de l'axe de propagation de la feuille, en fusionnant plusieurs volumes dont l'angle d'illumination a été déplacé. On peut notamment citer le MuVi-SPIM [23], ou le IsoView [24] qui utilisent un couple d'objectifs excitation-détection. Cette « duplication » au sein d'un même système permet de multiplier le nombre

d'images acquises simultanément, mais au prix de modifications complexes. Ils démontrent tous deux une grande stabilité d'imagerie, sur de très grands FOVs et avec une excellente résolution.

Cependant, ces architectures encombrant la zone d'imagerie et ne sont pas adaptées à tous les échantillons. En effet, ces microscopes requièrent un montage complexe de l'échantillon, souvent dans des carottes d'agarose, pour pouvoir le suspendre dans l'espace limité entre les objectifs. Cette proximité contraint également à l'utilisation d'objectifs à faible NA, plus petits, et donc réduit la résolution spatiale du microscope. Le développement de microscope à feuille de lumière inversé et/ou n'utilisant qu'un seul objectif a permis de limiter l'encombrement stérique autour de l'échantillon.

- i. La LSFM inversée (OTLS, de l'anglais « Open-Top Light Sheet microscopy ») consiste à imager l'échantillon en configuration inversée, à l'aide d'un couple d'objectifs illumination-détection, placé à 90° sous la lamelle. Strnad et al. [25] développent ce type de système en 2015 pour imager des échantillons embryonnaires à travers un porte-échantillon personnalisé, avec des résolutions semblables à la microscopie confocale. La contrainte principale de ce type de système est que les faisceaux traversent successivement l'échantillon, la lamelle et le milieu d'imagerie, avec un angle de 45° ce qui a pour effet de produire d'énormes aberrations optiques. Une solution consiste à modifier le porte-échantillon pour supprimer une partie de ces aberrations [26]. Une configuration récente, présentée par Glaser et al. [27], vise à utiliser un objectif pour l'illumination et deux objectifs de détection ; l'un placé à la verticale sous l'échantillon (à 45° du plan illuminé) et l'autre orthogonalement à la feuille de lumière (à 90° du plan illuminé). En plus des avantages de la microscopie OTLS, cette configuration permet de trouver la meilleure combinaison entre résolution et vitesse d'imagerie, ce qui rend ce système très versatile.
- ii. Il existe aussi des LSFM n'utilisant qu'un seul objectif pour l'illumination et la détection. Initié par Dunsby [28], cette méthode vise à éclairer l'échantillon avec un plan d'illumination oblique, non perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif. La fluorescence est ensuite collectée par le même objectif, et une paire d'objectifs, en aval du système, sert à « redresser » le plan d'imagerie vers la caméra. Les techniques SCAPE [29], [30], (de l'anglais « Swept and Confocally Aligned Planar Excitation ») reprennent ce procédé en y ajoutant un miroir à balayage pour déplacer très rapidement la feuille oblique. Combiné au déplacement de l'échantillon, cette méthode permet une imagerie 3D extrêmement rapide.
- iii. Une autre méthode consiste à utiliser un miroir placé à 45° du plan horizontal de la lamelle et un objectif placé sous l'échantillon. Le faisceau est alors envoyé, par l'objectif, vers le miroir, qui réfléchit le

faisceau à 90° sur l'échantillon. Une feuille de lumière orthogonale à l'objectif illumine alors l'échantillon et la fluorescence est collectée par l'objectif. Ce système, nommé soSPIM [31] (de l'anglais « single-objective Selective Plane Illumination Microscopy »), permet l'utilisation d'objectif à très forte NA et donc l'imagerie haute et super résolution à l'intérieur d'échantillons épais.

2.1.6. Microscopie à feuille de lumière « lattice »

Parmi les nombreux développements en LSFM, la réalisation du microscope LLSM en 2014 par l'équipe d'Eric Betzig [1], représente une amélioration substantielle pour l'imagerie 3D en très haute résolution, à très haute fréquence pour l'imagerie d'échantillons fixés et vivants. L'innovation majeure réside dans l'illumination par une feuille de lumière non diffractive, capable d'imager un plus grand FOV en gardant une épaisseur de feuille submicrométrique et constante.

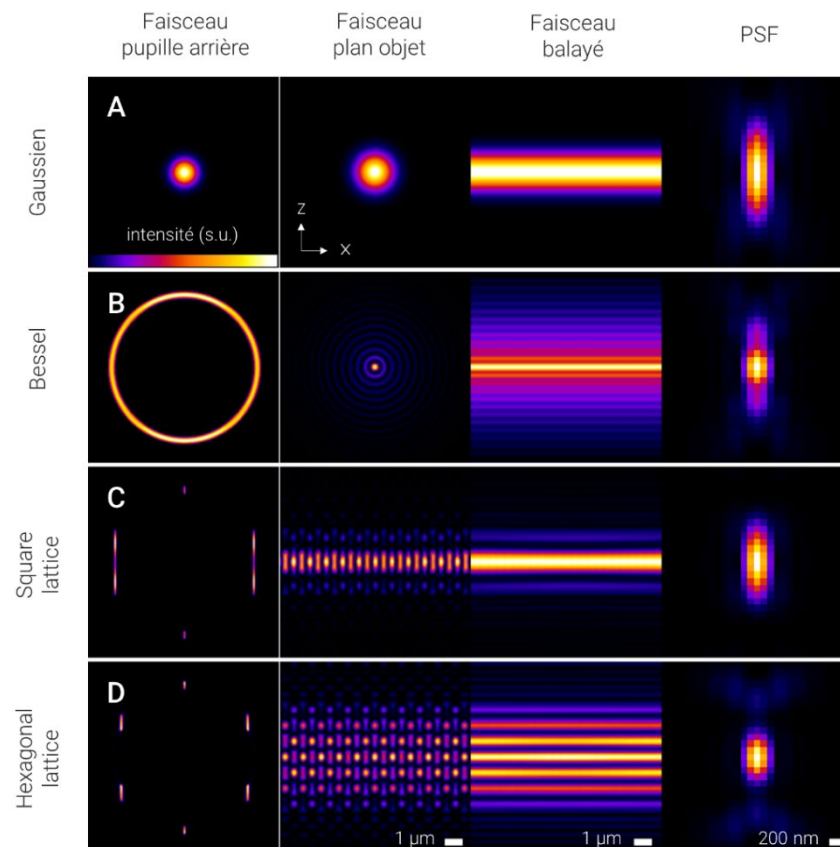


Figure 7 : Représentation des différents faisceaux d'illumination en microscopie « lattice » et comparaison avec la feuille de lumière gaussienne (adapté de Chen et al. [1]). Chaque colonne représente le faisceau à différentes étapes de formation et une illustration de la PSF XZ résultante. **A.** Formation d'une feuille de lumière gaussienne. **B.** Formation d'un faisceau de Bessel. **C.** Formation d'un faisceau « lattice » carré. **D.** Formation d'un faisceau « lattice » hexagonal.

Un faisceau gaussien (Figure 7.A) qui illumine la pupille arrière d'un objectif permet de créer une LS par balayage latéral (selon l'axe X, ici). C'est la technique DSLM. La PSF résultante peut être de l'ordre de $1\ \mu\text{m}$ selon Z (axe perpendiculaire à la LS) mais sur une longueur limitée à quelques μm . Pour augmenter la longueur de la feuille, on peut employer un faisceau Bessel qui est généré par une illumination circulaire fine dans la pupille arrière d'un objectif (Figure 7.B). Le balayage en X de ce faisceau à travers le plan focal de détection XY produit une LS dont la majorité de l'énergie est confinée sur le plan central [16]. Cependant, les lobes latéraux du faisceau de Bessel (anneaux concentriques autour du faisceau central) induisent une illumination hors focus parasite. Ainsi, bien que le Bessel consiste en un faisceau plus fin (meilleur sectionnement optique) sur une plus grande longueur (plus grand FOV) qu'un faisceau gaussien, l'illumination « parasite » limite la résolution spatiale offerte par ce type de faisceau.

De ce constat, Chen et al. [1], proposent l'utilisation d'une somme de faisceaux de Bessel qui constituent un réseau non diffractant périodique, ce qu'on appelle aussi un « lattice » optique. L'idée consiste à superposer plusieurs faisceaux de Bessel, afin d'induire des interférences destructives qui vont annihiler les lobes latéraux. L'illumination hors focus d'un faisceau « lattice » est donc considérablement réduite par rapport à un faisceau de Bessel scanné (Figure 7.C). Pour créer ce type d'illumination, le faisceau suit le trajet d'excitation suivant :

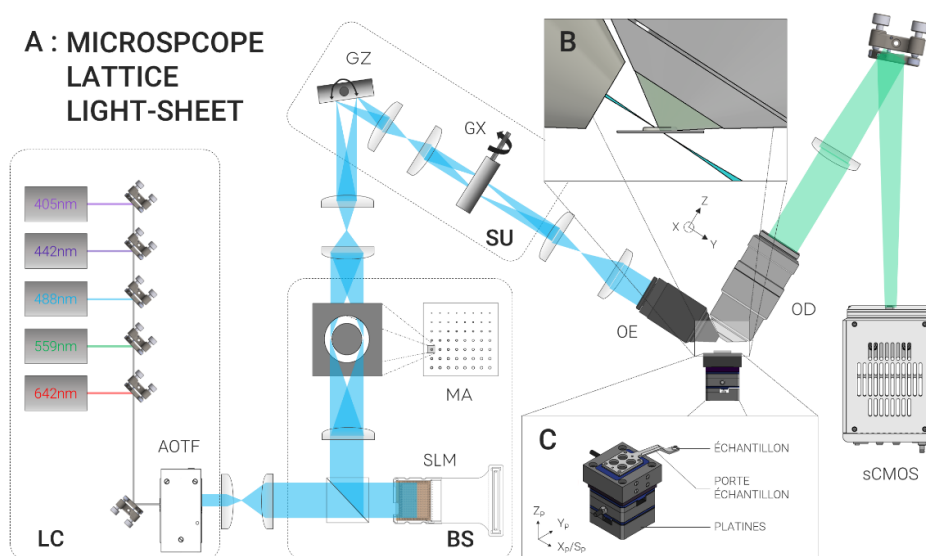


Figure 8 : Schéma d'un microscope à feuille de lumière « lattice ». **A.** Un banc laser avec cinq lasers contrôle puissance et longueur d'onde grâce à un AOTF (LC : Laser Combiner). Un ensemble constitué d'un SLM et d'un masque annulaire (MA) permet de créer le « lattice » (BS : Beam Shaper). Deux galvanomètres permettent la translation de cette illumination selon les axes Z (GZ) et X (GX) (SU : Scanning Unit). En oscillant GX, la feuille de lumière est créée en sortie de l'objectif d'excitation (OE) et illumine un plan de l'échantillon, perpendiculairement à l'objectif de détection (OD). La fluorescence du plan d'illumination est détectée grâce à une caméra sCMOS. **B.** Une feuille de lumière très fine ($\sim 0,5\ \mu\text{m}$) et allongée ($>15\ \mu\text{m}$ selon Y et $\sim 100\ \mu\text{m}$ selon X) illumine un plan de l'échantillon. **C.** L'échantillon est monté sur une lamelle de verre située au bout du porte-échantillon. Des platines de translation (X_p, Y_p, Z_p) permettent de positionner l'échantillon, et une platine piezoélectrique sert au balayage latéral rapide ($S_p=X_p$) pour les acquisitions 3D.

- i. Le faisceau d'entrée est élargi de telle sorte à illuminer une fine bande d'un modulateur spatiale de lumière (SLM, de l'anglais « Spatial Light Modulator ») binaire. Combiné à une lame demi-onde et un séparateur de faisceau polarisant, il forme une unité de génération de motifs en modifiant la phase locale du faisceau. C'est ici que le motif (Bessel, « lattice » ou autre) est créé.
- ii. La figure de diffraction du SLM est ensuite projetée sur un masque annulaire (MA, Figure 8) qui ne transmet que l'ordre de diffraction correspondant au pattern « lattice » (ou Bessel) (« Faisceau pupille arrière », Figure 7.B).
- iii. Le faisceau passe ensuite par deux galvanomètres, conjugués au BFP de l'objectif d'excitation. Le premier permet le balayage de la figure situé au niveau de l'échantillon selon l'axe X (G_x), ce qui crée la feuille de lumière. L'autre modifie la position du faisceau le long de l'axe Z, axe optique de l'objectif de détection (G_z).
- iv. La figure est finalement conjuguée au BFP de l'objectif d'excitation (OE) et passe à travers ce dernier pour focaliser le faisceau (« Faisceau plan objet », Figure 7). En balayant le faisceau selon la direction X, la feuille de lumière voulue est créée (« Faisceau balayé », Figure 7).

L'utilisation d'un SLM permet de générer une grande variété de figure « lattice ». On peut par exemple créer une « lattice » hexagonale utilisée pour la microscopie par illumination structurée (SIM, de l'anglais « Structured Illumination Microscopy ») 3D comme illustrée sur la Figure 7.D [1]. Pour l'imagerie limitée par diffraction, on utilise plutôt une « lattice » carrée, un peu plus épaisse que la « lattice » hexagonale, mais avec moins de lobes latéraux. De plus, le couple SLM – masque annulaire est capable de générer des « lattice » (ou Bessel) de taille et d'épaisseur différentes. Pour cela, il suffit de modifier le pattern sur le SLM et de sélectionner le masque de diamètres interne et externe adéquat. Ainsi il est théoriquement possible de créer des feuilles entre 0.4 et 3.5 μm d'épaisseur, et entre 10 et 100 μm de long. En pratique des contraintes d'alignement et d'aberration limitent la gamme de feuilles réalisable. Dans le cadre de cette thèse, nous avons employé une feuille de 0.6 μm d'épais sur 15 μm de long.

La configuration droite, c.-à-d. les objectifs au-dessus de l'échantillon, permet le montage horizontal d'échantillons fins ou fragiles qui reposent sur une lamelle de 5 mm de diamètre. Combiné à l'utilisation de deux objectifs à immersion à eau et de haut NA, ce système est particulièrement adapté à l'imagerie d'échantillons vivants de petites dimensions (<1mm d'épaisseur). Cette configuration impose un formalisme des axes XYZ, choisi comme celle d'une image acquise avec le système (axes XYZ Figure 8.A).

En dehors de la création de la feuille de lumière « lattice », le système est composé des sous-ensembles suivants (Figure 8) :

- i. Plusieurs lasers à longueur d'ondes individuelles sont installés dans un banc laser (LC, Figure 8) et élargis à un diamètre d'environ 2,5mm. Les faisceaux sont co-alignés et tous polarisés horizontalement avant d'être couplés dans un filtre accordable acousto optique (AOTF, de l'anglais « Acousto-Optic Tunable Filter », illustré dans la Figure 8). Le contrôle de l'AOTF permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation avec un pourcentage de transmission choisi.
- ii. Le faisceau entre ensuite dans le système LLSM où un premier miroir « flip » permet de choisir entre une illumination inversée en épifluorescence/champ large, et le trajet à l'origine de la création de la feuille de lumière. Seul le second est présenté Figure 8.
- iii. En configuration « épifluorescence », le faisceau est élargi par un système télescopique et est focalisé sur le BFP d'un objectif (Olympus 40x/0,8) illuminant l'échantillon par le bas, à travers la chambre et le porte échantillon. Un séparateur de faisceau 90:10 permet d'envoyer 10% du laser pour l'illumination. 90% de la fluorescence est recueillie et focalisée, par le même objectif, sur une caméra.
- iv. Le chemin de détection est celui d'un microscope à champ large classique (illustré en vert Figure 8).

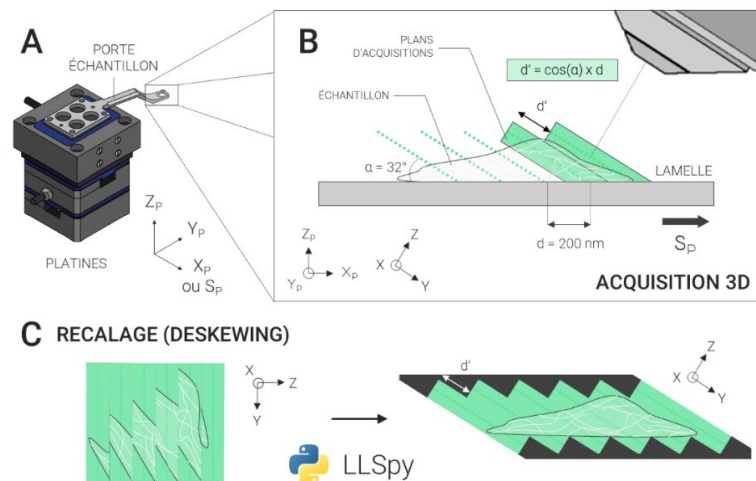


Figure 9 : Acquisition volumétrique avec le microscope à feuille de lumière « lattice ». **A.** L'échantillon est translaté en $X_P Y_P Z_P$ à l'aide de trois platines motorisées. **B.** Lors d'une acquisition 3D, l'échantillon est déplacé par une platine piézoélectrique selon l'axe S_P (équivalent à X_P) avec un pas défini par d . Les plans d'imagerie étant liés à la position des objectifs (XYZ), en résulte un angle α , entre les plans d'acquisitions et l'axe de déplacement de l'échantillon. En conséquence, un décalage d' est créé entre les plans 2D successifs. **C.** Chaque plan du volume 3D est décalé selon y par rapport aux plans adjacents. Un logiciel est utilisé pour compenser ce décalage et faire coïncider les plans 2D successifs.

- v. L'échantillon est monté sur des platines $X_P Y_P Z_P$ qui permettent son déplacement (Figure 8.C et Figure 9.A). La configuration particulière autour de l'échantillon implique que les axes de translations $X_P Y_P Z_P$, sont différents de l'image 2D XYZ. En acquisition 3D (Figure 9.B), l'échantillon est translaté selon l'axe S_p , par une platine piézoélectrique (résolution <1 nm). Le décalage induit par l'angle doit être recalé en post-traitement (le « deskewing » en anglais, illustré Figure 9.C).
- vi. L'ensemble du système est contrôlé par un logiciel *LabVIEW* en communication avec une carte FPGA (de l'anglais « Field Programmable Gate Arrays »). Les composants qui requièrent un contrôle temporel précis lors de l'acquisition (caméra sCMOS, SLM, galvanomètres) sont pilotés directement par cette carte qui permet de synchroniser l'ensemble. Plusieurs modes d'acquisitions sont disponibles : acquisition « live » (continu sans sauvegarde), 2D, 2D +t, 3D+t, etc.

Les propriétés de la LLSM, en particulier sa haute résolution spatiale, son faible photoblanchiment et sa rapidité ont permis la réalisation d'un grand nombre de travaux scientifiques autour d'études dynamiques et structurales des cellules [32]–[37], d'expériences en SR et en SPT [38]–[41], l'intégration de la microscopie d'expansion [42] ou des études autour de la physiologie neuronale [43]–[47].

Récemment, quelques travaux ont questionné les avantages du « lattice » par rapport à l'illumination gaussienne classique en LSFM [48], en proposant notamment une méthode, nommée « Field Synthesis », capable de générer simplement n'importe quel type de feuille de lumière [49]. Toutefois, une étude récente démontre l'intérêt du LLSM et de ses avantages [50].

2.2. Microscopie de super-résolution, SMLM et DNA-PAINT utilisé dans le cadre du LLSM

Au fil des décennies, les techniques de microscopie se sont perfectionnées, permettant aux chercheurs d'explorer plus profondément le monde subcellulaire. Parmi les avancées récentes, la microscopie de fluorescence de SR a émergé comme une véritable révolution en permettant l'imagerie sous la limite de diffraction. Regroupant plusieurs techniques, elle transcende les limitations de la microscopie de fluorescence conventionnelle, permettant aux scientifiques d'explorer de manière inédite la dynamique cellulaire à l'échelle nanométrique. Cette prouesse a été rendue possible par le développement de techniques novatrices qui exploitent astucieusement les propriétés des molécules fluorescentes. Le prix Nobel de chimie 2014 a d'ailleurs été décerné à Eric Betzig, Stefan Hell et William Moerner pour leurs contributions majeures dans ce domaine.

Il existe deux grandes familles de microscopie SR : celles basées sur l'imagerie de population de fluorophores, et celles basées sur la localisation de molécules individuelles. Nous commencerons par présenter brièvement la première catégorie avant de présenter plus en détail la deuxième qui a été utilisée dans cette thèse.

L'une des avancées les plus influentes dans ce domaine a été le développement de la microscopie STED [51], par Hell et al. en 1994. Le principe réside dans le balayage simultané par (1) un faisceau laser focalisé qui excite des molécules fluorescentes et (2) un faisceau de déplétion, de longueur d'onde supérieure, en forme de tore et qui englobe la région excitée. Le faisceau de déplétion provoque l'émission stimulée des photons excités. Les fluorophores n'émettent plus de fluorescence sur la zone du faisceau de déplétion. En conséquence, la PSF d'excitation se retrouve fortement réduite, en deçà de la limite de diffraction.

- i. En balayant ce faisceau, il est possible d'obtenir des images avec une résolution quasi isotropique de ~ 100 nm, tout en ayant un excellent contraste par le filtrage des photons provenant de l'émission stimulée [52]. Comparée aux autres techniques de microscopie SR, elle est moins sensible aux dégradations en profondeur et est capable d'imager des structures de plusieurs dizaines de μm sous la surface de l'échantillon [52].
- ii. Une limite majeure de ce microscope est sa résolution temporelle, car basée sur le balayage du faisceau. De plus, les puissances laser mises

en jeu augmentent fortement le photoblanchiment des fluorochromes, en sélection limitée pour répondre à l'émission stimulée [52].

La microscopie à illumination structurée (SIM) [53] a été développée par Gustafsson et al. au début des années 2000. Le SIM consiste à projeter sur l'échantillon un patron spatial périodique, souvent produit par interférence, ce qui a pour effet de convoluer les fréquences spatiales de cette figure avec celle de l'échantillon. L'effet résultant, nommé effet Moiré, permet de déplacer les fréquences spatiales d'ordre supérieur, normalement non collectées, dans la bande passante de l'objectif de détection. En modifiant l'orientation et la phase de la figure d'interférence, l'ensemble de l'espace fréquentiel est échantillonné. L'image est alors reconstruite en combinant les fréquences obtenues dans l'espace de Fourier.

- i. Cette technique permet d'obtenir des résolutions latérales d'environ 100 nm et axiales de l'ordre de 300 nm. Même si la résolution obtenue est limitée par rapport au STED, elle nécessite moins de puissance laser et atteint des résolutions temporelles supérieures, de l'ordre de ~200 Hz [54]. De plus, la mise en œuvre repose principalement sur la mise en forme d'un faisceau d'excitation, peu puissant, et ne nécessite aucune modification de marquage au niveau de l'échantillon. Ces avantages lui permettent d'être particulièrement recommandée pour l'imagerie super-résolue du vivant [52].
- ii. Cependant, la technique originale est moins performante dans le cadre d'échantillons épais. (1) La structuration du faisceau d'illumination est dégradée par les aberrations optiques et la diffusion en profondeur et (2) le signal hors focus induit des fréquences basses qui impactent la reconstruction finale de l'image. Ces deux phénomènes ont tendance à former des artefacts de reconstruction.

Un autre ensemble de techniques SR communément utilisées en biologie est la SMLM. Initié par les travaux d'Eric Betzig en 1995 [55], ce terme regroupe toutes les techniques permettant de (1) générer une image pointilliste à partir de l'activation stochastique d'une partie des fluorochromes et (2) de détecter la PSF et localiser la position du centroïde de chaque fluorochrome.

C'est en 2005, qu'est démontrée pour la première fois la propriété des fluorophores à passer d'un état allumé (émission de photons) à un état éteint (pas d'émission [56], [57]. S'en est suivi le développement de nouvelles techniques, permettant le scintillement des molécules fluorescentes en utilisant leurs propriétés de commutation : la microscopie à reconstruction optique stochastique (STORM, de l'anglais « *ST*ochastic *O*ptical *R*econstruction *M*icroscopy ») [58], la microscopie à reconstruction optique stochastique directe (dSTORM, de l'anglais « *direct ST*ochastic *O*ptical *R*econstruction *M*icroscopy ») [59] et la microscopie par localisation photoactivée (PALM, de l'anglais « *Photo-Activated Localization*

Microscopy ») [60]. Toutes ces techniques démontrent une précision de localisation jusqu'à ~10-40 nm sur des structures biologiques. Ces dernières années, de nouvelles techniques ont été développées et la SMLM est rapidement devenue une technique largement appliquée dans la recherche biologique.

Dans cette partie, nous reviendrons dans un premier temps sur les principes généraux de la SMLM ainsi que ses avantages et inconvénients par rapport aux autres techniques SR. Ensuite, les différentes techniques SMLM seront détaillées. Enfin, un focus sera réalisé sur la technologie DNA-PAINT tout en expliquant le choix de cette méthode dans le cadre de la thèse.

2.2.1. Principe général de la SMLM

La méthode SMLM est basée sur le fait que les coordonnées spatiales d'une population de molécules fluorescentes peuvent être déterminées individuellement avec une grande précision si leurs PSF ne se chevauchent pas (Figure 10). Pour éviter cela, les signaux émis par les fluorophores sont séparés dans le temps. Cette séparation temporelle est le plus couramment obtenu en utilisant les propriétés de commutation (« photoswitch » en anglais) des molécules. Les fluorophores peuvent passer d'un état actif "ON", où elles émettent de la fluorescence lorsqu'elles sont excitées, à un ou plusieurs états inactifs "OFF" ou "sombres", où elles n'émettent plus lorsqu'elles sont excitées. Ce phénomène est aléatoire, mais la densité spatiale des molécules dans l'état ON et la vitesse de clignotement peuvent être contrôlés en jouant sur l'énergie envoyée à la molécule et/ou sur les propriétés chimiques de l'environnement. Dans des conditions appropriées, seul un petit nombre de molécules seront activées et, par conséquent, apparaîtront comme des PSF isolées dans l'espace (« Plan i » illustré Figure 10.B). La commutation OFF/ON/OFF entraîne le scintillement, ou clignotement, des fluorophores. Plusieurs milliers d'images du même FOV sont ensuite acquises de sorte qu'un grand nombre de fluorophores soit allumé durant toute la séquence.

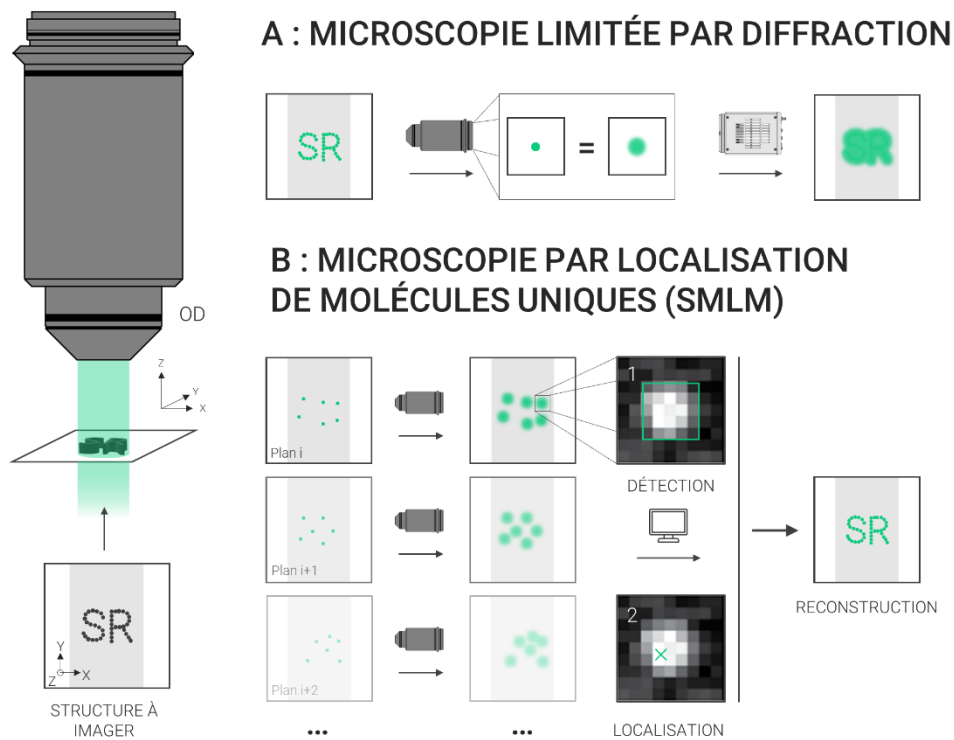


Figure 10 : Principe de fonctionnement de la SMLM. A. En microscopie limitée par diffraction, la nature ondulatoire de la lumière engendre une tâche d'Airy pour chaque fluorophore détecté. L'imagerie simultanée de l'ensemble de ces molécules entraîne une superposition des points sources, résultant en une image non définie de la structure d'intérêt. B. En SMLM, seule une portion des fluorophores est imagée à chaque point temps (Plan, Plan $i+1$, Plan $i+2$,...). L'imagerie séquentielle de ces molécules évite un chevauchement des PSF et permet de détecter (DÉTECTION) et localiser le centroïde (LOCALISATION) de chacune d'elles. Le positionnement de chaque centroïde permet d'obtenir une image sous la limite de diffraction, représentative de la structure d'intérêt.

Chaque image est ensuite traitée, généralement en post-acquisition, avec un logiciel adapté, de manière à détecter chaque molécule et à déterminer les coordonnées de son centre. Le principe détection/localisation est généralement commun à l'ensemble des logiciels, qui se différencient principalement par les algorithmes utilisés, leurs implémentations et leurs niveaux de performances. On peut notamment citer le logiciel *ThunderSTORM* [61], largement utilisé par la communauté scientifique, *Picasso* [62] développé dans le cadre de la méthode DNA-PAINT ou encore *WaveTracer* [63] développé par Kechkar et al. au sein de l'équipe Sibarita à l'IINS.

- i. L'étape de détection (« DÉTECTION », Figure 10.B) consiste à déterminer la localisation approximative des molécules émettrices. L'image est souvent prétraitée pour éliminer l'arrière-plan, par exemple à l'aide d'algorithmes de gaussienne différentielle, de filtrage par ondelettes, ou en soustrayant l'arrière-plan moyenné sur l'ensemble de la séquence d'images. Ensuite, la détection se fait généralement en extrayant les maxima locaux de l'image corrigée de

l'arrière-plan. Enfin, chaque détection est marquée par une ROI (région d'intérêt, de l'anglais « Region Of Interest ») et toutes les coordonnées sont listées. Chaque algorithme produit plus ou moins de faux positifs et/ou de faux négatifs en fonction du bruit et du SNR.

- ii. L'étape de localisation (« LOCALISATION », Figure 10.B) se fait généralement molécule par molécule en extrayant pour chacune une ROI individuelle. Dans un cas simplifié, un estimateur vient localiser, en X et en Y, ce qui est considéré comme le centre de la molécule. Cet estimateur peut détecter le maximum d'intensité de la PSF, le centroïde ou encore le maximum de l'ajustement gaussien. Le choix de l'estimateur influe sur la précision de localisation. Des estimateurs plus puissants implémentent un modèle PSF plus détaillé [64] : comme l'ajustement aux moindres carrés (LSF, de l'anglais « Least-Square Fitting ») ou l'estimation du maximum de vraisemblance (MLE, de l'anglais « Maximum Likelihood Estimation »).

Enfin, toutes ces localisations sont accumulées en une seule image (« RECONSTRUCTION », Figure 10.B). La résolution de l'image reconstruite est déterminée par (1) la précision avec lesquelles les molécules individuelles sont localisées et (2) par la densité de molécules localisées [65]. L'imagerie séquentielle et le calcul de positions des fluorophores sont communs à la plupart des techniques SMLM. Leurs différences principales résident dans le choix du fluorophore et la manière dont la commutation ON/OFF est réalisée.

2.2.2. Techniques SMLM

Les techniques SMLM se distinguent principalement sur la manière dont les fluorophores passent de l'état ON à l'état OFF. Cette commutation est dépendante des marqueurs utilisés et va influencer, le choix du système d'imagerie, les paramètres d'acquisition et la préparation des échantillons. On distingue trois grandes familles : les techniques de photo-activation, les techniques de commutation par contrôle des propriétés chimiques et le scintillement par cinétique d'accroche des molécules [65]. Le Tableau 2 et la Figure 11 récapitulent les principes, les avantages et les inconvénients des différentes techniques :

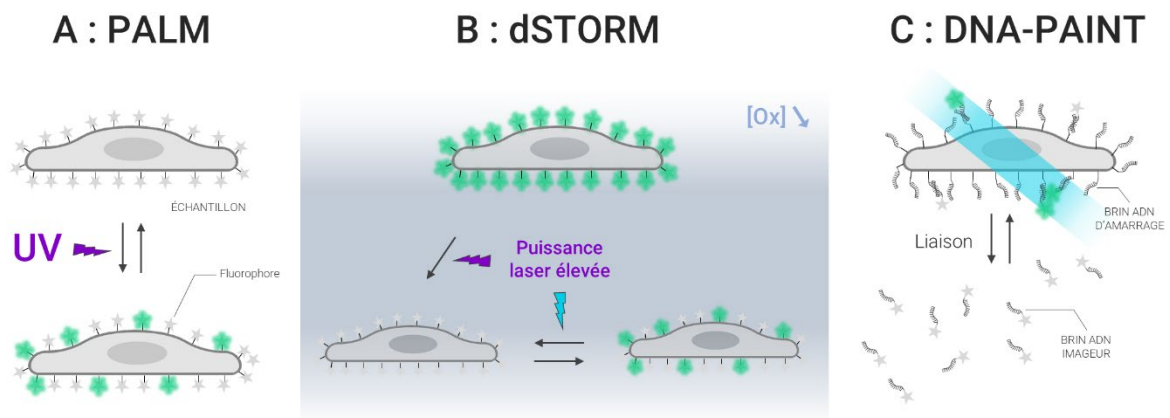


Figure 11 : Principales techniques employées en SMLM. A. En PALM les fluorophores activés aléatoirement à l'aide de forte puissance laser (UV). B. En dSTORM, l'ensemble des fluorophores sont passés dans un état non lumineux. En les éclairant avec une puissance constante, ils se réactivent et émettent de la fluorescence aléatoirement. C. En DNA-PAINT, les fluorophores nommés « imageurs » s'attachent et se détachent tout au long de l'acquisition pour former le scintillement de l'image.

	PALM	STORM	PAINT	Commentaire
Fluorophore	protéine fluorescente	fluorophore organique	fluorophore organique	Les fluorophores organiques sont plus brillants et moins sensibles au photoblanchiment.
Marquage	expression exogène	expression endogène	expression endogène	La surexpression d'une protéine fluorescente peut perturber la physiologie de la cellule.
Milieu	milieu classique	tampon spécifique	solution saline	Pour le STORM les marquages multiples sont complexes car demandent l'utilisation de fluorophores ayant des propriétés photophysiques comparables.
Vivant	OUI	NON	NON	L'expression exogène en PALM permet l'imagerie du vivant.
Résolution	-	+	+	La résolution est principalement liée à la brillance des fluorophores.
Dynamique	~ 50 ms (conversion/activation)	~ 20 ms (photophysique lié au tampon)	~ 100-200 ms (cinétique de liaison)	Des temps d'acquisitions très longs augmentent le risque de drift.

Tableau 2 : Principales caractéristiques des procédés SMLM.

2.2.2.1. SMLM par photo-activation des molécules (PALM)

La microscopie PALM (Figure 11.A) a été initialement démontrée en utilisant des protéines fluorescentes, photo-activables ou photo-convertibles, qui peuvent être activées avec une longueur d'onde donnée et désactivées par photoblanchiment [60], [66]. Les protéines photo-activables n'émettent pas de signal au repos, mais après activation à l'aide d'un faisceau UV (405 nm), elles deviennent fluorescentes. Les protéines photo-convertibles sont capables de passer d'un état excité à un autre à l'aide d'un faisceau de conversion (généralement UV, 405 nm) et donc de modifier leurs longueurs d'onde d'émission. En ajustant l'intensité du faisceau d'activation, il est possible de n'activer qu'une infime quantité de molécules et de se placer dans un régime de scintillement de faible densité spatiale ($< 0,25$ molécules/ μm^2) [67]. Les fluorophores activés ne restent dans un état excité que très peu de temps (~ 50 ms) et le photoblanchiment les fait passer en état OFF.

Ces protéines peuvent être directement exprimées par les cellules après modification de leur génome, ce qui rend la méthode compatible avec l'imagerie du vivant. De plus, à chaque protéine cible est associée une protéine photo-activable ce qui permet (1) de suivre une protéine unique (sptPALM, de l'anglais « single particle tracking PALM ») [68] en localisant une même protéine au cours du temps et (2) d'envisager des analyses quantitatives sur les protéines [69]. Toutefois, le signal émis par les protéines fluorescentes est souvent peu brillant, ce qui limite la précision de localisation. Aussi, l'expression exogène peut conduire à des altérations physiologiques des cellules observées [70].

2.2.2.2. SMLM par contrôle des propriétés photophysiques (STORM)

La microscopie STORM [58] et les techniques associées reposent sur l'utilisation de fluorophores organiques capables de transiter plusieurs fois entre un état sombre et un état lumineux. Dans le cas du STORM classique, la transition se fait par plusieurs mécanismes : photo-activation, photo-conversion ou photo-transition. Cela dépend du fluorophore utilisé et des caractéristiques du système. Pour cette technique, le scintillement (ON-OFF-ON-...) est donc géré par l'utilisation d'un ou plusieurs lasers, à des instants précis et à puissance contrôlée. Bien qu'il offre une plus grande variété de fluorochromes que le PALM, sa mise en place est généralement plus complexe.

Le dSTORM [59] (Figure 11.B) résout cette problématique en utilisant un tampon chimique (représenté par le fond bleu Figure 11.B) favorisant la transition des fluorochromes d'un état lumineux à un état sombre. Pour chaque molécule, la fluorescence se fait lors du passage de l'état excité à l'état fondamental. Le fluorophore peut aussi transiter vers un état excité intermédiaire de plus faible énergie, dit état triplet (« T_1 », Figure 3). Il transite ensuite dans un état sombre sans émettre de photons avant de retourner à l'état fondamental. Le dSTORM consiste à utiliser cette propriété en passant la grande majorité de fluorophores en état sombre (état « OFF »), et de ne laisser que quelques fluorophores revenir,

aléatoirement au cours du temps, cycler entre l'état fondamental et l'état excité pour émettre de la fluorescence (état « ON »). Pour cela, la méthode implique l'utilisation (1) d'une forte puissance laser pour transiter les molécules dans l'état triplet et (2) d'un tampon chimique qui favorise cette transition et stabilise ces états dans le temps. En état triplet, les molécules sont (1) plus sensibles à l'oxygène et donc au photoblanchiment et (2) auront tendance à retourner dans l'état fondamental si la concentration d'oxygène augmente. Dans le but de réduire le photoblanchiment et de contrôler le retour à l'état fondamental des molécules (quantité de scintillement), une réaction enzymatique mise en place dans le tampon d'observation permet de capter l'oxygène présent, et le fait de travailler en chambre fermée évite l'apport d'oxygène extérieur.

L'avantage principal du dSTORM est d'utiliser des fluorophores organiques très brillants. La détection et la localisation des PSF sont facilitées ce qui conduit généralement à des résolutions de l'ordre de ~10 nm. La majorité des molécules étant en état sombre et le laser d'excitation continue, la dynamique de transition ON-OFF dépend principalement du temps d'excitation/déexcitation de chaque molécule repassant à un état fondamental. Ce phénomène étant quasi instantané, la vitesse d'acquisition atteint facilement 100 Hz (~10ms de temps d'exposition). Cependant, le tampon utilisé est souvent lié à un fluorochrome donné. Cela rend plus difficile l'imagerie multicolore. Aussi, même si le tampon joue en partie ce rôle, la dégradation plus importante des fluorophores par l'oxygène impose de travailler dans des conditions imperméables à l'entrée d'air extérieur, ou du moins contrôlé. Enfin, ce tampon chimique peut être toxique et la transition des fluorophores vers leur état triplet requiert des puissances laser relativement importantes (de l'ordre de 1 à 10 kW/cm²). Par conséquent, cette technique d'imagerie n'est pas compatible avec l'imagerie de cellules vivantes.

2.2.2.3. SMLM par modalité PAINT

La SMLM par accumulation de point pour l'imagerie en topographie à l'échelle nanométrique (PAINT, de l'anglais « Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography ») [71] utilise la cinétique des molécules fluorescentes en solution. Concrètement, les molécules sont en mouvement brownien dans le milieu d'imagerie où se trouve l'échantillon et sont capables de s'attacher puis de se détacher aux structures d'intérêts. En imageant un FOV fixe, seules seront perçues les molécules attachées aux structures durant un laps de temps suffisant pour être détecté par la caméra. Le reste des molécules formera un bruit de fond. La microscopie PAINT utilise des colorants [71] qui interagissent avec les cibles par liaison transitoire.

La méthode uPAINT (de l'anglais, « universal PAINT ») [72] repose sur le même principe, mais utilise des fluorophores conjugués à un ligand, afin de cibler spécifiquement une population de protéines membranaires à la surface de cellules. Elle permet d'enregistrer de grandes densités de trajectoire sur la membrane cellulaire et est adaptée à l'imagerie de cellules vivantes.

La méthode DNA-PAINT [73] (illustrée Figure 11.C) repose sur l'interaction transitoire et spécifique d'un oligonucléotide « brin imageur » (couplé à un fluorophore) à son complémentaire appelé « brin d'amarrage ». Les brins d'amarrages sont couplés à la protéine d'intérêt par le biais d'un immunomarquage direct ou indirect, les brins imageurs diffusent dans le milieu d'observation.

Ces méthodes ne sont pas sensibles au photoblanchiment, car le réservoir de fluorophores peut être considéré comme infini. Même si les imageurs se dégradent au fil du temps, la concentration peut être réajustée. Aussi, le DNA-PAINT est compatible avec l'imagerie multicolore via la méthode Exchange-PAINT [73]. Dans cette méthode, chaque structure d'intérêt est marquée avec un brin d'ancrage spécifique, ce qui rend possible l'utilisation de plusieurs brins imageurs associés à un ou plusieurs fluorophores imagés séquentiellement. Cependant, le temps d'acquisition est plus élevé en DNA-PAINT. Il est affecté par la cinétique des imageurs, elle-même dépendante de trois paramètres : la taille de la séquence ADN (généralement ~8-10 nucléotides), la concentration d'imageurs, et la concentration saline de la solution d'imagerie. Malgré des travaux réalisés sur la concentration et la vitesse d'association des imageurs [74], cette cinétique reste assez lente ($\tau_{ON} \sim 200\text{ms}$) et le temps d'exposition de la caméra doit généralement être ajusté entre 100 et 300 ms [62], [73] (5 à 3Hz). Aussi, l'immunomarquage peut diminuer fortement la résolution des images acquises à cause de l'incertitude de localisation liée à la longueur de l'attache entre le fluorophore et la structure d'intérêt. Pour contrer cela, le DNA-PAINT a été combiné avec des marqueurs plus petits comme des « nanobodies » secondaires par exemple [75].

2.2.3. Résolution en SMLM

La résolution spatiale atteignable en SMLM dépend principalement de trois paramètres : la précision de la localisation, la densité de localisation détectée et les erreurs de liaisons liées au choix du marquage.

Deschout et al. [76] démontre l'effet de ces trois paramètres à travers la figure réadaptée suivante.

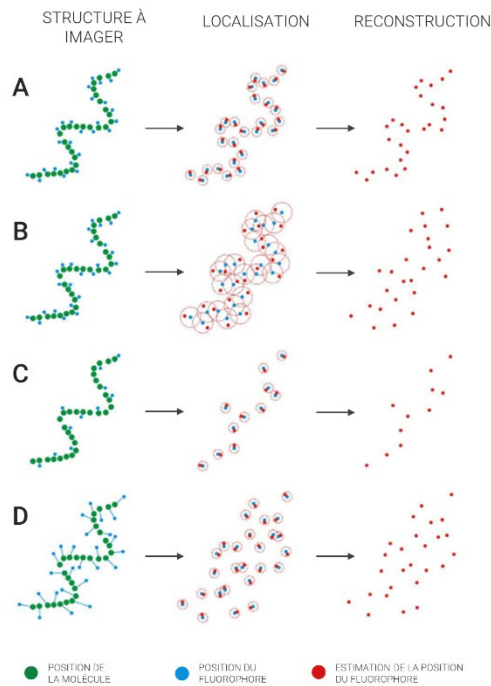


Figure 12 : Effets de la précision de localisation, de la densité de localisation, et des erreurs de liaisons sur la reconstruction SMLM. **A.** Illustration d'un marquage SMLM performant, offrant une précision de localisation et une densité forte avec peu de longueurs de liaisons. **B.** Imagerie SMLM avec une faible précision de localisation. **C.** Imagerie SMLM avec une faible densité de marquage. **D.** Imagerie SMLM avec une grande longueur de liaisons entre les fluorophores et les structures d'intérêts.

2.2.3.1. Précision de localisation

En SMLM, l'étape de localisation fait suite à l'acquisition des images et à la détection des scintillements associés. Comme défini précédemment, ces scintillements peuvent être considérés comme des PSF, généralement approximés à une fonction gaussienne de la tâche d'Airy :

$$I(x) = I_B + \frac{I_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-x_0)^2}{2\sigma^2}}$$

où, la largeur de la gaussienne est communément définie par la FWHM de la PSF :

$$FWHM = 2\sqrt{2\ln(2)}\sigma \approx 2,355\sigma$$

La localisation utilise ce type d'ajustement selon les deux dimensions latérales pour chacune des PSF individuelles. La capacité à calculer le centre de cette gaussienne limite la résolution de l'image SMLM. En effet, en fonction du bruit et de l'intensité de la PSF, des erreurs seront commises dans l'ajustement et donc dans la localisation du centre de la PSF. On parle de précision de localisation. Dans un cas idéal, la précision de localisation ne peut être inférieure à la limite

inférieure de Cramér-Rao (CRLB, de l'anglais « Cramér-Rao Lower Bound »), définie par :

$$\sigma_{loc} \geq \sigma_0 / \sqrt{N}$$

avec, σ_{loc} est l'écart type dans les coordonnées estimées, σ_0 est l'écart type de la PSF et N le nombre de photons collectés par la caméra. Bien qu'avec les paramètres mis en jeu en SMLM, la limite de précision de localisation peut être estimée autour de $\sim 1-10$ nm, cette limite est une simplification qui ne prend pas en compte le bruit de fond, les paramètres de la caméra (dark current), la taille de pixel ou le fait que la PSF n'a pas toujours une forme gaussienne. En prenant en compte le cas d'un système optique réel, avec le bruit de la caméra, b , et une taille de pixel finie, a , l'incertitude sur la localisation d'une molécule unique est définie par Thompson et al. [77] :

$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{\sigma^2}{N} + \frac{a^2}{12N} + \frac{8\pi \sigma^4 b}{a^2 N^2}$$

Ainsi, la précision de localisation est dépendante du nombre de photons détectés et de la taille de la PSF. Il est théoriquement possible d'augmenter la précision de localisation en augmentant l'intensité de chaque PSF, en utilisant des longueurs d'onde plus faibles ou des objectifs à grande NA ou bien en réduisant le bruit de fond. Ce dernier point démontre que la LSFM, offrant un haut sectionnement optique, est particulièrement adaptée pour la SMLM.

2.2.3.2. Densité de localisation

Un autre paramètre important pour la résolution de l'image est la densité de localisation, c'est-à-dire la détection d'une densité suffisante de molécules fluorescentes pour aboutir à une reconstruction fidèle de l'objet marqué. Ce paramètre est étroitement lié au critère de Nyquist, déjà défini dans ce manuscrit.

Appliquer ce théorème à la SMLM, implique en théorie que la présence d'un fluorophore tout les $R_{loc}/C_{Nyquist}$ nm (avec $C_{Nyquist}=2$) sur l'entièreté de l'image suffit à définir la structure marquée et à obtenir une résolution d'images de R_{loc} nm. Cependant, des études ont montré que le critère d'échantillonnage, $C_{Nyquist}$, devait être réévalué à 5 [39] pour obtenir une résolution R_{loc} égale à la précision de localisation théorique, σ_{loc} .

Par exemple, pour une précision de localisation théorique de 20 nm, il est donc nécessaire d'imager au moins 25% des molécules fluorescentes pour obtenir la limite de résolution atteignable.

$$\frac{C_{Nyquist}}{\sigma_{loc}} = \frac{5}{20} = 0,25$$

2.2.3.3. Erreur de liaison

La résolution d'une image SMLM est aussi définie par le type de marquage des structures comme vu précédemment dans le manuscrit (cf. 2.1.2.3.). En effet, les ordres de grandeur en SMLM mis en jeu dépendent fortement de la taille des marqueurs utilisés. Par exemple, l'utilisation d'un marquage AB1-AB2 (de l'anglais « AntiBody ») éloigne de ~30 nm le fluorophore détecté de la structure d'intérêt. Il convient donc de prendre en compte ce paramètre pour estimer la résolution finale d'une image SMLM.

2.2.4. Applications et problématiques en SMLM

La SMLM semble donc être un bon compromis pour obtenir des images super-résolues en biologie [52]. Elle permet (1) d'utiliser des systèmes microscopiques moins complexes qu'en STED ou en SIM, (2) emploie des puissances laser plus faibles qu'en STED (MW/cm^2 vs. kW/cm^2) et est donc plus respectueuse des échantillons, (3) offre une grande flexibilité dans le choix des marquages et des fluorophores et (4) surtout permet d'obtenir une résolution nanoscopique similaire, voir plus performante que le STED.

La SMLM souffre toutefois de plusieurs problématiques en fonction du type d'acquisition :

- i. La technique de localisation présentée permet de déterminer la position d'un fluorophore selon le plan XY. Cependant, selon cette méthode, aucune information axiale ne peut être déduite. En effet, la distribution d'intensité d'une PSF est symétrique axialement, à cause de la résolution axiale, et sans l'utilisation d'un discriminant il est impossible de déterminer la position de la molécule dans le DOF. La résolution axiale est alors dépendante des performances du système d'imagerie. Pour déterminer la position axiale de la molécule et obtenir une résolution isotrope, plusieurs techniques consistent à discriminer la PSF selon l'axe Z.
- ii. Plusieurs milliers d'images sont nécessaires pour l'acquisition d'un plan SMLM. Du coup la fréquence d'imagerie reste relativement faible comparé à d'autres techniques : ~ 6 min en STORM et ~60 min en DNA-PAINT. D'autre part cette lenteur rend cette technique particulièrement sensible à la dérive de l'échantillon.
- iii. La SMLM ne nécessite à priori qu'un microscope à champ large offrant un large FOV et équipé d'une caméra sensible, avec peu de bruit de lecture, avec une taille de pixel limitée et offrant une grande fréquence d'imagerie (EM-CCD ou sCMOS). Toutefois, la précision de localisation est sensible au bruit de fond et des technologies à sectionnement optique comme le TIRF [8] ou le HILO [9] sont

utilisées pour améliorer la résolution des images. La LSFM est aussi une candidate idéale pour améliorer la précision de localisation.

- iv. La résolution des images acquises au sein d'échantillons épais est fortement diminuée de par la forte sensibilité aux aberrations optiques qui dégradent la forme des PSF et donc la précision de localisation [78].

Pour répondre à ces limitations, de nombreux systèmes et méthodes ont été développés. Dans cette partie sera présenté le cas de la SMLM appliquée aux microscopes LSFM, les méthodes de correction de dérive et d'imagerie 3D, pour terminer sur les problématiques liées à l'imagerie en profondeur.

2.2.4.1. 3D-SMLM

Plusieurs méthodes sont utilisées en SMLM pour détecter et localiser axialement les molécules individuelles. Une revue plus détaillée de ces techniques est disponible dans l'article de von Diezmann [79],

- i. La microscopie multifocale permet l'imagerie de plans espacés de quelques nm. En mesurant l'intensité relative de chaque molécule, à chacun de ces plans, il est possible de déterminer la position de la molécule selon Z [80].
- ii. L'ingénierie de PSF exploite le fait que l'image 2D d'une molécule fluorescente dépend non seulement de ses coordonnées latérales (x, y) mais aussi de sa coordonnée axiale z . En lui appliquant une forme non symétrique axialement, la PSF sera modifiée en fonction de sa position axiale et il deviendra possible de déterminer sa position. L'approche la plus courante exploite une PSF astigmatique, générée par l'insertion d'une lentille cylindrique [81] ou d'AO [82] dans le chemin d'imagerie, ce qui permet généralement d'atteindre une résolution axiale égale à $\sim 10\text{-}50$ nm sur une profondeur de champ allant de ~ 500 nm à $1\ \mu\text{m}$. D'autres PSF, telles qu'une double hélice, un tétrapode, peuvent être obtenues à l'aide de masques de phase [83], de DM [84] ou d'autres dispositifs optiques, permettent d'obtenir une plus grande plage axiale (~ 2 à $3\ \mu\text{m}$).
- iii. D'autres méthodes se servent des caractéristiques de propagation du signal de fluorescence. C'est le cas de DONALD (de l'anglais « Direct Optical Nanoscopy with Axially Localized Detection ») [85] qui propose d'utiliser l'onde évanescente et l'angle supercritique de fluorescence pour déterminer une position absolue de la molécule.
- iv. D'autres méthodes emploient une illumination structurée. C'est le cas du MINFLUX [86], qui balaye un faisceau torique autour d'un fluorophore pour le localiser avec une précision de l'ordre du nm. La

technique ModLoc [87], utilise une illumination de franges inclinées pour moduler le signal de fluorescence et de déterminer la position axiale de chaque molécule avec une précision très élevée de quelques nm.

- v. D'autres méthodes exploitent le processus d'auto-interférences pour localiser axialement les molécules. Par exemple, la méthode SELFI utilise un masque de phase sur la voie de détection d'une architecture standard de microscope pour générer ces interférences [88].

2.2.4.2. SMLM et compensation de drift

L'imagerie à l'échelle nanoscopique est fortement sensible à la dérive de l'échantillon, qu'elle soit due aux variations des conditions expérimentales ou au mouvement de l'échantillon lui-même. C'est d'autant plus critique en SMLM où les temps d'acquisition sont longs. Plusieurs méthodes existent pour corriger ce mouvement durant ou après l'acquisition :

- i. La correction basée sur des marqueurs fiduciaires comme les « nanogolds » [89] ou les « nanodiamonds » [90] est l'une des méthodes les plus utilisées. Elle permet d'analyser, image par image, la position du marqueur de référence, et de calculer son déplacement au cours du temps. Le déplacement est ensuite appliqué, en post-traitement, pour corriger la position par rapport à l'image précédente. Bien qu'elle permette une correction précise grâce au contraste élevé des fiduciaires, elle nécessite néanmoins l'intégration de ces marqueurs dans l'échantillon ou sur la lamelle qui doivent être présents en densité suffisante sur le FOV d'imagerie.
- ii. Des algorithmes de corrélation peuvent aussi être utilisés. Ils permettent de comparer plusieurs images et de déduire le déplacement [91].

Étant donné que la SMLM est très souvent mise en œuvre avec une illumination TIRF ou HILO sur des microscopes équipés de système de maintien de focus (ex : perfect Focus System de Nikon) la dérive est corrigée uniquement en 2D, dans le plan d'imagerie. De plus les méthodes sont généralement utilisées en post-acquisition, car la dérive est considérée faible par rapport au FOV sur le temps d'acquisition. Il existe cependant plusieurs travaux qui ont démontré l'utilisation de boucles de rétrocontrôle pour recalibrer l'échantillon pendant l'acquisition et permettre une première correction avant analyse des images. De même, ces méthodes de correction ont été adaptées pour l'acquisition d'images volumétriques et la correction de la dérive en 3D [92], [93].

2.2.4.3. SMLM et microscopie LS

De nombreuses architectures LS ont été développées pour tenter d'améliorer le sectionnement optique tout en offrant la possibilité d'imager au sein de l'échantillon. En effet, bien que les microscopies HILO et TIRF offrent un excellent sectionnement optique, ces deux techniques ne permettent d'imager l'échantillon jusqu'à quelques μm au-delà de la surface de l'échantillon. La première démonstration fut celle de Zanicchi et al. [94] avec le IML-SPIM (de l'anglais « Individual Molecule Localization – Selective Plane Illumination Microscopy »), un microscope basé sur une architecture 90° . Dans cet article est démontrée l'imagerie SMLM de sphéroïdes pour différentes épaisseurs d'échantillons (de 50 à 150 μm) avec une précision de localisation inférieure à 35 nm. Bien que, l'illumination SPIM permette de fortement diminuer le bruit de fond et d'envisager la SMLM au sein d'échantillons épais, l'utilisation d'un objectif à grande NA (0.8 pour le IML-SPIM) contraint le montage de l'échantillon.

Pour contrer la problématique d'encombrement, deux solutions ont été trouvées : (1) augmenter la distance entre les objectifs en modifiant l'angle ou en utilisant des optiques supplémentaires et (2) modifier l'architecture d'illumination de tel sorte à n'utiliser qu'un seul objectif.

- i. Gebhardt et al. [95] avec le RLSM (de l'anglais « Reflected Light-Sheet Microscopy »), Hu et al. [96] avec le LSBM (de l'anglais « Light-Sheet Bayesian Microscopy »), et Gustavsson et al. [97] avec le TILT3D (de l'anglais « TILTed ligh-sheet microscopy with 3D PSF ») démontrent tous l'utilisation d'architectures permettant de déporter l'objectif d'excitation. En plus d'offrir plus de place au montage de l'échantillon, ils prouvent que le sectionnement optique et la diminution du bruit de fond permettent l'imagerie SR dans plusieurs zones de l'échantillon.
- ii. Plusieurs configurations n'utilisent qu'un seul objectif pour créer la LS et collecter la fluorescence. La première démonstration en SMLM fut celle de Galland et al. [31] en 2015 avec le microscope soSPIM qui utilise un miroir placé à 45° pour réfléchir la LS perpendiculairement à l'axe optique d'un objectif de détection placé sous l'échantillon. Ce système permet l'imagerie en dSTORM avec une précision de localisation inférieure à 30 nm. Des configurations d'illumination oblique comme celles de Kim et al. [98] avec le obSTORM (de l'anglais « oblique ») ou de Hung et al. [99] avec le microscope SOLEIL (de l'anglais « Single-Objective Lens-Inclined Light-sheet microscopy ») démontrent aussi l'utilisation du STORM pour l'imagerie SMLM.

Parmi les techniques développées en LFSM, la LLSM est celle offrant le meilleur compromis entre sectionnement optique et FOV. Plusieurs travaux ont été menés pour profiter de ces avantages en SMLM.

- i. Dès 2016, Legant et al. [39] décrivent l'utilisation de la méthode PAINT en LLSM. L'article montre l'imagerie 3D d'échantillon entier, d'épaisseur allant jusqu'à 20 μm , avec une résolution inférieure aux images déconvoluées en résolution limitée par diffraction. Ils proposent notamment d'imager très longuement les échantillons, afin d'obtenir une densité de localisation nécessaire pour améliorer la résolution SR de l'image. Avec la densité de localisation atteinte, la résolution théorique obtenue est $<50\text{nm}$ et $\sim 100\text{ nm}$, latéralement et axialement respectivement. Ils démontrent également l'imagerie multicolore sur des cellules COS et la correction de la dérive 3D de l'échantillon post-acquisition grâce à l'intégration de billes fluorescentes au sein de l'échantillon.
- ii. Pour réduire le temps d'acquisition et suivre le trajet de molécules au niveau des récepteurs membranaires de cellules 293T, Wäldchen et al. [41] proposent l'utilisation du dSTORM en LLSM. Ils arrivent à une précision de localisation inférieure à 20 nm en XY et de 40 nm en Z, grâce à l'utilisation d'une lentille cylindrique.

2.2.4.4. Imagerie SMLM en profondeur

L'imagerie au sein d'échantillons épais reste limitée en SMLM. Soit, car les techniques employées ne permettent que d'imager à quelques microns sous la surface de l'échantillon, mais surtout, car les aberrations optiques et la diffusion dégradent l'intensité et la résolution des images, et par conséquent la localisation des PSF pour la reconstruction SMLM. Pour contrer ce problème, des systèmes intégrant l'AO tentent d'améliorer la profondeur d'imagerie en résolution conventionnelle, mais aussi en super-résolution.

2.3. Optique adaptative : principes et applications à la microscopie

La qualité de l'image dépend d'un grand nombre de paramètres – (spécifications du microscope, la qualité du marquage, ...), mais aussi de la propagation de la lumière dans les systèmes optiques (lentilles, miroirs, ...) et au sein des échantillons. Lorsque cette propagation est altérée, au point de réduire la précision spatiale et la qualité des images, on parle d'aberrations. Ce phénomène dégrade l'observation et la quantification des structures biologiques étudiées. Ces aberrations sont créées (1) par les imperfections des composants optiques du microscope, et (2) par les variations d'indice de réfraction autour et dans l'échantillon. Elles constituent un défi majeur en microscopie de fluorescence, en particulier pour l'imagerie d'échantillons épais, car ce phénomène s'amplifie avec la profondeur.

L'AO, initialement développé dans le domaine de l'astronomie, permet de compenser ces limitations. Cette méthode utilise des éléments optiques déformables permettant de moduler la phase de l'onde lumineuse et corriger en temps réel les aberrations. Elle améliore considérablement la qualité d'image en ajustant activement des composants optiques, permettant ainsi une imagerie plus nette et une résolution accrue. Cette innovation a ouvert la voie à des avancées significatives en biologie cellulaire et en neurosciences, en offrant une vision plus précise des processus dynamiques et des structures en profondeur [100].

Afin de profiter des avantages de la LLSM en profondeur, nous avons décidé d'y intégrer l'AO. Un développement similaire a déjà été présenté par Liu et al. en 2018 [35] dans le but de corriger les aberrations induites par l'échantillon sur les chemins d'excitation et de détection. Cette intégration a permis l'acquisition volumétrique d'images avec une très haute résolution spatio-temporelle et jusqu'à plusieurs dizaines de microns sous la surface de l'échantillon, mais au prix de modifications complexes et coûteuses. Nous proposons une méthode alternative plus simple et économique pour maintenir une résolution submicrométrique dans les échantillons épais [101].

L'objectif de cette partie est de présenter les phénomènes à l'origine et les méthodes de correction des aberrations en microscopie de fluorescence, pour comprendre les choix réalisés dans le cadre de la thèse. Dans un premier temps, l'origine des aberrations optiques, ainsi que les autres phénomènes pouvant dégrader la résolution, seront présentés. Ensuite, les principales méthodes d'AO seront abordées pour expliquer la correction de ces perturbations en microscopie. Enfin, un focus sera fait sur l'AO dans le cadre de la SMLM et de la LSFM.

2.3.1. Propagation de la lumière : front d'onde et aberrations optiques

Le principe de front d'onde décrit la propagation de l'onde électromagnétique lumineuse. C'est la surface d'équiphase d'une onde définie par le théorème de Malus (Figure 13.A) : en tout point, le front d'onde est perpendiculaire à l'axe de propagation de l'onde. En d'autres termes, cette surface est composée de tous les points de même phase d'une onde, qui ont mis le même temps de parcours depuis la source.

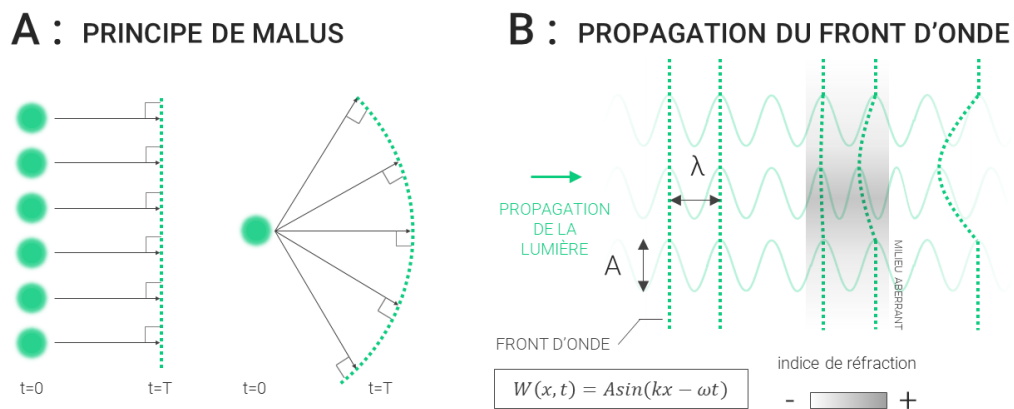


Figure 13 : Principe de représentation de la propagation de la lumière en front d'onde. **A.** Le principe de Malus indique qu'en tout point d'équiphase, le front d'onde est perpendiculaire à l'axe de propagation de l'onde lumineuse. **B.** Dans un milieu homogène, les ondes lumineuses (d'amplitude A et de fréquence λ) se propagent sans obstacle et le front d'onde (pointillé vert) ne subit aucune déformation. En traversant un milieu inhomogène (zone grisée), d'indice de réfraction variable, les ondes constituant le faisceau lumineux subissent des retards de phase locaux. Le front d'onde résultant est déformé.

Dans un cas idéal, si un faisceau collimaté ne subit aucune aberration, le front d'onde est plan. Les aberrations, dues aux variations d'indice de réfraction (Figure 13.B) vont conduire à un changement local de phase de l'onde lumineuse, ou à une déviation des rayons de propagation qui résulteront en une déformation de la surface du front d'onde. Les aberrations optiques peuvent être vues comme un écart de trajectoire entre les rayons réels et les rayons de propagations théoriques, dans un système idéal. En formalisme ondulatoire, ces aberrations sont vues comme une interaction onde-matière qui modifie la phase et l'amplitude des ondes lumineuses.

Cette surface peut être décrite par plusieurs fonctions mathématiques, dont les polynômes de Zernike (Figure 14). Ils permettent de définir la déformation du front d'onde par rapport à un front d'onde plan. Mathématiquement, ces polynômes sont orthogonaux entre eux, et continus à l'intérieur d'un disque de rayon r , qui correspond à une pupille circulaire (Figure 14). Cela signifie que chaque polynôme est indépendant de l'autre. Il apporte une contribution unique au front d'onde, contribution définie sur toute la surface du disque unitaire.

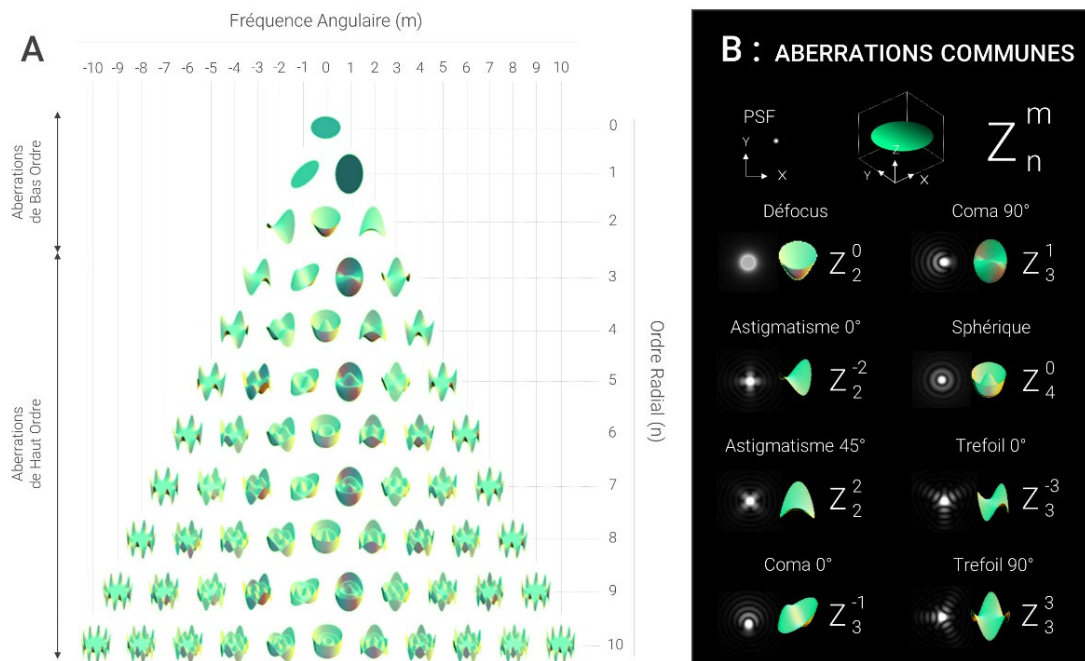


Figure 14 : Représentation tridimensionnelle des polynômes de Zernike. A. Polynômes de Zernike jusqu'à l'ordre radial 10. B. Polynômes de Zernike influant le plus fréquemment sur la déformation des images. Chaque aberration est associée à une représentation de la déformation engendrée à une PSF.

Ainsi, un front d'onde en coordonnées polaires, $W(r, \theta)$ ($\mu\text{m RMS}$ ou rad) est exprimé comme une somme de polynômes Z , d'amplitude C :

$$W(r, \theta) = \sum_{n,m} C_n^m Z_n^m(r, \theta)$$

Une description plus détaillée de la décomposition du front d'onde en modes de Zernike est présentée Annexe 1.

2.3.2. Aberrations optiques en microscopie de fluorescence

2.3.2.1. Aberrations induites par le système optique

On distingue deux types d'aberrations dues aux imperfections d'un système optique : les aberrations chromatiques et les aberrations géométriques. (1) Les aberrations chromatiques proviennent de la différence d'indice de réfraction du milieu en fonction de la longueur d'onde et entraînent un décalage spatial du point de focalisation. (2) Les aberrations géométriques sont dues principalement à l'ensemble des surfaces d'un système optique qui font que les rayons ne convergent pas tous sur le même point focal. Ce phénomène est particulièrement observable pour les rayons paraxiaux et marginaux.

Les techniques modernes de conception de lentilles et de miroir et de systèmes complexes (doublets, triplets, objectifs de microscopes) permettent de minimiser ces aberrations. Elles restent tout de même présentes, surtout lorsqu'on utilise des grandes NA. Il faut alors parfois avoir recours aux techniques d'AO pour corriger les aberrations du microscope.

L'aberration sphérique plus conséquente avec des objectifs à grande NA - comme démontré pour la microscopie confocale [102]–[104], multiphoton [103] ou encore en LSM [105] – est particulièrement importante à corriger. Pour cela, il est par exemple possible de modifier la lentille de tube, ajuster le milieu d'immersion pour recouvrir un indice de réfraction proche de l'échantillon ou contrôler l'ouverture de la pupille arrière de l'objectif. La méthode la plus accessible, et la plus communément utilisée, est l'utilisation d'objectif comportant un collier de correction pour l'aberration sphérique. Ce collier de correction permet de mouvoir axialement un groupe de lentilles pour corriger la propagation du faisceau à l'intérieur de l'objectif. Cette correction a été comparée à l'utilisation de l'AO, abordé dans la suite de cette thèse. Ji et al. [106] ont pu démontrer que la correction apportée par l'AO est plus significative et moins dépendante de l'angle de l'échantillon par rapport au plan focal de l'objectif.

2.3.2.2. Aberrations induites par l'échantillon

Les aberrations induites par un échantillon biologique peuvent être regroupées en deux classes : (1) les aberrations liées à l'interface entre l'échantillon et le milieu d'imagerie et (2) les aberrations liées aux entités au sein du tissu biologique.

2.3.2.2.1. Aberrations à l'interface de l'échantillon

En première approximation, les aberrations liées aux interfaces peuvent être décrites par la loi de Snell-Descartes :

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$$

En effet, c'est la variation d'indice entre les différents milieux qui va dévier la propagation des faisceaux d'excitation et de fluorescence. La majorité des milieux utilisés pour imager des échantillons biologiques vivants sont des solutions salines d'indice de réfraction approximativement égal à 1,34. Comparés à des indices de réfraction moyens allant de ~1,35 à ~1,40 pour les tissus neuronaux [107], l'interface milieu-échantillon est une source importante d'aberrations optiques.

Cependant, cette interface n'est pas systématiquement homogène et peut aussi être vue comme un dioptré aléatoire qui va induire de multiples réfractions. Ces deux phénomènes conjoints conduisent généralement à une déviation du faisceau et à une dégradation locale du front d'onde.

2.3.2.2.2. Aberrations au sein de l'échantillon et diffusion

L'ensemble des entités au sein d'un tissu biologique représentent des sauts d'indice de réfraction qui modifient la propagation des faisceaux, induisent des aberrations optiques et donc entraînent une baisse du signal et du contraste. En effet, la plupart des échantillons biologiques sont constitués de structures avec des variations d'indice de réfraction de l'ordre d'une dizaine de pourcent [108], [109], de par les structures qui les composent [107]. Ces variations locales sont également liées à un autre phénomène qui augmente avec l'épaisseur d'échantillon traversé : la diffusion.

La diffusion de la lumière se produit lorsqu'un photon rencontre une particule d'indice de réfraction différent de celui du milieu environnant et change de direction sans perdre d'énergie (diffusion élastique). Dans les tissus biologiques où la lumière rencontre des particules de tailles variées, on raisonne souvent à l'échelle macroscopique en utilisant le coefficient de diffusion, μ_s , dans la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 e^{-\mu_s Z}$$

où, I_0 , est l'intensité du faisceau avant de traverser le milieu, I , l'intensité transmise, z , l'épaisseur du milieu traversé. Cette loi renseigne sur la variation d'intensité d'un faisceau le long de son axe de propagation. Pour un tissu biologique, μ_s est généralement compris entre $\sim 100-500 \text{ cm}^{-1}$ [110]. Concrètement, ces valeurs, dépendantes de la longueur d'onde utilisée, dictent l'épaisseur d'échantillon à traverser (respectivement entre $\sim 100-20 \mu\text{m}$) pour que la diffusion soit majoritaire et qu'aucun des photons ne continue sa trajectoire initiale. Au-delà de cette profondeur, un front d'onde initialement plan (ou sphérique) devient progressivement aléatoire.

Ainsi, même si une solution AO est intégrée à un microscope pour corriger les aberrations au sein d'un échantillon, cette correction sera toujours partielle au-delà d'une profondeur qui dépend de la nature de l'échantillon.

En 2004, Schwertner et al. [111] propose une méthode d'interférométrie pour mesurer la quantité d'aberrations maximum en profondeur dans un échantillon lors de l'imagerie confocale ou multiphoton. Ils démontrent que les premiers ordres d'aberrations (4-22) ont un poids important et que l'aberration sphérique est l'aberration la plus présente. Une correction du front d'onde, à partir de ce système et sur une plus grande variété d'échantillons (dont des tranches de cerveaux) [112], confirme que le gain apporté par la correction des ordres >22 est négligeable.

2.3.3. Mesurer et corriger le front d'onde

L'AO a été initialement développée pour l'astronomie, à partir des années 50 [113]. Elle est devenue une technologie mature au début des années 80

[114][115]. Dans ce domaine, l'AO permet de compenser les effets de turbulence atmosphérique, qui dégrade la résolution des images, en ajustant en temps réel le front d'onde. Le front d'onde est mesuré à l'aide d'un WFS et corrigé grâce à WFC placé sur le chemin de détection du télescope. Les principes de l'AO ont ensuite été appliqués avec succès à l'ophtalmologie [116].

En microscopie optique, l'AO fonctionne sensiblement de la même façon qu'en astronomie. Elle requiert deux types d'instruments pour mesurer et corriger le front d'onde.

2.3.3.1. Analyseur de front d'onde

Le WFS permet de mesurer et analyser le front d'onde d'un faisceau. Initié par les travaux de Johannes Hartmann [117], au début du XX^e siècle et de Roland Shack [118], en 1970, l'analyseur de front d'onde Shack-Hartmann (SHWFS, de l'anglais « Shack-Hartmann WaveFront Sensor ») est l'instrument le plus utilisé en microscopie. Il fonctionne en mesurant les gradients de phase et l'intensité d'une onde lumineuse.

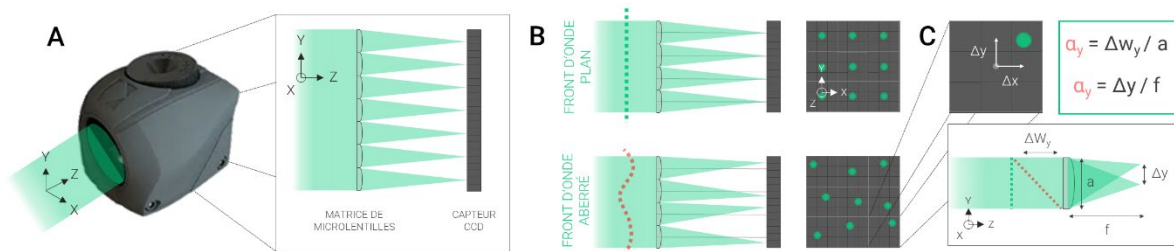


Figure 15 : Principe de fonctionnement d'un analyseur de front d'onde. **A.** L'analyseur de front d'onde est principalement composé d'une matrice de microlentilles et d'un capteur CCD. Lorsqu'un faisceau incident traverse la matrice, plusieurs points de focalisation sont créés sur le capteur CCD. **B.** Pour un faisceau sans aberrations (cas du haut), chaque sous-faisceau est focalisé le long de l'axe optique de chaque lentille. En résultat, la position centrale des points de focalisation pour chaque sous-groupe de pixel sur le capteur CCD (9 pixels dans chaque sous-groupe ici). Pour un front d'onde aberré (cas du bas), chaque onde lumineuse arrive avec une déviation angulaire locale. En conséquence, les sous-faisceaux sont focalisés avec une erreur de positionnement XY par rapport au centre de chaque sous-groupe de pixels. **C.** En mesurant cette erreur de position (Δx ou Δy) et en connaissant la focale de chaque lentille, il est possible de connaître l'angle local pour une portion de faisceau frappant la lentille considérée. Finalement, chaque angle permet de reconstituer le front d'onde global.

Le SHWFS est composé d'une matrice de microlentilles et d'une caméra matricielle placée au plan focal de cette matrice de microlentilles (Figure 15). Le faisceau incident traverse les microlentilles et se trouve focalisé en plusieurs points sur le capteur. Chaque foyer est focalisé sur une subdivision du capteur, composé de plusieurs pixels. Lorsque le faisceau a un front d'onde plan, sans aberrations optiques, chaque foyer est focalisé au centre de la subdivision. Lorsque le front d'onde est aberrant, chaque point de focalisation va subir un déplacement en deux dimensions qui va l'éloigner du centre. Cette variation de déplacement permet de mesurer une pente locale du front d'onde. En considérant que le front d'onde est continu, il est possible de le reconstruire dans son entièreté, par intégration [119].

Communément en microscopie optique, cet outil est utilisé en conjuguant la matrice de microlentilles avec la pupille arrière de l'objectif, ce qui permet avec un seul WFC de corriger tous les points de l'image. De plus, l'utilisation du point de focalisation pour mesurer la pente locale requiert que le faisceau provienne d'un point source. Dans les deux cas, le non-respect de ces conditions entraîne un mauvais confinement axial et/ou latéral de la lumière et une élongation des points focaux, dégradant la mesure du front d'onde [120].

L'imagerie d'un point source au sein d'échantillons biologiques peut être contraignante, car, dans la plupart des cas, l'intégration de billes fluorescentes est nécessaire. Ces billes [121], qui peuvent engendrer une phototoxicité accrue, sont souvent contraintes à la surface de l'échantillon ou de la lamelle et, sont difficiles à placer avec une bonne précision et une bonne densité au sein des zones d'intérêts. Ainsi, les aberrations optiques de certains types ou zones internes d'échantillons sont complexes à mesurer en utilisant le couple SHWFS-billes fluorescentes.

Pour limiter l'utilisation des billes, des étoiles guides artificielles, créées par un laser pulsé, peuvent être induites au plan focal d'imagerie [122]. Cette méthode qui a été utilisée dans l'intégration de l'AO sur le microscope LLSM [35] permet d'étendre la gamme d'échantillons observables par AO, mais aussi de bénéficier d'une mesure d'aberration sur un FOV accru. L'utilisation des billes limite la mesure des aberrations sur des zones localisées de l'échantillon. En balayant l'étoile guide sur l'ensemble d'un FOV et en descendant le signal généré, il est possible de mesurer un front d'onde moyen sur un plus grand FOV.

Un autre type de SHWFS permet de s'affranchir de l'utilisation de point source au sein de la source d'imagerie. Les analyseurs de front d'onde en scène étendue (ESSH, de l'anglais « Extended-Scene Shack-Hartmann ») [123] se basent directement sur l'image de l'échantillon pour calculer les pentes locales du faisceau de détection. L'image de l'objet d'intérêt se forme à l'arrière de chaque microlentille du capteur de front d'onde. Le décalage de chaque image par rapport aux images voisines est calculé par « cross-correlation », ce qui permet d'obtenir les pentes locales du front d'onde. L'ESSH permet une mesure rapide et directe au sein de l'échantillon, sans passer par un point source [124].

2.3.3.2. Correcteur de front d'onde

Les correcteurs de front d'onde, aussi appelés modulateurs de phase, sont principalement de trois types en microscopie optique : les DMs, les SLMs et les dispositifs optofluidiques.

2.3.3.2.1. Miroir déformable

Un DM se compose d'une surface réfléchissante, déformable, continue ou segmentée, et d'actionneurs placés dessous (Figure 16). Pour les DM à surface continue, l'ensemble de la membrane est poussé ou tiré par les actionneurs ce qui a pour effet de lui donner une forme non plate. Pour les DM à surface segmentée, les actionneurs jouent le même rôle, mais en déplaçant individuellement un miroir plan. C'est la somme des déplacements des miroirs individuels qui forme la surface. Dans les deux cas, cette surface réfléchissante modelée va permettre de modifier localement la phase d'un faisceau et donc de corriger les aberrations.

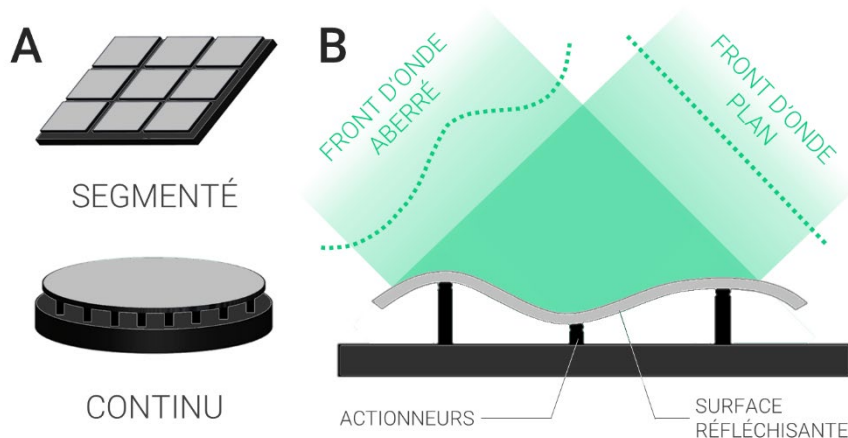


Figure 16 : Principe de fonctionnement d'un miroir déformable. Un miroir est composé de deux éléments principaux : les actionneurs et la surface réfléchissante. **A.** Cette surface est soit segmentée - chaque zone est liée à un actionneur – ou bien continue et repose sur l'ensemble des actionneurs. **B.** En modifiant sa forme, la surface est capable de compenser le retard de phase local du faisceau et ainsi de corriger les aberrations.

La technologie des actionneurs (bobine magnétique, piézoélectrique, MEMS...), le nombre d'actionneurs, le couplage interactionneurs, la vitesse, la course des actionneurs, le diamètre de la pupille et la finition de surface sont les principales caractéristiques d'un DM. C'est le nombre d'actionneurs qui détermine la résolution de l'appareil. La dynamique d'amplitude maximale, définit par la course individuelle d'un actionneur et le couplage par rapport aux autres (tension qui limite la course des actionneurs adjacents) donne la valeur limite corrigeable d'aberrations par le DM. Ces paramètres sont variables en fonction de la technologie utilisée pour concevoir le miroir ou pour faire mouvoir les actionneurs. Ce sont généralement les dispositifs les plus utilisés pour la correction des aberrations en microscopie optique [125], [126] :

- i. Contrairement au SLM, un DM est achromatique et donc capable de travailler sur des spectres de lumière plus larges. De plus, l'utilisation d'un SLM impose une polarisation de la lumière.
- ii. Dans la grande majorité des cas, ils ont un fonctionnement linéaire, avec une hystérésis inférieure à 2% pour les plus performants [127] ce qui facilite grandement leurs implémentations.

- iii. Les DM continus ne présentent pas d'effet de diffraction (faible effet d'empreinte) et ont un meilleur bilan photométrique (perte de photons plus faible) que les SLM ou les DM segmentés.
- iv. Leurs fréquences maximales (~500 Hz à quelques kHz) permettent une correction rapide [127]. Cela est tout de même à mettre en perspective avec la méthode de correction choisie.

Le DM utilisé dans le cadre de ce projet est un MirAO 52-e d'Imagine Optic. Il utilise des bobines magnétiques pour mouvoir les actionneurs.

2.3.3.2.2. Modulateur spatial de lumière

Un SLM est un dispositif optique qui permet de moduler la phase, l'amplitude ou la polarisation de la lumière. Il est composé de cellules à cristaux liquides qui transmettent ou réfléchissent la lumière incidente. Ces cristaux sont des matériaux qui peuvent modifier leur indice de réfraction sous l'influence d'un champ électrique appliqué. La couche de cristaux liquides est divisée en une matrice de pixels micrométriques, dont chacun peut être contrôlé indépendamment. En microscopie optique, cette technologie est généralement utilisée pour mettre en forme un faisceau d'illumination, comme en SIM [53] ou en LLSM [1]. Elle peut cependant aussi être utilisée dans la correction d'un front d'onde sur le chemin d'excitation [35], [122]. Son utilisation reste cependant limitée pour la microscopie de fluorescence, car ce type de système est généralement conçu pour travailler avec une lumière monochromatique et polarisée.

2.3.3.2.3. Dispositif optofluidique

Ces dispositifs fonctionnent en transmission et sont basés sur le principe de réfraction. En effet, ils sont capables de modifier leur forme en fonction du mouvement du fluide sous l'effet d'une pression localisée [128]. Cela entraîne une modification locale de la phase qui permet de corriger une partie des aberrations. Comparé aux DM et SLM, ils ont une résolution moindre, mais ils constituent une option intéressante, car leur taille et leur transmission leur permettent d'être facilement intégrées dans les systèmes d'imagerie existants [129]. Aujourd'hui, ces dispositifs ont un coefficient de transmission qui se situe généralement entre 80 et 95% en fonction des matériaux utilisés, et travaille à des vitesses d'environ 100 Hz [128], [130].

2.3.4. Mise en œuvre de l'optique adaptative en microscopie optique

L'AO en microscopie optique consiste en l'utilisation conjointe d'un correcteur et d'un analyseur. Notons que le correcteur, souvent un DM, doit être calibré à l'aide de l'analyseur. Ce dernier mesure les fronts d'onde résultant du mouvement

individuel des actionneurs pour « indiquer » au miroir son action sur le faisceau. Après cette étape de calibration, deux approches distinctes émergent : la correction directe et la correction indirecte.

2.3.4.1. Correction par mesure directe du front d'onde

La correction par mesure directe du front d'onde, utilise à la fois un WFC et un WFS (Figure 17). Son principe consiste à mesurer le front d'onde d'un faisceau incident, passant par le WFC et de modifier la forme du WFC pour corriger ces aberrations. Généralement, cette correction est itérative : plusieurs mesures/corrections successives sont réalisées pour obtenir un front d'onde quasi-plan. Pour une correction directe pendant l'imagerie, une partie du faisceau est envoyée vers le SHWFS ce qui réduit le signal d'imagerie.

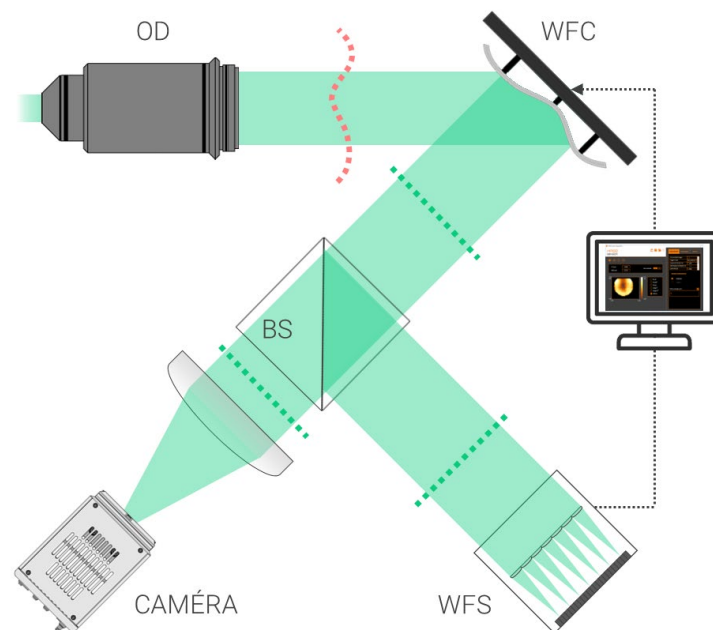


Figure 17 : Principe de correction optique adaptative par mesure directe du front d'onde. Un faisceau de détection provenant d'un objet de détection (OD) est réfléchi par un correcteur de front d'onde (WFC, miroir déformable dans ce cas-là). Une partie de faisceau est envoyée vers la caméra d'imagerie (CAMÉRA), et une autre partie vers l'analyseur de front d'onde (WFS). La mesure du front d'onde permet de renseigner, par l'intermédiaire d'une matrice d'interaction, la forme de miroir pour corriger les aberrations optiques.

Le principal avantage de cette méthode est sa rapidité. En effet, les temps de calcul étant négligeables, la mesure et la correction du front d'onde ne sont limitées que par la vitesse des deux instruments. Les progrès réalisés aujourd'hui permettent d'atteindre des vitesses de fonctionnement supérieures à 100 Hz et bien moindres que les temps d'exposition engagés en microscopie de fluorescence. Cette rapidité a permis de l'imagerie en haute résolution de développement embryonnaire [35], [122], d'activité calcique ou bien d'imagerie *in vivo* au sein de tranches de cerveaux [131]. Cette vitesse permet aussi de diminuer le

photoblanchiment de l'échantillon et éventuellement de corriger les aberrations de plusieurs zones de l'échantillon pendant une acquisition en « mosaïque ».

Son efficacité en fait également une méthode de choix pour recouvrer le pouvoir de résolution optimale du microscope. Dans le cas d'une imagerie en profondeur pas ou peu limitée par la diffusion, seules les caractéristiques des instruments limitent le pouvoir de correction de l'AO. Avec des résolutions respectives d'environ 0,01 μm RMS et de $\lambda/100$ pour le DM et le SHWFS, une correction en boucle fermée est facilement capable d'atteindre des erreurs résiduelles de l'ordre de la dizaine de nm RMS.

Bien qu'elle soit efficace et rapide, cette méthode entraîne trois problématiques.

- i. Une correction directe demande l'imagerie d'un point source au sein de l'échantillon créé soit à partir de billes fluorescentes ou d'une étoile guide artificielle (cf. 1.3.3.2), mais la première engendre des contraintes d'intégration et de phototoxicité lors de la préparation de l'échantillon et la seconde complexifie grandement le système optique avec l'implémentation d'un laser pulsé.
- ii. Une partie du signal est envoyé vers le SHWFS ce qui réduit le nombre de photons disponibles pour l'imagerie.
- iii. La principale limitation de la correction par mesure directe est son incapacité à mesurer correctement dans un échantillon diffusant, ce qui limite généralement la méthode aux échantillons transparents ou à l'imagerie de faible profondeur des échantillons opaques.

2.3.4.2. Correction indirecte du front d'onde : approche modale

La correction indirecte n'utilise qu'un WFC. Aucune mesure directe du front d'onde n'est réalisée. Pour connaître la quantité d'aberrations à corriger, la correction se base sur l'optimisation d'une métrique mesurée sur l'image. Plusieurs sous-catégories de correction existent en fonction de l'instrument ou du microscope utilisé : la correction zonale [132]–[134], la correction par récupération/diversité de phase [135]–[138], ou la correction modale. Dans le cadre de cette thèse nous nous sommes concentrés sur l'approche modale qui (1) ne nécessite pas l'utilisation de points sources, (2) est capable de travailler efficacement sur des niveaux de signal faibles et (3) est très répandue, étudiés dans le cadre de nombreux microscope et dont l'implémentation est plus simple.

Dans l'approche modale, le front d'onde est représenté comme continu sur toute la surface de la pupille et comme une somme d'aberrations, généralement mathématiquement décrites par des polynômes de Zernike (pour une pupille circulaire). Ces modes de Zernike sont appliqués séquentiellement au DM et les

changements dans l'image sont quantifiés à l'aide d'une métrique telle que l'intensité ou la netteté de l'image.

Dans l'approche classique (Figure 18), nommée 2N+1, 3N ou optimisation basée sur un modèle (MBO, de l'anglais « model-based optimization »), deux coefficients sont appliqués au DM, de part et d'autre de la valeur de référence. En résultat, trois images correspondantes aux trois coefficients appliqués : $-\alpha$, 0 et $+\alpha$. On mesure ensuite une métrique sur les images résultantes et une courbe (généralement parabolique) peut être tracée. Il convient ensuite de déterminer l'amplitude d'aberration à appliquer au DM qui permet de maximiser la métrique. Lorsque la valeur de la métrique est à son optimum, la dégradation de l'image est annulée : l'amplitude appliquée au miroir permet d'annuler l'aberration créée par l'échantillon. D'autres modes peuvent ensuite être corrigés itérativement.

Pour converger vers une forme de miroir qui corrige un maximum d'aberrations, les paramètres d'entrées de la MBO doivent être judicieusement sélectionnés en fonction : (1) de la quantité d'aberrations, (2) du type d'aberrations et de leurs impacts sur l'information de l'image et (3) du temps de correction.

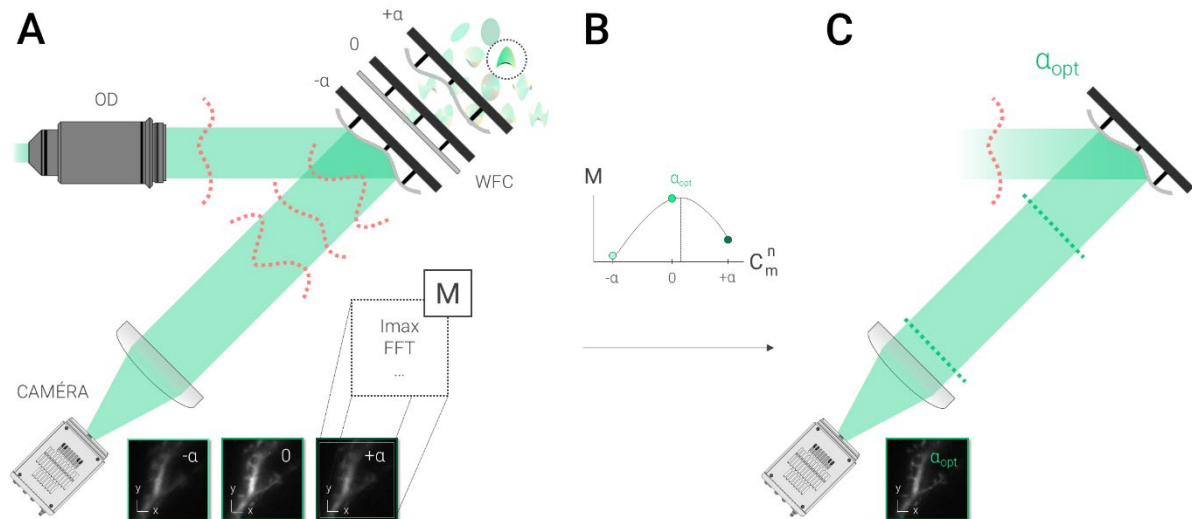


Figure 18 : Principe de correction optique adaptative par mesure indirecte du front d'onde. **A.** Un faisceau, comprenant des aberrations optiques (seulement l'astigmatisme 45° dans ce cas), est propagé par un objectif de détection (OD) et réfléchi par un correcteur de front d'onde (WFC, un DM ici). Successivement, trois coefficients ($-\alpha$, 0, $+\alpha$) sont appliqués au DM pour l'aberration sélectionnée (astigmatisme 45° entouré en pointillé). En résultent trois images, comprenant un niveau d'aberration différent (à droite de CAMÉRA). Pour chaque image, une métrique M est mesurée. **B.** Les valeurs de métriques M tracées en fonction des coefficients appliqués C_m^n permettent un ajustement pour trouver le coefficient α_{opt} qui permet de maximiser la métrique et donc minimiser la quantité d'aberrations. **C.** Ce coefficient est appliqué au DM pour corriger l'aberration sélectionnée.

2.3.4.2.1. Choix de la métrique

La métrique, ou facteur de mérite, est sûrement le paramètre le plus important pour la correction 3N. C'est cette métrique qui sonde l'image et en retire les informations nécessaires. Les aberrations dégradant la qualité de l'image, l'objectif est de trouver une métrique dont la valeur varie avec l'augmentation d'un mode d'aberration. La variation de la métrique en fonction de l'aberration peut alors être décrite par une fonction gaussienne, lorentzienne [139] ou polynomiale [101]. L'optimum de la courbe correspond au minimum d'aberration. La métrique dicte la sensibilité de la correction. Plus le facteur de mérite varie en fonction de l'aberration appliquée, plus la courbure de la fonction sera importante et donc plus l'ajustement sera précis pour de faibles variations d'amplitude appliquées au miroir. Ainsi, il convient de choisir judicieusement l'information à sonder en fonction des propriétés de l'image de l'échantillon observé.

- i. Les aberrations affectent à la fois l'intensité et la résolution des images. Les travaux menés par Debarre et al., Zeng et al. et Facomprez et al. [139]–[141] ont démontré l'intérêt d'utiliser l'intensité moyenne pour la correction 3N en microscopie multiphoton. Bourgenot et al. [142] démontre également l'utilisation d'une métrique définie comme la variation quadratique moyenne du contraste (RMS contrast) pour la correction de fortes quantités d'aberrations sur des billes fluorescentes de $2\mu\text{m}$ dans l'agarose imagées avec un microscope à feuille de lumière.
- ii. En fonction de la profondeur d'imagerie ou de la quantité de signal, l'intensité n'est parfois pas assez sensible aux variations d'aberrations. Observer le contenu fréquentiel de l'image peut permettre d'accéder à cette information. Dès 2007, Débarre et al [143] se concentre sur les basses fréquences de l'image en utilisant l'énergie de la transformée de Fourier (FT). Ils démontrent que plus les basses fréquences sont prises en compte, moins la métrique est sensible et plus l'amplitude de correction à appliquer doit être importante. Dans un article consacré à la correction des aberrations optiques sur un microscope à feuille de lumière multivues, Royer et al [144] décrivent plusieurs métriques utiles pour l'autofocus d'une feuille de lumière. Parmi elles, les métriques basées sur la transformée discrète en cosinus (DCT, de l'anglais « Discrete Cosine Transform ») semblent plus performantes que les métriques basées sur la FT. Les auteurs expliquent cela par le fait que la DCT produit une meilleure compression du signal de l'image et concentre la majeure partie de l'information dans les basses fréquences. Ainsi, le bruit est séparé plus efficacement du signal d'intérêt. En appliquant un filtre passe-bas comme l'entropie de Shannon, on obtient une métrique très sensible.

- iii. Au sein de ces métriques, la métrique « Sharpness » semble particulièrement adaptée à la SMLM. Présentée pour la première fois par Gould et al. [145], elle est réutilisée par Burke et al. [78] pour l'imagerie STORM. Elle consiste en l'application d'un masque sur la transformée de Fourier normalisée de l'image et permet de ne pas être sensible à l'intensité et au nombre de scintillements dans l'image tout en coupant les hautes fréquences correspondantes au bruit. Mlodzianoski et al. [146], modifie cette métrique afin d'y incorporer le poids de l'OTF qui représente les caractéristiques du système. Cela permet de couper l'ensemble des fréquences au-delà de la demi-fréquence de coupure du système. Récemment, Siemons et al. [147] ont comparé la métrique originale et sa modification. Ils démontrent qu'en modalité DNA-PAINT, la variation de signal entraîné par les aberrations se déroule majoritairement sous la limite NA/λ . La métrique « sharpness » modifiée y est plus sensible, car elle fonctionne comme un filtre pondéré sur les basses fréquences et de coupure sur les hautes fréquences, ce qui lui permet de coïncider parfaitement à la zone de variation fréquentielle.

2.3.4.2.2. Choix de l'amplitude

La quantité d'aberrations induites par l'échantillon, exprimée en $\mu\text{m RMS}$ ou en radians (rad), doit être comprise dans l'amplitude $[-\alpha, +\alpha]$ de coefficients appliqués pour chaque aberration. Cette amplitude peut être vue comme la dynamique de courbe de réponse de la métrique qui va être sondée. Si la quantité d'aberrations à corriger est importante, la valeur de métrique référentielle du DM (coefficient 0, Figure 19) va être éloignée de l'optimum de réponse. En appliquant une amplitude trop faible au miroir les valeurs obtenues ont de grande chance de se trouver en dehors de l'optimum (Figure 19.A). A contrario, si l'amplitude est trop importante, l'ajustement sera moins précis (Figure 19.B).

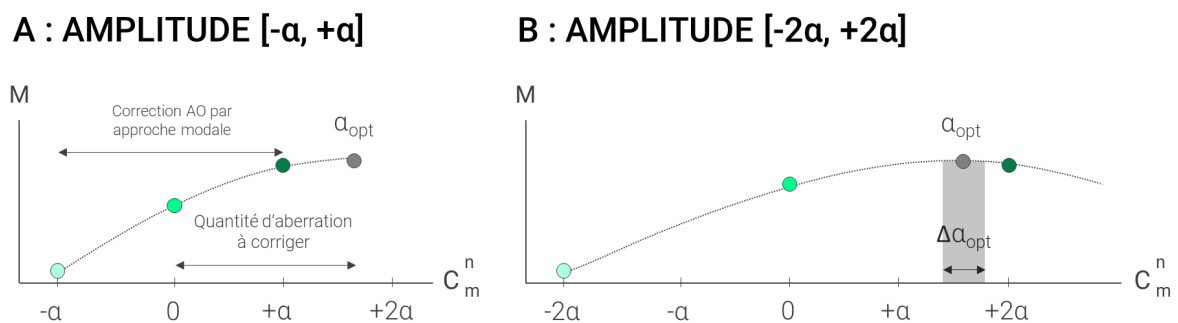


Figure 19 : Rôle de l'amplitude appliquée au miroir déformable pour la correction d'une grosse quantité d'aberrations. **A.** Cas où l'amplitude $[-\alpha, +\alpha]$ est insuffisante pour corriger la quantité de l'aberration sondée. Ici, l'algorithme ne parviendra pas à trouver de solutions. **B.** Cas où l'amplitude $[-2\alpha, +2\alpha]$ parvient à inclure le niveau d'aberration à corriger, mais où la précision est limitée. La grande amplitude conduit à un ajustement de pente faible, et donc à une incertitude de localisation ($\Delta\alpha_{opt}$) sur la réelle valeur d'aberration α_{opt} .

- i. Débarre et al. [143] traite ce point en corrigeant une quantité d'aberrations connues avec une optimisation $2N+1$ et en mesurant l'erreur entre le front d'onde corrigé et le front d'onde aberrant initialement. L'article démontre que l'amplitude sélectionnée ne doit pas dépasser la largeur à mi-hauteur de la courbe de réponse de la métrique aux aberrations afin de garder une bonne précision, mais ne doit pas être trop faible sous peine de ne pouvoir corriger l'aberration.
- ii. Facomprez et al. [139] réitère cette expérience dans le cadre de la microscopie multiphoton. Ils démontrent une nouvelle fois que (1) l'amplitude appliquée au miroir est fortement dépendante de la réponse de la métrique et de l'ajustement effectué pour trouver l'optimum et (2) qu'idéalement cette valeur doit être choisie de telle sorte à correspondre à la largeur à mi-hauteur de la courbe.

2.3.4.2.3. Rapidité vs. Efficacité

Le dernier paramètre à prendre en compte est le nombre de mesures faites pour corriger un mode d'aberration. Il est aisé de comprendre que plus le nombre de mesures pris dans l'intervalle - l'échantillonnage - sera élevé, plus la qualité de l'ajustement et donc la précision de mesure sera grande. Toutefois, ajouter des mesures correspond à augmenter le nombre d'images acquises et donc diminuer la vitesse de correction. Pour trouver la bonne balance entre ces deux paramètres, quelques études ont été menées.

- i. Facomprez et al. [139] testent la correction modale indirecte avec 3, 5 et 9 mesures prises par mode. L'apport du $5N$ permet de corriger plus efficacement les aberrations. Le $9N$ n'y apporte qu'une légère amélioration au prix de quatre images supplémentaires.
- ii. Siemons et al [147] explorent un plus grand nombre de points de mesures : 5, 7, 9, 11, 13. Après une correction complète sur des aberrations induites, le niveau de correction pour ces cinq expériences est sensiblement similaire.

De plus, le nombre d'itérations et l'ordre de correction peuvent avoir une grosse influence sur l'efficacité de la correction. Pour un jeu d'aberrations donné, (1) si la quantité d'aberrations est trop forte, la première itération risque d'être peu précise : l'amplitude du DM sélectionné sera grande et l'ajustement moins précis. (2) Si un mode prend le pas sur les autres, l'image va être fortement dégradée ce qui va diminuer la sensibilité de l'ajustement pour les autres modes.

- i. Facomprez et al. [139] démontrent qu'au bout de deux itérations avec l'algorithme $5N$, le front d'onde résiduel atteint un plateau.
- ii. Siemons et al. [147] montrent que trois itérations d'algorithmes comprenant 9 points de mesures est la stratégie la plus efficace.

Cependant, les performances de correction après deux itérations comprenant 7 et 9 points de mesures, semble tout aussi efficace.

2.3.4.2.4. Autres types d'algorithmes en correction modale

D'autres algorithmes ont été testés en AO indirect : les algorithmes génétiques (GA, de l'anglais « Genetic Algorithm ») et l'optimisation d'un simplexe (DSA, de l'anglais « Downhill Simplex Algorithm »).

- i. Le GA est un processus « machine learning » qui évalue, modifie et sélectionne une population d'informations en fonction d'un ou plusieurs paramètres. Wright et al. [148] démontrent pour la première fois son utilisation pour corriger les aberrations d'un microscope confocal ou multiphoton. Son principe consiste à tester une population de plusieurs fronts d'onde (formes de miroir générées aléatoirement) en mesurant une métrique sur les images résultantes. Tant que la métrique ne converge pas vers un maximum, un nouveau jeu de données est généré en retirant les entités ayant donné les moins bons résultats. Poland et al. [149] testent l'utilisation de plusieurs métriques pour montrer l'efficacité du GA sur un microscope confocal. Toutefois, l'efficacité et la rapidité du GA y sont comparées à des méthodes de correction ne s'appuyant pas sur l'application de polynômes de Zernike, mais sur le changement de position aléatoire d'un ou plusieurs actionneurs d'un DM. Plus récemment, Tehrani et al. [150] ont combiné cette méthode à une métrique fréquentielle sur l'image pour la microscopie SMLM.
- ii. Mlodzianoski et al. [146] propose d'utiliser le DSA pour l'optimisation de PSF en imagerie super-résolue. Cette méthode mathématique repose sur la diminution d'aire d'une fonction à $N+1$ dimensions dans un espace à N dimensions. Les variables de la fonction s'ajustent jusqu'à obtenir un point où la fonction est localement minimale. Dans ce cas, la fonction est la forme du miroir et les variables sont les coefficients de Zernike. Un facteur de mérite fréquentiel est utilisé pour ajuster les coefficients au cours de l'optimisation. L'article démontre une amélioration de la résolution pour l'imagerie de tranche de cerveaux de souris de $30\mu\text{m}$ d'épaisseur avec un microscope HILO.

Bien que ces deux autres méthodes permettent de corriger les aberrations pour la SMLM, qui nécessite des échelles de temps longues, elles restent limitées par leur rapidité. Pour exemple, la solution proposée par Tehrani et al. demande plusieurs milliers d'images avant de converger vers une forme optimisée. De plus, Siemons et al. ont démontré que ces deux algorithmes d'optimisation convergent vers un front d'onde résiduel plus élevé que la correction classique [147].

2.3.4.3. Correction par l'utilisation du Machine-Learning

Le « machine learning » (ML) est une solution intéressante afin d'augmenter la rapidité et l'efficacité des corrections AO. Une approche du ML est l'apprentissage supervisé, généralement architecturé par un réseau de neurones (NN, de l'anglais « Neural Network »). Ce type d'apprentissage permet à un modèle mathématique d'apprendre des fonctions de traitement en ajustant le poids de paramètres d'entraînement et en utilisant des fonctions d'activation non linéaire. Une fois qu'un NN est correctement entraîné, il acquiert la capacité de faire des prédictions ou d'effectuer des tâches spécifiques avec une précision acceptable. Avant d'utiliser le NN entraîné, il est important de l'évaluer pour mesurer sa performance. Cela implique de tester le réseau sur un ensemble de données distinct, appelé ensemble de validation, qui n'a pas été utilisé pendant l'entraînement.

Plusieurs méthodes basées sur le NN commencent à émerger pour corriger les aberrations optiques.

- i. Dans un premier temps, l'analyse s'est faite sur le cas simple de la PSF, qui permet de réduire considérablement les informations et donc le jeu d'entraînement. Plusieurs types d'entraînement y sont testés : soit à partir de données expérimentales [151], soit à partir de PSF théorique simulée [152]. Bien que ces méthodes démontrent une certaine efficacité, elles restent cantonnées à l'imagerie de point source au sein des échantillons. Pour se rapprocher des méthodes de corrections indirectes, des NN basant la correction sur les images commencent à être développés. La problématique reste de déterminer l'information à analyser et les variables d'ajustements à entraîner.
- ii. Certains proposent d'utiliser le NN en l'entraînant sur des principes physiques de formation de l'image. Wang et al. [153] proposent en 2020 de baser la correction sur le pattern de diffraction des images alors que Bostan et al. [154] jouent sur la minimisation d'un gradient d'intensité entre une image théorique aberrée et une image réelle. L'avantage majeur de ces deux méthodes est qu'elles utilisent des NN non entraînés, car elles sont basées sur des principes de formations d'images connues.
- iii. D'autres méthodes se basent sur les informations fréquentielles contenues dans l'image. On peut notamment citer le travail de Hu et al. [155] qui combinent (1) l'utilisation de données simulées ; basées sur la formation de l'image en microscopie, pour l'entraînement du NN et (2) l'acquisition de données expérimentales modifiées par l'application de coefficients de Zernike (comme en méthode modale). L'acquisition de deux images, correspondants à deux coefficients de Zernike appliqué par un DM, permet de varier le contenu fréquentiel de l'image et d'obtenir une pseudo-PSF, utilisée pour trouver le

coefficient qui optimise son contenu fréquentiel. Cette technique ne requiert que la présence d'un WFC et est testée sur des microscopes multiphoton et d'épifluorescence.

- iv. Récemment, Rai et al. [156] ont développé un algorithme NN pour la LSFM. Chaque NN, entraîné sur un jeu d'images d'aberrations connues, traite séparément la correction des aberrations les plus importantes. Ils ont pu démontrer que ce type de correction permet de corriger une grande partie des aberrations en profondeur de tranches de cerveaux clarifiés.

Développées depuis peu, ces techniques appliquées à la correction des aberrations semblent prometteuses, mais un recul de quelques années sera sûrement nécessaire pour démontrer leurs efficacités comparées aux autres méthodes d'AO. De plus, elles requièrent l'utilisation de données d'entraînement qui sont parfois complexe à automatiser dans la durée, en fonction du microscope ou de l'échantillon observé. Toutefois la versatilité de ces méthodes peut en faire un atout majeur pour améliorer la résolution des images. Appliqué aux méthodes AO déjà existantes ou utilisant des jeux de données partagées, le ML semble être une méthode de choix pour détecter/traiter rapidement et efficacement les phénomènes qui dégradent la qualité des images. Pour preuve, de nombreux NN sont déjà utilisés pour le « denoising » et la déconvolution des images [157], [158].

2.3.5. Optique adaptative et LSFM

En LSFM, l'illumination est indépendante du chemin de détection. L'AO peut donc être appliquée sur le chemin d'illumination et celui de détection. En ce qui concerne l'illumination, la feuille de lumière doit produire un sectionnement optique colocalisé avec le plan focal de l'objectif de détection. Deux effets peuvent dégrader ce co-alignement : (1) une déviation angulaire ou translationnelle de la feuille de lumière par rapport au plan focal produit une image dégradée, floue [159], (2) les aberrations optiques qui modifient la mise en forme du faisceau le long de son axe de propagation.

- i. Le positionnement précis de la feuille permet de maintenir une qualité d'imagerie optimale comme démontré par Royer et al. [160], [161] grâce à un système optomécanique motorisé complexe. Cette correction est d'autant plus nécessaire que le saut d'indice de réfraction à la surface de l'échantillon peut entraîner une déviation de l'illumination [162]. Combiné au rayon de courbure de la surface de l'échantillon, cela conduit à un décalage tridimensionnel de la feuille qui croît avec sa distance de pénétration [35]. On peut considérer ce recalage de la feuille de lumière sur le plan focal de l'objectif de détection comme une correction des aberrations de bas ordre (tip/tilt/defocus).

- ii. Liu et al. [35] utilisent également un repositionnement de la feuille de lumière à travers l'utilisation d'un galvanomètre pour un « autofocus » de la feuille, mais ils combinent cette correction à l'utilisation d'un SLM pour la correction des aberrations induites par l'échantillon sur le faisceau d'illumination. Cette méthode est également expliquée par Wilding et al. [163] en 2016.

Pour les configurations LSFM intégrant deux objectifs, la correction à l'illumination est généralement accompagnée d'une minimisation des aberrations à la détection. Plusieurs méthodes de correction ont été testées.

- i. En plus de corriger les aberrations à l'illumination, Liu et al. [35] compensent les aberrations sur le bras de détection. La correction se base sur une mesure directe du front d'onde générée par une étoile guide 2P via un WFS et un DM. La rapidité de correction permet l'imagerie du vivant à plusieurs échelles, allant jusqu'à l'imagerie à 200 μm sous la surface de cerveaux de *Zebrafish*.
- ii. Turaga et Holy sont les premiers à tester cette correction sur un microscope LSFM [162], [164]. Ils utilisent une configuration excitation-détection où la feuille de lumière, directement créée par la combinaison d'une fibre monomode et de lentilles cylindriques, traversent l'échantillon par le dessus et orthogonalement d'un objectif de détection [165]. Ils utilisent ensuite une méthode de correction basée sur la diversité de phase à la détection, en plaçant un DM entre l'objectif et la caméra. Le point clé de leurs méthodes repose sur la calibration du DM sans utiliser de point source. Cette méthode de correction, accompagnée d'un « autofocus » de la feuille de lumière par un miroir, permet d'obtenir un front d'onde après calibration d'environ 30 nm RMS.
- iii. Bourgenot et al. [142] proposent une méthode de correction par approche modale pour corriger les aberrations induites par l'utilisation d'une pipette en verre où est placé l'échantillon. La métrique est basée sur un masque de fréquence et corrige les douze premiers modes de Zernike (hors « tip/tilt »). Même si cette méthode est intéressante, sa démonstration reste limitée par l'imagerie d'un échantillon *Zebrafish* qui induit peu d'aberrations, pouvant être compensées par le choix de la pipette adéquate.
- iv. Rai et al. [159], proposent une méthode LSFM intégrant l'AO pour l'imagerie d'échantillons de grande dimension (7x6x5 mm³) clarifiés. La correction se concentre sur les aberrations « coma », « astigmatisme », « trefoil » et « sphérique » et se décompose en deux étapes : une recherche large des valeurs d'aberrations, puis une mesure plus fine, basée sur la mesure de la métrique DCTS. Cela conduit à un total d'environ 15 images acquises par mode

d'aberration. Combinés à une correction « autofocus » et rotationnelle de la feuille de lumière, à l'aide d'un algorithme ML [166], ils démontrent une augmentation de 64% de l'énergie de la DCTS.

Enfin, on peut également citer plusieurs techniques LSFM qui bénéficient de la rapidité de correction apportée par les technologies AO plus récentes :

- i. Rai et al. [156] ont récemment adapté la correction des aberrations de fluorescence au ML en comparant deux architectures : une comprenant plusieurs réseaux de neurones pour chaque mode d'aberration et une autre définie par un seul réseau de neurones pour l'ensemble de la correction. La première architecture montre des résultats similaires à la méthode classique avec seulement deux images acquises.
- ii. Hubert et al. [123], [124], démontrent l'utilisation d'un module d'AO comprenant un DM et un ESSH pour corriger les aberrations optiques à la détection d'un LSFM. L'article démontre l'imagerie de l'activité calcique au sein de cerveaux de drosophiles, avec une correction de 20 à 40 modes de Zernike prenant moins de ~500 ms par zone isoplanatique.

2.3.6. Optique adaptative et SMLM

En SMLM, la présence d'aberrations optiques a un effet majeur sur la reconstruction de l'image [167]. Chaque émetteur doit être identifié et adapté à un modèle de PSF. Les aberrations affectent l'étape de localisation, s'il y a un décalage entre la PSF du système et le modèle théorique. Il y a deux conséquences principales : soit l'ajustement peut ne pas répondre aux critères et la molécule détectée sera rejetée, soit l'ajustement est accepté, mais avec une précision de localisation réduite. Pour contrer cet effet, d'autant plus important pour l'imagerie 3D en profondeur, l'AO est devenu un outil très utilisé en SMLM :

- i. Dès 2015, Burke et al. [78] utilisent l'AO sur un microscope d'épifluorescence pour l'imagerie STORM. La méthode proposée est une correction indirecte modale, qui s'appuie sur une métrique mesurant les variations de fréquences d'une image au sein d'un masque minimisant les basses fréquences et englobant les hautes fréquences jusqu'à la limite de diffraction ($\lambda/2NA = 240$ nm). L'article démontre l'amélioration de la résolution sur des microtubules imagés à ~6 μm de profondeur via un gain de FRC allant de ~15-30% et un doublement du nombre de localisations. Aussi, l'astigmatisme est utilisé pour l'imagerie 3D sur une plage d'environ 400 nm.
- ii. Mlodzianoski et al. [146] démontrent l'utilisation d'un microscope HILO avec une feuille de ~11 μm d'épaisseur sur une aire ~32x32 μm^2 pour l'imagerie 3D à 30 μm de profondeur sous la surface d'une

tranche de cerveaux de souris. La métrique consiste en une modification de la métrique de Burke et al. [78], modifiée pour la correction des aberrations sphériques, et basées sur une approche algorithmique différente. En modifiant la quantité d'astigmatisme en fonction de la profondeur, il est possible de conserver une résolution axiale inférieure à ~ 30 nm jusqu'à ~ 170 μm de la surface.

- iii. Siemons et al. [147] utilisent aussi l'épifluorescence pour l'imagerie 3D au sein de différents tissus DNA-PAINT. Ils adaptent la métrique de Mlodzianoski et al. [146] à l'approche modale pour acquérir l'organisation de la spectrine dans les axones à 50 μm de profondeur d'une couche corticale de souris, sur une plage de 1 μm , avec une amélioration de la FRC d'environ 30%.

Toutefois, même si ces techniques montrent des résultats encourageants, l'architecture des microscopes choisis limite les performances de l'AO en mesure indirecte. (1) L'épifluorescence induit un bruit de fond qui diminue le contraste de l'image, la localisation des molécules individuelles, mais aussi la correction basée sur la recherche des hautes fréquences de l'image. (2) Le HILO offre un meilleur sectionnement, mais seulement à proximité immédiate de la surface de l'échantillon où les aberrations restent parfois limitées. Ainsi l'approche indirecte, basée sur la mesure d'une métrique de l'image, souffre de ce contexte.

Pour maximiser la correction des aberrations optiques, certaines méthodes s'appuient sur la mesure directe des aberrations.

- i. En 2021, Navikas et al. [168] proposent de combiner une correction de la dérive axiale (par l'utilisation d'un laser IR ou du TIRF) avec un module d'AO à la détection d'un microscope d'épifluorescence, pour l'imagerie 3D avec une plage axiale de 10 μm . Chaque plan d'imagerie est réalisé sur 1 μm avec l'application de 60 nm RMS d'astigmatisme. La précision de localisation latérale varie de 29 à 38 nm de la surface à la profondeur, mais la précision de localisation axiale reste égale à ~ 130 nm. Bien que cet article démontre la stabilité du module AO pour l'imagerie 3D-SMLM, la correction des aberrations pour chaque plan est en fait effectuée sur une bille avec un algorithme 3N.
- ii. Park et al. [169] ont récemment développé une méthode, nommée CLASS (de l'anglais « Closed-Loop Accumulation of Single-Scattering »), basée sur la construction d'une matrice de réflectance à partir d'images obtenues à différents angles d'illumination, pour obtenir une reconstruction du front d'onde. Les aberrations sont ensuite annulées par l'application de la matrice inverse sur un SLM dans un bras de détection SMLM. Cette méthode a l'avantage de mesurer les aberrations sans fluorescence et est particulièrement efficace en profondeur, où le signal devient quasiment indétectable et ne peut donc pas servir à une correction AO en mesure indirecte. Ils

imagent entre autres des épines dendritiques à l'intérieur de tranches de cerveaux épaisses à ~ 50 et ~ 74 μm de profondeur avec une amélioration respective de ~ 10 et ~ 5 fois du nombre de localisations et une précision de localisation passant de ~ 65 à ~ 38 nm.

D'autres utilisent la LSFM, technique de sectionnement optique plus adaptée à la SMLM en profondeur.

- i. Hung et al. [170], intègrent l'AO sur le microscope LSFM à objectif unique SOLEIL. La méthode de correction est basée sur une mesure indirecte des aberrations du front d'onde par une métrique basée sur les hautes fréquences de l'image et 11 images acquises par mode de Zernike. En 2D, ils démontrent un gain de 47% de la FRC à 65 μm de profondeur lors de l'imagerie STORM de cellules Caco2-BBE, mais à partir des aberrations induites par une couche artificielle (buffer STORM). En 3D-SMLM, basé sur l'astigmatisme, la correction des aberrations permet d'améliorer la précision de localisation latérale (de ~ 30 à ~ 24 nm) et axiale (de ~ 115 à ~ 55 nm).
- ii. On peut également citer les travaux menés par Rémi Galland, Hisham Forrière et Corey Butler de l'équipe Sibarita (IINS) concernant l'utilisation de l'AO sur le soSPIM pour la SMLM en 3D [171], [172].

En conclusion, les techniques AO non invasives (mesure indirecte du front d'onde), implémentées pour la LSFM ou la SMLM démontrent la correction des aberrations au sein de tissus épais complexes comme les tranches de cerveaux. Généralement, l'AO est utilisée à des profondeurs faibles, à cause des techniques employées, ou bien sur des échantillons favorables à l'identification simple des aberrations (échantillon clarifié de grande dimension, *Zebrafish*, couches de tissus artificielles...).

3. Méthodologie

Dans le cadre de ma thèse, le projet de modification du système LLSM a été initié avec plusieurs équipes de l'IINS qui cherchent à imager les cellules neurologiques au sein de tranches de cerveaux. Le développement réalisé dans le cadre de cette thèse n'est cependant pas destiné uniquement aux applications en neurosciences. Les tranches de cerveaux, organotypiques ou aigües, ont une épaisseur pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de μm . Le microscope LLSM est un instrument parfaitement approprié pour imager ce type d'échantillons. (1) Il offre des résolutions latérale et axiale proches de la limite de diffraction sur des FOVs de 100 μm de large sur 15 à 50 μm selon la longueur de la feuille, ce qui permet d'imager des structures allant du soma à l'épine dendritique. (2) Le haut sectionnement optique limite fortement le photoblanchiment et la phototoxicité ce qui est bénéfique pour la préservation des structures dans le temps et du marquage (généralement faible sur ce type d'échantillon). (3) La haute résolution temporelle - 200 Hz (~5 ms) pour un FOV 2D, 3Hz (~330 ms) pour un volume 3D - est idéale pour l'imagerie du vivant dans des tranches non fixées.

Cependant, la prise de vue de structures est contrainte à une dizaine de μm sous la surface avec le LLSM, à cause des aberrations optiques qui dégradent à la fois la feuille de lumière et l'image détectée.

Un autre axe d'amélioration pour l'imagerie au sein d'échantillon biologique épais, tel que des tranches de cerveaux, est l'intégration de la super-résolution. Bien que la résolution limitée par la diffraction en LLSM permette d'imager les structures morphologiques et les activités (transport vésiculaire, signal calcique ...) au sein des échantillons biologiques à l'échelle submicrométrique, l'ensemble des phénomènes qui sous-tendent la physiologie cellulaire font appel à des éléments nanométriques (vésicules, filaments, protéines en interaction ou individuelles) qui ne peuvent pas être résolus en microscopie classique. Le SIM et le STED permettent d'imager des ensembles de molécules avec des résolutions spatiales de 100 et 50 nm respectivement, mais ne peuvent pas localiser de molécule unique. De plus le STED est difficilement compatible avec l'architecture LLSM. Quant au SIM qui a été mis en œuvre en LLSM [1] il ne permet qu'un gain de résolution modéré et limité aux axes perpendiculaires à la direction d'illumination. Nous avons donc choisi de combiner la LLSM avec l'imagerie SMLM qui permet à la fois une imagerie à des résolutions plus élevées et de suivre la dynamique des molécules uniques. Toutefois, il est complexe d'appliquer la SMLM en profondeur dans les tissus. (1) Il faut s'assurer que le protocole SMLM (STORM, PALM ou PAINT) est applicable aux échantillons épais, i.e. que les

structures d'intérêt sont marquées efficacement et spécifiquement. (2) La dégradation de résolution entraînée par les aberrations optiques à l'excitation et à la détection est d'autant plus limitante en SMLM. La reconstruction des images, basée sur la localisation précise de chacune des PSF, va se retrouver plus ou moins compromise en fonction de la quantité d'aberrations.

Imager une structure super-résolue au sein d'une tranche, tout en utilisant une technique respectueuse de l'échantillon, rapide et adaptée à la SMLM, comme la microscopie LLSM, devient donc un challenge. Cependant, l'AO, pour corriger les aberrations optiques, et la SMLM, ont déjà été implémentées séparément sur le microscope LLSM. (1) En 2016, Legant et al. [39] ont démontrés l'utilisation du DNA-PAINT sur ce microscope. Toutefois, l'utilisation de cette technique reste limitée aux couches superficielles de l'échantillon (~20-30 μm). (2) En 2018, Liu et al. [35], développent une correction des aberrations sur les chemins d'excitation et de détection du microscope. Ils utilisent une méthode de correction en boucle fermée, basée sur l'imagerie d'une étoile guide. Ce système performant pour corriger la mise en forme de la feuille de lumière et les aberrations à la détection nécessite néanmoins une modification importante et coûteuse du système et intègre l'utilisation d'un laser femtoseconde pour la création de l'étoile guide par fluorescence à 2 photons.

La première étape de cette thèse a été de concevoir, développer et monter un microscope LLSM intégrant l'AO et capable de corriger les aberrations en résolution classique et en SMLM. Pour cela, il a été décidé de concentrer notre approche sur (1) la refocalisation de la LS et (2) la correction indirecte des aberrations sur le chemin de détection à partir d'un DM. Les objectifs principaux étaient (1) de s'éloigner le moins possible du schéma du système LLSM original (précédemment construit au BIC) pour éviter les coûts et une complexification de l'alignement du microscope, (2) de conserver au maximum la quantité de photons arrivant jusqu'à la caméra.

Nous avons commencé par construire une réplique du LLSM développé par Chen et al [3] et décrite au chapitre 2.1.6, Figure 8. Le chemin d'excitation comprend un galvanomètre Z (G_Z) optiquement conjugué à la pupille arrière de l'objectif d'excitation (OE, Thorlabs, 20x 0.6 NA, water). La rotation du G_Z déplace la feuille de lumière le long de l'axe Z, c'est-à-dire l'axe optique de l'objectif de détection (OD, Nikon, 25x 1,1 NA, water). Le motif du réseau est créé par la diffraction sur un SLM programmable et filtré par un masque annulaire. Pour toutes les acquisitions de ce travail, nous avons utilisé un masque avec des NA interne et externe de 0,44 et 0,55 respectivement. La feuille de lumière résultante avait une épaisseur quasi uniforme sur une longueur de 15 μm . La résolution spatiale mesurée au centre du champ de vision était de 0,28 μm latéralement et de 0,55 μm axialement (λ_{ex} : 488nm λ_{em} : 510nm).

Ici nous présenterons dans un premier temps l'intégration de l'AO sur le chemin de détection, depuis l'ajout des nouvelles optiques jusqu'au développement du logiciel de contrôle. Ensuite, les principes et l'implémentation logiciel des deux

types de correction seront abordés. Enfin, le protocole de correction/imagerie des échantillons, intégrant l'ensemble de ces processus, sera expliqué, avant de revenir sur les perspectives et les axes d'améliorations de cette méthode.

Ces travaux ont été menés en étroite et fructueuse collaboration avec Imagine Optic, entreprise spécialisée dans la métrologie laser et l'AO.

3.1. Intégration de l'optique adaptative sur le chemin de détection

La modification majeure du nouveau LLSM installé au BIC (Figure 20) est l'utilisation d'AO sur le chemin de détection. Il permet à la fois de calibrer le DM à l'aide d'un SHWFS et de corriger les aberrations optiques de l'échantillon en utilisant une correction par mesure indirecte à l'aide du DM et de la caméra. Le chemin intègre (1) un DM (Mirao 52-e, Imagine Optic), qui réfléchit la fluorescence tout en modifiant la phase du faisceau, (2) un SHWFS (HASO 4 First, Imagine Optic) qui capte la fluorescence à l'aide d'une déviation intégrale de la fluorescence et sert à la calibration du DM. Cet ensemble doit respecter plusieurs règles optiques et contraintes mécaniques pour assurer un bon alignement et un bon fonctionnement de l'AO.

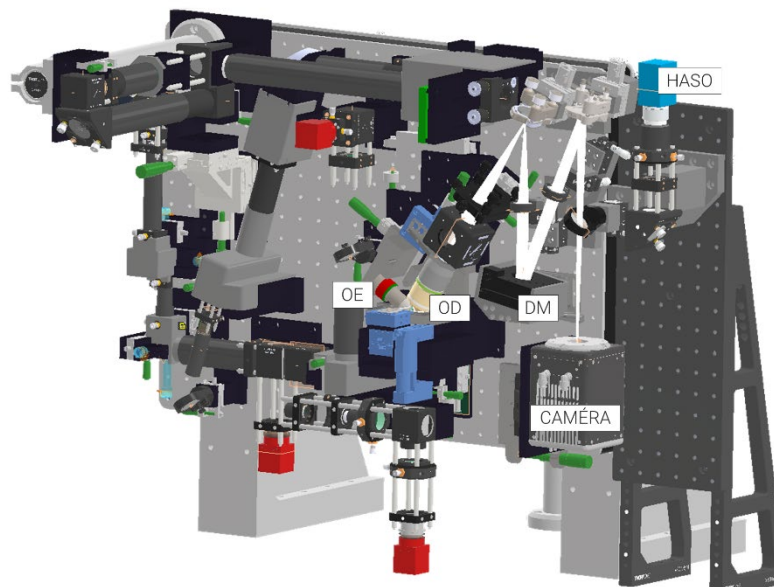


Figure 20 : Représentation 3D du microscope à feuille de lumière « lattice » conçu et monté dans le cadre de cette thèse. OE : Objectif d'excitation. OD : Objectif de détection. DM : Miroir déformable. HASO : Analyseur de front d'onde.

3.1.1. Intégration optique et mécanique

Des travaux préliminaires ont été réalisés avec Imagine Optic pour simuler et concevoir un chemin de détection intégrant ces modifications, tout en respectant

au maximum l'encombrement du système. La Figure 21 illustre le chemin de détection intégrant la caméra (gauche) ou bien le HASO (droite). Pour simplifier l'usage, il a été décidé de combiner ces deux chemins, en plaçant un miroir « flip » après le miroir M2. Ainsi, lors de la phase de calibration, la fluorescence est envoyée vers le HASO (en rouge, Figure 22) et lors de l'imagerie, vers la caméra (en vert, Figure 22). L'intégration optique respecte les conditions suivantes :

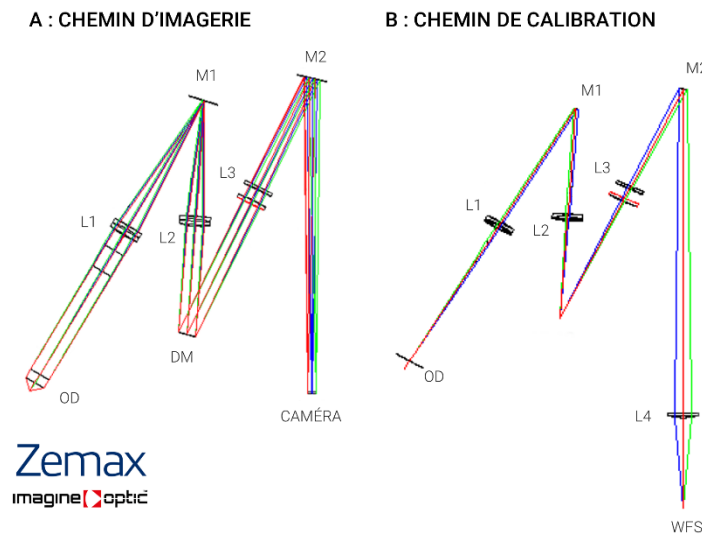


Figure 21 : Schéma optique du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative. **A.** Chemin d'imagerie de l'objectif de détection (OD) jusqu'à la caméra (CAMÉRA). Le plan focal arrière de l'OD est imagé par une paire de doublets achromatiques (L1 : $f=125$ mm Thorlabs AC254-125-A, et L2 : $f= 101,6$ mm Edmund Optics 49-783) dans un arrangement 4f, replié en utilisant le miroir M1, sur un miroir déformable à cinquante-deux actionneurs (DM - Imagine Optic - MirAO 52-e). La lentille de tube (L3 : $f=400$ mm, Thorlabs ; AC254-400-A) forme une image de l'échantillon sur la caméra sCMOS avec un grossissement de 62,5 \times . **B.** Un chemin de déviation, utile pour la calibration du DM, intègre un doublet achromatique (L4 : $f=75$ mm, Thorlabs AC254-75-A) et permet de conjuguer le plan focal arrière de l'objectif de détection avec un capteur de front d'onde de Shack-Hartmann (WFS - Imagine Optic - HASO 4 First)

- i. Le grossissement (0,81) de cette paire de lentilles garantit que la totalité de l'ouverture arrière de l'objectif ($D= 17,6$ mm) est imagée au niveau de la pupille du DM ($D=15$ mm) sans perte.
- ii. Avec un grossissement de 62,5 \times , la taille du pixel caméra ($6.5 \mu\text{m}$) correspond ainsi à une dimension de 104 nm dans l'échantillon.
- iii. Le chemin de calibration est atteint à l'aide d'une déviation par un miroir « flip » (FM, Figure 23), et d'un miroir de repli (M3, Figure 23). Le WFS est utilisé pour deux raisons : (1) pour calibrer le DM, c'est-à-dire calculer la matrice d'interaction entre les positions des 52 actionneurs du DM et la forme du front d'onde et (2) pour compenser les aberrations statiques du système.

Une fois la position des éléments définis par le schéma optique, il convient de réaliser le montage opto-mécanique sur le « breadboard » du microscope avec les degrés de liberté adéquats pour assurer un alignement précis. Pour respecter les problématiques de placement, d'encombrement et d'alignement, il a été décidé de créer des sous-ensembles composés de pièces opto-mécaniques et de pièces en aluminium. Les plans 3D du système ont été réalisés avec le logiciel *Autodesk Inventor Professional 2018*, en se basant sur le plan du microscope fourni par le laboratoire d'Eric Betzig. Cette conception demande l'ajout d'une extension au « breadboard », nécessaire pour fixer le miroir flip et le HASO (Figure 22).

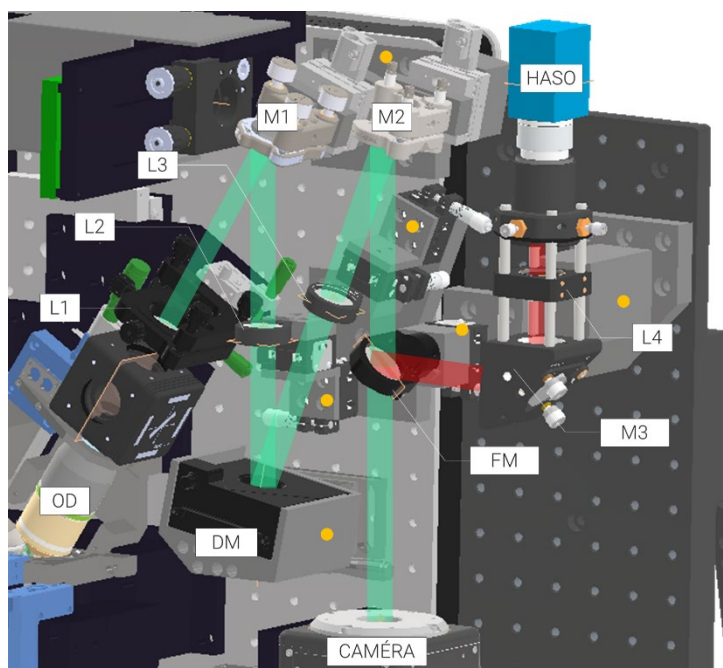


Figure 22 : Illustration des chemins d'imagerie (en vert) et de calibration (en rouge), sur le bras de détection du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative.

Les sous-ensembles sont conçus pour que le centre de chaque élément optique soit à la même hauteur selon l'axe X. Les plans des pièces marquées d'un point jaune sont disponibles en Annexe 2. Le centre de chaque élément optique coïncide avec le passage théorique du faisceau de fluorescence (représenté en vert). Chaque optique possède ensuite un ou plusieurs degrés de liberté, par l'ajout d'éléments optomécaniques et en fonction de l'alignement nécessaire. Tout défaut d'alignement peut entraîner de fortes aberrations optiques sur ce chemin de détection. Ces degrés de liberté sont visualisables en Annexe 2.

- i. Les lentilles L1-4 sont montées dans des montures de translation XY pour les centrer.
- ii. Les miroirs sont intégrés sur des montures « tip-tilt » pour régler l'angle de réflexion du faisceau.

- iii. La caméra est montée sur une platine de translation selon l'axe S , et peut aussi être ajustée selon X pour que le centre du capteur soit précisément sur l'axe optique de la lentille de tube.
- iv. Un réglage fin des distances entre les éléments optiques est nécessaire pour respecter au mieux les conjugaisons optiques. Pour cela, il a été choisi d'intégrer des platines de translations pour les deux miroirs diélectriques M1 et M2, sur la lentille L1 et sur le DM. Pour ne pas changer l'angle du faisceau, la translation des miroirs diélectriques selon la bissectrice entre le faisceau incident et le faisceau réfléchi.
- v. Le DM demande un réglage complexe et précis pour garantir à la fois que l'image de la pupille arrière de l'objectif y soit parfaitement centrée, et pour co-aligner l'angle de réflexion avec l'axe optique de la lentille L3. Il est fixé à un ensemble de pièces lui apportant tous les degrés de liberté nécessaires, visibles Figure 23.A. Deux platines de translations permettent d'ajuster la position du centre du DM selon le plan parallèle au « breadboard » (axes S et $Y-Z$), et une platine « pitch-yaw » offre des rotations pour ajuster l'angle de réflexion du faisceau (autour des axes X et S).

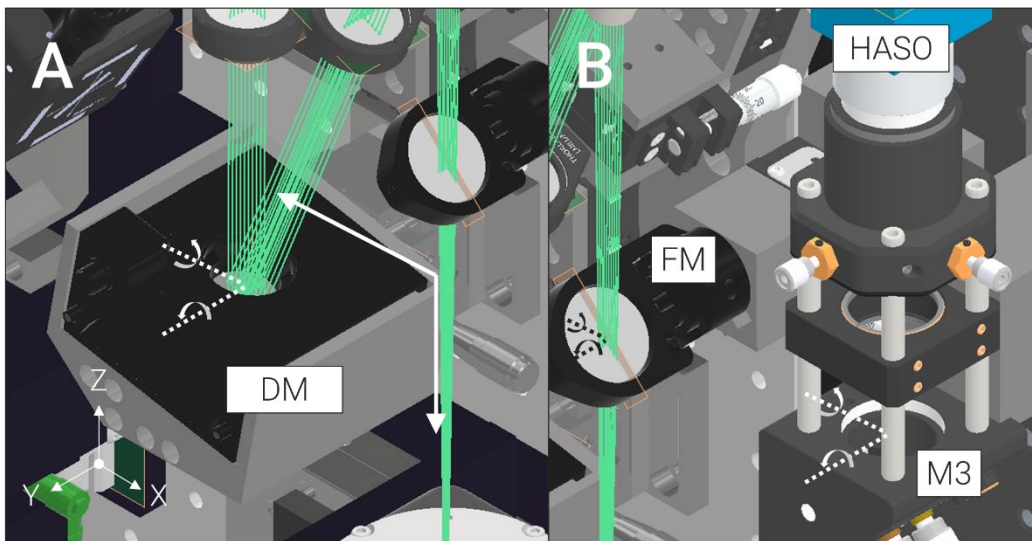


Figure 23 : Représentation des degrés de liberté disponibles pour le positionnement du miroir déformable (DM) et de l'analyseur de front d'onde (HASO), par rapport au faisceau de fluorescence. A. Degrés de liberté du DM. B. Degrés de liberté du miroir « flip » (FM) et du miroir M3 en amont du HASO.

- vi. Le HASO doit pouvoir réaliser une rotation de précision de type « tip-tilt » autour des axes S et X afin que le faisceau incident frappe la matrice de microlentilles perpendiculairement et en son centre. Il est donc fixé à une monture de miroir qui permet de renvoyer le faisceau à 90° , via des tiges et un jeu de tubes et d'adaptateurs (Figure 23.B). Le réglage nécessaire en « tip-tilt » se fait avec les vis de précision du

miroir 90°. Le HASO doit également être précisément placé pour être co-aligné avec la caméra.

Enfin, pour faciliter l'alignement initial, nous avons choisi d'employer un miroir statique à la place du DM. En effet, l'état « flat » du miroir, calibré en usine, peut être légèrement imparfait dans le cadre de son intégration dans notre système. De plus, le miroir plan statique offre une surface plus accessible, utile pour centrer le faisceau lors de l'alignement préliminaire. La solution trouvée est de créer une pièce intégrant un miroir plan diélectrique et remplaçant le bloc intégrant le DM. Cette pièce accueille le miroir diélectrique, monté sur une platine « pitch-yaw », qui va réfléchir le faisceau de détection de la même façon que le DM. Cette monture « pitch-yaw » permet de modifier l'angle de réflexion du miroir, indépendamment de la platine « pitch-yaw » sur laquelle repose l'ensemble du bloc.

3.1.2. Alignement, calibration et corrections des aberrations du système

Les réglages optiques se font en quatre étapes : (1) le montage et l'alignement des optiques du bras de détection, de la sortie de l'objectif jusqu'à la caméra et au HASO, (2) l'alignement de la feuille de lumière en fonction des conditions d'imagerie (température, milieu d'immersion), (3) la calibration du DM à l'aide du chemin de déviation vers le HASO et (4) la compensation des aberrations statiques du système.

Les étapes (1) et (2) sont détaillées en Annexes 3 et 4 respectivement. Nous présenterons ici spécifiquement les étapes (3) et (4). A noter que tout changement de conditions expérimentales (ex : température, salinité du milieu d'immersion) nécessite de reprendre les étapes (2) et (4). En revanche les étapes (1) et (3) sont stables.

3.1.2.1. Calibration du DM

Cette étape de calibration est indispensable pour le bon fonctionnement de l'AO. Comme développé dans l'état de l'art, la correction à l'aide d'un DM consiste à modifier la position des actionneurs pour modifier la phase locale du faisceau. Ainsi, il est nécessaire de connaître l'effet de chacun des actionneurs sur la modification du front d'onde et par extension sur les polynômes de Zernike. Par exemple, le DM doit être capable d'appliquer un coefficient donné pour une mode de Zernike individuel sur le front d'onde, en modifiant la position de chaque actionneur.

Le protocole de calibration d'un DM est généralement divisé en plusieurs étapes [115] :

- i. La première étape consiste à imager sur la caméra du HASO une microbille fluorescente, jouant le rôle d'étoile guide, de diamètre $1\mu\text{m}$, éclairée en épifluorescence. Ces billes sont idéales pour la calibration.

Elles sont très lumineuses, facilement détectables sur la caméra du HASO et ne photoblanchissent pas.

- ii. Une fois l'image de la bille détectée sur chaque sous-région de la caméra du HASO - correspondant à chaque microlentille - le logiciel applique une tension négative et positive constante à chaque actionneur. Une mesure du front d'onde est faite à chaque tension appliquée pour finalement calculer une matrice d'interaction.
- iii. L'inverse de cette matrice donne une matrice de commande qui définit pour la suite l'influence de chaque actionneur pour l'application quantifiée de mode de Zernike. La calibration consiste alors à calculer la matrice qui relie la tension des actionneurs à la forme du front d'onde précédemment mesuré. La matrice de commande sera utilisée lorsque l'action est donnée d'amplifier ou d'atténuer un type d'aberration en modifiant la position des actionneurs.

Cette étape de calibration est finalisée par une correction des aberrations résiduelles sur le chemin de détection.

3.1.2.2. Correction des aberrations du système

Bien que, le protocole d'alignement vise à minimiser les aberrations, la multiplication des défauts de surfaces résiduels des optiques et légers décalages entraîne l'apparition d'aberrations non corrigées. Pour minimiser les aberrations du système au démarrage des expériences, une correction directe avec le HASO est réalisée. Selon le critère de Maréchal, l'étalonnage est correct lorsque le front d'onde résiduel est inférieur à 35 nm RMS pour une longueur d'onde d'imagerie de 488 nm.

Cette correction prend en compte le front d'onde entre le miroir « flip » et le HASO, alors que l'imagerie et la correction des aberrations de l'échantillon ne passent pas par cette partie du chemin optique. La compensation des aberrations statiques peut alors être inexacte dans le cas d'aberrations significatives non liées au trajet commun. Dans notre configuration, de telles aberrations peuvent être par exemple dues à la mauvaise planéité du miroir « flip » (Thorlabs BB1-E02) ou bien à la différence de trajet entre le HASO et la caméra.

La forme du front d'onde calculée au cours de ce processus correspond à la forme initiale utilisée avant l'optimisation 3N+ de chaque échantillon. Les aberrations statiques peuvent changer au cours des expériences en raison des faibles variations de température ou de l'instabilité des éléments optomécaniques, mais ces variations sont prises en compte lors de la correction par mesure indirecte sur l'échantillon.

3. Méthodologie

Enfin, une PSF en trois dimensions est acquise pour chaque longueur d'onde pour vérifier la résolution finale du système. Ces PSF servent également à réaliser la déconvolution des images.

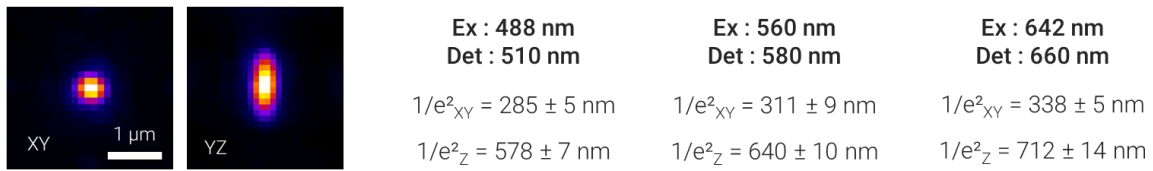


Figure 24 : PSF_{XY} et PSF_{YZ} et valeurs des rayons à $1/e^2$ caractéristiques du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative ($N=5$; masque annulaire - $NA_{min}/NA_{max} = 0,44 / 0,55$).

3.2. Optimisation active de l'image à l'excitation et à la détection avec le microscope LLSM

Le processus de correction des aberrations à l'excitation et à la détection, appelé optimisation active de l'image (AIO) consiste en (1) une correction du focus de la LS, nommée « autofocus » (AF) de la feuille de lumière suivie (2) d'une correction des aberrations induites par l'échantillon sur le chemin de détection (3N+) (Figure 25). Dans les deux cas, une correction indirecte est appliquée, à partir des images de l'échantillon. Comme discuté plus tôt, ce type d'optimisation permet d'éviter l'intégration d'un point source au sein du FOV (bille ou étoile guide) et de conserver l'ensemble des faisceaux d'excitation et de détection pour l'imagerie.

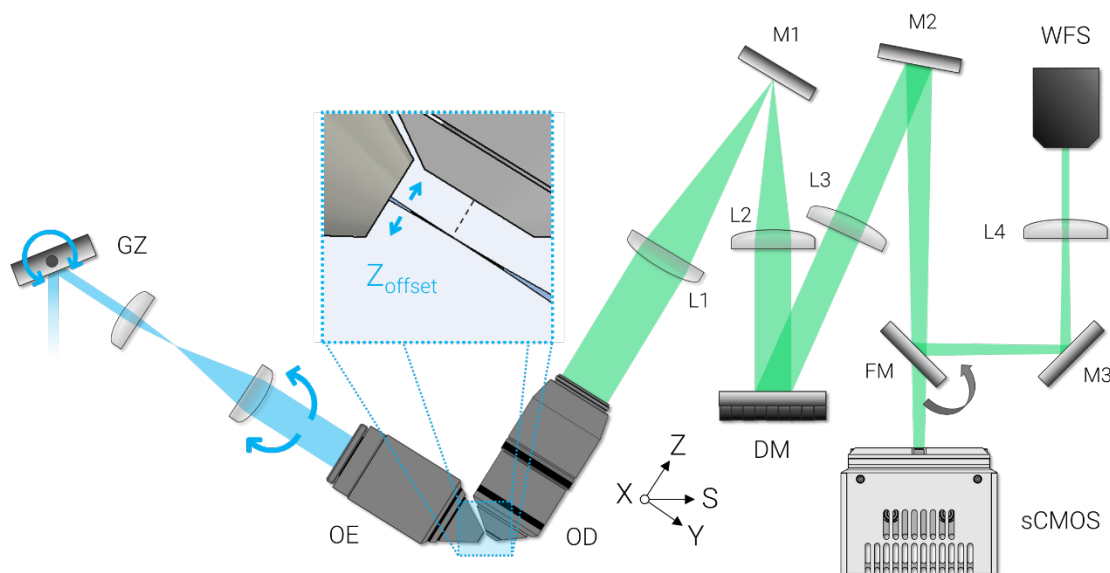


Figure 25 : Représentation schématique des éléments optiques utilisés pour l'optimisation active de l'image sur le microscope à feuille de lumière « lattice ». Le galvanomètre GZ permet de modifier l'angle d'entrée du faisceau d'illumination dans l'objectif d'excitation (OE) et donc de corriger la position de la feuille de lumière selon l'axe Z (encadré bleu). Le miroir déformable (DM) permet de corriger les aberrations optiques sur le chemin de détection.

3.2.1. Recalage de la feuille de lumière par autofocus

La défocalisation de la LS entraîne une forte perte de résolution et de contraste. Ici on parle du décalage axial de la feuille de lumière par rapport au plan focal de l'objectif de détection. Même si, un décalage rotationnel ou latéral peut également engendrer une dégradation de l'image [161], il a été décidé, par souci de simplicité, de concentrer les efforts sur le réglage du focus en utilisant le galvanomètre déjà installé sur le microscope. Ce galvanomètre Z (G_z), optiquement conjugué à la pupille arrière de l'objectif d'excitation, permet de modifier la position de la LS le long de l'axe optique de l'objectif de détection.

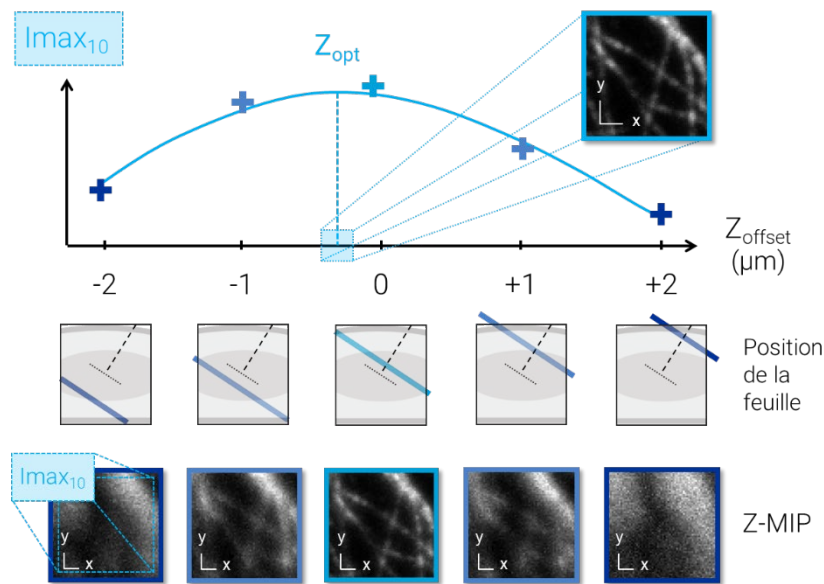


Figure 26 : Principe de l'autofocus (AF) utilisé dans le cadre de l'optimisation de l'image active (AIO). Cinq projections d'intensité maximum (Z-MIP), constituée de 30 images sont acquises en modifiant la position de la feuille de lumière autour de la position de référence (Position de la feuille). Pour chaque Z-MIP, l'intensité maximum moyennée sur 10 pixels est mesurée. En traçant ces valeurs en fonctions de la position de la feuille appliquée par le galvanomètre (Z_{offset}), un ajustement permet de connaître le coefficient optimal (Z_{opt}) à appliquer au galvanomètre pour maximiser la métrique $I_{max_{10}}$ et ainsi refocaliser la feuille au plan focal de l'objectif de détection.

Une fois l'échantillon monté et une région d'intérêt sélectionnée, la première étape de l'AIO consiste à corriger la défocalisation entre le plan d'illumination et le plan focal de l'objectif de détection (Figure 26). Le processus se base sur la maximisation d'une métrique calculée à partir des images acquises par la caméra sCMOS. La métrique $I_{max_{10}}$ est la somme des 10 pixels les plus brillants mesurés sur la projection d'intensité maximale (MIP, de l'anglais « Maximum Intensity Projection ») d'une pile Z d'images de $10 \mu m$ d'épaisseur. Plus précisément, plusieurs piles d'images sont enregistrées (30 plans, pas de $0,345 \mu m$) avec un décalage de la LS (lignes bleues dégradées) entre -2 et $+2 \mu m$, appliqué par G_z . Cette plage a été sélectionnée, car il a été observé que la défocalisation reste dans ces limites dans toutes nos conditions expérimentales.

La Figure 26 présente le cas de cinq images acquises avec un décalage de $-2, -1, 0, +1$ et $+2 \mu m$. Lorsque le plan d'illumination est décalé par rapport au plan focal, les PSF d'excitation et de détection ne se chevauchent pas axialement et le pic d'intensité de la PSF résultante est réduit. Le signal de l'image est donc diminué et la métrique $I_{max_{10}}$ diminue. D'autre part, $I_{max_{10}}$ est maximal lorsque le plan d'illumination et le plan focal se chevauchent parfaitement. $I_{max_{10}}$ est calculé à partir d'un MIP-3D de $10 \mu m$ d'épaisseur au lieu d'une seule image 2D ($\sim 0,5 \mu m$ d'épaisseur) afin d'augmenter la quantité de structures de l'échantillon sur lesquelles la mise au point est optimisée. Le décalage qui maximise $I_{max_{10}}$ est interpolé avec une fonction gaussienne ou parabolique (Z_{opt}). Enfin, Z_{opt} est appliqué à G_z pour recentrer la LS.

Cette optimisation est directement intégrée au logiciel *LabVIEW* contrôlant le microscope sous la forme d'une procédure automatisée. L'utilisateur garde la possibilité de rejeter le réglage proposé si la mesure de refocalisation semble erronée (signal trop faible, bougé de l'échantillon...).

3.2.2. Correction des aberrations optiques de l'échantillon par l'optimisation 3N+

3.2.2.1. Principe de l'optimisation 3N+

Dans cette étape, les aberrations corrigées sont représentées par les polynômes de Zernike. La déformation du front d'onde, mesurée comme l'écart quadratique moyen par rapport à un front d'onde plan, augmente avec l'amplitude de chaque polynôme de Zernike.

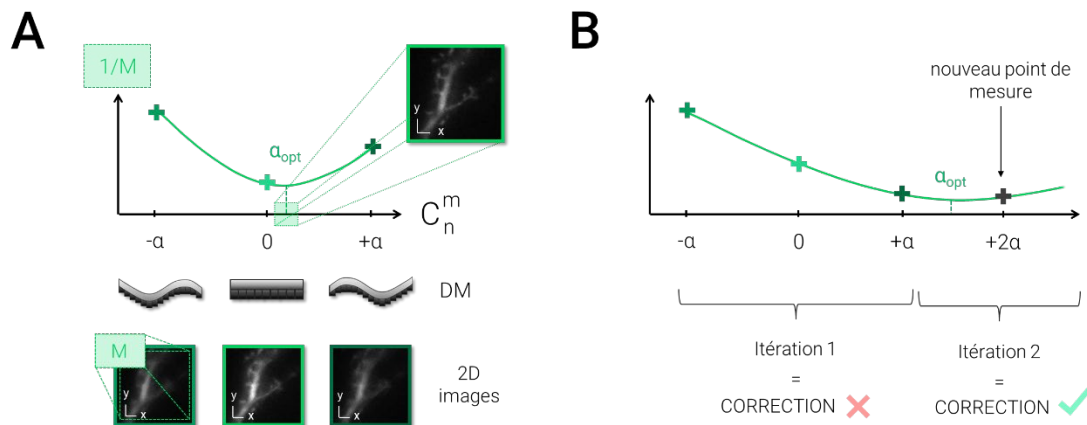


Figure 27 : Principe de l'optimisation 3N+ utilisé dans le cadre de l'optimisation de l'image active (AIO). **A.** Trois images 2D (2D images) sont acquises en modifiant le coefficient ($-a$, 0 , $+a$) d'une aberration préalablement sélectionnée sur le miroir déformable (DM). Une métrique (M) est mesurée pour chaque image. L'inverse de cette métrique ($1/M$) est tracé en fonction du coefficient appliqué au DM. Un ajustement polynomial permet de déduire le coefficient optimal (α_{opt}) à appliquer au DM pour minimiser ($1/M$) et donc corriger l'aberration qui dégrade la résolution de l'image. **B.** L'algorithme 3N+ développé est capable d'ajouter des points de mesure (point de mesure gris - Itération 2), si la première itération (points de mesures vert - Itération 1) ne permet pas de calculer α_{opt} .

Ces polynômes de Zernike sont corrigés de manière séquentielle, en commençant généralement par l'astigmatisme. De la même manière que l'AF, l'objectif est d'optimiser un facteur de mérite basé sur l'image. Grâce à la calibration, le DM est capable d'appliquer avec précision une forme de front d'onde prédéfinie basée sur une représentation des modes de Zernike. Le processus de correction (Figure 27) consiste à appliquer un coefficient positif, nul (forme initiale du miroir) et négatif à un mode de Zernike spécifique ($+a$, 0 et $-a$) et à mesurer le facteur de mérite (M) correspondant basé sur l'image. Dans notre cas, le facteur de mérite est l'inverse d'une métrique ($1/M$), comme par exemple l'intensité maximale ou l'énergie d'un domaine de fréquences spatiales prédéfini. Les valeurs mesurées sont ajustées avec un polynôme du second ordre pour interpoler le coefficient (α_{opt})

qui minimise le facteur de mérite pour le mode Zernike sélectionné. Ce coefficient annule la majeure partie de l'aberration de Zernike et par conséquent, augmente le signal et la résolution.

L'optimisation 3N+ est conçue pour accélérer l'optimisation sans sacrifier la précision. Il présente deux améliorations par rapport aux algorithmes AO les plus courants.

- i. Afin de simplifier le traitement, nous utilisons une parabole pour ajuster le facteur de mérite $1/M$ et trouver son minimum. Il s'agit d'un calcul algébrique direct et très rapide. Les autres algorithmes 3N sont souvent basés sur un ajustement gaussien légèrement plus complexe de M .
- ii. La seconde amélioration consiste à mesurer la métrique en un nombre minimum, mais suffisant de points. Étant donné que l'optimisation indirecte ne tient pas compte de la quantité d'aberrations à corriger, une valeur fixe initiale de α doit être choisie comme compromis entre la précision (faible valeur α = échantillonnage élevé) et la plage dynamique (grande valeur α). Afin de minimiser le nombre d'images requises par la procédure itérative (et de minimiser le temps d'optimisation et le photoblanchiment), seules trois images par mode de Zernike (algorithme 3N ou 2N+1) sont généralement utilisées. Ici, trois valeurs sont initialement mesurées pour les coefficients $-\alpha$, 0 et $+\alpha$. Si le minimum de la parabole se trouve dans cette plage, le processus d'optimisation est terminé. Dans le cas contraire, le facteur de mérite à $+2\alpha$ ou -2α est mesuré en fonction de la pente de la parabole (Figure 27.B). Un nouvel ajustement de la parabole est alors calculé avec des points ajoutés (par exemple $-\alpha$, 0 $+\alpha$ et $+2\alpha$). Si le minimum n'est toujours pas atteint et si le nombre d'itérations est inférieur à une limite prédéfinie, une autre itération est lancée. Si une itération converge vers un calcul erroné, aucun coefficient n'est appliqué et l'algorithme passe au mode Zernike suivant. Par conséquent, l'optimisation 3N+ utilise trois images dans le cas idéal ; c'est-à-dire lorsque le coefficient d'aberration de Zernike se situe dans la plage de recherche, et seulement quelques acquisitions supplémentaires, si nécessaire, minimisant ainsi le nombre total d'images. Cette méthode adaptative de correction indirecte de l'aberration est nommée « 3N+ ». Une explication plus détaillée et un organigramme de l'algorithme 3N+ sont accessibles en Annexe 5.

3.2.2.2. Logiciel de contrôle de l'optique adaptative

L'algorithme 3N+ est intégré au sein d'un logiciel *LabVIEW* indépendant du logiciel du microscope LLSM, développé au cours de la thèse. Ce logiciel donne accès à (1) une fonction d'application des coefficients, dite « Open Loop », qui permet d'appliquer au DM un ou plusieurs coefficients sur des modes de Zernike

sélectionnés, (2) la fonction d'optimisation 3N+ et (3) des fonctions avancées qui permettent d'automatiser la recherche des paramètres pour la correction indirecte des aberrations, en utilisant les deux fonctions précédentes. Ces dernières sont notamment au cœur de l'étude d'optimisation des paramètres d'entrée, présentés dans les parties suivantes de cette thèse.

3.3. Processus d'imagerie comprenant l'optimisation active de l'image

Les corrections AF et 3N+ présentées précédemment permettent de compenser les aberrations induites par l'échantillon. Ces deux processus doivent alors s'inscrire efficacement au sein du processus d'imagerie global.

Dans le cas simple de l'imagerie d'un plan 2D, la méthode proposée consiste en l'application d'un AF, suivi d'une correction des aberrations avec le 3N+, à partir de l'aberration « astigmatisme » jusqu'à « trefoil 90 », afin de corriger les modes de Zernike influant le plus sur la déformation de l'image, tout en évitant de corriger une nouvelle fois la défocalisation (corrigé par l'AF). En 3D, on réalise l'optimisation sur le plan central uniquement, et on fait l'hypothèse que les aberrations sont quasi-uniformes sur l'ensemble de la pile d'images. L'AF permet dans un premier temps de refocaliser la feuille d'imagerie sur le bon plan. Le 3N+ est paramétré en fonction du type d'échantillon. Il ne prend pas en compte la correction de l'aberration « focus » car celle-ci est corrigée grâce à l'AF. Le temps d'optimisation est défini par le nombre d'images acquises, le temps d'exposition de chacune des images, et le temps de calcul des algorithmes :

- i. L'AF comprend l'acquisition de 5 piles de 30 images dont le temps d'exposition est en moyenne fixé à 100 ms. Ainsi, on peut considérer que l'AF dure en moyenne 15 s.
- ii. L'optimisation 3N+ dépend de l'acquisition d'au minimum trois points de mesures pour chacune des aberrations considérées. Chaque image a en moyenne un temps d'exposition de 100 ms et les aberrations sélectionnées vont généralement de l'astigmatisme au trefoil soit sept modes. Afin de s'assurer que l'image acquise correspond au coefficient d'aberration souhaité, une pause de 100 ms est appliquée entre l'application d'une forme de DM (application du coefficient α) et la récupération de l'image. Dans ce cas de figure, l'optimisation 3N+ prend entre 5s (3 points de mesure par aberration) et 7s (4 points de mesures). En incorporant la correction jusqu'aux aberrations de second ordre (astigmatisme à tetrafoil) l'optimisation prend entre 9s et 12s.
- iii. En intégrant les calculs et l'action de l'utilisateur, le temps de correction dure environ 40s pour une exposition réelle de l'échantillon durant environ 25s.

4. Imagerie d'échantillons épais limitée par diffraction

4.1. Contexte de l'étude

Une fois la nouvelle conception réalisée, j'ai démontré l'efficacité et la robustesse de la méthode AIO à travers la publication d'un article, publié dans *Biomedical Optics Express* en 2022 [101]. Cet article se concentre sur deux points majeurs : (1) la définition d'un protocole et la recherche des paramètres AF et 3N+ conduisant à la meilleure optimisation possible pour l'imagerie limitée par diffraction et (2) la démonstration de la correction des aberrations, avec la méthode paramétrée, pour l'imagerie de tranches organotypiques de cerveaux et de racines de plantes vivantes.

L'article entier est présenté en partie 4.3. Les principaux résultats sont expliqués ci-dessous.

4.2. Résumé des résultats

Comme discuté dans l'état de l'art et la partie concernant la méthodologie, l'AF et le 3N+ sont multiparamétrables et il convient de sélectionner les meilleures entrées pour converger vers la meilleure correction. Cette versatilité permet d'adapter chacune des méthodes au type d'échantillon (information détectée dans l'image) et à la quantité de correction à appliquer (modifiant la précision et l'efficacité de la correction).

- i. L'AF est dépendant du nombre de piles d'images (nombre de points sur la courbe), du type d'ajustement réalisé (gaussien ou polynomial) et de la métrique mesurée (cf. Figure 26 en 3.2.1). Une expérience a été réalisée pour démontrer l'efficacité d'une métrique moyennant les 10 pixels les plus brillants de chaque MIP, sur plusieurs types de marquage de cellules COS, en variant le nombre de mesures et le type d'ajustement. Quel que soit le type de structure (membrane à 488nm, tubuline à 568nm, clathrine à 647nm), l'application de l'AF est efficace et répétitive grâce à l'utilisation d'un fit gaussien comprenant 5 points de mesures.
- ii. L'optimisation 3N+ est directement liée au type de signal enregistré. Le type de structure sur laquelle la correction se base influence

directement le choix de la métrique. En effet, chaque métrique aura une sensibilité différente en fonction du mode de Zernike sondé. Par exemple, si l'application d'un coefficient d'un mode de Zernike donné ne fait que très peu varier l'intensité de l'image, la métrique $I_{\max 10}$ ne sera probablement pas optimale pour corriger ce type d'aberration. Une autre métrique devra être employée. Nous avons testé plusieurs métriques ; basées sur l'intensité ($I_{\max 10}$: moyenne des 10 pixels les plus brillants) ou sur la quantité d'énergie dans une bande fréquentielle variable (masque annulaire appliqué sur la FT de l'image de diamètre différent). Pour l'imagerie de dendrites exprimant la GFP au sein des tranches de cerveaux, il a été démontré que la métrique $FFT_{500-1000}$ était en moyenne la plus sensible.

- iii. Le 3N+ est également dépendant du type et de la quantité de chacune des aberrations à corriger. Dans un échantillon biologique il est impossible d'anticiper les aberrations prépondérantes dans la dégradation de l'image et quel est le niveau à corriger. Toutefois, il convient d'adapter l'amplitude appliquée au miroir (coefficient α), les types et l'ordre des aberrations à corriger, ainsi que le nombre d'itérations de correction, pour obtenir une correction adéquate. Plusieurs protocoles de correction, faisant varier ces paramètres, ont été testés. Pour chaque protocole, l'expérience consistait à corriger, cent fois, des aberrations aléatoirement simulées par le DM sur des structures en surface. Ces expériences démontrent que trois itérations de 3N+, démarrant par la correction de l'aberration sphérique et avec une amplitude de DM variable permettent d'obtenir un front d'onde résiduel en dessous de 30 nm RMS.

Pour démontrer l'intérêt de notre méthode, des analyses quantitatives ont respectivement été réalisées sur (1) la taille des têtes d'épines dendritiques exprimant la GFP dans des tranches de cerveaux fixées et (2) sur les processus fins d'astrocytes mesurés sur des images déconvoluées, et sur le *Reticulum Endoplasmique* de cellules de racine d'*Arabidopsis* marquées au tagRFP.

- i. La première étude quantitative a permis de mesurer la FWHM de 67 têtes d'épines différentes, à environ 40 μm de profondeur, avant toute correction, après AF et après une AIO complète (AF + 3N+). L'AF apporte une augmentation d'intensité de 16%, et de 24% avec l'AIO complète. Cette amélioration se traduit également dans la taille des épines mesurées. Sans correction, la taille moyenne des épines mesurées est $\sim 0,5 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$. Après AF, cette taille diminue à $0,07 \mu\text{m} \pm 0,11 \mu\text{m}$ et le 3N+ permet de réduire encore de $0,024 \mu\text{m}$. Un test ANOVA démontre que ces résultats sont statistiquement significatifs. De plus, grâce à l'AIO la taille moyenne des épines mesurées à 40 μm est identique à celle mesurée en surface. Pour comparaison, la largeur de la PSF mesurée sur une bille de 170 nm

de diamètre, est égale ~ 270 nm (ajustement gaussien $1/e^2$). Les tailles d'épines sont donc nettement plus larges que la PSF instrumentale.

- ii. La déconvolution est un post-traitement utilisé en microscopie pour réduire le bruit et augmenter la résolution et le contraste des images acquises. Si la PSF est erronée, la déconvolution comprend des artefacts. C'est le cas si une image aberrante est déconvoluée avec une PSF mesurée dans des conditions non aberrantes. En LLSM, la PSF du microscope est mesurée en prenant des images d'une bille fluorescente à la surface d'une lamelle. Pour améliorer la déconvolution, une solution consiste à corriger les aberrations avant l'acquisition de l'image. Dans cette étude, nous avons comparé les acquisitions sans et avec correction AIO, avant et après déconvolution, à partir (1) de MIPs de 30 images d'astrocyte exprimant la GFP à $15\ \mu\text{m}$ sous la surface d'une tranche de cerveau et (2) de plans 2D de cellules marquées au tagRFP, à une profondeur de $15\ \mu\text{m}$ correspondante à la seconde couche épidermique d'une racine d'*Arabidopsis*. Dans les deux cas, la déconvolution sur des images non corrigées entraîne la création d'artefacts non visibles sur l'image corrigée et sa déconvolution. L'augmentation du contraste et de l'intensité permet de faire ressortir des structures non visibles lors d'une déconvolution sans AIO.

4.3. Article



Active image optimization for lattice light sheet microscopy in thick samples

MAXIME MALIVERT,^{1,2} FABRICE HARMS,² CYNTHIA VEILLY,²
JEROME LEGRAND,² ZIQIANG LI,³ EMMANUELLE BAYER,³ DANIEL
CHOQUET,^{1,4} AND MATHIEU DUCROS^{1,*} 

¹Université de Bordeaux, CNRS, INSERM, Bordeaux Imaging Center (BIC), UAR 3420, US 4, F-33000 Bordeaux, France

²Imagine Optic, F-91400 Orsay, France

³Université de Bordeaux, CNRS, Laboratory of Membrane Biogenesis (LBM), UMR 5200, F-33140 Villenave d'Ornon, France

⁴Université de Bordeaux, CNRS, Interdisciplinary Institute for Neuroscience (IINS), UMR 5297, F-33000 Bordeaux, France

*mathieu.ducros@u-bordeaux.fr

Abstract: Lattice light-sheet microscopy (LLSM) is a very efficient technique for high resolution 3D imaging of dynamic phenomena in living biological samples. However, LLSM imaging remains limited in depth due to optical aberrations caused by sample-based refractive index mismatch. Here, we propose a simple and low-cost active image optimization (AIO) method to recover high resolution imaging inside thick biological samples. AIO is based on (1) a light-sheet autofocus step (AF) followed by (2) an adaptive optics image-based optimization. We determine the optimum AIO parameters to provide a fast, precise and robust aberration correction on biological samples. Finally, we demonstrate the performances of our approach on sub-micrometric structures in brain slices and plant roots.

© 2022 Optica Publishing Group under the terms of the [Optica Open Access Publishing Agreement](#)

1. Introduction

For the last 20 years light-sheet fluorescence microscopy (LSFM) has become a very common and successful bio-imaging method [1]. More than 300 LSFM-based biology research papers were published in 2020. The reason of this success comes from a unique combination of three key imaging properties: (1) a very fast imaging rate, (2) an intrinsic optical sectioning and (3) a very low photo-toxicity and photo-bleaching [2]. LSFM is thus an ideal technique for fast, non-invasive, 3D imaging of live samples with high spatial resolution. LSFM implementations are very diverse with a wide range of commercial and home-made instruments, each addressing a specific range of sample size, imaging resolution, experimental conditions, or technical realization. In this growing forest of instruments, lattice light-sheet microscopy (LLSM) stands out as probably the most efficient microscope for gentle and fast 3D imaging at the sub-cellular scale [3]. The main difference between LLSM and other LSFM microscopes resides in the way the light sheet is created. In LLSM, the excitation laser beam is shaped by a spatial light modulator into an array of non-diffractive beams, also called an optical lattice. Restricting this optical lattice to the detection objective focal plane results in a very thin and uniform light sheet with a constant thickness over a distance much greater than the Rayleigh range of a focused Gaussian beam. Typical lattice light sheet thickness is $\sim 0.7 \mu\text{m}$ over $15 \mu\text{m}$ long along the propagation direction. This sub-micrometric homogenous optical sectioning plane provides LLSM superior imaging performances ideal to study 3D dynamics in biological samples at subcellular scales. Dissemination of LLSM technology was boosted by the group of E. Betzig at HHMI who shared the complete technical documentation to reproduce the original LLSM. Thus, many research groups and core facilities could access this powerful microscope. Soon after its initial publication,

LLSM was applied successfully to a number of biological research domains: quantification of membrane dynamics during cell division [4,5] study of transcription factors mechanisms [6], of organelles interaction [7], application to immunology researches [8,9], to oncology [10] or neuroscience. [11–14].

However, most of these studies were performed on very thin or semitransparent samples, or just below the surface of thick tissues. One of the main reasons is the presence of optical aberrations that alters light propagation from a straight path when imaging deeper inside a biological sample. The first cause of aberrations is the sample-media interface that represents, at the macroscopic level, an uneven surface with an index of refraction step. Furthermore, at the microscopic scale, any biological sample presents strong index of refraction inhomogeneities that modify the phase of light, inducing wavefront (WF) distortion [15,16]. As light penetrates deeper, typically beyond 100 μm , the WF is eventually randomized by successive scattering events. Here we address the sample-induced aberrations occurring at shallow depth before randomization of light phase. It is important to note that both excitation and detection paths of LLSM are affected by these sample-induced optical aberrations. Regarding the excitation path, the effects of the sample on the light sheet can be decomposed in two categories: (1) a deviation of the light sheet from its original position and (2) a broadening of the light sheet. In terms of deviation, the axial shift of the light sheet along the detection objective optical axis, also called defocus, is of critical importance as the light sheet thickness in LLSM is typically $\sim 0.7 \mu\text{m}$ and the detection objective depth of field $\sim 0.7 \mu\text{m}$. Failing to achieve a perfect overlap between the light sheet and the objective focal plane results in reduced signal and resolution. In the present work we propose a method to automatically find the light sheet axial position that creates the best focused image. Illumination path aberrations other than defocus might also affect the light sheet position and shape but are not compensated by our approach.

Regarding the detection path, the aberrations also degrade the imaging PSF and result in a lower resolution and intensity. The effects of optical aberrations on image quality can be reduced or cancelled with adaptive optics (AO) strategies [17,18]. AO consists in correcting the aberrations with a WF shaping device such a deformable mirror (DM) or a spatial light modulator (SLM). Two classes of AO methods exist: direct or indirect [18,19].

In direct AO, the aberrated WF is measured with a WF sensor and the opposite WF is applied to the DM or SLM. The WF can be measured from a point source within the sample, for example a fiduciary fluorescent bead [20]. However, this strategy is difficult to implement within biological specimen. A less invasive solution consists in creating an artificial guide star using 2-photon excitation of sample fluorophores with a focused NIR femtosecond laser [21]. Also a more recent approach estimated the WF using an extended source WF sensor, that does not require either a real or artificial point source within the sample but uses a non-uniform contrasted feature within the sample itself [22,23].

In indirect AO, the WF is not measured, however, the aberrations can still be compensated using various strategies. If a point-like sub-resolution object can be imaged, one can acquire a PSF and estimate the local WF using the phase retrieval method [24]. Another more common method, named modal adaptive optics [25], consists in applying a series of controlled wavefronts shapes and measuring a metric on the acquired image for each WF. The set of WF that produces the highest metric determines the optimum aberration correction. The WF is typically decomposed in orthogonal modes such as Zernike polynomials and each mode is optimized separately. Various metrics (intensity [26–28], sharpness [29], spatial frequency content [30,31]) and optimization algorithms (model-based [32,33], hill climbing [34], genetic algorithm [35,36]) were developed [37]. Instead of applying changes to the entire WF, other teams use a zonal pupil method [38].

Correction of aberrations using AO has been used in many microscopy modalities among which LFSM is one. Adding AO capabilities to LFSM detection path significantly improved contrast inside multicell spheroids with direct AO method using in situ fiducials to measure WF

[39,40]. AO corrections at the excitation and detection paths of a LLSM was recently developed [41]. In this complex microscope the aberrated WF is measured successively at the excitation and detection paths using an artificial guide star produced at the focus of a NIR fs pulsed laser. The light sheet axial shift (defocus) is also corrected. Thanks to these corrections this AO-LLSM produced very high-quality images at depth that could not be reached by the conventional LLSM. For example, they demonstrated high resolution fast 3D imaging inside a zebrafish embryo. More recently AO-LLSM combined with big data analysis was applied to study clatherin-mediated endocytosis in organoids [42]. However, this AO-LLSM approach requires a complex integration and expensive instrument, with the addition of a NIR fs pulsed laser (to generate the guide star), the use of two full sets of AO systems (wavefront sensor and corrector), an upgrade of SLM in the excitation path, additional galvanometers, flip mirrors as well as several relay optics. Here we propose an alternative, simpler and low-cost two steps method: (1) light sheet defocus correction and (2) sensorless aberration correction at the detection path with AO. These processes allow to increase the resolution and contrast of images acquired with LLSM, especially in depth of the sample where the optical aberrations lead to the shifting of the illumination plane and the deterioration of image quality.

2. Methods

2.1. Optical system—alignment and calibration

Originally, our LLSM setup is a replica of the LLSM setup developed by Chen et al [3]. The excitation path (Fig. 1.a, blue) includes a Z galvanometer (GZ) optically conjugated to the back pupil of the excitation objective (EO, Special Optics, 28.6x 0.66 NA water). Rotation of GZ moves the light-sheet along the Z-axis, i.e., the optical axis of the detection objective (DO, Nikon 25x 1.1 NA water). The lattice pattern is created by the diffraction onto a programmable SLM and filtered by an annular mask. For all acquisitions in this work, we used a mask with inner and outer NA of 0.44 and 0.55 respectively. The resulting light-sheet had a quasi-uniform thickness over 15 μm length. Spatial resolution measured in the center of the field of view was 0.28 μm laterally and 0.55 μm axially. We modified the detection path (Fig. 1.a in green) to insert the AO capability and correct sample-induced aberrations. The back focal plane of the DO is imaged by a pair of achromatic doublet lenses (L1: $f = 125$ mm Thorlabs AC254-125-A, and L2: $f = 101.6$ mm Edmund Optics 49-783) in a 4f arrangement, folded using mirror M1, onto a fifty-two actuators DM (Imagine Optic - MirAO 52-e). The magnification (0.81) of this pair of lenses ensures that the full objective back aperture ($D = 17.6$ mm) is imaged at the DM pupil ($D = 15$ mm) without loss. A third lens (L3: $f = 400$ mm, Thorlabs; AC254-400-A) forms an image of the sample on the sCMOS camera with a 62.5 \times magnification. The entire optical path was designed using OpticStudio (Zemax) in order to minimize instrumental aberrations. A deviation path, composed of a flip mirror (FM), a fold mirror (M3) and an achromatic doublet lens (L4: $f = 75$ mm, Thorlabs AC254-75-A), allows to conjugate the back focal plane of the detection objective onto a Shack-Hartmann wavefront sensor (WFS) (*Imagine Optic – HASO 4 First*). This AO hardware integration requires to follow a precise alignment protocol detailed in Supplementary Note 1. WFS is used for two reasons: (1) to calibrate the DM, i.e., compute the interaction matrix between the DM 52 actuators positions and the WF shape (“DM calibration” Fig. 1(b), Supplementary Note 2 for details) and (2) to cancel static instrumental optical aberrations (“Static aberration corrections”, Fig. 1(b), Supplementary Note 3). For this step 1 μm diameter fluorescent beads (ThermoFisher Yellow-Green F8823) (Supplementary Note 6.1.) are illuminated and a closed loop AO process is applied, using fluorescent light from a single bead, between the DM and the WFS to correct static instrumental aberrations and obtain a flat WF after the DM. We consider, following the Maréchal criterion, that the calibration is correct when the residual WF is smaller than 35 nm RMS for an imaging wavelength of 488 nm. The previous compensation of static aberrations might be inaccurate in the case of significant non-common path aberrations. In our setup, such

aberrations can mainly be due to poor flatness of the flip mirror (Thorlabs BB1-E02). The flatness specification of this mirror being $\lambda/10$ (633 nm) we consider non-common path aberrations to be negligible in our setup. The WF shape calculated during this process corresponds to the initial shape used before each sample WF optimization. Static aberrations might change during the experiments due to minor temperature variation or opto-mechanical elements instability, but such variations will be taken into account when performing AO on the sample. During the rest of our optimization method the WFS is not used, as since our approach is image-based.

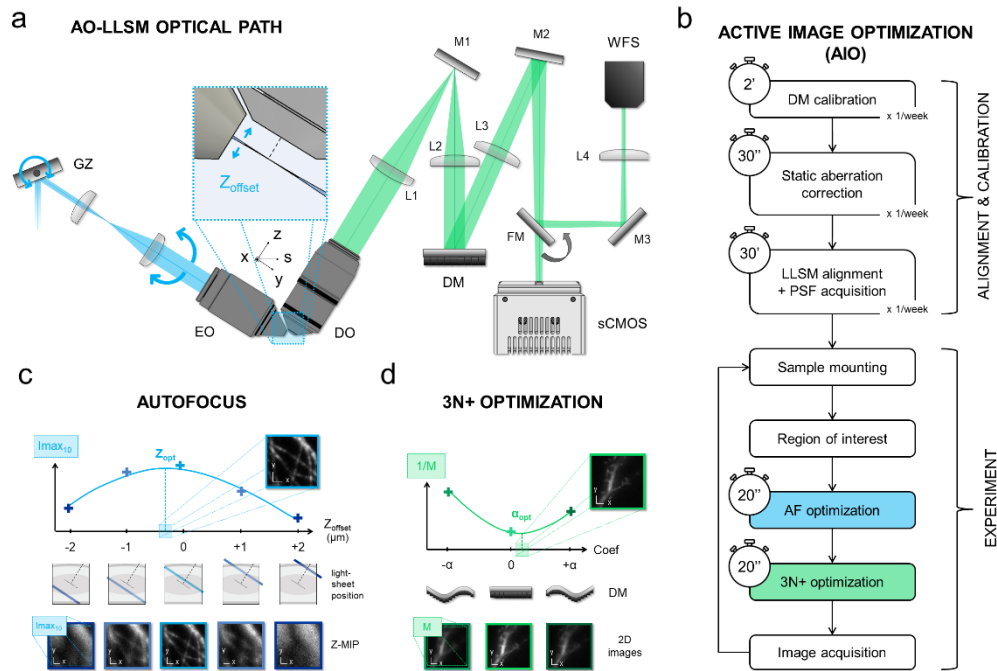


Fig. 1. Active image optimization (AIO) is based on automatic light sheet refocusing and detection path aberrations correction **(a)** Simplified optical diagram of the AO lattice light-sheet microscope. In the illumination path (blue) GZ galvanometer controls the light sheet position along the Z-axis (Z_{offset}). In the detection path (green) the deformable mirror (DM) modifies the WF to correct the optical aberrations using a sensorless iterative optimization process. **(b)** AIO steps, their frequencies and duration. **(c)** Principle of the “Autofocus” process: a minimum of five 3D stacks (30 images, $0.345 \mu\text{m}$ steps) are acquired, each with a specific Z_{offset} (e.g. $-2, -1, 0, +1$ and $+2 \mu\text{m}$). The maximum intensity projections (Z-MIP) along the Z axis of the 3D acquisition are measured for each stack (b, bottom) and the Z-MIP signal intensity is computed (Imax_{10} : mean of 10 brightest pixels). Finally, the Z_{offset} that maximizes Imax_{10} (Z_{opt}) is interpolated and applied to GZ. **(d)** Detection path aberration correction using an image metric (3N+). A set of negative, null and positive coefficients (α) is applied on a given Zernike mode by setting the WF with the DM. A metric M is measured on the 3 corresponding 2D images and a 2nd order parabolic curve is fit to $1/M$. The apex of this curve provides the coefficient α_{opt} that optimizes the image metric for the specific aberration mode. In case α_{opt} is not reached in the range $[-\alpha, +\alpha]$, additional α points are measured (see text below). We repeat this process for all selected Zernike modes.

Once the detection path static aberrations have been canceled, the light sheet is co-aligned with the detection objective focal plane (manual tip/tilt, and translation adjustments of the LLSM) and a PSF is acquired on a 170 nm diameter bead (Fig. 1.b, “LLSM alignment + PSF acquisition”, Supplementary Note 4 – beads sample protocol in Supplementary 6.1.). These

alignment and calibration procedures should be performed every time the sample immersion medium or temperature are modified. When keeping the same experimental conditions, we empirically determined that it was necessary and sufficient to repeat these steps once a week.

2.2. Active image optimization (AIO) process

Our AIO process consists in (1) a light sheet autofocus correction (AF, Fig. 1(c)) followed by (2) a detection path aberration correction (3N+, Fig. 1(d)). Typically, full AIO takes 40 s, with ~ 30 s actual sample exposure time. Here we describe the general principle of these two steps, integrated in a LabVIEW stand-alone software (Supplementary Note 5). We conducted benchmark tests to determine the AF and 3N+ parameters that provide the fastest and most robust performances, and that are presented further in the Results and Supplementary sections.

2.2.1. Autofocus (AF) correction process

Once the sample is mounted and a ROI is selected (“*Sample mounting*” and “*Region of Interest*” (ROI) in Fig. 1(b)), the first step of our AIO consists in correcting the defocus between the illumination plane and the focal plane of the detection objective (“*AF optimization*” in Fig. 1(b)). We base this process on the maximization of a metric computed from the images acquired by the sCMOS camera. Our metric $I_{\max 10}$ is the sum of the 10 brightest pixels measured on maximum intensity projection (MIP) of a $10\ \mu\text{m}$ thick Z-stack (Z-MIP images in Fig. 1.c). Specifically, we acquire multiple Z stacks (30 planes, $0.345\ \mu\text{m}$ steps) with a different light-sheet Z_{offset} (gradient blue lines in Fig. 1.c) between -2 and $+2\ \mu\text{m}$. We chose this range because we observed that defocus remains within these bounds in all our experimental conditions. In Fig. 1.c the case with five images acquired with Z_{offset} at $-2, -1, 0, +1$ and $+2\ \mu\text{m}$ is presented. When the illumination plane is shifted away from the focal plane, the excitation and detection PSF do not overlap axially and the resulting PSF peak is reduced. Hence the image signal is reduced and the metric $I_{\max 10}$ decreases. On the other hand, $I_{\max 10}$ is maximum when the illumination plane and the focal plane perfectly overlap. We compute $I_{\max 10}$ in a MIP of a $10\ \mu\text{m}$ thick 3D stack instead of a single 2D image ($\sim 0.5\ \mu\text{m}$ thick) to increase the sample information content over which we optimize the best focus. The offset that maximizes $I_{\max 10}$ is interpolated with either a gaussian or parabolic function (Z_{opt} in Fig. 1.c). Finally, Z_{opt} is applied to GZ to refocus the light sheet.

2.2.2. 3N+ aberration correction process

In this step we correct the aberrations represented by Zernike polynomials [43], which are continuous and orthogonal functions used to describe aberrations in optical systems. The Zernike aberration decomposition is very commonly used because there is almost no cross talk between these polynomial functions (aka modes). The wavefront deformation, measured as the root mean square (RMS) deviation from a flat wavefront, increases with the amplitude of each Zernike polynomial. We correct Zernike modes sequentially, typically starting with astigmatism (“*3N+ optimization*” in Fig. 1(b)). The sample aberrations arise from refractive index mismatch between the imaging solution and the sample and from sample inhomogeneities. Aberrations tend to increase with the imaging depth. In a similar way as AF, the goal is to optimize an image-based merit factor. We use an iterative process sequentially on each Zernike mode. Thanks to the previous DM calibration, the DM is capable to accurately apply a pre-defined WF shape based on a Zernike representation. The correction process consists in applying a positive, null (initial mirror shape) and negative coefficient to a specific Zernike mode ($+\alpha, 0$ and $-\alpha$ in Fig. 1(d)) and to measure the corresponding image-based merit factor. In our case the merit factor is the inverse of a metric, such as e.g., the maximum intensity or the energy from a pre-defined spatial frequency domain (see benchmarking section below). We fit the measured data points with a second order polynomial to interpolate the coefficient (α_{opt} in Fig. 1(d)) that maximizes the merit

factor for the selected Zernike mode. This coefficient cancels out most of the corresponding Zernike aberration from the detection WF and consequently, increases signal and resolution.

Our aberration correction process is designed to speed up optimization without sacrificing precision. It presents two improvements when compared to most common AO algorithms [25,32]. First, in order to simplify processing, we use a parabola to fit the $1/M$ merit factor and find its minimum. This is a very fast and direct algebraic calculation. Other 3N algorithms [32] are often based on a slightly more complex Gaussian fit of M . The second improvement consists in a simple logical method to measure $1/M$ in a minimum but sufficient number of points. Since sensorless optimization is blind to the amount of aberrations to be corrected, an initial fixed value of α (see Fig. 1.d) has to be selected as a trade-off between precision (low α value = high sampling) and dynamic range (large α value). In order to minimize the number of images required from the iterative procedure (and minimize optimization time and photobleaching), usually only three images per Zernike modes (3N or 2N+1 algorithm) are used. Here we start with three measurements for coefficients $-\alpha$, 0 and $+\alpha$. If the parabola minimum is within this range, then the optimization process is terminated. If not, we measure the merit factor at either $+2\alpha$ or -2α depending on the parabola slope and a new parabola fit is computed with added points (e.g., $-\alpha$, 0 and $+2\alpha$). In the event that the minimum is still not reached and if the number of iterations is below a predefined limit, another iteration is launched. If not, or if an iteration converges to wrong calculation, none coefficient is applied and the algorithm switches to the next Zernike mode. As a result, our optimization process uses three images in ideal cases – i.e., when the Zernike aberration coefficient is in the search range -, and only a couple of supplementary acquisitions, when necessary, thus minimizing the total number of images. We named this adaptive sensorless aberration correction method 3N+. The complete organization chart of the algorithm is available in Supplementary Fig. S1.

3. Results

As described in the Introduction, a wide variety of approaches exist for AF corrections and 3N optimization in microscopy and vary in their calculation method, input parameters, system integration and performances. Overall, optimizing the performance of AF and 3N processes requires to tailor their parameters, in particular considering the specificities of the samples of interest, the signal to noise, the amplitude of aberrations to be compensated, or the expected accuracy of the correction. With the aim to both maximize the quality of the correction and minimize the time required for both processes, we conducted a systematic analysis of the impact of the key parameters of the AF and 3N+ processes, including for the AF process the number of offset points, and for the 3N+ process the comparison of several merit factors, the amplitude of the sampling step and order of modes of the modal process, and the overall number of iterations.

All images processing and acquisition conditions presented in the following section and in supplementary are defined in Supplementary Note 7 and 8.

3.1. AF process optimization

First, we tested the AF process by imaging COS cells with three types of labeled structures (Supplementary Note 6.3.): a quasi-homogeneous labeling of cell membranes (Fig. 2.a, membrane, blue), filamentary structures (Fig. 2.b, tubulin, green) and punctate, high spatial frequency signal (Fig. 2.c, clathrin, red) in order to assess the reliability of AF when applied to different sample types, corresponding for example to different spatial frequencies. To optimize both precision and speed we tested our AF process with either five or nine Z_{offset} data points. Sampling the defocus with nine points could potentially provide higher precision. On the other hand, sampling only five points would be faster and reduce photobleaching. We also tested fitting the data with either a gaussian or parabolic curve. We expected the Imax_{10} metric to decrease symmetrically for small ($\pm 1 \mu\text{m}$) positive or negative defocus (reduced PSF peak). However, the shape of Imax_{10}

for larger defocus is not straightforward and most likely sample dependent. We decided to test empirically both curves in various samples to determine the best fit (results for the parabolic curve fit in Supplementary Fig. S2). First, we achieved a perfectly focused light sheet by using “Autofocus Bead” function of LLSM software (Supplementary Note 4) on one of 170 nm diameter beads included in the COS cell cover slip with poly-L-lysine. Then we applied four defocus ($-1\ \mu\text{m}$ / $-0.5\ \mu\text{m}$ / $+0.5\ \mu\text{m}$ / $+1\ \mu\text{m}$, “applied offset” Fig. 2(d)) by tilting the Z-galvo (GZ) and launched the AF process to measure the defocus (“measured offset” Fig. 2(d)).

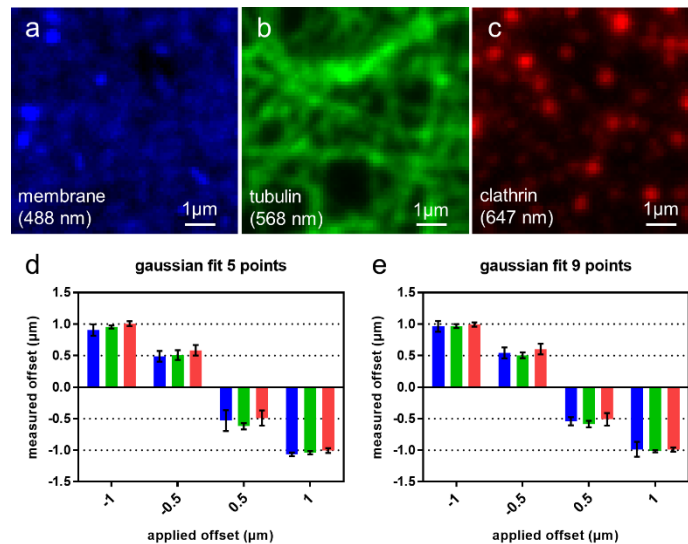


Fig. 2. AF process is precise and reliable. We test AF on three cellular structures imaged in a $6 \times 6\ \mu\text{m}^2$ ROI in COS cells: (a) membranes (WGA conjugated to Alexa 488 nm), (b) tubulin (immunolabelling with Alexa 568) and (c) clathrin (immunolabeling with Alexa 647). Four defocus are applied: $-1\ \mu\text{m}$, $-0.5\ \mu\text{m}$, $+0.5\ \mu\text{m}$ and $+1\ \mu\text{m}$. AF processes based on (d) 5 points or (e) 9 points fit with a Gaussian curve are launched to correct this applied defocus. In both cases and for each labeling, the averaged measured defocus on five FOVs allows an accurate correction.

Here, we present the variation of the average measured offset on five FOVs for three colors with the applied initial offset for the gaussian fit on five points (Fig. 2.d) and on nine points (Fig. 2.e). The results for the AF process based on a 2nd order polynomial fit are presented in supplementary (Supplementary Fig. S2). We show that the AF process based on a gaussian fit allows to recover the position of the light-sheet on the focal plane of the detection objective with five or nine measurements with a good repeatability and reproducibility. The average defocus measured have a low error and standard deviation (relative to the defocus amplitude) with any type of sample and applied offset. The maximum mean square deviation between the measured and applied defocus values is measured on the gaussian 5 points AF on membrane labelling, with a value of $0.11\ \mu\text{m}$. For the other fits applied to the three labeling, this value is below $0.09\ \mu\text{m}$, which demonstrates the effectiveness of the method in correcting the defocus with few errors. Thereafter, we will use the AF process based on a gaussian fit and five measurements to decrease the processing time and reduce the risk of photobleaching.

3.2. Comparison of several merit factors for 3N+ process

Regarding the 3N+ process, the optimal parameters of the algorithm are dependent on the characteristics of the image. In particular the merit factor is strongly influenced by the sample

intensity, SNR, and spatial frequency content. We compared three metrics: the maximum intensity averaged on 10 brightest pixels ($I_{\max_{10}}$ – left image in Fig. 3.a), the signal integrated in a Fourier ring for spatial frequencies either in the range 500-1000 mm^{-1} ($\text{FFT}_{500-1000}$ – centered image in Fig. 3.a) or 1000-2000 mm^{-1} ($\text{FFT}_{1000-2000}$ – right image in Fig. 3.a). The microscope theoretical cutoff frequency is $\sim 3600 \text{ mm}^{-1}$ ($\text{NA} = 1.1$, $\lambda = 500 \text{ nm}$), in good agreement with the measured lateral resolution of 275 nm. We selected frequency metrics below this cutoff frequency to remain in a range where the signal is significantly above the noise level and the AO process gain can be clearly detected. Furthermore, the specific neuronal sample imaged here presented bright structures such as spines and dendritic branches, with sizes between 2 μm - 1 μm ($\text{FFT}_{500-1000}$) and 1 μm - 500 nm ($\text{FFT}_{1000-2000}$). The corresponding merit factors are the inverse of these metrics. We tested the merit factors sensitivities on dendrites labeled with cytosolic GFP in a fixed mouse brain slice (e.g., Fig. 3.a left, Supplementary Note 3). Five ROIs were selected at the surface of the brain slice. At each ROIs we applied varying amplitudes of aberration coefficients (-0.15 till +0.15 μm RMS, 0.05 μm steps) for Zernike modes from astigmatism 0° to trefoil 90° thanks to the calibrated DM that can induce a precise quantity of any Zernike aberration. For each coefficient, one image is acquired and the three merit factors are measured. The results for the effect of spherical aberration are presented on Fig. 3.a, bottom. Data for all other aberration modes are presented in Supplementary Fig. S3.

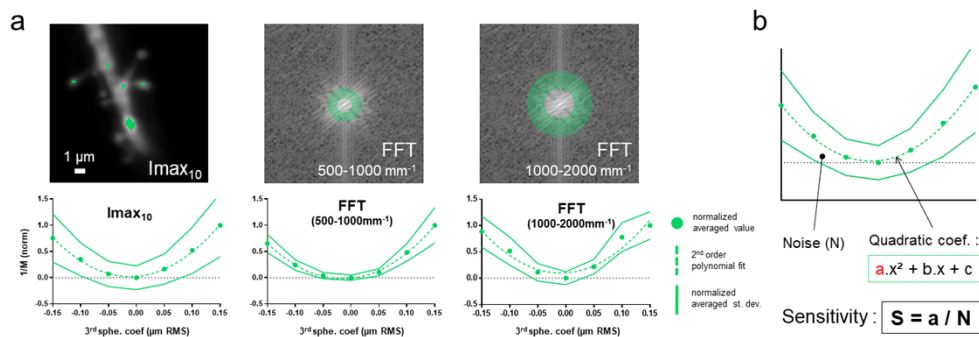


Fig. 3. Comparison of three merit factors for the 3N+ process. **(a) top:** Illustration of the pixels used to compute the merit factors, either on the LLSM image of a neuronal dendrite ($I_{\max_{10}}$ – more than 10 pixels for illustration), or on the 2D Fourier transform ($\text{FFT}_{500-1000 \text{ mm}^{-1}}$ and $\text{FFT}_{1000-2000 \text{ mm}^{-1}}$); **bottom:** Normalized response of the three merit factors as a function of applied spherical aberration coefficient between -0.15 and 0.15 μm RMS, measured on neuronal dendrites expressing GFP. The merit factors (green dot) are measured and averaged on five different areas in the sample, green line indicating the standard deviation edges. Data are fitted with a second order polynomial curve (dashed green line). **(b)** For each response curves we measure a sensitivity factor defined as the ratio of the parabola quadratic coefficient divided by the noise N.

We then asked ourselves which merit factor gives the greatest chance of our 3N+ algorithm to converge with a minimum number of steps and the smallest error. For this we computed a sensitivity factor defined as the quadratic coefficient of the polynomial fit (“a” in Fig. 3(b)) divided by the integral of the noise N (grey area in Fig. 3(b)). A large S means that a small aberration will induce a large merit factor change with low noise, thus increasing the probability of our 3N+ algorithm to converge fast and precisely to the global minimum. These sensitivity factors are presented in Table 1.

$I_{\max_{10}}$ systematically results in lower sensitivities than the two FFT metrics. $\text{FFT}_{500-1000}$, which integrates image information in the spatial frequency range corresponding to fine dendrites and spines – i.e., structures most impacted by aberrations – gives the best result for all modes

Table 1. Sensitivity factors for most relevant Zernike modes for neuronal samples investigated^a

Metric Zernike mode	Dendrites in brain slice (GFP)		
	Imax ₁₀	FFT _{500–1000}	FFT _{1000–2000}
Astig 0°	50.6	190.4	228.6
Astig 45°	70.2	243.8	260.6
Coma 0°	108.6	339.6	286.9
Coma 90°	115.2	418.7	273.9
3 rd spherical	188.4	532.2	322.8
Trefoil 0°	82.5	335.5	240.6
Trefoil 90°	83.4	325.6	220.7

^aAverage values are calculated on five FOV for each sample. Highest values for each Zernike modes are show in bold.

except astigmatism where FFT_{1000–2000} provided a very small increase in sensitivity. Overall, we conclude that the FFT_{500–1000} provides a sensitive metric for this type of sample and we selected it as the merit factor for all the subsequent tests and experiments with the 3N+ process.

3.3. Optimization of other 3N+ parameters

In addition to the merit factor, other input parameters impact the 3N+ algorithm accuracy and must be carefully selected to precisely correct sample induced optical aberrations. (1) The Zernike mode search range α defines the sampling step to find the optimum Zernike coefficient and so is directly related to the 3N+ result accuracy. (2) Zernike mode correction order is critical because correcting first the mode that degrades the most the image can increase the sensitivity for the following modes. (3) The number of iterations n of the 3N+ algorithm can increase progressively the accuracy of the process (at the cost of slowing down the AO process)

We tested the effects of the range α , the Zernike mode orders and the iteration number n on fixed brain slices with labeled neurons (Supplementary Note 3). First, we start from a reference mirror shape corresponding to a flat WF, i.e., the imaging path corrected from static aberrations, and imaged a fine dendritic structure at the surface of the sample (“ROI at surface” in Fig. 4(a)). Then, to mimic the effect of light propagation inside the sample, we induced an artificial aberration by generating a random set of Zernike coefficients between 0 and 200 nm RMS and from astigmatism 0° to trefoil 90° (“DM_J” in Fig. 4(a)). The aberration is applied by changing the shape of the DM. Acquisition parameters are chosen to avoid photobleaching during the 3N+ process experiment (Supplementary Note 8). After an AF, to correct potential light-sheet defocus, we ran three successive iterations of the 3N+ process that output three sets of Zernike coefficients (green inset in Fig. 4.a) and correspond to three mirror shapes. This experiment is reproduced ten times in ten different selected areas at the sample surface, to integrate 100 measurements for significant statistical analysis.

In Fig. 4, we present the results of a 3N+ process where we chose to correct aberrations in the following order: 3rd spherical, astigmatism 0°, astigmatism 45°, coma 0°, coma 90°, trefoil 0° and trefoil 90°. This 3N+ optimization is repeated three times, with iterations 1, 2, and 3 having α amplitudes 100, 50 and 50 nm RMS respectively. Mismatch between sample and immersion medium refractive index lead to spherical aberrations in depth. By correcting it first, we intend to suppress a significant part of WF deformation and improve correction on subsequent modes. We set the first iteration amplitude to 100 nm RMS as this is a representative value of the typical aberrations we observed in our samples in depth, and represents a good compromise between

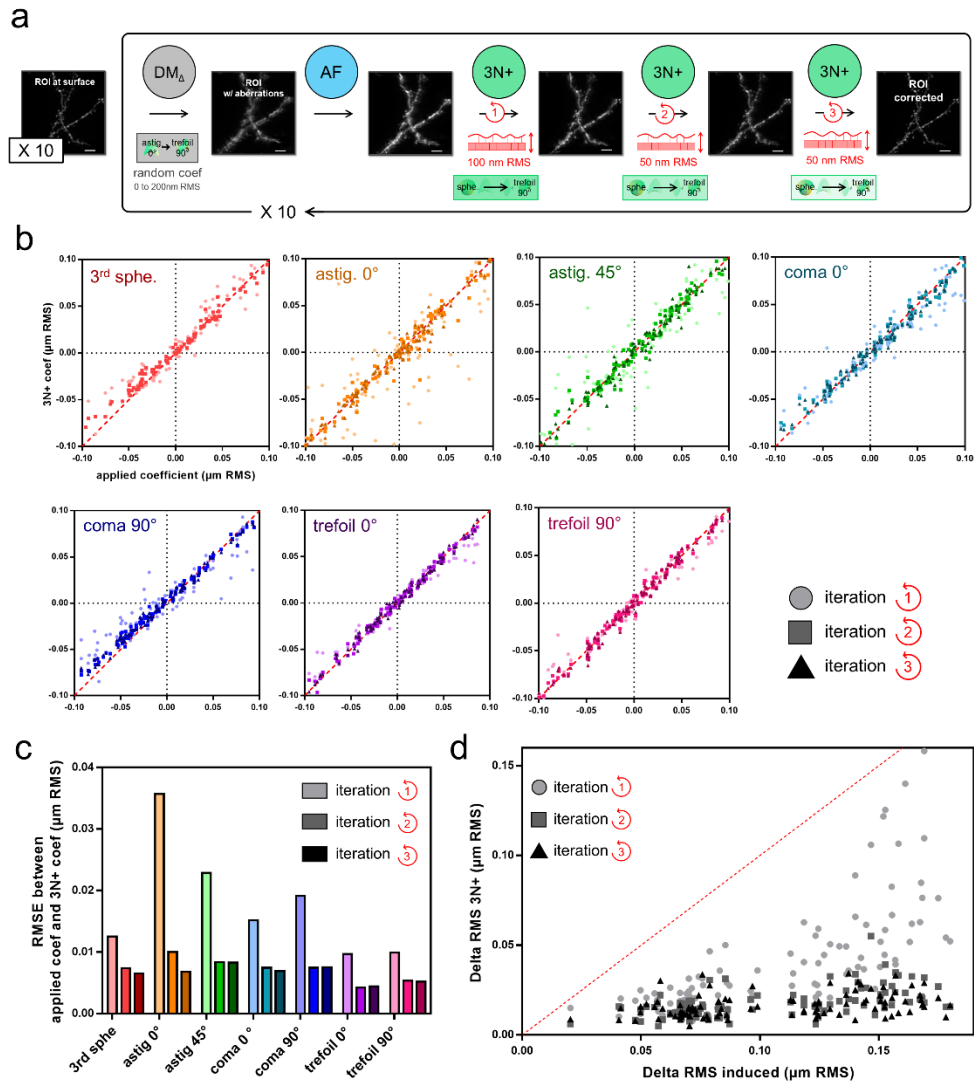


Fig. 4. The 3N+ process efficiently corrected artificially-induced aberrations. (a) We acquired a non-aberrated image at the surface of a brain slice with labeled dendrites, then added a random set of aberrations from astigmatism to trefoil (random coef. in grey) with the DM (DM_{Δ}) and run three iterations of the 3N+ process (green circles) after an AF (blue circle). For all iterations, 3rd spherical aberration is corrected first. For iteration 1, DM had an amplitude of 100 nm RMS, and then 50 nm RMS was applied for iterations 2 and 3. The same process was repeated 10 times on 10 different areas of the sample with a different randomly generated aberration. (b) 3N+ coefficient found after each iteration as a function of applied coefficient on DM, for each Zernike mode. Red dashed line corresponds to a perfect 3N+ correction. An excellent correlation between applied and measured coefficients is shown for all Zernike modes. (c) Root mean square error (RMSE) are extracted to show the 3N+ error for each Zernike mode at each iteration. (d) We computed the induced and residual WF $\Delta RMS_{induced}$ and ΔRMS_{3N+} respectively using the known DM shapes and calibration matrix. After only 2 iterations the residual WF is 50 nm RMS, independently of the induced aberration

measurement speed and accuracy. The next two iterations allow to refine the algorithm precision. Two other 3N+ process with different orders of optimization and amplitudes are described in Supplementary Fig. S4. The 3N+ process presented in Fig. 4 provided the best results in terms of correction speed and accuracy.

We can plot the 3N+ process output coefficients vs. induced coefficients for each Zernike mode (Fig. 4.b). We see that 3N+ is very efficient, especially after 2 iterations, since most points fall on the identity line. For each iteration and each Zernike mode, we can estimate the accuracy of the 3N+ process by computing the root mean square error (RMSE) of the coefficients found with the 3N+ vs. induced coefficients (Fig. 4.c). After the second iteration, all induced aberrations are corrected with an error lower than 10 nm RMS. We notice that an error superior to 20 nm RMS on astigmatism is still present after the first iteration, independently of the Zernike order used for the correction (Supplementary Fig. S4), demonstrating the lower efficiency of 3N+ on astigmatism. This particular behavior of the process on astigmatism might be attributed to some drift of the DM shape with temperature, membrane DMs being known to be sensitive to temperature variations in particular regarding astigmatism at first. The latest version of the DM used includes a stabilization module (Imagine Optic MirAO52ES - <https://www.imagine-optic.com/products/mirao-52es-deformable-mirror/>), which is planned to be integrated in our setup to mitigate this possible effect.

The corrected WF could then be computed and the residual aberration expressed as the WF Δ RMS computed and plotted as a function of the induced WF Δ RMS (Fig. 4.d). Contrary to the measurement for each individual Zernike mode, this representation provides a global estimate of the performance of the 3N+ process. Independently of the quantity of aberrations induced (at least up to 200 nm RMS), the 3N+ algorithm is capable to correct the aberrations to less than 50 nm Δ RMS after only two iterations for 99/100 test points. A 3rd iteration does not result in a significant supplementary gain.

This 3N+ process - spherical aberrations corrected first, and two 3N+ iterations are run with respectively 100 nm and 50 nm α amplitudes - obtained on images of neuronal dendrites offers the most accurate and efficient results compared to the other correction processes tested (see Supplementary Fig. S4). For all the results presented below, we used this 3N+ process along with the AF method and merit factor selected on Section 3.1 and 3.2.

3.4. Dendritic spines imaging in depth of a brain slice

After optimizing the parameters of AF and 3N+, we tested the complete process by imaging submicrometric structures in fixed organotypic hippocampal brain slices in depth (Supplementary Note 3). Specifically, we imaged the width of dendritic spine heads in neurons expressing cytosolic GFP at approximately 40 μ m depth, where the imaging quality is typically significantly degraded compared to the surface. First, the light-sheet position and the mirror shape were optimized on dendrites at the surface to correct system aberrations. Then, dendritic spines were imaged between 38 and 44 μ m under this surface in three steps: (1) before any type of correction, (2) after AF optimization and (3) after 3N+ optimization process. To quantify the impact of these optimizations, the width of selected dendritic spine heads was measured at each of the three stages, by plotting an intensity profile perpendicularly to the spine necks (Fig. 5(a)) and by measuring the full width at half maximum (FWHM) of the profile gaussian fit. A total of 67 spines were examined for the three optimization steps, taken from 8 different experiments – all issued from the same sample preparation – and were included in the ANOVA test which results are displayed in Fig. 5(b).

Without correction, the average spine head width measured on dendritic spines increased to $0.493 \mu\text{m} \pm 0.100 \mu\text{m}$ compared to the average size at the surface equal to $0.397 \mu\text{m} \pm 0.062 \mu\text{m}$ ($n = 134$, dot dashed line in Fig. 5.b). After AF, this value is strongly reduced at $0.424 \mu\text{m} \pm 0.080 \mu\text{m}$. After 3N+ spines almost recover their size at the surface ($0.400 \mu\text{m} \pm 0.079 \mu\text{m}$). ANOVA

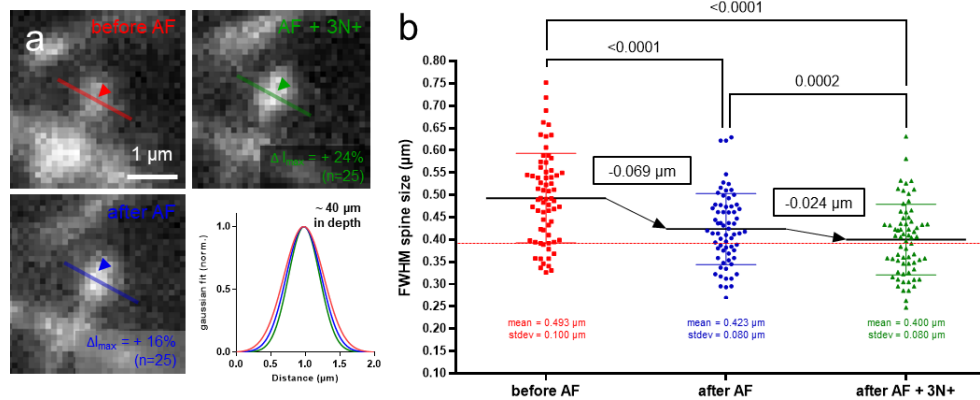


Fig. 5. The active image optimization (AIO = AF & 3N+) process recovers an accurate morphological representation of dendritic spines down to 40 μm below brain slice surface. (a) Spine head widths are measured before AIO (red), after AF optimization (blue) and after AIO (green). We define the spine head width as the FWHM from a gaussian fit of intensity profiles perpendicular to the spine neck. We measured, at each step, the peak intensity profiles (black arrows) and found an intensity increase of +16% after AF and +24% after AIO ($n = 25$ spines). (b) ANOVA test on 67 FWHM measurements made on dendritic spines. For each set of data, averaged value and associated standard deviation are indicated as black horizontal lines and color error bars. AF decreases by $0.069 \mu\text{m} \pm 0.011 \mu\text{m}$ on average, and 3N+ by $0.024 \mu\text{m} \pm 0.005 \mu\text{m}$. with ANOVA test respective significance threshold below 0.0001 and equal to 0.0002. After AIO, the average size of dendritic spines at the surface (red dashed line) is restored.

test also indicate significant difference of $0.069 \mu\text{m} \pm 0.011 \mu\text{m}$ on average between the start and the AF ($p < 0.0001$), and $0.024 \mu\text{m} \pm 0.005 \mu\text{m}$ between AF and 3N+ ($p = 0.0002$), and $0.093 \mu\text{m} \pm 0.011 \mu\text{m}$ between the beginning of experiment and the last correction ($p < 0.0001$).

The results of this ANOVA test show a significant reduction of the dimension of this submicrometric neuronal structure thanks to the resolution enhancement in depth provided by the AIO process. Both AF and 3N+ provide significant improvements although the correction power of 3N+ is less compared to AF, probably due to low aberrations quantity at this depth. Overall, we conclude that AIO greatly improves the accuracy of morphological representations of fine structures in depth of biological samples.

3.5. AOI and deconvolution process

Deconvolution is a post-treatment widely used in microscopy to decrease the noise and increase the resolution and contrast of acquired images. The principle of deconvolution is based on the fact that the acquired image is the convolution of the original sample 3D information by the PSF of the microscope. Any deconvolution algorithm requires an accurate PSF (or the Fourier domain OTF) that can be either computed from theoretical formulas or measured in situ. If the PSF is erroneous, the deconvolution result is necessarily artefactual. This is the case if an aberrated image is deconvolved with a PSF measured in a non-aberrating condition. In LLSM we typically measure the microscope PSF by imaging a small fluorescent bead on a cover slip surface. Deconvolution of images acquired in depth inside biological samples is likely to show poor quality if one uses the surface PSF. To enhance the deconvolution, a solution is to correct aberrations before the image acquisition.

The deconvolution on raw and aberration corrected images was tested on astrocytes expressing cytosolic GFP in a fixed organotypic mouse brain slice (Fig. 6.a., Supplementary Note 3 for

sample preparation) and living *Arabidopsis* root microtubules tagged to tagRFP (Fig. 6.b and 6.d, Supplementary Note 4). Although LLSM microscopy provides high-content information at the surface of the sample, it is impossible with conventional LLSM to observe structures in depth. As a result, biological studies on astrocytic fine processes and microtubules arrangement in *Arabidopsis* roots [44] are constrained to the surface. In order to show that it is possible to extend the LLSM imaging volume on these sample, we used our method on structures at ~ 15 μm depth for these two samples.

Deconvolution is based on a Richardson-Lucy algorithm as described in the original LLSM article [3] (Supplementary Note 7).

Each step of our optimization process is illustrated with MIP of 30 planes (26.24×26.24 μm in XY) in Fig. 6(a) Astrocyte fine processes, not visible in raw image, appear thanks to contrast increase after the AIO on non-deconvolved data (“No AIO” and “AIO” images in Fig. 6(a)). After deconvolution, resolution is further enhanced, whereas some structures are not well resolved without AIO (comparison of “No AIO + deconv.” and “AIO + deconv.” images). It is particularly visible in zoom regions 1 and 2, where deconvolution induces artifacts of reconstruction without aberration correction. In region 1, astrocyte processes are separated after AIO (“AIO” and “AIO + deconv.” of zoom 1 images) compared to blurred structures without AO (“No AIO” and “No AIO + deconv.” of zoom 1 images). Structures from region 2 are divided in three filaments with AIO (“AIO” and “AIO + deconv.” of zoom 2 images) where the two filaments at the bottom are confounded in background noise without optimization (“No AIO” and “No AIO + deconv.” of zoom 2 images). AF and 3N+ allows to show more accurate structures even without deconvolution.

In *Arabidopsis* roots, microtubules create highly organized meshes at the cell periphery and have a role in cell division, expansion and morphogenesis. We illustrate this structure along two views: (1) a middle section of a cell where microtubules grow perpendicular to the image plane (Fig. 6(b)) and (2) a surface section of one cell where microtubule run parallel to the image plane (Fig. 6(d)). Without AIO correction, we hardly resolve any structures (“No AIO” in Fig. 6(b), 6(d) and grey dotted lines in top charts of Fig. 6(c) and 6(e)). Deconvolution alone does not allow to recover these filaments (“No AIO + deconv.” Fig. 6(b) and Fig. 6(d)) and intensity peaks remain near the background noise (grey dashed lines in top chart of Fig. 6(c) and 6(e)). Thanks to AIO correction, we start observing filaments structures (“AIO” images from Fig. 6(b) and 6(d)) illustrated by high peak intensities compared to background (blue lines in top charts of Fig. 6(c) and 6(e)). Deconvolution enhances resolution, initiated by the AIO process with well resolved structures (“AIO + deconv.” in Fig. 6(b) and 6(d)) and peak intensities increasing by $\sim 30\%$ for microtubules filaments viewed perpendicularly compared to deconvolution without optimization (Fig. 6(c), bottom) and by $\sim 40\%$ for parallel microtubules (Fig. 6(e) bottom).

We note that nuclei are also labelled in this *Arabidopsis* root sample (Fig. 6.b) because the plant express tubulin above the endogenous level. Not all tubulin could be incorporated into microtubule arrays and free tubulin would be seen in the cytosol and nuclear.

We also wanted to determine the relative gain due to AF alone Vs full AIO on deconvolved images (Supplementary Fig. S5). For the astrocyte sample presented in Fig. 6 the 3N+ step did not significantly improve the image quality, most likely because we are imaging at very shallow depth that does not induce significant optical aberrations. However, regarding the *Arabidopsis* root, 3N+ clearly improves the image resolution compared to AF alone, as illustrated by the microtubule structures that are better defined. We believe that this sample induced stronger aberrations than brain slice due to its curved surface.

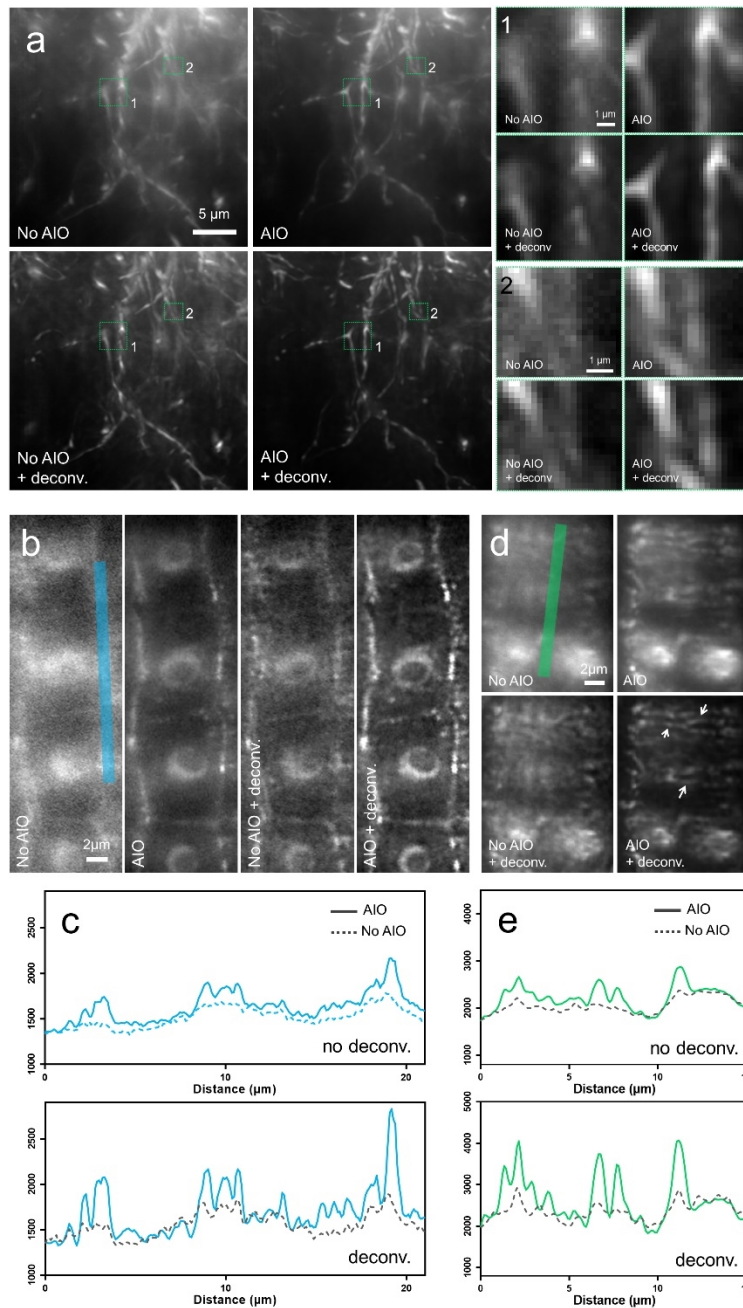


Fig. 6. Correction of aberrations with AIO before deconvolution provides significant artifact reduction as well as resolution and signal enhancement. (a) MIPs of 30 planes in an astrocyte expressing GFP at approximately 15 μm in depth, in four conditions: raw data ("No AIO"), data after AIO ("AIO"), raw data deconvolved ("No AIO + deconv.") and AIO data deconvolved ("AIO + deconv."). Regions 1 and 2 are zoomed for each condition in right panel. (b) 2D slice in the center of Arabidopsis root cells around 15 μm in depth, with microtubules labeled with tagRFP, corresponding to the second layer after the epidermis. (c) Intensity profile (blue line in b.), in "no deconv." and "deconv." cases. AIO highlights microtubules which surrounded cells and enhances the deconvolution process. (d) MIPs on top of Arabidopsis root cell to image subcortical microtubules filaments around 15 μm in depth. Profiles along the cell (green line) show resolution increase in (e) on the corresponding intensity profiles. Deconvolution with AIO highlights microtubules filaments (white arrows in d).

4. Discussion and conclusions

We developed an AIO process for LLSM that significantly improves image quality in depth in thick samples. Here a “thick” sample corresponds to any biological specimen for which the illumination or detection optical pathways are altered compared to a straight light propagation and that induce a noticeable reduction of image resolution and intensity. Our optimization process is based on merit factors from images acquired by the detection camera, and does not require to measure the WF emitted by a fluorescent point source within the sample. Our AIO is divided in two consecutive steps, AF and 3N+ that are both required. AF corrects the light-sheet position in less than 20 seconds and 3N+ strongly decreases the optical aberrations in another 20 seconds (2 iterations) from astigmatism to trefoil with a global residual WF error around 20 nm RMS (Fig. 4(d)). We apply first AF, then 3N+, the 3N+ process benefiting from the increase of signal brought by the AF process. Indeed, it has been recently demonstrated in an adaptive LSFM setup that the sequence of optimizing the illumination followed by correcting aberrations of the detection path provides an optimal image enhancement, as compared to the opposite sequence [45]. Despite this method takes more time than direct WF correction [19,18], it avoids the use source points – beads or artificial guide stars - and a deviation path for a WFS. Thus, the sample preparation is facilitated (no fiducials required), and the system is more light-efficient. Additionally, the cost and complexity of our approach is reduced compared to other aberration correction systems that require an expensive NIR fs pulsed laser to generate an artificial guide star and a WFS. Our method is applicable to any LLSM, but could be easily adapted to other LSFM detection path at a reasonable cost.

In this work, we have tested low level merit factors for the 3N+: intensity and Fourier domain ring integration. However, complex merit factors in terms of filtering process or spectral content probed, might further increase the 3N+ efficacy, especially on samples with a different spectral content as compared to the dendrites presented in Fig. 3 and 4. An example could be one of the spectral image quality metrics defined by Royer et al. [46] and, in particular, the normalized Discrete Cosine Transform Shannon entropy (DCTS). Indeed, DCTS was identified as the optimum image quality metric for light-sheet microscopy with excellent separation of signal and noise to reveal the useful content of the image.

It should be noted that we did not study the effect of the image SNR on the convergence of the AIO process. Our results are obtained with typical signals of 350 photons/pixels integrated over 300-1000 pixels/image. A future study is required to determine the minimum SNR to reach satisfactory aberration correction based on our AIO method. As a first order of magnitude, [26] showed that typically 2000 photons per mode and per iteration are sufficient to reach a Strehl ratio above 0.9. Even if we do not expect a significantly different result regarding the 3N+ process, it could be interesting to study the minimum SNR required for accurate AF. Likely, we should determine a compromise between SNR, efficient correction, convergence speed and photobleaching.

Also, we decided to correct only the axial defocus of the light-sheet in the excitation path. Royer et al. [46,47] developed a very thorough automatic procedure based on the SIMView microscope to compensate any axial, lateral or angular mismatch between light-sheet and detection focal plane. This light sheet re-alignment is performed automatically thanks to several motorized opto-mechanical devices. However, in the case of LLSM, Liu et al. showed that, in most samples, the light sheet pitch angle generates a negligible defocus within the small LLSM FOV (see [41] Supplementary Fig. S3.). Therefore, we decided to implement a basic axial light sheet refocusing method and our results show that, in our experimental conditions, this simple AF approach is sufficient to significantly improve image quality (see “before AF” and “After AF” in Fig. 5(b)). Furthermore, our approach does not compensate for optical aberrations in the illumination path other than axial defocus. It could be achieved for example by adjusting the WF with a SLM

in the light sheet path as in [41]. This option would likely provide even higher image quality improvement in depth.

We have also observed that the image resolution and contrast is greatly improved by the AF, whereas the additional gain provided by the 3N+ process is often comparatively smaller. This is likely due to the fact that the samples were imaged at shallow depth, where optical aberrations are small and mostly created by the minor mismatch between the sample and immersion medium indices of refractions. Still, the resolution improvement provided by the 3N+ process is illustrated by the spine head size reduction (Fig. 5(b), “After AF + 3N+”) and in the image of the Arabidopsis root presented in Fig S5. Further studies on more aberrating samples such as zebrafish embryo could help to better determine the relative gain of AF and 3N+ steps.

Even if our AO detection path method offers several advantages, the aberration correction is not optimal when compared to closed-loop correction [41]. The integration of extended source WFS [22,23] and double labelling in our method could be a relevant next step to improve the performance of AO correction, still avoiding the requirement of a point source in the sample, and minimizing photon loss for structures of interest.

We optimized AF and 3N+ parameters and demonstrated that the loss of spatial resolution when imaging in depth in thick samples can be almost canceled by AIO, as illustrated by the measurement of dendritic spine head widths at 40 μm (Fig. 5). Further studies are required to determine the maximum depth up to which AIO provides a significant resolution improvement. This value is clearly sample dependent and is ultimately limited by light scattering. Extending the imaging depth for LLSM in thick samples is critical for many biological studies. For example, in acute brain slices, which are a very common integrated model for neuroscientists, the cells at the surface are damaged during the sectioning process. Hence it is essential to study cells at depth greater than 20 μm . This is now possible thanks to the high-resolution imaging provided by the combination of LLSM and our AIO process.

We also showed that the accuracy of the 3D deconvolution of LLSM data is strongly affected by sample aberrations (Fig. 6). Without AIO the deconvolution results seem to be improved compared to before deconvolution, but are actually prone to artifacts. On the other hand, AIO followed by deconvolution allows to observe fine submicrometric details inside brain slices or Arabidopsis roots. Deconvolution is a critical step for 3D structural imaging it is thus essential that the deconvolution process can be trusted. Our approach could also be used for SMLM. The combination of LLSM and SMLM has been demonstrated by [48]. Any loss of resolution due to aberrations would reduce the number and localization precision of single molecules. As demonstrated by [31], AO strategies can significantly improve the output of SMLM algorithms. Furthermore, AO can be used to increase the Z localization precision in super resolution by adding a controlled amount of astigmatism [49]. Therefore, the combination of LLSM and AO opens the way for efficient 3D super resolution microscopy inside thick samples.

Funding. Conseil Régional Aquitaine (AAPPF2020I-2019-8336710); Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (programme plateformes 2015 - 2015-7); Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (CIFRE PhD funding 2020/0147); Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Crédit Equipement 2020 EQT-313831); H2020 European Research Council (772103-BRIDGING); European Research Council (ADOS 339541, Dyn-Syn-Mem 787340).

Acknowledgments. We thank Mathieu Letellier for kind preparation and sharing of organotypic hippocampal brain slices as well as fruitful discussions. We thank Monica Fernandez Monreal, Magali Mondin, Fabrice Cordeliere, Sebastien Marais, Jérémie Teillon and Christel Poujol all engineers at the Bordeaux Imaging Center (BIC) for their scientific technical and communication advices. Also, we wish to thank Stephanie Lalet, administrative manager of the BIC, for her constant fast and efficient support in all projects of the BIC. Also, we are grateful to Gregory Clouvel, former Imagine Optic engineer, who participated in the optical design of the detection path. We thank the Howard Hughes Medical Institute, Janelia Research Campus for providing all the technical information to reproduce the lattice light sheet microscope upon signature of a research license agreement.

Disclosures. MM, FH, CV, JL: Imagine Optic (E)

Data availability. Data underlying the results presented in this paper are not publicly available at this time but may be obtained from authors upon reasonable request.

Supplemental document. See [Supplement 1](#) for supporting content.

References

1. E. H. K. Stelzer, "Light sheet fluorescence microscopy for quantitative biology," *Nat. Methods* **12**(1), 23–26 (2015).
2. O. E. Olarte, J. Andilla, E. J. Gualda, and P. Loza-Alvarez, "Light-sheet microscopy: a tutorial," *Adv. Opt. Photonics* **10**(1), 111 (2018).
3. B. C. Chen, W. R. Legant, K. Wang, L. Shao, D. E. Milkie, M. W. Davidson, C. Janetopoulos, X. S. Wu, J. A. Hammer, Z. Liu, B. P. English, Y. Mimori-Kiyosue, D. P. Romero, A. T. Ritter, J. Lippincott-Schwartz, L. Fritz-Laylin, R. D. Mullins, D. M. Mitchell, J. N. Bembek, A. C. Reymann, R. Böhme, S. W. Grill, J. T. Wang, G. Seydoux, U. S. Tulu, D. P. Kiehart, and E. Betzig, "Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution," *Science* **346**(6208), 1257998 (2014).
4. F. Aguet, S. Upadhyayula, R. Gaudin, Y. Y. Chou, E. Cocucci, K. He, B. C. Chen, K. Mosaliganti, M. Pasham, W. Skillern, W. R. Legant, T. L. Liu, G. Findlay, E. Marino, G. Danuser, S. Megason, E. Betzig, and T. Kirchhausen, "Membrane dynamics of dividing cells imaged by lattice light-sheet microscopy," *Mol. Biol. Cell* **27**(22), 3418–3435 (2016).
5. N. Yamashita, M. Morita, W. R. Legant, B.-C. Chen, E. Betzig, H. Yokota, and Y. Mimori-Kiyosue, "Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus," *J. Biomed. Opt.* **20**(10), 101206 (2015).
6. Z. Liu, W. R. Legant, B. Chen, L. Li, J. B. Grimm, L. D. Lavis, E. Betzig, and R. Tjian, "3D imaging of Sox2 enhancer clusters in embryonic stem cells," 1–29 (2014).
7. A. M. Valm, S. Cohen, W. R. Legant, J. Melunis, U. Hershberg, E. Wait, A. R. Cohen, M. W. Davidson, E. Betzig, and J. Lippincott-Schwartz, "Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome," *Nature* **546**(7656), 162–167 (2017).
8. N. D. Condon, J. M. Heddleston, T. L. Chew, L. Luo, P. S. McPherson, M. S. Ioannou, L. Hodgson, J. L. Stow, and A. A. Wall, "Macropinosome formation by tent pole ruffling in macrophages," *J. Cell Biol.* **217**(11), 3873–3885 (2018).
9. A. T. Ritter, Y. Asano, J. C. Stinchcombe, N. M. G. Dieckmann, B. C. Chen, C. Gawden-Bone, S. van Engelenburg, W. Legant, L. Gao, M. W. Davidson, E. Betzig, J. Lippincott-Schwartz, and G. M. Griffiths, "Actin depletion initiates events leading to granule secretion at the immunological synapse," *Immunity* **42**(5), 864–876 (2015).
10. L. B. Crowe, P. F. Hughes, D. A. Alcorta, T. Osada, A. P. Smith, J. Totzke, D. R. Loiselle, I. D. Lutz, M. Gargsha, D. Roy, J. Roques, D. Darr, H. K. Lyerly, N. L. Spector, and T. A. J. Haystead, "A fluorescent Hsp90 probe demonstrates the unique association between extracellular Hsp90 and malignancy in vivo," *ACS Chem. Biol.* **12**(4), 1047–1055 (2017).
11. Y. Xiao, A. Faucherre, L. Pola-Morell, J. M. Heddleston, T.-L. Liu, T.-L. Chew, F. Sato, A. Sehara-Fujisawa, K. Kawakami, and H. Lopez-Schier, "High-resolution live imaging reveals axon-glia interactions during peripheral nerve injury and repair in zebrafish," *Dis. Model. Mech.* **8**(6), 553–564 (2015).
12. N. Trivedi, D. R. Stabley, B. Cain, D. Howell, C. Laumonnerie, J. S. Ramahi, J. Temirov, R. A. Kerekes, P. R. Gordon-Weeks, and D. J. Solecki, "Drebrin-mediated microtubule-actomyosin coupling steers cerebellar granule neuron nucleokinesis and migration pathway selection," *Nat. Commun.* **8**(1), 14484 (2017).
13. M. Ducros, A. Getz, M. Arizono, V. Pecoraro, M. Fernandez Monreal, M. Letellier, V. Nägerl, and D. Choquet, "Lattice light sheet microscopy and photo-stimulation in brain slices," *SPIE BiOS* **8**, 8 (2019).
14. A. M. Getz, M. Ducros, C. Breillat, A. Lampin-saint-amaux, S. Daburon, U. François, A. Nowacka, M. Fernández-monreal, E. Hosity, F. Lanore, H. L. Zieger, M. Sainlos, Y. Humeau, and D. Choquet, "High-resolution imaging and manipulation of endogenous AMPA receptor surface mobility during synaptic plasticity and learning," *Sci. Adv.* **8**(30), 5298 (2022).
15. M. Schwertner, M. J. Booth, M. A. A. Neil, and T. Wilson, "Measurement of specimen-induced aberrations of biological samples using phase stepping interferometry," *J. Microsc.* **213**(1), 11–19 (2004).
16. M. Schwertner, M. J. Booth, and T. Wilson, "Characterizing specimen induced aberrations for high NA adaptive optical microscopy," *Opt. Express* **12**(26), 6540 (2004).
17. M. J. Booth, "Adaptive optics in microscopy," *Philos. Trans. R. Soc., A* **365**(1861), 2829–2843 (2007).
18. N. Ji, "Adaptive optical fluorescence microscopy," *Nat. Methods* **14**(4), 374–380 (2017).
19. M. J. Booth, "Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image," *Light: Sci. Appl.* **3**(4), e165 (2014).
20. 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," *Opt. Express* **18**(16), 17521 (2010).
21. R. Aviles-Espinosa, J. Andilla, R. Porcar-Guezenc, O. E. Olarte, M. Nieto, X. Levecq, D. Artigas, and P. Loza-Alvarez, "Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy," *Biomed. Opt. Express* **2**(11), 3135 (2011).
22. A. Hubert, F. Harms, R. Juvénal, P. Treimany, X. Levecq, V. Lorette, G. Farkouh, F. Rouyer, and A. Fragola, "Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star," *Opt. Lett.* **44**(10), 2514 (2019).

23. S. Imperato, F. Harms, A. Hubert, M. Mercier, L. Bourdieu, and A. Fragola, "Single-shot quantitative aberration and scattering length measurements in mouse brain tissues using an extended-source Shack-Hartmann wavefront sensor," *Opt. Express* **30**(9), 15250 (2022).
24. B. M. Hanser, M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, and J. W. Sedat, "Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy," *J. Microsc.* **216**(1), 32–48 (2004).
25. M. J. Booth, M. A. A. Neil, R. Juškaitis, and T. Wilson, "Adaptive aberration correction in a confocal microscope," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**(9), 5788–5792 (2002).
26. A. Facomprez, E. Beaupaire, and D. Débarre, "Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics," *Opt. Express* **20**(3), 2598 (2012).
27. D. Débarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson, "Image-based adaptive optics for two-photon microscopy," *Opt. Lett.* **34**(16), 2495–2497 (2009).
28. J. Zeng, P. Mahou, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaupaire, and D. Débarre, "3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues," *Biomed. Opt. Express* **3**(8), 1898 (2012).
29. N. Olivier, D. Débarre, and E. Beaupaire, "Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy," *Opt. Lett.* **34**(20), 3145–3147 (2009).
30. D. Debarre, M. J. Booth, and T. Wilson, "Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies," *Opt. Express* **15**(13), 8176 (2007).
31. M. E. Siemons, N. A. K. Hanemaaijer, M. H. P. Kole, and L. C. Kapitein, "Robust adaptive optics for localization microscopy deep in complex tissue," *Nat. Commun.* **12**(1), 3407 (2021).
32. D. Burke, B. Patton, F. Huang, J. Bewersdorf, and M. J. Booth, "Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy," *Optica* **2**(2), 177 (2015).
33. L. Streich, J. C. Boffi, L. Wang, K. Alhalaseh, M. Barbieri, R. Rehm, S. Deivasigamani, C. T. Gross, A. Agarwal, and R. Prevedel, "High-resolution structural and functional deep brain imaging using adaptive optics three-photon microscopy," *Nat. Methods* **18**(10), 1253–1258 (2021).
34. M. J. Mlodzianoski, P. J. Cheng-Hathaway, S. M. Bemiller, T. J. McCray, S. Liu, D. A. Miller, B. T. Lamb, G. E. Landreth, and F. Huang, "Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections," *Nat. Methods* **15**(8), 583–586 (2018).
35. L. Sherman, J. Y. Ye, O. Albert, and T. B. Norris, "Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror," *J. Microsc.* **206**(1), 65–71 (2002).
36. K. F. Tehrani, J. Xu, Y. Zhang, P. Shen, and P. Kner, "Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) using a genetic algorithm," *Opt. Express* **23**(10), 13677 (2015).
37. A. J. Wright, D. Burns, B. A. Patterson, S. P. Poland, G. J. Valentine, and J. M. Girkin, "Exploration of the optimisation algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy," *Microsc. Res. Tech.* **67**(1), 36–44 (2005).
38. N. Ji, D. E. Milkie, and E. Betzig, "Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues," *Nat. Methods* **7**(2), 141–147 (2010).
39. R. Jorand, G. Le Corre, J. Andilla, A. Maandhui, C. Frongia, V. Lobjois, B. Ducommun, and C. Lorenzo, "Deep and clear optical imaging of thick inhomogeneous samples," *PLoS One* **7**(4), e35795 (2012).
40. A. Masson, P. Escande, C. Frongia, G. Clouvel, B. Ducommun, and C. Lorenzo, "High-resolution in-depth imaging of optically cleared thick samples using an adaptive SPIM," *Nat. Publ. Gr.* 1–14 (n.d.).
41. 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. Kohrman, T. N. Medwig, D. Dambournet, 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, "Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms," *Science* **360**(6386), eaaq1392 (2018).
42. J. Schöneberg, D. Dambournet, T. L. Liu, R. Forster, D. Hockemeyer, E. Betzig, and D. G. Drubin, "4D cell biology: big data image analytics and lattice light-sheet imaging reveal dynamics of clathrin-mediated endocytosis in stem cell-derived intestinal organoids," *Mol. Biol. Cell* **29**(24), 2959–2968 (2018).
43. V. Lakshminarayanan and A. Fleck, "Zernike polynomials: A guide," *J. Mod. Opt.* **58**(7), 545–561 (2011).
44. A. Maizel, D. Von Wangenheim, F. Federici, J. Haseloff, and E. H. K. Stelzer, "High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy," *Plant J.* **68**(2), 377–385 (2011).
45. M. R. Rai, C. Li, and A. Greenbaum, "Quantitative analysis of illumination and detection corrections in adaptive light sheet fluorescence microscopy," *Biomed. Opt. Express* **13**(5), 2960 (2022).
46. L. A. Royer, W. C. Lemon, R. K. Chhetri, Y. Wan, M. Coleman, E. W. Myers, and P. J. Keller, "Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms," *Nat. Biotechnol.* **34**(12), 1267–1278 (2016).
47. L. A. Royer, W. C. Lemon, R. K. Chhetri, and P. J. Keller, "A practical guide to adaptive light-sheet microscopy," *Nat. Protoc.* **13**(11), 2462–2500 (2018).
48. W. R. Legant, L. Shao, J. B. Grimm, T. A. Brown, D. E. Milkie, B. B. Avants, L. D. Lavis, and E. Betzig, "High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes," *Nat. Methods* **13**(4), 359–365 (2016).
49. I. Izeddin, M. El Beheiry, J. Andilla, D. Ciepielewski, X. Darzacq, and M. Dahan, "PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking," *Opt. Express* **20**(5), 4957 (2012).

4.4. Discussions et perspectives

Bien que les échantillons testés au cours de ces expériences aient une épaisseur allant d'environ 100 μm pour les tranches de cerveaux et de 300 μm pour les racines d'*Arabidopsis*, la correction et l'imagerie n'ont été réalisées qu'au maximum à 50-60 μm en profondeur sous la surface. Cela s'explique par deux phénomènes. (1) Dans le cas des tranches de cerveaux organotypiques observés, les prolongements neuronaux ne plongeaient que très rarement au-delà de 40 μm . Une solution pourrait être de tester l'AIO sur des tranches de cerveaux plus homogènes en profondeur. D'autre part, une application de l'AIO sur des tranches aigües serait potentiellement très bénéfique. En effet, la couche superficielle (0-30 μm) des tranches aigües comporte beaucoup de débris et de cellules mortes à cause du processus de coupe, et engendre très probablement plus d'aberrations optiques, que sur les tranches organotypiques. La correction des aberrations pourrait permettre d'améliorer grandement la qualité d'imagerie à des profondeurs ~ 50 μm , là où les cellules sont saines. (2) La forte inhomogénéité de certains échantillons entraîne une diffusion importante qui dégrade à la fois les faisceaux d'excitation et de fluorescence sur des distances de l'ordre de 20-50 μm (équivalent $\mu\text{s} = 200\text{-}500$ cm^{-1}). Dans le cas de l'excitation, la LS se retrouve de plus en plus déformée et perd en intensité le long de son axe optique, avec l'épaisseur d'échantillon à traverser. Pour la détection, la fluorescence collectée contient une part de plus en plus importante de photons diffus pour lesquels le principe de correction d'aberration est inopérant. Toutefois, s'il est clair que l'AIO (comme toute méthode d'AO) ne peut pas compenser les effets de la diffusion, il semble impossible de déterminer a priori la limite d'efficacité de l'AIO en fonction du type d'échantillon et de la profondeur visée, ni de distinguer les bénéfices respectifs de l'AF et du 3N+. Une idée pourrait être de décorréler chacune des deux optimisations sur des échantillons plus ou moins diffusants.

Notre méthode d'AF consiste à recaler axialement le plan d'illumination sur le plan focal de l'objectif de détection. Même si la focalisation du plan d'illumination est primordiale, cette méthode ne correspond en fait qu'à une correction très partielle. Pour une illumination parfaitement corrigée, il faudrait compenser les autres déviations translationnelles et rotationnelles autour du plan d'imagerie, comme proposé dans l'article de Royer et al. en 2016 [144]. Une solution pourrait être d'affiner et d'automatiser le réglage des degrés de liberté contrôlant l'entrée du faisceau d'excitation dans l'objectif. Ces réglages sont effectués manuellement lors de l'alignement du système, mais en fonction de l'échantillon et des conditions d'imagerie, des déviations peuvent avoir lieu. Une seconde solution, moins contraignante et démontrée par Liu et al. en LLSM [35], pourrait être d'utiliser le SLM pour corriger les aberrations optiques à l'excitation.

Cet article présente un protocole de recherche des paramètres du 3N+ pour un type d'échantillon donné, et démontre l'efficacité de la méthode avec les entrées sélectionnées. En fonction du type d'échantillon, de l'application, du niveau de performance et de la rapidité souhaitée, ces paramètres doivent être ajustés. C'est

particulièrement le cas pour un échantillon présentant des structures plus uniforme ou dispersée spatialement. Les fréquences des images mises en jeu seront différentes et les diamètres interne et externe de l'anneau fréquentiel utilisé pour la métrique devront être ajustés. Des métriques, plus complexes qu'un passe-bande [143], [144], peuvent également être utilisées pour maximiser la sensibilité de réponse. De la même façon, pour la structure observée, l'influence du SNR n'a pas été étudiée. Il a été choisi de tester le 3N+ sur des niveaux d'intensité (350 photons/pixels en moyenne) et de bruit standards (100 photons/pixels en moyenne) pour ce type d'échantillon étudié sur le microscope LLSM du BIC. En considérant que le signal des structures est intégré sur 300-1000 pixels/image, notre correction se retrouve dans les limites de condition de photon définies par Facomprez et al. [139]. Dans cet article, il est indiqué qu'au minimum 2000 photons/mode/itération sont nécessaires pour obtenir un « Strehl ratio » supérieur à 0,9 et correspondant à une correction efficace. Pour un échantillon peu brillant, il sera intéressant de tester l'AIO (avec les paramètres appropriés), pour connaître la limite de photons nécessaires pour une correction efficace.

Dans cet article, l'efficacité de l'AIO est prouvée dans le cadre d'imagerie 2D. La correction s'applique sur des FOV allant d'environ $12 \times 12 \mu\text{m}^2$ (imagerie des dendrites, 128×128 pixels) à $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ (imagerie de l'astrocyte, 256×256 pixels). La zone isoplanatique, correspondant au volume où les aberrations mesurées sont considérées uniformes, a été empiriquement déterminée comme un volume de 30-60 μm de côté [35], [161]. Bien que l'AIO est appliquée dans ces limites se pose la question de la correction dans le cadre de l'acquisition 3D. Cette limite théorique impose donc de réfléchir à une correction adaptative en fonction du déplacement au sein de l'échantillon. Une solution consiste à décomposer le volume de l'échantillon en sous-volumes supposés isoplanatiques, et de calculer en amont les formes de DM pour corriger les aberrations dans ces sous-régions comme dans [35]. La mise à jour de la correction est aussi potentiellement nécessaire dans le cadre de l'imagerie du vivant. Les modifications structurelles et/ou de composition peuvent modifier les formes ou les indices de réfraction en fonction du type d'échantillon. C'est par exemple ce que nous avons observé lors de l'imagerie des racines d'Arabidopsis vivantes sur un temps > 10 mn environ. Pour l'imagerie 2D+t ou 3D+t, la problématique du temps de correction rentre aussi en compte. Comme démontré dans l'article, l'AIO complète (1x « AF » + 3x « 3N+ ») prend en moyenne 40 s. Il est important de s'assurer que les variations d'aberrations ne soient pas plus rapides que la correction globale. Sinon, les paramètres appliqués ne seront plus effectifs à la fin de correction. Pour assurer l'efficacité et la robustesse de la correction (1) dans le temps et (2) quel que soit la zone d'imagerie, une automatisation de processus devra être mise en place. Cette automatisation pourra par exemple permettre d'appliquer des corrections préenregistrées en fonction de la position, mais aussi de réitérer une correction.

Enfin, l'intérêt de l'AO pour la déconvolution ouvre une perspective intéressante pour l'imagerie super-résolue en profondeur. Dans le cadre de l'article, la correction des aberrations permet de restaurer l'image convoluée, avant

d'appliquer le processus mathématique inverse. En SMLM, le processus de reconstruction s'appuie sur la détection et la localisation de molécules uniques, pouvant être considéré comme des PSF. En supprimant les aberrations, et donc en corrigeant la distribution de photons pour chaque PSF, plus de détections sont prises en compte et leurs localisations sont améliorées.

5. Imagerie d'échantillons en super-résolution

L'objectif principal de ce projet de thèse est d'offrir à la communauté scientifique, et en particulier aux utilisateurs du BIC, un système capable d'imager des structures super-résolues au sein d'échantillons épais.

L'implémentation simple et peu coûteuse de l'AIO sur le LLSM tend à répondre à la problématique de l'imagerie en profondeur, en appliquant une correction des aberrations à l'excitation et à la détection, tout en (1) ne modifiant pas la préparation d'échantillons (pas de billes fluorescentes), (2) préservant l'ensemble du budget photon de fluorescence, (3) intégrant un protocole de correction paramétrable capable de s'adapter aux types de structures imagées et à la quantité d'aberrations. Cette approche a été validée en résolution limitée par diffraction (cf. Chapitre 3). Cependant, il convient de prendre en compte plusieurs points pour appliquer notre méthode à la SMLM :

- i. Le choix du protocole SMLM dicte le type de marquage, les conditions d'imageries ainsi que les propriétés photo-physiques du scintillement. Dans le cadre de nos expériences sur échantillons épais, il est nécessaire de choisir une technique SMLM qui s'adapte (1) aux échantillons sélectionnés pour l'étude et (2) à l'instrumentation offerte par le LLSM.
- ii. Comme vu dans l'état de l'art, l'imagerie SMLM requiert plusieurs milliers d'images pour reconstruire un plan 2D. Cela rend les acquisitions SMLM particulièrement sensible à la dérive de l'échantillon. Une méthode de correction de dérive, en pré et/ou en post-traitement, doit être envisagée.
- iii. L'AIO, et en particulier le 3N+, a été testé sur des images limitées par diffraction. Typiquement ces images contiennent plus de basses fréquences spatiales qu'en SMLM, où le signal est un scintillement de points lumineux sur un bruit de fond limité, contenant des fréquences plus proches de la fréquence de coupure du microscope. De plus, ce scintillement varie tout au long de l'acquisition et donc durant la correction. Les algorithmes et leurs entrées (choix de la métrique par exemple) doivent être adaptés à ce type de signal.
- iv. Enfin, après avoir démontré la faisabilité de la méthode SMLM sur les échantillons choisis, il sera nécessaire de démontrer comment les

aberrations optiques dégradent le signal SMLM en profondeur. En ce sens, une analyse quantitative des paramètres de sortie (nombre de détections, précision de localisation) des reconstructions SMLM sera faite.

Cette partie consiste donc à décrire l'étude de l'AIO en SMLM en LLSM. Premièrement, nous détaillerons le choix du DNA-PAINT, des tranches de cerveaux fixées comme échantillon et des spécificités de la méthode comparées au travail en régime limité par diffraction (cf. Chapitre 3) [101]. Ensuite, nous présenterons les premiers résultats obtenus sur ces échantillons. Enfin nous discuterons des résultats.

5.1. Méthode

5.1.1. Choix de la technique DNA-PAINT

Pour tester la SMLM au sein en LLSM, le choix s'est porté sur la technique DNA-PAINT. En plus, d'avoir déjà été testé en LLSM [39] elle offre de nombreux avantages :

- i. En règle générale, l'utilisation du PALM demande des constructions de biologie moléculaire complexes pour exprimer les protéines photo-convertibles. Ainsi, il est plus difficile de trouver une architecture de marquage qui valide l'imagerie de la structure d'intérêt. De plus, ces protéines sont moins brillantes et plus sensibles au photoblanchiment.
- ii. En dSTORM, l'utilisation d'un tampon et d'une enceinte imperméable à l'oxygène est recommandée pour éviter l'oxydation des fluorophores et assurer une stabilité du scintillement. Or, l'architecture du microscope n'offre pas une solution simple pour éviter l'entrée d'oxygène. Le DNA-PAINT ne demande que l'utilisation d'une solution saline.
- iii. Le DNA-PAINT offre un niveau de signal fort, de par l'utilisation de fluorophores très brillants et des temps d'exposition plus longs. Cela facilite la détection des molécules individuelles en profondeur.
- iv. La microscopie DNA-PAINT permet de marquer simultanément plusieurs cibles avec différentes séquences d'ADN et des fluorophores distincts. Cela facilite l'imagerie multicolore, c'est-à-dire l'imagerie de plusieurs cibles en même temps.

Dans cette étude, les échantillons sélectionnés sont des tranches de cerveaux fixées. Une question importante s'est posée autour de la pénétration des brins imageurs au sein de ces échantillons épais.

5.1.2. Choix du marquage de l'échantillon

Les échantillons imagés dans cette étude sont des tranches de cerveaux organotypiques fixées (Figure 28). Elles proviennent de souris « wild type » qui ont subi une injection de virus pour une expression exogène d'une GFP soluble sur une population clairsemée de neurones. Le marquage pour le DNA-PAINT consiste en la fixation de « nanobodies » anti-GFP (sdGFP) comprenant un brin d'amarrage « dock 3 ». L'imager est le fluorophore Cy3B lié à un brin d'ADN « dock 3 ».

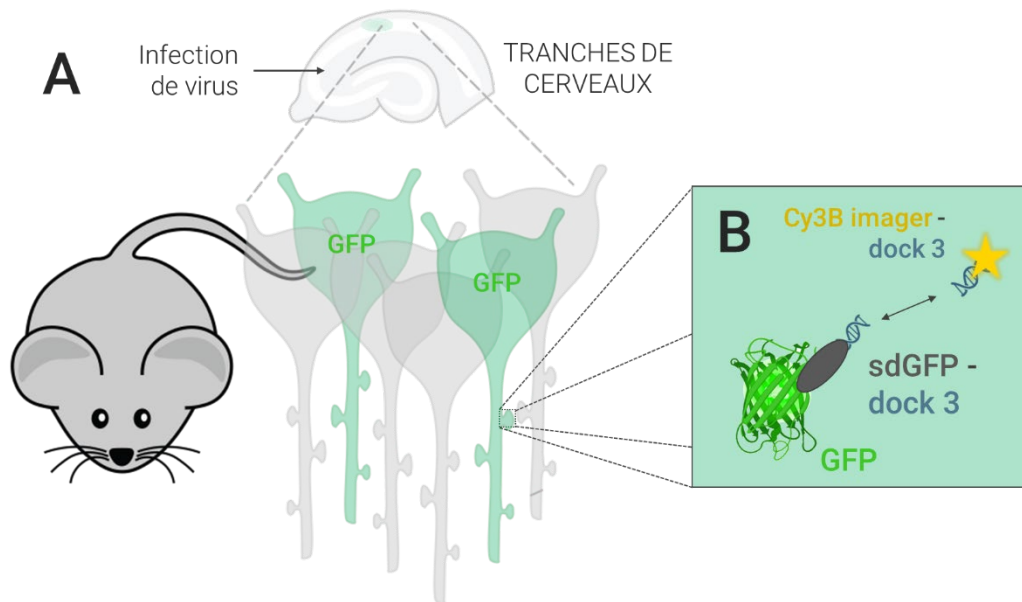


Figure 28 : **A** : Infection virale sur des tranches de cerveau organotypiques de souris de type sauvage pour exprimer la GFP sur une petite population de neurones. **B** : Immunomarquage de la GFP avec des « nanobodies » conjugués à des brins d'ancrage " dock3 ". Les coupes sont incubées avec du Cy3 conjugué au brin d'ADN correspondant au " dock 3 " pour acquérir des images DNA-PAINT.

Cette architecture de marquage offre plusieurs avantages pour l'étude de l'AIO en configuration SR :

- i. Bien que les tranches organotypiques soient moins proches du cerveau intact que les tranches aigües, elles sont plus simples à manipuler, et offrent des possibilités de marquage plus étendues, en pré ou post-fixation. Leurs épaisseurs (~100-200 μm) permettent tout de même l'observation d'aberrations optiques en profondeur.
- ii. Le choix du DNA-PAINT impose l'utilisation de tranches fixées.
- iii. Le double marquage (GFP et Cy3B), dirigé sur le volume du neurone, permet une comparaison directe entre les images en résolution limitée par diffraction et les images SMLM en utilisant l'imagerie à deux longueurs d'onde (488 et 562 nm).

- iv. De plus, le marquage GFP permet (1) de repérer les cellules avant l'imagerie SMLM, (2) sert pour la correction AF et la correction de dérive (cf. 4.1.3.) et (3) potentiellement pour corriger les aberrations avec le 3N+ sur le signal continu de la cellule.

5.1.3. Correction de dérive et imagerie SMLM

Dans le cas de l'imagerie 2D sur un temps long (>10 min), comme en SMLM, plusieurs phénomènes sont à considérer. (1) Bien que le milieu d'imagerie soit contrôlé en température et protégé par une cuve et un insert thermostaté, des variations de températures ou de composition du milieu peuvent entraîner un décalage axial de la LS. Ainsi, il convient de faire un AF à intervalle régulier en fonction de l'application. (2) On observe aussi sur des temps longs un mouvement de l'échantillon (même fixé), communément appelé « dérive ». Plus ou moins importante en fonction du type d'échantillon, de son montage et des conditions d'imagerie, il est important de la minimiser au maximum pour éviter d'imager successivement deux plans différents.

Nous avons développé un algorithme qui vise à corriger cette dérive (Figure 29). Implémenté au sein du logiciel contrôlant le microscope, il est capable de mesurer la dérive en comparant deux piles d'images acquises à des points temps différents. À intervalle régulier et prédéfini, il réalise une pile de 30 images et en extrait les MIP XY et YZ. Un algorithme de corrélation permet de calculer le décalage spatial entre ces MIP, et d'en déduire un vecteur de déplacement. Une translation inverse est ensuite appliquée à chacune des platines X, Y et Z sur lesquelles le porte-échantillon repose.

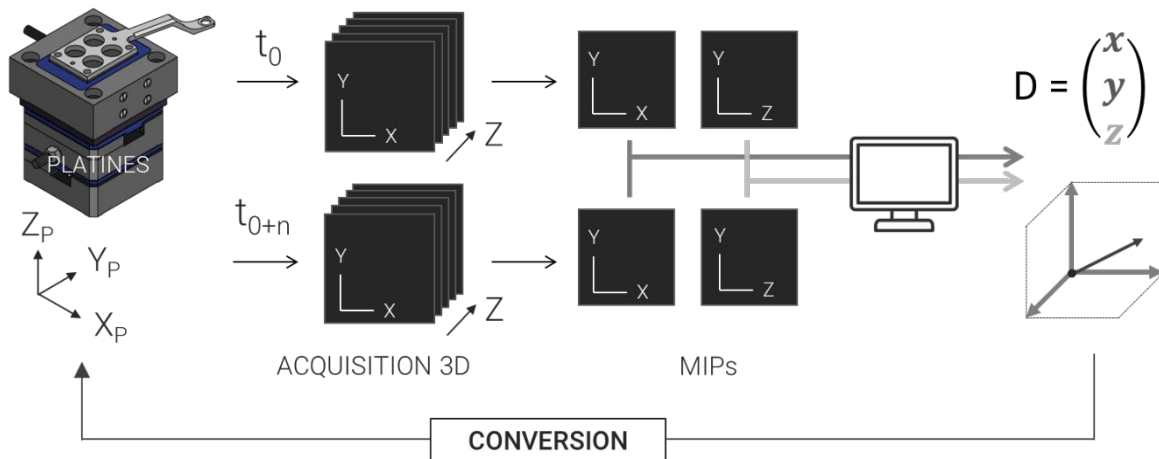


Figure 29 : Principe de fonctionnement de la correction de dérive implémentée sur le microscope à feuille de lumière « lattice ». Durant le processus d'acquisition global, une pile d'images 3D est acquise à un instant t donné. A chaque nouvelle pile d'image (t_0+t), un algorithme de corrélation compare les structures imagées à une pile d'images de référence (t_0) pour définir un vecteur de déplacement selon XYZ. Ce décalage est converti en déplacement de la platine selon $X_P Y_P Z_P$, afin de translater l'échantillon et conserver le même ROI.

L'intégration de la correction de dérive et l'application de l'AIO, conduit aux modifications suivantes dans le protocole d'imagerie :

- i. Afin de disposer de suffisamment de photons pour la corrélation des images et pour l'AF, ces corrections sont faites à partir du signal continu (GFP) de l'échantillon. Elles sont appliquées toutes les 2000 images DNA-PAINT (toutes les ~ 7 min).
- ii. À noter que la correction des aberrations optiques, par le 3N+, n'est réalisée qu'une seule fois avant l'acquisition. En effet, il est considéré que ces aberrations ne varient pas au cours du temps, au sein d'échantillons fixés.
- iii. De plus, l'algorithme 3N+ a été modifié de telle sorte à pouvoir récupérer plusieurs images à chaque point de mesure. Au lieu de mesurer la métrique sur une seule image, il est possible d'enregistrer un nombre d'images données, d'en faire un MIP et de mesurer la métrique à partir de ce MIP. En SMLM, où chaque image a un nombre fini de molécules individuelles, cela permet d'augmenter le signal pour conduire à une mesure plus robuste.
- iv. Finalement, c'est le nombre d'itérations qui définit le nombre d'images totales acquises.

5.2. Résultats

Pour détecter les molécules uniques et reconstruire l'image SR nous avons utilisé le plugin *ThunderSTORM* installé dans *ImageJ*. Ce logiciel nous permet d'accéder à plusieurs paramètres de localisation, en particulier : la précision de localisation, la densité de molécules (μm^{-2}).

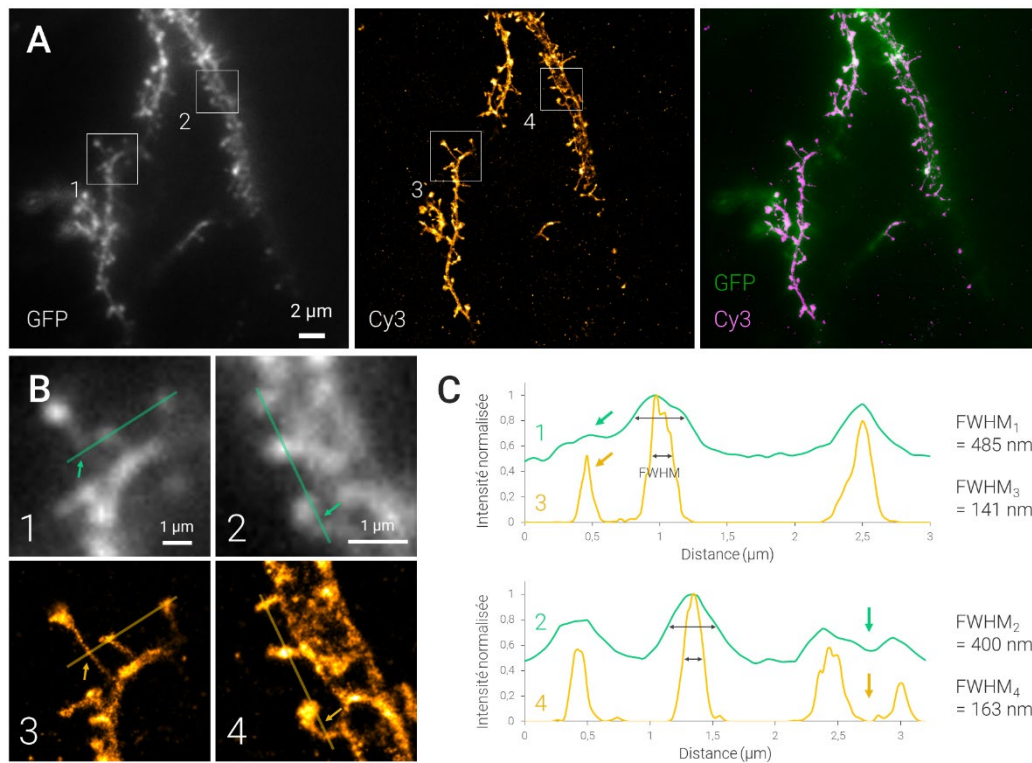


Figure 30 : Démonstration de la SMLM pour l'imagerie de dendrites neuronales au sein de tranches de cerveaux de souris et avec un microscope à feuille de lumière « lattice ». **A.** Plan 2D (288x288 pixels) d'un prolongement dendritique imagé en surface, à 488 nm (GFP – résolution limitée par diffraction) et à 561 nm (Cy3 - SMLM) et image composite associée. **B.** ROIs (1,2,3 et 4) de la section A. Des lignes de mesures d'intensité (en vert et jaune) permettent de comparer les dimensions des épines dendritiques entre 1/3 et 2/4. **C.** Profils d'intensités des lignes de mesures 1,2,3 et 4. L'imagerie SMLM permet de résoudre la taille des épines sous la limite de diffraction.

Avant de réaliser un test systématique des paramètres en profondeur, la première étape a été de vérifier le gain de résolution apporté par le protocole DNA-PAINT sur l'acquisition des images en surface. La Figure 30 illustre une de ces expériences sur un FOV de 288x288 pixels ($\sim 830 \mu\text{m}^2$). En surface, la densité moyenne de molécules détectées sur la structure (la dendrite dans ce cas) est d'environ $\sim 0,20 \pm 0,08$ molécules μm^{-2} pour chaque image, soit $\sim 5-7$ molécules détectées par image. Ceci garantit la détection de molécules individuelles. La valeur moyenne de la précision de localisation, σ_{loc} , est dans ce cas égale à $\sim 16 \text{ nm} \pm 6 \text{ nm}$. Lors d'une acquisition de 40000 images, comme illustré Figure 30 la reconstruction de l'image permet de passer sous la limite de diffraction. La taille mesurée du cou des épines dendritiques passe de $\sim 450 \text{ nm}$ sur l'image GFP à $\sim 150 \text{ nm}$ en reconstruction DNA-PAINT.

5.2.1. Imagerie en profondeur et AIO sur signal continu

Une fois la preuve de concept du DNA-PAINT faite en surface, l'expérience suivante consiste à démontrer l'effet des aberrations optiques sur l'acquisition et la reconstruction des images SMLM et le bénéfice apporté par la correction de ces aberrations avec le 3N+. Pour cela, nous avons réalisé 7 acquisitions pour chaque condition et extrait les paramètres de reconstruction donnée par *ThunderSTORM*: (1) acquisition en surface (« Surface », Figure 31), (2) à 40 μm sous la surface de l'échantillon (« 40 μm », Figure 31) et (3) à 40 μm après une correction des aberrations optiques sur le chemin de détection (« 40 μm +3N+ », Figure 31). Afin de partir d'un point connu, la correction 3N+ se fait à partir des images du signal GFP.

- i. L'ensemble des acquisitions a été réalisé avec un temps d'exposition de 200 ms et une puissance laser de ~ 5 mW (puissance mesurée à l'entrée de l'objectif d'excitation), sur une zone d'environ 165 μm^2 (128 x 128 pixels). L'échantillon est immergé dans 9 mL d'une solution de PBS 1X / NaCl à 500 nM, mélangé à 0,5 nM d'imageur Cy3.
- ii. Chaque acquisition est réalisée sur une zone différente de l'échantillon, correspondant à un prolongement dendritique peuplé de plusieurs épines. Plusieurs échantillons, provenant d'un même jeu de préparation, ont été utilisés durant toutes ces acquisitions.
- iii. Seul l'effet du 3N+ a été testé. En effet, la bonne focalisation de la feuille de lumière tout au long de l'acquisition est primordiale pour obtenir des PSF non défocalisées. Ainsi, chaque reconstruction prise dans chaque condition est composée de 20000 images, avec un AF réalisé toutes les 2000 images. Aussi, une correction de la dérive est réalisée toutes les 2000 images. L'acquisition complète se compose donc de dix piles de 2000 images.
- iv. Pour avoir une comparaison d'échantillons pairée avant/après correction 3N+, les acquisitions à 40 μm se sont faites sur 7 structures distinctes. Une structure est choisie à 40 μm en profondeur et (1) soit une correction 3N+ est appliquée avant la première acquisition, (2) soit l'acquisition est démarrée sans correction préalable des aberrations optiques. L'acquisition suivante se fait respectivement (1) sans correction 3N+ (forme de DM utilisée pour la surface de l'échantillon) ou (2) après correction 3N+ sur le signal GFP.

Après AF, le contraste des molécules individuelles est optimal en surface (« Surface », Figure 31.A). La valeur d'intensité maximale est observée autour de ~ 800 coups (soit ~ 162 photons) avec un bruit de fond limité autour de ~ 250 coups. À $40\ \mu\text{m}$ (« $40\ \mu\text{m}$ » Figure 31.A), l'intensité maximale est plus faible, entre ~ 300 et ~ 500 coups. Le bruit de fond est lui aussi plus important. La correction des aberrations optiques (« $40\ \mu\text{m}+3\text{N}+$ », Figure 31.A) augmente légèrement les valeurs d'intensités maximales (~ 400 - 600), mais conduit surtout à une meilleure distribution spatiale des photons. Cela se répercute sur le nombre de détections moyen sur 20000 images, qui passe de $\sim 2565\ \mu\text{m}^{-2} \pm \sim 1234\ \mu\text{m}^{-2}$ sans correction à $\sim 3139\ \mu\text{m}^{-2} \pm \sim 963\ \mu\text{m}^{-2}$ après correction (Figure 31.B), soit une augmentation relative moyenne de 22%. En surface, ce nombre est plus élevé avec $\sim 3869\ \mu\text{m}^{-2} \pm 1649\ \mu\text{m}^{-2}$ détections. Ainsi, la correction 3N+ permet d'augmenter le nombre de détections en profondeur, mais pas de revenir aux conditions de surface.

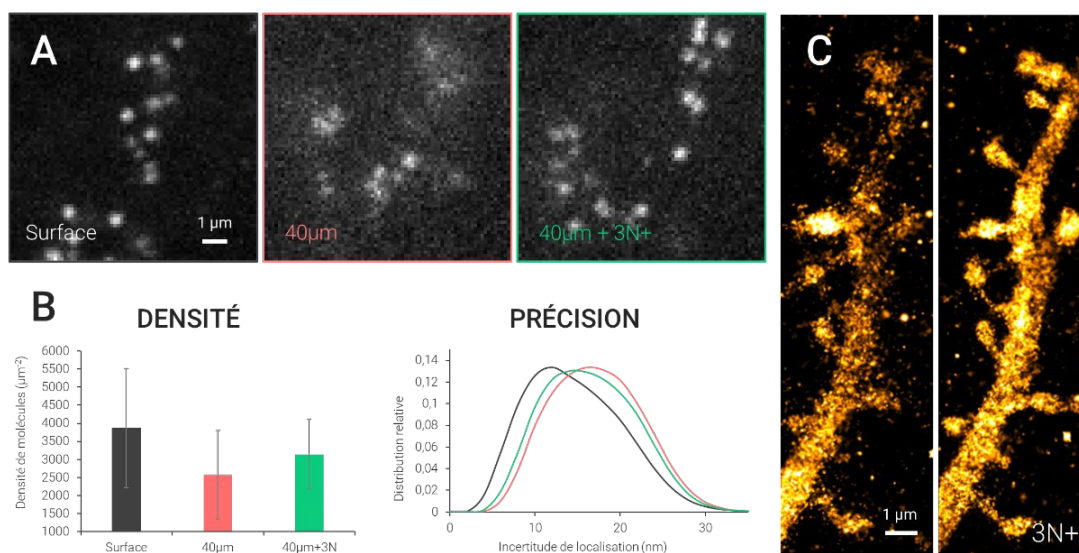


Figure 31 : Démonstration de la SMLM pour l'imagerie de dendrites neuronales, en profondeur, au sein de tranches de cerveaux de souris et avec un microscope à feuille de lumière « lattice ». **A.** Exemples de molécules individuelles imagées durant l'acquisition du scintillement SMLM, en surface, à $40\ \mu\text{m}$ sous la surface de l'échantillon et à $40\ \mu\text{m}$ après correction 3N+. **B.** Mesures de densité de molécules moyennes détectées (μm^{-2}) et distribution relative de la précision de localisation mesurées pour chaque détection, pour chaque condition. Chaque mesure est faite sur sept acquisitions de 20000 images, où un AF et la correction de dérive sont répétés toutes les 2000 images. **C.** Reconstruction SMLM d'un prolongement dendritique, à $40\ \mu\text{m}$, à partir de 20000 plans 2D, avant (gauche) et après (droite) correction 3N+.

La Figure 31.B montre également la distribution relative de la précision de localisation pour toutes les molécules détectées dans chaque condition (histogramme « PRÉCISION »). En surface, la précision de localisation moyenne est égale à $\sim 16\ \text{nm} \pm 6\ \text{nm}$ avec une médiane à $\sim 15,1\ \text{nm}$ et un 75^e centile à $\sim 19,6\ \text{nm}$. Cette valeur médiane descend à $\sim 18\ \text{nm}$ avec 75% des valeurs sous la barre de $\sim 22\ \text{nm}$ pour l'imagerie en profondeur. Après correction, la distribution de précision revient à des valeurs plus faibles (courbe verte sur l'historgramme « PRÉCISION ») avec un gain de $\sim 5\%$ sur la valeur médiane ($\sim 17,15\ \text{nm}$).

Ces améliorations sont visibles Figure 31.C, où la correction 3N+ permet une forte augmentation du nombre de détections, une distribution plus localisée des fluorophores et en conséquence l'apparition de structures fines telle que les cous d'épines dendritiques, pas ou peu visibles sans correction 3N+.

5.2.2. Exploration des métriques sur les images SMLM

Dans les résultats présentés jusque-là, nous avons basé la correction des aberrations sur l'optimisation 3N+ d'une métrique mesurée sur l'image du canal GFP, qui est une image limitée par diffraction. Nous allons maintenant explorer la possibilité d'utiliser les images du canal DNA-PAINT, constitué des scintillements de molécules individuelles. En effet, ce signal est potentiellement plus sensible aux aberrations, car constitué principalement de hautes fréquences spatiales. Pour définir la métrique la plus appropriée dans ce cas de figure, nous avons testé la réponse des métriques (1) « Sharpness », proposé par Mlodzianoski et al. [146] et réutilisé par Siemons et al. [147] et (2) « FFT » développée dans notre premier article [101], représentées Figure 32.

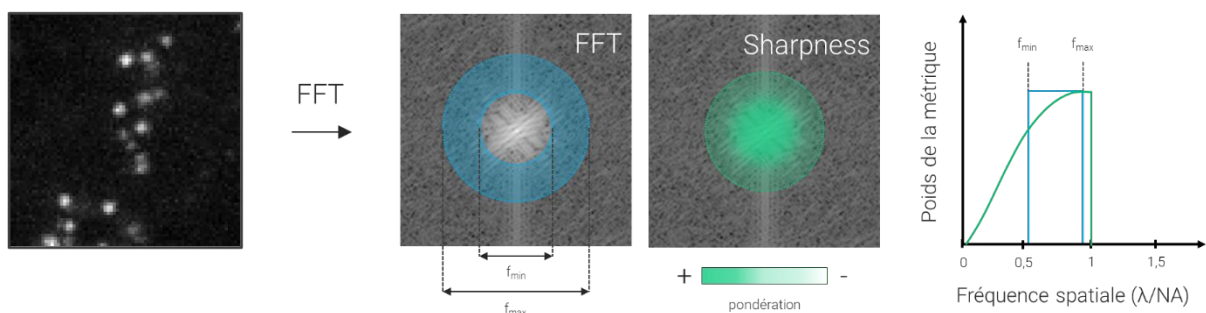


Figure 32 : Illustration des métriques utilisées pour mesurer le contenu fréquentiel des images dans le cadre de la correction 3N+ pour l'imagerie SMLM.

- i. La métrique « FFT » consiste à mesurer l'énergie moyenne relative sur une bande fréquentielle d'une image, à travers l'application d'un masque annulaire, de diamètres interne (f_{min}) et externe (f_{max}) variables. Cela correspond à appliquer un filtre passe-bande sur les fréquences d'une image (en bleu sur le graphique de droite). En choisissant un diamètre adapté, il est possible de ne sonder que les fréquences de l'image qui correspondent au signal SMLM.
- ii. La métrique « Sharpness » consiste également à retirer une énergie moyenne relative, mais en maximisant la mesure sur les hautes fréquences de l'image (en vert sur le graphique de droite). En prenant en compte l'OTF théorique du système (FT de la PSF) au sein d'un masque annulaire, il est possible de diminuer l'apport des basses fréquences dans la mesure de l'énergie globale (pondération +/-). Cette métrique fonctionne comme un filtre passe-bande dont la pondération

minimise les basses fréquences et laisse passer toutes les hautes fréquences. Cette pondération peut être modifiée à l'aide du coefficient α dans la formule suivante :

$$\text{Sharpness} = \frac{\sum_{n,m} \hat{I}_{n,m} (1 - OTF_{n,m})^\alpha OTF_{n,m} \mu_{n,m}}{\sum_{n,m} \hat{I}_{n,m} \mu_{n,m}}$$

où, n et m sont compris entre $[-L/2 ; +L/2-1]$ (avec L le nombre de pixels dans une dimension latérale), $\hat{I}_{n,m}$ l'énergie de la FT de l'image, $OTF_{n,m}$, la FT de la PSF théorique du système et $\mu_{n,m}$, un masque fréquentiel circulaire.

Ainsi, nous avons testé les métriques suivantes (Figure 33.B) : « FFT » avec trois masques annulaires de diamètres interne et externe différents ; $500-1000 \text{ mm}^{-1}$ (« FFT₅₀₀₋₁₀₀₀»), $1000-2000 \text{ mm}^{-1}$ (« FFT₁₀₀₀₋₂₀₀₀») et $1500-2000 \text{ mm}^{-1}$ (« FFT₁₅₀₀₋₂₀₀₀»), et la métrique « Sharpness » avec trois coefficients de pondération différent : 1 (« Sharpness 1 »), 1,3 (« Sharpness 1,3 ») et 1,6 (« Sharpness 1,6 »). Les métriques ont été mesurées sur des images où ont été appliquées des coefficients allant de $0,15 \mu\text{m RMS}$ à $0,15 \mu\text{m RMS}$, de 14 modes de Zernike (« astigmatisme 0° » à « tetrafoil 90° »). Les métriques sont mesurées sur un MIP de 6 images successives. Ainsi, nous obtenons $\sim 10-15$ molécules individuelles, ce qui représente un SNR suffisant pour calculer une métrique fiable. Par contre ce processus ralentit la correction 6x par rapport à une mesure sur le canal GFP. Toutes les acquisitions ont été réalisées en surface pour éviter d'induire des aberrations supplémentaires liées à la profondeur d'imagerie. Les conditions d'imagerie et les molécules individuelles résultantes sont les mêmes que celles citées dans la partie précédente.

Nous avons utilisé la méthode décrite au Chapitre 4 pour déterminer la meilleure métrique [101]. Ce protocole consiste à imager une zone caractéristique de l'échantillon, d'appliquer successivement et mode par mode des aberrations sur une plage de coefficient prédéfinie. Sur chaque image on mesure les métriques étudiées et on obtient finalement une variation de cette valeur en fonction de la quantité d'une aberration donnée. En répétant ces mesures sur plusieurs zones de l'échantillon, on obtient une courbe de la valeur de métrique moyenne (pointillé sur le premier graphique de la Figure 33.A) en fonction du coefficient de Zernike appliqué. Ces moyennes s'accompagnent d'écart-types qui, réunies, représentent le bruit de mesure (lignes vertes sur le premier graphique Figure 33.A), i.e. la variation de la métrique. En divisant le coefficient quadratique du « fit » parabolique (a, Figure XX.A) par l'aire dessinée par les écart-types, on obtient la sensibilité de la métrique à la variation de chaque mode de Zernike.

Si la variation de la métrique pour un coefficient donné est faible (faible bruit) et si l'écart de valeur est important d'un coefficient à l'autre (grande courbure), la métrique a une grande sensibilité au mode de Zernike (graphique « FFT₅₀₀₋₁₀₀₀ – 3th sphe. », Figure 33.A). En d'autres termes, lors de la correction du mode de Zernike avec le 3N+, (1) il y a moins de chance de mesurer une valeur aberrante (dans la zone du bruit) qui pourrait venir fausser l'ajustement polynomial et (2) il y a plus de chance d'avoir des valeurs bien séparées conduisant à un ajustement polynomial plus précis.

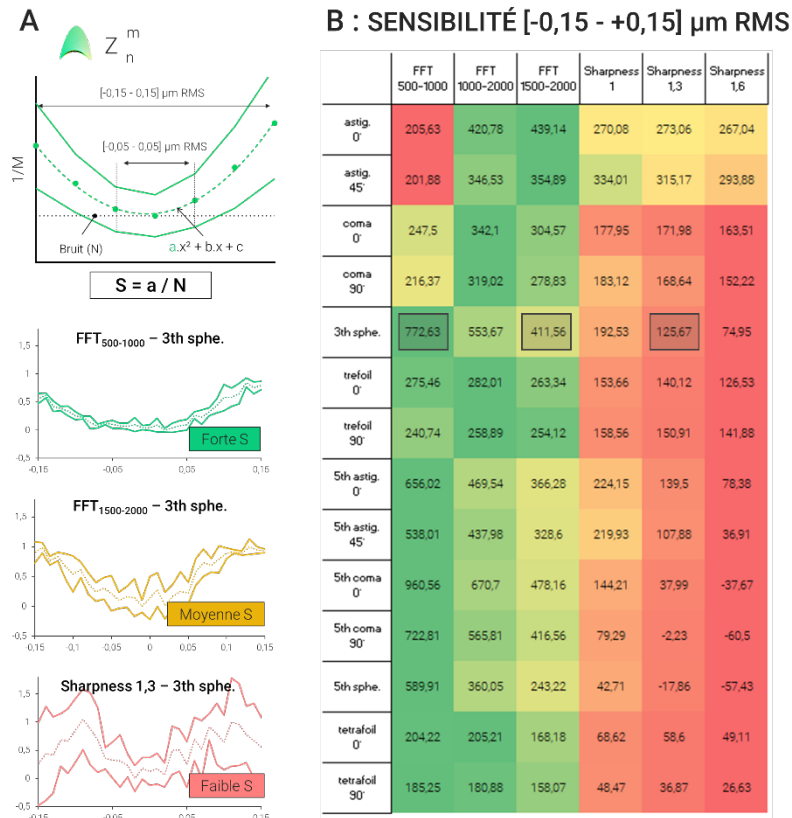


Figure 33 : Description de la mesure des coefficients de sensibilité de plusieurs métriques lors de la variation des coefficients de quatorze modes de Zernike (astigmatisme 0° à tetrafoil 90°) lors de l'imagerie SMLM en surface de tranches de cerveaux. **A.** Pour chaque mode de Zernike, Z_n , le coefficient est modifié de $-0,15$ à $+0,15$ $\mu\text{m RMS}$ par pas de $0,01$ $\mu\text{m RMS}$. Les six métriques sont mesurées sur chaque image résultante (MIP de 6 images). L'expérience est répétée cinq fois, sur plusieurs aires de l'échantillon. En résulte une variation moyenne de la valeur de métrique ($1/M$) accompagnée d'une incertitude (bruit N). En divisant le coefficient quadratique, a , de l'ajustement polynomial des valeurs moyennes, par le bruit N , on obtient le coefficient de sensibilité S . Les exemples de graphiques vert, jaune et rouge représentent la décroissance de la valeur de S . **B.** Tableau récapitulatif de l'ensemble des valeurs de sensibilité pour chaque métrique et chaque aberration. Le dégradé allant du vert vers le rouge représente la décroissance de la valeur de S , suivant chaque mode de Zernike.

La mesure de sensibilité a été réalisée sur la gamme d'amplitude d'aberration de -0.15 à $+0.15$ $\mu\text{m RMS}$ (Figure 33.B). Le tableau donne les valeurs de sensibilités mesurées pour chaque métrique en fonction de l'aberration testée. Le code couleur est dépendant de chaque aberration et varie de la meilleure valeur de sensibilité (en vert) à la moins bonne (rouge) pour les six métriques testées.

- i. Sur l'ensemble de la plage $[-0,15 ; 0,15]$ μm RMS (Figure 33.B), il ressort qu'en moyenne la métrique FFT est plus adaptée que la métrique Sharpness.
- ii. Parmi ces métriques, $\text{FFT}_{1000-2000}$ est, en moyenne, plus sensible sur les aberrations d'ordre faible (« astigmatisme 0° » à « trefoil 90° ») tandis que $\text{FFT}_{500-1000}$ semble plus performante de l'aberration sphérique jusqu'à « tetrafoil 90° ».

À la suite de ces résultats intéressants, nous aurions souhaité répéter les tests effectués au chapitre 5.2.1 mais en utilisant le signal DNA-PAINT et les métriques FFT pour corriger les aberrations. Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de réaliser ces tests dans le cadre de cette thèse. Ils seront menés dans un avenir très proche.

5.3. Discussion des résultats

Ces premiers résultats démontrent que la correction des aberrations optiques en profondeur, à partir d'un marquage structural en résolution classique (le canal GFP dans notre cas), peut apporter un réel gain pour l'imagerie SR. Le nombre de détections plus élevé (+22%) permet d'envisager une diminution du temps d'acquisition global pour respecter le critère de Nyquist appliqué à la SMLM. Combiné à une diminution de l'incertitude de localisation, ceci nous permettra d'augmenter la résolution des images reconstruites, comme illustré sur la Figure 31.C.

Cependant notre approche ne permet pas de retrouver les valeurs des paramètres SMLM (densité, incertitude de localisation) mesurés à la surface, alors que nous avons démontré les performances de cette même méthode sur le signal GFP de dendrites dans notre premier article. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer le gain marginal apporté par la correction 3N+ sur le signal GFP.

- i. Le gain marginal de densité peut s'expliquer par une pénétration atténuée des imageurs en fonction de la profondeur. La concentration d'imageurs disponibles pour le signal DNA-PAINT à $40\mu\text{m}$ est probablement plus faible qu'à la surface du tissu.
- ii. Malgré la correction de dérive appliquée toutes les 2000 images, il arrive parfois que celle-ci ne permette pas de revenir exactement au plan d'imagerie initial. En résulte l'acquisition de molécules individuelles hors plan focal qui engendrent une diminution des résultats de localisation.
- iii. L'AF ne corrige que la défocalisation de la feuille de lumière. Il a déjà été démontré que le faisceau « lattice » perd son sectionnement optique avec l'augmentation des aberrations en profondeur d'un

échantillon et qu'une correction AO sur le chemin d'excitation peut permettre de restaurer sa mise en forme [35]. Dans notre cas, il est possible que cette déformation impacte l'illumination des molécules individuelles, engendrant des PSF aberrées, que la correction 3N+ seulement à la détection ne permet pas de restaurer.

Les pistes d'amélioration sont donc (1) une utilisation d'une correction de dérive plus précise permettant une analyse sur le même plan focal du début à la fin de l'acquisition, combiné à (2) la recherche d'une méthode pour quantifier les impacts individuels des aberrations à l'excitation et à la détection.

Dans le cas de la correction des aberrations à partir du signal SMLM, l'utilisation d'une métrique basée sur la mesure des hautes fréquences de l'image semble particulièrement adaptée. La métrique modulable « FFT », développée dans le cadre de notre premier article, donne une réponse peu bruitée pour des quantités d'aberrations de -0.15 à $+0.15$ μm RMS d'amplitude, tandis que la métrique « Sharpness » est plus sensible à des variations faibles (-0.5 à $+0.5$ μm RMS) des aberrations. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cela.

- i. Le filtre passe-bande des métriques FFT exclut le continu et donc le bruit de fond de l'image. Il permet de mieux isoler le signal des molécules uniques même lorsqu'elles sont déformées par des aberrations importantes.
- ii. Par contre lorsque les aberrations sont faibles, la métrique « Sharpness » intègre une gamme plus grande de fréquence et devient donc plus sensible.

Ces résultats préliminaires sur le choix de la métrique laissent envisager plusieurs perspectives pour l'amélioration de la correction 3N+ en SMLM.

- i. Chaque métrique ayant une sensibilité différente en fonction du mode d'aberration sondé, il devient envisageable d'utiliser plusieurs métriques lors de la correction 3N+. En modifiant l'algorithme 3N+, il est possible d'associer à chaque aberration sa métrique la plus sensible. De la même façon, les métriques ont une réponse différente en fonction de l'amplitude autour du coefficient optimum de correction (creux de la courbe). Comme démontré dans le premier article [101], la correction 3N+ comporte plusieurs itérations avec une amplitude décroissante appliquée au DM. Le choix de la métrique pourrait donc aussi être dicté par l'itération et l'amplitude associée.
- ii. Une analyse précise du contenu fréquentiel des images DNA-PAINT, avec ou sans aberration, nous permettra d'éclairer le choix des métriques

- iii. Ces résultats ont été réalisés en condition de surface, où l'intensité et le contraste des molécules individuelles sont les plus favorables et en utilisant le MIP de 6 images pour maximiser le nombre de molécules sur l'image. Il conviendra par la suite de répéter cette expérience dans des conditions de signal à bruit plus basses et en analysant l'influence du nombre de molécules sur le contenu fréquentiel des images.

6. Discussion et perspectives

Cette thèse avait pour but l'intégration de méthodes d'AO à la LLSM, pour la correction des aberrations optiques lors de l'imagerie en profondeur au sein d'échantillons épais. Cette correction devait à la fois être applicable pour l'imagerie limitée par diffraction, mode d'imagerie couramment utilisé avec le microscope LLSM, mais aussi pour l'imagerie SR, plus particulièrement la SMLM, ouvrant la voie à de nouvelles applications. Dans ce contexte, plusieurs missions ont été réalisées tout au long du projet.

- i. La première étape fut l'étude, la conception et la réalisation d'un nouveau chemin optique, intégrant l'AO, pour le microscope. Premièrement, une étude de la géométrie optique intégrant le DM et le WFS sur le microscope LLSM a été menée pour décider des optiques et de leurs placements au sein du chemin de détection. Ensuite, un travail de conception 3D a été réalisé dans le but d'intégrer ces nouveaux éléments en respectant les contraintes du système. Enfin, un protocole de montage, d'alignement et de calibration de ce nouveau chemin de détection AO a été mis en place.
- ii. Dans un second temps, le projet s'est concentré sur le développement d'un logiciel permettant de contrôler l'AO, et plus particulièrement pour la correction 3N+. Ce logiciel, développé sous *LabVIEW*, se présente comme un module, fonctionnant en parallèle du logiciel de contrôle du microscope. Il est capable de commander le DM et de récupérer les images acquises par le microscope, de façon cadencée. Ces deux fonctions permettent de réaliser l'optimisation 3N+ et d'autres procédures « avancées » : variation de la métrique selon le mode et l'amplitude des aberrations, correction d'aberrations simulées, etc. Ces dernières permettent d'envisager une étude automatisée du paramétrage du 3N+ en fonction de l'échantillon et des conditions d'imagerie.
- iii. Les premières expériences de cette thèse ont été réalisées sur le système LLSM dédié avant tout aux utilisateurs du BIC. Ce microscope était peu accessible pour ce travail de thèse qui nécessitait un instrument à temps plein. Il a été décidé de concevoir et de construire un second microscope LLSM, dédié uniquement à ce projet de développement. Une partie de cette thèse a donc consisté à construire ce nouveau microscope avec l'apport de modifications

permettant d'envisager de nouveaux développements. Ainsi, (1) les directions de propagation de plusieurs faisceaux ont été modifiées pour limiter l'encombrement sur face avant du microscope et permettre un meilleur accès à l'échantillon et (2) certains éléments ont été optimisés (objectif d'excitation avec une distance de travail plus grande, caméra sCMOS plus sensible, plaque des masques annulaires facilitant le changement de feuille « lattice » ...) pour améliorer les performances du système.

- iv. Enfin, tout au long de la thèse, la recherche et la fabrication de techniques de marquage sur des échantillons d'intérêts a permis la conduite d'expériences pour démontrer l'intérêt de l'AO. Menés dans le cadre de collaboration avec plusieurs équipes de recherche - notamment Angela Getz de l'équipe IINS « Dynamique de l'organisation des synapses » dirigée par Daniel Choquet, ou encore Patrick Li de l'équipe LBM « Communication intercellulaire médiée par les plasmodesmes » dirigée par Emmanuelle Bayer – ces travaux ont permis d'étudier l'effet des aberrations optiques dans des échantillons épais et diffusant comme les tranches de cerveaux organotypiques ou des racines d'Arabidopsis. Le travail de collaboration avec Magali Mondin, ingénieure de recherche au BIC, a permis de démontrer la faisabilité du DNA-PAINT en profondeur dans les échantillons épais. La combinaison d'un protocole SMLM adapté permettant la pénétration des imageurs au sein de l'échantillon avec le haut sectionnement optique et la haute NA de l'objectif de détection du microscope permettent l'imagerie DNA-PAINT à plusieurs dizaines de μm (~40-60 μm) sous la surface de ces échantillons épais.

L'ensemble des travaux ont été effectués en étroite collaboration avec Imagine Optic et plus particulièrement Fabrice Harms, Cynthia Vielly et Jérôme Legrand. En plus de financer cette thèse, les nombreuses discussions, le partage de compétences, l'aide apportée pour la conception mécanique et le développement logiciel autour de l'AO et l'investissement matériel ont permis de mener à bien l'ensemble de l'étude présentée dans cette thèse.

Les développements réalisés durant cette thèse ont permis de démontrer l'intérêt (1) d'une refocalisation de la feuille de lumière à l'excitation (AF) et (2) d'une correction des aberrations optiques engendrées par l'échantillon sur le chemin de détection (3N+), pour la LLSM en profondeur, que ce soit en résolution limitée par diffraction ou en SMLM.

- i. En résolution « classique », nous avons dans un premier temps défini un protocole de sélection des paramètres pour l'AF et le 3N+ à partir d'aberrations simulées en surface d'échantillons divers (billes fluorescentes, cellules HEK ou neurones dans les tranches de cerveaux). Une fois paramétrée, notre méthode, nommée AIO (AF +

3N+) permet de récupérer un front d'onde plan avec une erreur inférieure à 50 nm RMS et en moins de 40 secondes. Ce gain a été illustré par les améliorations d'intensité et de résolution lors de l'imagerie d'épines dendritiques à 40 μm de profondeur sous la surface de tranches de cerveaux organotypiques. La méthode permet de recouvrer la taille et le contraste des épines imagées à la surface. Aussi, l'apport de l'AIO pour la déconvolution des images a été démontré à la fois sur des tranches de cerveau et des racines d'*Arabidopsis*.

- ii. En SR, nous avons obtenu des résultats préliminaires prometteurs pour la suite du projet. Tout d'abord, nous avons réussi à appliquer un protocole DNA-PAINT sur l'ensemble des structures neuronales, allant jusqu'à 40-50 μm , au sein de tranches de cerveaux. En surface, le passage de la résolution sous la limite de diffraction a été illustré par la reconstruction SMLM de dendrites et d'épines dendritiques, avec des mesures de FWHM inférieure à 150 nm. Ensuite, les premiers tests ont montré qu'à 40 μm sous la surface, les aberrations optiques détérioraient la forme des PSF individuelles et *in fine* le nombre de molécules détectées et la précision de localisation. En basant la correction 3N+ sur le second marquage, continu, une amélioration de ces deux paramètres de sortie est visible et conduit à une meilleure reconstruction SMLM. Pour améliorer la correction, nous avons entamé une étude de la correction 3N+ basée sur le signal SMLM, et notamment sur le choix de la métrique.

L'objectif principal de cette thèse étant l'utilisation de la LLSM pour l'imagerie SMLM en profondeur, des travaux supplémentaires seront nécessaires pour démontrer l'apport de l'AO. En effet, les premiers résultats démontrent un gain de précision de localisation limité par rapport à de récentes études [147], [170]. Toutefois, l'initialisation des travaux sur le paramétrage du 3N+ appliqué à la SMLM laisse espérer un fonctionnement robuste et performant de la méthode à partir du scintillement de l'image.

Une fois l'étude de la correction 3N+ complétée, nous souhaitons mettre en évidence la robustesse et les performances de l'AIO pour la SMLM à travers deux études biologiques quantitatives. La première, en collaboration avec Angela Getz et Magali Mondin, concerne l'imagerie SR, en profondeur, des récepteurs aux glutamates présents sur les épines dendritiques au sein de tranches de cerveaux organotypiques fixées. La seconde est l'imagerie SR de l'organisation de la spectrine de dendrites neuronales, avec l'aide d'Anna Brachet (IINS, équipe « Choquet »), Mathieu Letellier (IINS, équipe « Molécules d'adhérence cellulaire dans l'assemblage synaptique » dirigée par Olivier Thoumine) et Magali Mondin. Ces deux études permettront une comparaison de l'imagerie SMLM en surface et en profondeur tout en s'appuyant sur la mesure de structures biologiques connues.

Les résultats présentés dans cette thèse sont aussi à mettre en perspective avec le type d'échantillons imagés lors de ce projet. Que ce soit les tranches de cerveaux ou bien les racines de plantes, ces deux échantillons représentent un challenge de taille pour la correction des aberrations optiques : (1) la diffusion joue un rôle majeur dans la dégradation de résolution, et ce dès quelques dizaines de μm sous la surface et/ou (2) peu de structures marquées sont présentes au-delà de $\sim 40\text{-}50\ \mu\text{m}$ de profondeur. En plus d'améliorer les performances de l'AIO sur ce type d'échantillons, nous souhaitons ainsi ouvrir l'étude à l'imagerie d'échantillons, moins diffusants, et plus favorables à la correction 3N+, comme par exemple l'imagerie structurale du *Zebrafish* [35], [142] ou bien de sphéroïdes dans des capsules d'alginate [94].

Aussi, nous nous sommes principalement concentrés sur la correction des aberrations au sein d'échantillons fixés. Ce type d'échantillons apportent plusieurs avantages pour la standardisation des expériences : (1) la fixation permet une conservation plus longue des échantillons permettant de répéter les manipulations, (2) généralement les échantillons fixés sont plus simples à monter, (3) l'utilisation d'un milieu d'imagerie à renouveler entraîne une dérive de l'échantillon plus importante. Avec sa rapidité d'imagerie, la LLSM est particulièrement performante pour l'imagerie du vivant.

A terme, l'objectif majeur de ce développement, est d'ailleurs l'utilisation de l'AO dans le vivant est plus particulièrement pour le SPT dans les tranches de cerveaux organotypiques ou aigües. Dans ce but, nous travaillerons autour de trois axes majeurs : (1) les techniques de marquages, pour détecter des molécules uniques brillantes et peu sensibles au photoblanchiment, (2) une correction de dérive plus efficace, qui permettra un suivi de la molécule dans le temps et (3) une AIO capable de corriger rapidement les aberrations, quelle que soit la zone d'imagerie au sein de l'échantillon. Cette correction rapide permettra de (1) de compenser des variations d'aberrations dues à un changement morphologique de l'échantillon (croissance d'une racine, développement d'un embryon), et surtout (2) de réduire le photoblanchiment en minimisant le nombre d'images nécessaires à la correction. Sur ce dernier point, même si l'approche modale indirecte (3N+) permet de conserver l'ensemble des photons de fluorescence pour l'imagerie - ce qui est très utile pour le SPT, où les niveaux de signal sont limités - elle limite la rapidité de correction comparée à une approche directe. Deux méthodes sont envisageables pour augmenter la rapidité de correction.

- i. Premièrement, un développement logiciel pourrait permettre de précalculer les formes de DM en fonction de la zone isoplanétique de l'échantillon. Ainsi, les corrections seraient appliquées automatiquement, via le DM, en fonction de l'aire d'intérêt. Cette cartographie de la déformation du front d'onde permettrait aussi une analyse détaillée de l'origine des aberrations au sein des échantillons imagés.

- ii. Un déclenchement analogique (« trigger » en anglais) en entrée du DM pourrait permettre de synchroniser très précisément la prise d'images et l'application des coefficients durant le 3N+. Actuellement, une « pause » d'environ 100 ms est appliquée entre l'application d'un biais et l'acquisition de l'image, afin d'assurer la mesure de métrique à partir du coefficient voulu. En combinant cela à l'optimisation du nombre et du temps d'exposition des images prises pour l'AF, nous estimons pouvoir gagner entre ~5 et 10 s sur le processus d'AIO.

À court terme, l'AO pourra permettre l'imagerie SMLM en 3D. L'utilisation du DM sur le chemin de détection permet d'appliquer facilement un décalage sur n'importe quel mode de Zernike. La déformation des PSFs avec l'astigmatisme [82], [83] révèle leurs localisations axiales et ouvre donc la voie à la 3D-SMLM. De plus, le système LLSM conçu permet de modifier l'épaisseur de la feuille « lattice » en modifiant le modèle créé par le SLM et le masque annulaire (diamètres interne et externe variables). En jouant à la fois sur l'épaisseur de la feuille de lumière et l'amplitude de l'astigmatisme via le DM, il deviendra alors possible d'atteindre la super-résolution axiale à l'intérieur d'une feuille de lumière de 500 nm à 2 μ m, et ce pour n'importe quel type d'échantillons.

En plus de cela, nous envisageons de nouvelles modifications pour améliorer l'imagerie en profondeur et étudier le fonctionnement de l'AO sur le LLSM.

- i. Un premier axe d'amélioration est une correction plus poussée des aberrations optiques à l'excitation. Notre méthode AF ne corrige que la défocalisation de la feuille de lumière, qui peut être assimilée à une correction de bas ordre. Cependant, le faisceau d'illumination subit les mêmes variations d'indice de réfraction au sein de l'échantillon, ce qui a pour effet, avec la profondeur d'imagerie, de dégrader la forme et donc le sectionnement optique le long de l'axe de propagation. L'utilisation conjointe du SLM, déjà testée en LLSM [35], pourrait permettre d'assurer un haut sectionnement optique au-delà de la surface de l'échantillon en supprimant les aberrations optiques à l'excitation. Nous envisageons des premiers tests avec le SLM binaire, utilisé sur le système pour générer le modèle « lattice ». Même si, le déphasage binaire (0 ou $\pi/2$) n'offre pas la résolution nécessaire pour corriger les aberrations optiques d'ordre haut, une correction translationnelle/rotationnelle de la feuille permettra déjà d'améliorer l'illumination. À terme, le passage à un SLM continu servirait à créer le modèle « lattice » et corriger l'ensemble des modes de Zernike.
- ii. Notre collaboration avec Imagine Optic nous permet également d'envisager l'utilisation de l'ESSH pour la correction des aberrations à la détection. Déjà intégré sur un LFSM [124] et basé sur une correction par mesure directe du front d'onde, ce système permettrait, comme pour la méthode actuelle, de se passer de points sources au sein des échantillons imagés. Bien que, cette méthode a un

fonctionnement différent de l'AIO (approche indirecte), son intégration ne demandera que quelques ajustements du système optique. Elle permettrait entre autres de (1) vérifier les performances de l'AIO comparé à une approche directe, (2) de mesurer le type et la quantité des aberrations au sein des échantillons étudiés au BIC et (3) d'apporter un retour d'expériences sur cette technologie nouvellement développée.

Enfin, la construction de ce nouveau système limite l'encombrement autour de l'échantillon et laisse plus d'espace sur la table optique pour envisager de nouveaux développements. Une idée pourrait être, dans le cadre d'un nouveau projet, d'intégrer l'électrophysiologie au microscope.

Pour conclure, ce projet de thèse, à la croisée de plusieurs domaines scientifiques, s'est inscrit dans une volonté de faire bénéficier des méthodes, des résultats et du matériel aux différentes parties prenantes et à la communauté scientifique. Dans le cadre du BIC, ce projet aura permis d'installer un nouveau microscope de pointe au sein de la plateforme, d'intégrer un premier système avec AO et d'envisager des développements futurs pour les besoins des utilisateurs. Dans le cadre de l'IINS, ce système ouvre la voie à l'imagerie SR au sein des tranches de cerveaux vivantes. Plus largement, ce développement bénéficiera à la communauté scientifique pour l'imagerie d'échantillons épais. Dans le cadre d'Imagine Optic, ces travaux auront servi au développement de l'algorithme 3N+, à démontrer les performances du matériel sur un nouveau microscope et à envisager de futurs développements. En résumé, nous espérons que cette thèse aura eu un impact durable et positif qui saura faire avancer la microscopie optique et la biologie.

Bibliographie

- [1] B. C. Chen *et al.*, “Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution,” *Science (80-.)*, vol. 346, no. 6208, 2014, doi: 10.1126/science.1257998.
- [2] D. Choquet, M. Sainlos, and J. B. Sibarita, “Advanced imaging and labelling methods to decipher brain cell organization and function,” *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 22, no. 4, pp. 237–255, 2021, doi: 10.1038/s41583-021-00441-z.
- [3] E. A. Rodriguez *et al.*, “The Growing and Glowing Toolbox of Fluorescent and Photoactive Proteins,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 42, no. 2, pp. 1–19, 2017, doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.010.
- [4] L. Wang, M. S. Frei, A. Salim, and K. Johnsson, “Small-Molecule Fluorescent Probes for Live-Cell Super-Resolution Microscopy,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 141, pp. 2770–2781, 2019, doi: 10.1021/jacs.8b11134.
- [5] M. Minsky, “Memoir on Inventing the Confocal Scanning Microscope,” *Scanning*, vol. 10, no. 4, pp. 128–138, 1987.
- [6] A. Nakano, “Spinning-disk Confocal Microscopy — A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic Need for a rapid confocal scanning system,” *Cell Struct. Funct.*, vol. 355, pp. 349–355, 2002.
- [7] W. Denk, J. H. Strickler, and W. Webb, “Two-photon laser scanning fluorescence microscopy,” *Science (80-.)*, vol. 248, no. 13 4951, pp. 73–76, 1990.
- [8] D. Axelrod, “Total Internal Reflection Fluorescence,” *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.*, vol. 13, no. June, pp. 247–268, 1984.
- [9] T. Makio, I. Naoko, and K. Sakata-Sogawa, “Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 159–161, 2008, doi: 10.1093/nq/199.jul.315-d.
- [10] H. Siedentopf and R. Zsigmondy, “Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser.,” *Ann. Phys.*, vol. 11, no. 11, p. 433, 1901.
- [11] A. H. Voie, D. H. Burns, and F. A. Spelman, “Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: Three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens,” *J. Microsc.*, vol. 170, no. 3, pp. 229–236, 1993, doi: 10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x.
- [12] J. Huiskens, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, “Optical Sectioning Deep inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy,” *Science (80-.)*, vol. 305, no. 5686, pp. 1007–1009, 2004.

- [13] P. J. Keller, A. D. Schmidt, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer, “Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy,” *Science (80-.)*, vol. 322, no. 5904, pp. 1065–1069, 2008, doi: 10.1126/science.1162493.
- [14] E. G. Reynaud, J. Peychl, J. Huisken, and P. Tomancak, “Guide to light-sheet microscopy for adventurous biologists,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 1, pp. 30–34, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3222.
- [15] J. Huisken and D. Y. R. Stainier, “Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM),” *Opt. Lett.*, vol. 32, no. 17, pp. 2608–2610, 2007.
- [16] L. Gao, “Extend the field of view of selective plan illumination microscopy by tiling the excitation light sheet,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 5, p. 6102, 2015, doi: 10.1364/oe.23.006102.
- [17] K. M. Dean, P. Roudot, E. S. Welf, G. Danuser, and R. Fiolka, “Deconvolution-free Subcellular Imaging with Axially Swept Light Sheet Microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 108, no. 12, pp. 2807–2815, 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.05.013.
- [18] E. Sapoznik *et al.*, “A versatile oblique plane microscope for large-scale and high-resolution imaging of subcellular dynamics,” *Elife*, vol. 9, pp. 1–39, 2020, doi: 10.7554/eLife.57681.
- [19] F. F. Voigt *et al.*, “The mesoSPIM initiative: open-source light-sheet microscopes for imaging cleared tissue,” *Nat. Methods*, vol. 16, no. 11, pp. 1105–1108, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0554-0.
- [20] T. A. Planchon *et al.*, “Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 5, pp. 417–423, 2011, doi: 10.1038/nmeth.1586.
- [21] L. Gao, L. Shao, B. Chen, and E. Betzig, “3D live fluorescence imaging of cellular dynamics using Bessel beam plane illumination microscopy,” *Nat. Protoc.*, vol. 9, no. 5, pp. 1083–1101, 2014, doi: 10.1038/nprot.2014.087.
- [22] T. Vetterburg *et al.*, “Light-sheet microscopy using an Airy beam,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 5, pp. 541–544, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2922.
- [23] U. Krzic, S. Gunther, T. E. Saunders, S. J. Streichan, and L. Hufnagel, “Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging,” *Nat. Methods*, vol. 9, no. 7, 2012, doi: 10.1038/NMETH.2064.
- [24] R. K. Chhetri, F. Amat, Y. Wan, B. Höckendorf, W. C. Lemon, and P. J. Keller, “Whole-animal functional and developmental imaging with isotropic spatial resolution,” *Nat. Methods*, no. October, pp. 1–8, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3632.
- [25] P. Strnad *et al.*, “Inverted light-sheet microscope for imaging mouse pre-implantation development,” *Nat. Methods*, no. December, pp. 1–7, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3690.
- [26] R. McGorty, H. Liu, D. Kamiyama, Z. Dong, and S. Guo, “Open-top selective plane illumination microscope for conventionally mounted specimens,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 12, pp. 113–119, 2015, doi: 10.1364/OE.23.016142.
- [27] A. K. Glaser *et al.*, “A hybrid open-top light-sheet microscope for multi-scale imaging of cleared tissues,” *Nat. Methods*, vol. 19, no. 5, pp. 613–619, 2022, doi: 10.1038/s41592-022-01468-5.A.

- [28] C. Dunsby, “Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy,” *Opt. Express*, vol. 16, no. 25, pp. 186–196, 2009.
- [29] M. B. Bouchard *et al.*, “Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high-speed volumetric imaging of behaving organisms,” *Nat. Photonics*, vol. 9, no. 2, pp. 113–119, 2015, doi: 10.1038/nphoton.2014.323.
- [30] V. Voleti *et al.*, “Real-time volumetric microscopy of in vivo dynamics and large-scale samples with SCAPE 2.0,” *Nat. Methods*, vol. 16, no. October, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0579-4.
- [31] R. Galland, G. Grenci, A. Aravind, V. Viasnoff, V. Studer, and J. B. Sibarita, “3D high-and super-resolution imaging using single-objective SPIM,” *Nat. Methods*, vol. 12, no. 7, pp. 641–644, 2015, doi: 10.1038/nmeth.3402.
- [32] E. Betzig *et al.*, “Three-dimensional tracking of plus-tips by lattice light-sheet microscopy permits the quantification of microtubule growth trajectories within the mitotic apparatus,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 20, no. 10, p. 1, 2015, doi: 10.1117/1.jbo.20.10.101206.
- [33] A. M. Valm *et al.*, “Applying systems-level spectral imaging and analysis to reveal the organelle interactome,” *Nature*, vol. 546, no. 7656, pp. 162–167, 2017, doi: 10.1038/nature22369.
- [34] D. M. Veltman *et al.*, “A plasma membrane template for macropinocytic cups,” *Elife*, vol. 5, pp. 1–24, 2016, doi: 10.7554/eLife.20085.
- [35] T. L. Liu *et al.*, “Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms,” *Science (80-.)*, vol. 360, no. 6386, 2018, doi: 10.1126/science.aaq1392.
- [36] F. Aguet *et al.*, “Membrane dynamics of dividing cells imaged by lattice light-sheet microscopy,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 22, pp. 3418–3435, 2016, doi: 10.1091/mbc.E16-03-0164.
- [37] A. F. David, P. Roudot, W. R. Legant, E. Betzig, G. Danuser, and D. W. Gerlich, “Augmin accumulation on long-lived microtubules drives amplification and kinetochore-directed growth,” *J. Cell Biol.*, vol. 218, no. 7, pp. 2150–2168, 2019.
- [38] J. Chen *et al.*, “Single-Molecule Dynamics of Enhanceosome Assembly in Embryonic Stem Cells,” *Cell*, vol. 156, no. March, pp. 1274–1285, 2014, doi: 10.1016/j.cell.2014.01.062.
- [39] W. R. Legant *et al.*, “High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes,” *Nat. Methods*, vol. 13, no. 4, pp. 359–365, 2016, doi: 10.1038/nmeth.3797.
- [40] M. Mir *et al.*, “Dynamic multifactor hubs interact transiently with sites of active transcription in *Drosophila* embryos,” *Elife*, vol. 7, pp. 1–27, 2018.
- [41] F. Wäldchen *et al.*, “Whole-cell imaging of plasma membrane receptors by 3D lattice light-sheet dSTORM,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–6, 2020, doi: 10.1038/s41467-020-14731-0.
- [42] R. Gao *et al.*, “Cortical column and whole-brain imaging with molecular contrast and nanoscale resolution,” *Science (80-.)*, vol. 363, no. 245, pp. 1–16, 2019, doi: 10.1126/science.aau8302.

- [43] A. T. Ritter *et al.*, “Actin Depletion Initiates Events Leading to Granule Secretion at the Immunological Synapse,” *Immunity*, vol. 42, no. 5, pp. 864–876, 2015, doi: 10.1016/j.immuni.2015.04.013.
- [44] M. Ducros *et al.*, “Lattice light sheet microscopy and photo-stimulation in brain slices,” 2019, doi: 10.1117/12.2509467.
- [45] C. Chen *et al.*, “The Applications of Lattice Light-Sheet Microscopy for Functional Volumetric Imaging of Hippocampal Neurons in a Three-Dimensional Culture System,” *Micromachines*, vol. 10, no. 9, pp. 1–15, 2019.
- [46] A. Omelchenko, N. K. Singh, and B. L. Firestein, “Current advances in in vitro models of CNS trauma,” *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, 2020, doi: 10.1016/j.cobme.2020.05.002.
- [47] A. M. Getz *et al.*, “High-resolution imaging and manipulation of endogenous AMPA receptor surface mobility during synaptic plasticity and learning,” *Sci. Adv.*, vol. 8, no. 30, p. 5298, 2022, doi: 10.1126/sciadv.abm5298.
- [48] B.-J. Hang, K. M. Dean, and R. Fiolka, “Systematic and quantitative comparison of lattice and Gaussian light-sheets,” *Opt. Express*, vol. 28, no. 18, pp. 27052–27077, 2020.
- [49] B.-J. Chang, M. Kittisopikul, K. M. Dean, P. Roudot, E. S. Welf, and R. Fiolka, “Universal Light-Sheet Generation with Field Synthesis Bo-Jui,” *Nat. Methods*, vol. 16, no. 3, pp. 235–238, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0327-9.Universal.
- [50] G. Liu *et al.*, “Characterization, comparison, and optimization of lattice light sheets,” *Sci. Adv.*, vol. 9, no. 13, pp. 1–66, 2023, doi: 10.1126/sciadv.ade6623.
- [51] S. W. Hell and J. Wichmann, “Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy,” *Opt. Lett.*, vol. 19, no. 11, p. 780, 1994, doi: 10.1364/ol.19.000780.
- [52] L. Schermelleh *et al.*, “Super-resolution microscopy demystified,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 21, no. 1, pp. 72–84, 2019, doi: 10.1038/s41556-018-0251-8.
- [53] M. G. L. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy,” *J. Microsc.*, vol. 198, no. 2, pp. 82–87, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x.
- [54] X. Huang *et al.*, “Fast , long-term , super-resolution imaging with Hessian structured illumination microscopy,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 36, no. April, pp. 451–459, 2018, doi: 10.1038/nbt.4115.
- [55] E. Betzig, “Proposed method for molecular optical imaging,” *Opt. Lett.*, vol. 20, no. 3, pp. 237–239, 1995.
- [56] M. Heilemann, E. Margeat, R. Kasper, M. Sauer, and P. Tinnefeld, “Carbocyanine Dyes as Efficient Reversible Single-Molecule Optical Switch,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, no. 11, pp. 3801–3086, 2005.
- [57] M. Bates, T. R. Blosser, and X. Zhuang, “Short-Range Spectroscopic Ruler Based on a Single-Molecule Optical Switch,” *Phys. Rev. Lett.*, vol. 108101, no. March, pp. 1–4, 2005, doi: 10.1103/PhysRevLett.94.108101.
- [58] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang, “Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical

- reconstruction microscopy (STORM),” *Nat. Methods*, vol. 3, no. 10, pp. 793–795, 2006, doi: 10.1038/nmeth929.
- [59] M. Heilemann *et al.*, “Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes,” *Angew. Chemie - Int. Ed.*, vol. 47, no. 33, pp. 6172–6176, 2008, doi: 10.1002/anie.200802376.
- [60] E. Betzig *et al.*, “Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution,” *Science (80-.)*, vol. 313, no. 5793, pp. 1642–1645, 2006, doi: 10.1126/science.1127344.
- [61] G. M. Hagen, P. Kr, J. Borkovec, and M. Ovesny, “ThunderSTORM: a comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging,” *Bioinformatics*, vol. 30, no. 16, pp. 2389–2390, 2014, doi: 10.1093/bioinformatics/btu202.
- [62] J. Schnitzbauer, M. T. Strauss, T. Schlichthaerle, F. Schueder, and R. Jungmann, “Super-resolution microscopy with DNA-PAINT,” *Nat. Protoc.*, vol. 12, no. 6, pp. 1198–1228, 2017, doi: 10.1038/nprot.2017.024.
- [63] A. Kechkar, D. Nair, M. Heilemann, D. Choquet, and J. Sibarita, “Real-Time Analysis and Visualization for Single-Molecule Based Super-Resolution Microscopy,” *PLoS One*, vol. 8, no. 4, pp. 1–10, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0062918.
- [64] A. Small and S. Stahlheber, “Fluorophore localization algorithms for super-resolution microscopy,” *Nat. Publ. Gr.*, vol. 11, no. 3, pp. 267–279, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2844.
- [65] M. Lelek *et al.*, “Single- molecule localization microscopy,” *Nat. Rev. Methods Prim.*, vol. 1, no. 39, pp. 1–27, 2021, doi: 10.1038/s43586-021-00038-x.
- [66] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason, “Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 91, no. 11, pp. 4258–4272, 2006, doi: 10.1529/biophysj.106.091116.
- [67] S. Mailfert *et al.*, “A Theoretical High-Density Nanoscopy Study Leads to the Design of UNLOC , a Parameter-free Algorithm,” *Biophys. J.*, vol. 115, no. 3, pp. 565–576, 2018, doi: 10.1016/j.bpj.2018.06.024.
- [68] S. Manley *et al.*, “High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 2, pp. 155–157, 2008, doi: 10.1038/nmeth.1176.
- [69] D. Lando *et al.*, “Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-A Cnp1 deposition occurs during G2 in fission yeast,” *Open Biol.*, vol. 2, pp. 1–10, 2012.
- [70] G. Prelich, “Gene Overexpression: Uses, Mechanisms, and Interpretation,” *Genetics*, vol. 190, no. 3, pp. 841–854, 2012, doi: 10.1534/genetics.111.136911.
- [71] A. Sharonov and R. M. Hochstrasser, “Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 50, pp. 18911–18916, 2006, doi: 10.1073/pnas.0609643104.
- [72] G. Giannone *et al.*, “Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density,” *Biophys. J.*, vol. 99, no. 4, pp. 1303–1310, 2010, doi: 10.1016/j.bpj.2010.06.005.
- [73] P. Y. R. Jungmann, M.S. Avendano, J.B. Woehrstein, M. Dai, W.M. Shih, “Multiplexed 3D

- Cellular Super-Resolution Imaging with DNA- PAINT and Exchange-PAINT,” *Physiol. Behav.*, vol. 176, no. 1, pp. 139–148, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2835.Multiplexed.
- [74] R. Van Wee, M. Filius, and C. Joo, “Completing the canvas: advances and challenges for DNA-PAINT super- resolution imaging,” *Trends Biochem. Sci.*, vol. 46, no. 11, pp. 1–13, 2021, doi: 10.1016/j.tibs.2021.05.010.
- [75] S. Sograte-idrissi *et al.*, “Circumvention of common labelling artefacts using secondary nanobodies,” *R. Soc. Chem.*, vol. 12, pp. 10226–10239, 2020, doi: 10.1039/d0nr00227e.
- [76] H. Deschout *et al.*, “Precisely and accurately localizing single emitters in fluorescence microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 3, pp. 253–266, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2843.
- [77] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb, “Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes,” *Biophys. J.*, vol. 82, no. 5, pp. 2775–2783, 2002, doi: 10.1016/S0006-3495(02)75618-X.
- [78] D. Burke, B. Patton, F. Huang, J. Bewersdorf, and M. J. Booth, “Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy,” *Optica*, vol. 2, no. 2, p. 177, 2015, doi: 10.1364/optica.2.000177.
- [79] L. von Diezmann, Y. Shechtman, and W. E. Moerner, “Three-Dimensional Localization of Single Molecules for Super-Resolution Imaging and Single-Particle Tracking,” *Chem. Rev.*, vol. 117, no. 11, pp. 7244–7275, 2017, doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00629.
- [80] M. F. Juetten *et al.*, “Three-dimensional sub – 100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 527–529, 2008, doi: 10.1038/NMETH.1211.
- [81] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang, “Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy,” *Science (80-.)*, vol. 319, no. 5864, pp. 810–813, 2008, doi: 10.1126/science.1153529.
- [82] I. Izeddin, M. El Beheiry, J. Andilla, D. Ciepielewski, X. Darzacq, and M. Dahan, “PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 5, p. 4957, 2012, doi: 10.1364/oe.20.004957.
- [83] S. Rama *et al.*, “Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 9, pp. 2995–2999, 2009, doi: 10.1073/pnas.0900245106.
- [84] A. Aristov, B. Lelandais, E. Rensen, and C. Zimmer, “ZOLA-3D allows flexible 3D localization microscopy over an adjustable axial range,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 2049, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1038/s41467-018-04709-4.
- [85] N. Bourg *et al.*, “Direct optical nanoscopy with axially localized detection,” *Nat. Photonics*, vol. 9, no. August, pp. 587–593, 2015, doi: 10.1038/nphoton.2015.132.
- [86] F. Balzarotti *et al.*, “Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes,” *Science (80-.)*, vol. 355, no. 6325, pp. 606–612, 2016.
- [87] P. Jouchet *et al.*, “Nanometric axial localization of single fluorescent molecules with modulated excitation,” *Nat. Photonics*, vol. 15, no. April, pp. 297–306, 2021, doi: 10.1038/s41566-020-00749-9.
- [88] P. Bon *et al.*, “Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue

- investigations,” *Nat. Methods*, vol. 15, pp. 449–454, 2018, doi: 10.1038/s41592-018-0005-3.
- [89] H. Ma, J. Xu, J. Jin, Y. Huang, and Y. Liu, “A Simple Marker-Assisted 3D Nanometer Drift Correction Method for Superresolution Microscopy,” *Biophys. J.*, vol. 112, no. 10, pp. 2196–2208, 2017, doi: 10.1016/j.bpj.2017.04.025.
- [90] J. Yi, A. Manna, V. A. Barr, J. Hong, K. C. Neuman, and J. Lippincott-schwartz, “madSTORM: a superresolution technique for large-scale multiplexing at single-molecule accuracy,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 27, no. 22, pp. 3591–3600, 2016, doi: 10.1091/mbc.E16-05-0330.
- [91] Y. Wang, J. Schnitzbauer, Z. Hu, X. Li, and Y. Cheng, “Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm,” *Opt. Express*, vol. 22, no. 13, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1364/OE.22.015982.
- [92] S. H. Lee *et al.*, “Using fixed fiduciary markers for stage drift correction,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 11, pp. 5090–5096, 2012.
- [93] R. Megorty, D. Kamiyama, and B. Huang, “Active microscope stabilization in three dimensions using image correlation,” *Opt. Nanoscopy*, vol. 2, no. 3, pp. 1–7, 2013.
- [94] F. C. Zanicchi *et al.*, “Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples,” *Nat. Methods*, vol. 8, no. 12, pp. 1047–1050, 2011, doi: 10.1038/NMETH.1744.
- [95] J. C. M. Gebhardt *et al.*, “Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells,” *Nat. Methods*, vol. 10, no. February, pp. 421–426, 2013, doi: 10.1038/nmeth.2411.
- [96] Y. S. Hu *et al.*, “Light-sheet Bayesian microscopy enables deepcell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells,” *Opt. Nanoscopy*, vol. 2, no. 7, pp. 1–12, 2013, doi: 10.1186/2192-2853-2-7.
- [97] A. Gustavsson, P. N. Petrov, M. Y. Lee, Y. Shechtman, and W. E. Moerner, “3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet,” *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 123, pp. 1–8, 2018, doi: 10.1038/s41467-017-02563-4.
- [98] J. Kim *et al.*, “Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals,” *Nat. Methods*, vol. 16, pp. 853–857, 2019, doi: 10.1038/s41592-019-0510-z.
- [99] S.-T. Hung *et al.*, “SOLEIL: single-objective lens inclined light sheet localization microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 13, no. 6, pp. 3275–3294, 2022.
- [100] Q. Zhang *et al.*, “Adaptive optics for optical microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 14, no. 4, p. 1732, 2023, doi: 10.1364/boe.479886.
- [101] M. Malivert *et al.*, “Active image optimization for lattice light sheet microscopy in thick samples,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 13, no. 12, p. 6211, 2022, doi: 10.1364/boe.471757.
- [102] S. Hell, G. Reiner, C. Cremer, and E. H. K. Stelzer, “Aberrations in confocal fluorescence microscopy induced by mismatches in refractive index,” *J. Microsc.*, vol. 1, no. iii, 1993.
- [103] M. J. Booth, M. A. A. Neil, and T. Wilson, “Aberration correction for confocal imaging in refractive-index-mismatched media,” *J. Microsc.*, vol. 192, no. 2, pp. 90–98, 1998, doi: 10.1111/j.1365-2818.1998.99999.x.

- [104] M. J. Booth and T. Wilson, "Strategies for the compensation of specimen-induced spherical aberration in confocal microscopy of skin," *J. Microsc.*, vol. 200, no. October, pp. 68–74, 2000.
- [105] L. Silvestri, L. Sacconi, and F. S. Pavone, "Correcting spherical aberrations in confocal light sheet microscopy: A theoretical study," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 77, no. 7, pp. 483–491, 2014, doi: 10.1002/jemt.22330.
- [106] R. Turcotte, Y. Liang, and N. Ji, "Adaptive optical versus spherical aberration corrections for in vivo brain imaging," *Biomed. Opt. Express*, vol. 8, no. 8, p. 3891, 2017, doi: 10.1364/boe.8.003891.
- [107] R. Khan, B. Gul, S. Khan, H. Nisar, and I. Ahmad, "Refractive index of biological tissues : Review , measurement techniques , and applications," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 33, no. January, p. 102192, 2021, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102192.
- [108] G. J. Tearney, "Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography," *Opt. Lett.*, vol. 20, no. 21, pp. 2258–2260, 1995.
- [109] F. P. Bolin, L. E. Preuss, R. C. Taylor, and R. J. Ference, "Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method," *Opt. Soc. Am.*, vol. 28, no. 12, pp. 2297–2303, 1989.
- [110] A. J. mer. Welch and M. J. C. van Gemert, *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue*. 2011.
- [111] M. Schwertner, M. J. Booth, M. A. A. Neil, and T. Wilson, "Measurement of specimen-induced aberrations of biological samples using phase stepping interferometry," *J. Microsc.*, vol. 213, no. 1, pp. 11–19, 2004, doi: 10.1111/j.1365-2818.2004.01267.x.
- [112] M. Schwertner, M. J. Booth, and T. Wilson, "Characterizing specimen induced aberrations for high NA adaptive optical microscopy," *Opt. Express*, vol. 12, no. 26, p. 6540, 2004, doi: 10.1364/opex.12.006540.
- [113] H. W. Babcock, "The Possibility of Compensating Astronomical Seeing," *Astron. Soc. Pacific*, vol. 65, no. 386, pp. 229–236, 1953.
- [114] J. W. Hardy, "Active Optics: A New Technology For The Control Of Light," 1977.
- [115] R. Tyson, *Principles of Adaptive Optics*. 2011.
- [116] E. Akyol and A. M. Hagag, "Adaptive optics : principles and applications in ophthalmology," *Eye*, vol. 35, pp. 244–264, 2021, doi: 10.1038/s41433-020-01286-z.
- [117] J. Hartmann, "Objektivuntersuchungen," *Zeitschrift für Instrumentenkde*, vol. 25, no. 1, 1904.
- [118] R. Shack and B. Platt, "Production and use of a lenticular Hartmann screen," *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 61, pp. 656–660, 1971.
- [119] S. Thomas, T. Fusco, A. Tokovinin, M. Nicolle, V. Michau, and G. Rousset, "Comparison of centroid computation algorithms in a Shack-Hartmann sensor," *Mon. Not. R. Astron. Soc.*, vol. 371, no. 1, pp. 323–336, 2006, doi: 10.1111/j.1365-2966.2006.10661.x.
- [120] V. Akondi and A. Dubra, "Multi-layer Shack-Hartmann wavefront sensing in the point source regime," *Biomed. Opt. Express*, vol. 12, no. 1, p. 409, 2021, doi: 10.1364/boe.411189.

- [121] O. Azucena *et al.*, “Wavefront aberration measurements and corrections through thick tissue using fluorescent microsphere reference beacons,” *Opt. Express*, vol. 18, no. 16, p. 17521, 2010, doi: 10.1364/oe.18.017521.
- [122] K. Wang *et al.*, “Rapid adaptive optical recovery of optimal resolution over large volumes,” *Nat. Met.*, vol. 11, no. 6, 2014, doi: 10.1038/nmeth.2925.
- [123] A. Hubert *et al.*, “Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star,” *Opt. Lett.*, vol. 44, no. 10, p. 2514, 2019, doi: 10.1364/ol.44.002514.
- [124] A. Hubert *et al.*, “Enhanced neuroimaging with a calcium sensor in ex-vivo *Drosophila melanogaster* brains using closed-loop adaptive optics light-sheet fluorescence microscopy,” *J. Biomed. Opt.*, vol. 28, no. 06, pp. 1–12, 2023, doi: 10.1117/1.jbo.28.6.066501.
- [125] K. Hampson *et al.*, “Adaptive optics for high-resolution imaging,” *Nat. Rev. Methods Prim.*, pp. 1–53, 2022, doi: 10.1038/s43586-021-00066-7.Adaptive.
- [126] A. Peinado, E. Bendek, S. Yokoyama, and K. E. Poskanzer, “Deformable mirror-based axial scanning for two-photon mammalian brain imaging,” *Neurophotonics*, vol. 8, no. 01, pp. 1–18, 2021, doi: 10.1117/1.nph.8.1.015003.
- [127] P. Baudoz, “Acheter un miroir déformable,” *Photoniques*, pp. 43–48, 2016.
- [128] K. Banerjee, P. Rajaeipour, Ç. Ataman, and H. Zappe, “Optofluidic adaptive optics,” *Appl. Opt.*, vol. 57, no. 22, pp. 6338–6344, 2018.
- [129] P. Pozzi, M. Quintavalla, A. B. Wong, J. G. G. Borst, S. Bonora, and M. Verhaegen, “Plug-and-play adaptive optics for commercial laser scanning fluorescence microscopes based on an adaptive lens,” *Opt. Lett.*, vol. 45, no. 13, p. 3585, 2020, doi: 10.1364/ol.396998.
- [130] S. Bonora *et al.*, “Wavefront correction and high-resolution in vivo OCT imaging with an objective integrated multi-actuator adaptive lens,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 17, p. 21931, 2015, doi: 10.1364/oe.23.021931.
- [131] Z. Li *et al.*, “Fast widefield imaging of neuronal structure and function with optical sectioning in vivo,” *Sci. Adv.*, vol. 6, no. 19, pp. 1–13, 2020, doi: 10.1126/sciadv.aaz3870.
- [132] N. Ji, D. E. Milkie, and E. Betzig, “Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues,” *Nat. Methods*, vol. 7, no. 2, pp. 141–147, 2010, doi: 10.1038/nmeth.1411.
- [133] D. E. Milkie, E. Betzig, and N. Ji, “Pupil-segmentation-based adaptive optical microscopy with full-pupil illumination,” *Opt. Lett.*, vol. 36, no. 21, p. 4206, 2011, doi: 10.1364/ol.36.004206.
- [134] C. Wang *et al.*, “Multiplexed aberration measurement for deep tissue imaging in vivo,” *Nat. Methods*, vol. 11, no. 10, pp. 1037–1040, 2014, doi: 10.1038/nmeth.3068.
- [135] R. A. Gonsalves, “Phase retrieval and diversity in adaptive optics,” *Opt. Eng.*, vol. 21, no. 5, pp. 19–22, 1982, doi: 10.1117/12.7972989.
- [136] J. Antonello and M. Verhaegen, “Modal-based phase retrieval for adaptive optics,” *J. Opt. Soc. Am. A*, vol. 32, no. 6, p. 1160, 2015, doi: 10.1364/josaa.32.001160.
- [137] B. M. Hanser, M. G. L. Gustafsson, D. A. Agard, and J. W. Sedat, “Phase-retrieved pupil

- functions in wide-field fluorescence microscopy,” *J. Microsc.*, vol. 216, no. 1, pp. 32–48, 2004, doi: 10.1111/j.0022-2720.2004.01393.x.
- [138] D. Débarre, T. Vieille, and E. Beaurepaire, “Simple characterisation of a deformable mirror inside a high numerical aperture microscope using phase diversity,” *J. Microsc.*, vol. 244, no. 2, pp. 136–143, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2818.2011.03518.x.
- [139] A. Facomprez, E. Beaurepaire, and D. Débarre, “Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 3, p. 2598, 2012, doi: 10.1364/oe.20.002598.
- [140] D. Débarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson, “Image-based adaptive optics for two-photon microscopy,” vol. 34, no. 16, pp. 2495–2497, 2009.
- [141] J. Zeng, P. Mahou, M.-C. Schanne-Klein, E. Beaurepaire, and D. Débarre, “3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 3, no. 8, p. 1898, 2012, doi: 10.1364/boe.3.001898.
- [142] C. Bourgenot, C. D. Saunter, J. M. Taylor, J. M. Girkin, and G. D. Love, “3D adaptive optics in a light sheet microscope,” *Opt. Express*, vol. 20, no. 12, p. 13252, 2012, doi: 10.1364/oe.20.013252.
- [143] D. Debarre, M. J. Booth, and T. Wilson, “Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies,” *Opt. Express*, vol. 15, no. 13, p. 8176, 2007, doi: 10.1364/oe.15.008176.
- [144] L. A. Royer *et al.*, “Adaptive light-sheet microscopy for long-term , high- resolution imaging in living organisms,” *Nat. Biotechnol.*, no. October, 2016, doi: 10.1038/nbt.3708.
- [145] T. J. Gould, D. Burke, J. Bewersdorf, and M. J. Booth, “Adaptive optics enables 3D STED microscopy in aberrating specimens,” *Opt. Soc. Am.*, vol. 20, no. 19, pp. 17137–17142, 2012.
- [146] M. J. Mlodzianoski *et al.*, “Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections,” *Nat. Methods*, vol. 15, no. 8, pp. 583–586, 2018, doi: 10.1038/s41592-018-0053-8.
- [147] M. E. Siemons, N. A. K. Hanemaaijer, M. H. P. Kole, and L. C. Kapitein, “Robust adaptive optics for localization microscopy deep in complex tissue,” *Nat. Commun.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–9, 2021, doi: 10.1038/s41467-021-23647-2.
- [148] A. J. Wright, D. Burns, B. A. Patterson, S. P. Poland, G. J. Valentine, and J. M. Girkin, “Exploration of the optimisation algorithms used in the implementation of adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy,” *Microsc. Res. Tech.*, vol. 67, no. 1, pp. 36–44, 2005, doi: 10.1002/jemt.20178.
- [149] S. P. Poland, A. J. Wright, and J. M. Girkin, “Evaluation of fitness parameters used in an iterative approach to aberration correction in optical sectioning microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 47, no. 6, pp. 731–736, 2008, doi: 10.1364/AO.47.000731.
- [150] K. F. Tehrani, J. Xu, Y. Zhang, P. Shen, and P. Kner, “Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) using a genetic algorithm,” *Opt. Express*, vol. 23, no. 10, p. 13677, 2015, doi: 10.1364/oe.23.013677.
- [151] Y. Jin *et al.*, “Machine learning guided rapid focusing with sensor-less aberration corrections,” *Opt. Express*, vol. 26, no. 23, p. 30162, 2018, doi: 10.1364/oe.26.030162.

- [152] D. Saha *et al.*, “Practical sensorless aberration estimation for 3D microscopy with deep learning,” *Opt. Express*, vol. 28, no. 20, p. 29044, 2020, doi: 10.1364/oe.401933.
- [153] F. Wang *et al.*, “Phase imaging with an untrained neural network,” *Light Sci. Appl.*, vol. 9, no. 1, 2020, doi: 10.1038/s41377-020-0302-3.
- [154] E. Bostan, R. Heckel, M. Chen, M. Kellman, and L. Waller, “Deep phase decoder: self-calibrating phase microscopy with an untrained deep neural network,” *Optica*, vol. 7, no. 6, p. 559, 2020, doi: 10.1364/optica.389314.
- [155] Q. Hu *et al.*, “Universal adaptive optics for microscopy through embedded neural network control,” 2023, [Online]. Available: <http://arxiv.org/abs/2301.02647>.
- [156] M. R. Rai, C. Li, H. T. Ghashghaei, and A. Greenbaum, “Deep learning-based adaptive optics for light sheet fluorescence microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 14, no. 6, p. 2905, 2023, doi: 10.1364/boe.488995.
- [157] M. Weigert *et al.*, “Content-aware image restoration: pushing the limits of fluorescence microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 15, no. November, pp. 1090–1097, 2018, doi: 10.1038/s41592-018-0216-7.
- [158] F. Deng *et al.*, “Real-time denoising enables high-sensitivity fluorescence time-lapse imaging beyond the shot-noise limit,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 41, no. February, pp. 282–292, 2023, doi: 10.1038/s41587-022-01450-8.
- [159] M. R. Rai, C. Li, and A. Greenbaum, “Quantitative analysis of illumination and detection corrections in adaptive light sheet fluorescence microscopy,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 13, no. 5, p. 2960, 2022, doi: 10.1364/boe.454561.
- [160] L. A. Royer *et al.*, “Adaptive light-sheet microscopy for long-term, high-resolution imaging in living organisms,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 34, no. 12, pp. 1267–1278, 2016, doi: 10.1038/nbt.3708.
- [161] L. A. Royer, W. C. Lemon, R. K. Chhetri, and P. J. Keller, “A practical guide to adaptive light-sheet microscopy,” *Nat. Protoc.*, vol. 13, no. 11, pp. 2462–2500, 2018, doi: 10.1038/s41596-018-0043-4.
- [162] D. Turaga and T. E. Holy, “Aberrations and their correction in light-sheet microscopy: a low-dimensional parametrization,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 4, no. 9, p. 1654, 2013, doi: 10.1364/boe.4.001654.
- [163] D. Wilding, P. Pozzi, O. Soloviev, G. Vdovin, and M. Verhaegen, “Adaptive illumination based on direct wavefront sensing in a light-sheet fluorescence microscope,” *Opt. Express*, vol. 24, no. 22, p. 24896, 2016, doi: 10.1364/oe.24.024896.
- [164] D. Turaga and T. E. Holy, “Image-based calibration of a deformable mirror in wide-field microscopy,” *Appl. Opt.*, vol. 49, no. 11, pp. 2030–2040, 2010, doi: 10.1364/AO.49.002030.
- [165] T. F. Holekamp, D. Turaga, and T. E. Holy, “Fast Three-Dimensional Fluorescence Imaging of Activity in Neural Populations by Objective-Coupled Planar Illumination Microscopy,” *Neuron*, vol. 57, no. 5, pp. 661–672, 2008, doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.011.
- [166] C. Li, M. R. Rai, H. T. Ghashghaei, and A. Greenbaum, “Illumination angle correction during image acquisition in light-sheet fluorescence microscopy using deep learning,” *Biomed. Opt. Express*, vol. 13, no. 2, pp. 888–901, 2022.

- [167] M. Booth, D. Andrade, D. Burke, B. Patton, and M. Zurauskas, “Aberrations and adaptive optics in super-resolution microscopy,” *Microscopy*, vol. 64, no. 4, pp. 251–261, 2015, doi: 10.1093/jmicro/dfv033.
- [168] V. Navikas, A. C. Descloux, K. S. Grussmayer, S. Marion, and A. Radenovic, “Adaptive optics enables multimode 3D super-resolution microscopy via remote focusing,” *Nanophotonics*, vol. 10, no. 9, pp. 2451–2458, 2021, doi: 10.1515/nanoph-2021-0108.
- [169] S. Park *et al.*, “Label-free adaptive optics single-molecule localization microscopy for whole zebra fish,” *Nat. Commun.*, vol. 14, no. October, pp. 1–11, 2023, doi: 10.1038/s41467-023-39896-2.
- [170] S. Te Hung *et al.*, “Adaptive optics in single objective inclined light sheet microscopy enables three-dimensional localization microscopy in adult *Drosophila* brains,” *Front. Neurosci.*, vol. 16, 2022, doi: 10.3389/fnins.2022.954949.
- [171] C. Butler, “Quantitative single molecule imaging deep in biological samples using adaptive optics,” 2018.
- [172] H. Forrière, “Microscopie par Localisation de Molécules Individuelles en Profondeur Utilisant la Technologie soSPIM et l’Optique Adaptative,” 2021.

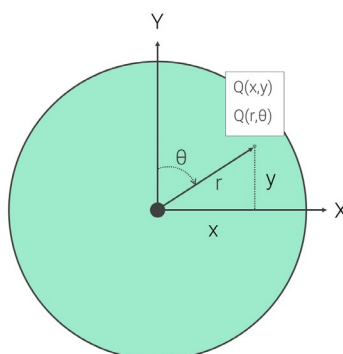
Annexes

Annexe 1 : Description d'un front d'onde dans le formalisme de Zernike

Un front d'onde en coordonnées polaires, $W(r, \theta)$ ($\mu\text{m RMS}$ ou rad) est exprimé comme une somme de polynômes Z , d'amplitude C :

$$W(r, \theta) = \sum_{n,m} C_n^m Z_n^m(r, \theta)$$

La Figure suivante illustre les coordonnées utilisées pour la démonstration :



Chaque polynôme de Zernike est défini par sa fonction radiale, R_n^m ; qui sert à moduler l'amplitude en fonction de la distance radiale r du disque, et la fonction angulaire ; utilisée pour décrire la dépendance angulaire de cette amplitude selon θ :

$$Z_n^m(r, \theta) = R_n^m(r) \cos(m\theta), \text{ si } m \leq 0$$

$$Z_n^{-m}(r, \theta) = R_n^m(r) \sin(m\theta), \text{ si } m > 0$$

où, r est compris entre 0 et 1, θ , mesuré dans le sens horaire selon l'axe vertical Y et $R_n^m(r)$:

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

où, m est la fréquence angulaire et n , un entier positif correspondant à l'ordre radial.

Une normalisation permet de satisfaire la condition $R_n^{\pm m}(1) = 1$ pour toutes les valeurs de n et m , de tel sorte que les fonctions deviennent :

$$Z_n^m(r, \theta) = \sqrt{\frac{2(n+1)}{1+\delta_{m0}}} R_n^m(r) \cos(m\theta), \text{ si } m \leq 0$$

$$Z_n^{-m}(r, \theta) = \sqrt{\frac{2(n+1)}{1+\delta_{m0}}} R_n^m(r) \sin(m\theta), \text{ si } m > 0$$

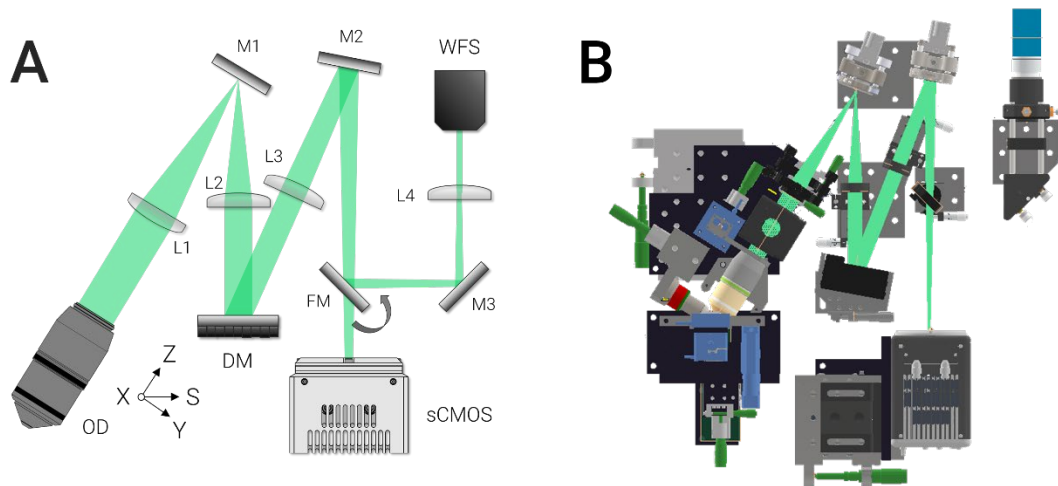
avec, δ_{m0} , le coefficient de Kronecker ($\delta_{m0} = 0$ si $m \neq 0$, $\delta_{m0} = 1$ si $m = 0$).

Une façon commune de mesurer la déformation globale d'un front d'onde W est de mesurer l'erreur quadratique moyenne (RMS, de l'anglais « Root Mean Square ») par rapport à une surface plane sans aberrations :

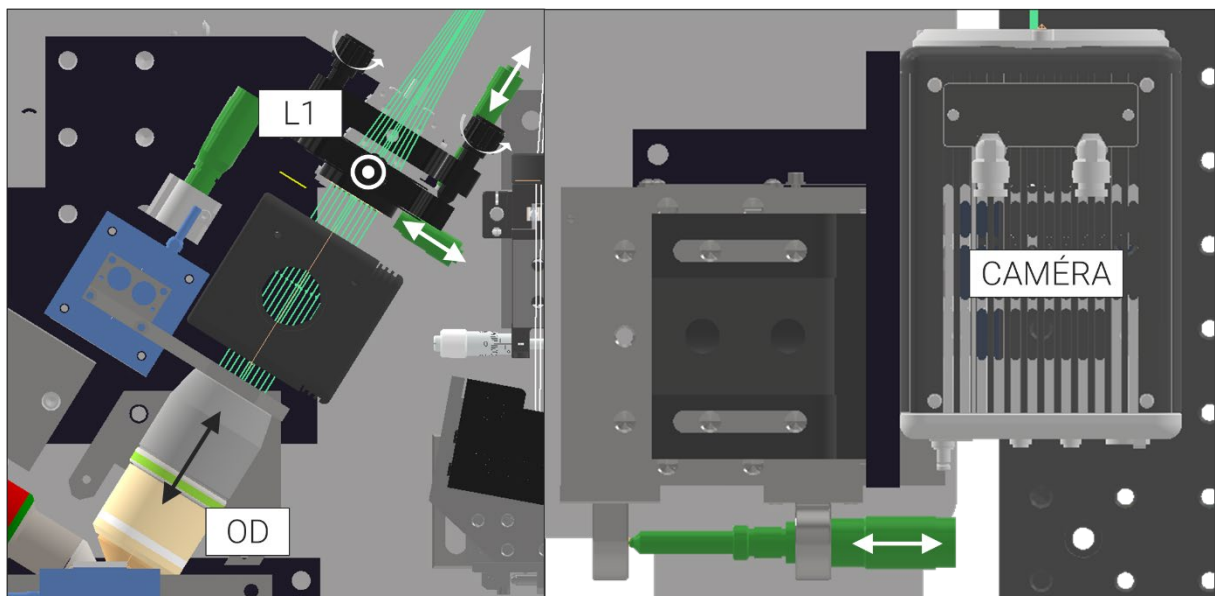
$$\sigma_{RMS} = \sqrt{\frac{1}{A} \int_{pupille} (W - \bar{W})^2 \cdot dx dy} = \sqrt{\sum_{(n,m) \neq (0,0)}^N C_{nm}^2}$$

où, A est l'aire de la pupille et \bar{W} est la différence moyenne de front d'onde. La variance s'exprime également avec la somme des coefficients appliqués à chacun des polynômes et s'exprime en μm ou en fraction de longueur d'onde.

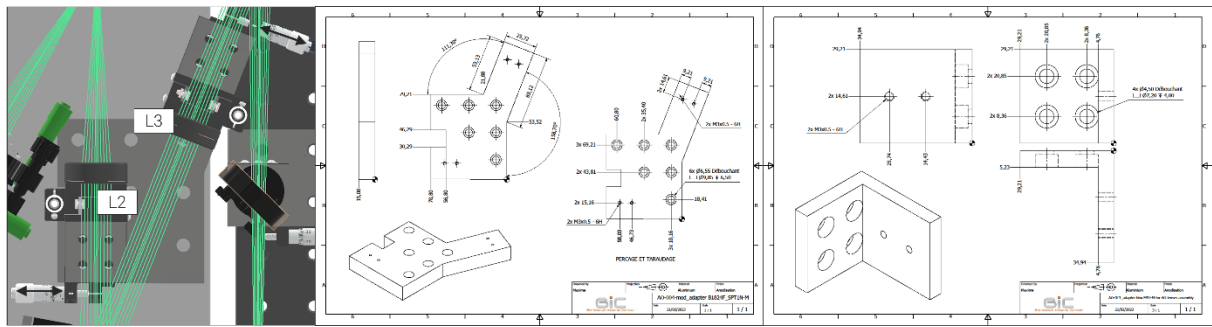
Annexe 2 : Montage optomécanique de l'AO dans le LLSM - Plan des pièces et degrés de liberté



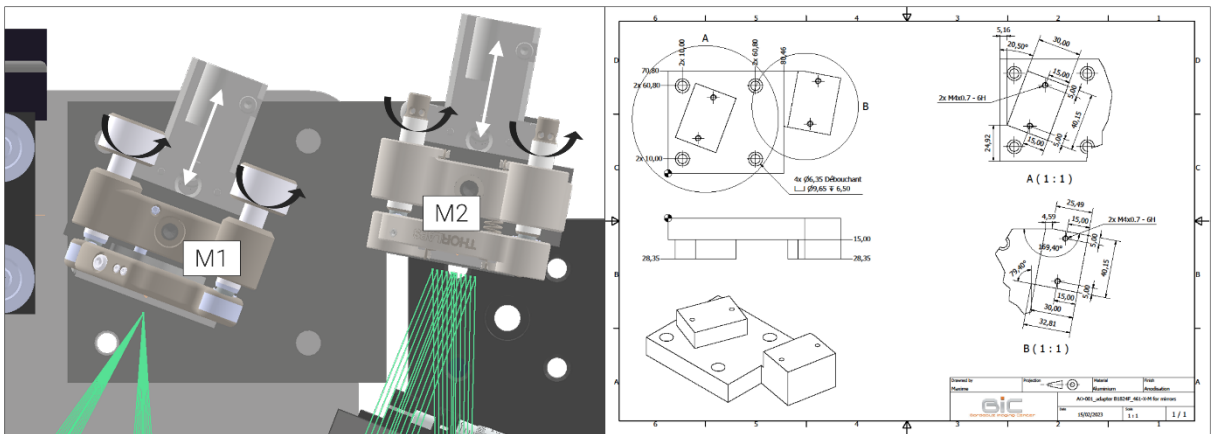
A. Schéma optique du chemin de détection du microscope à feuille de lumière « lattice » intégrant l'optique adaptative. B. Représentation 3D associée.



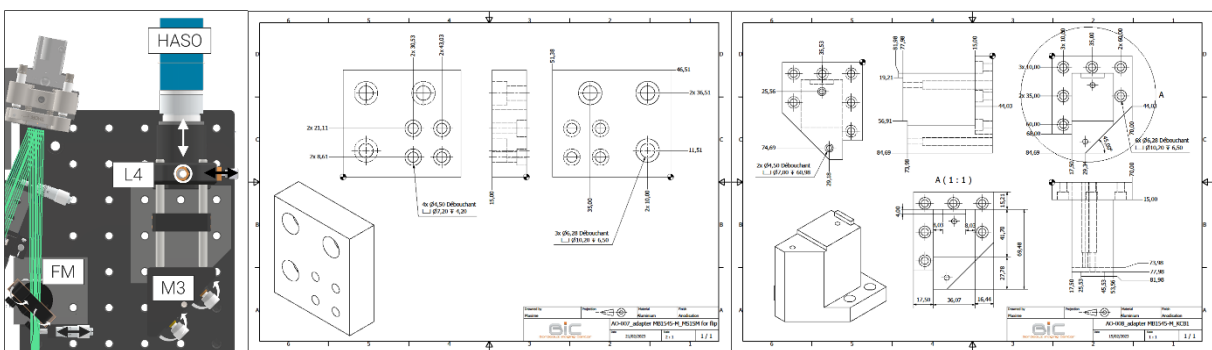
Degrés de liberté de l'objectif de détection (OD), de la lentille L1 et de la caméra (non modifiée).



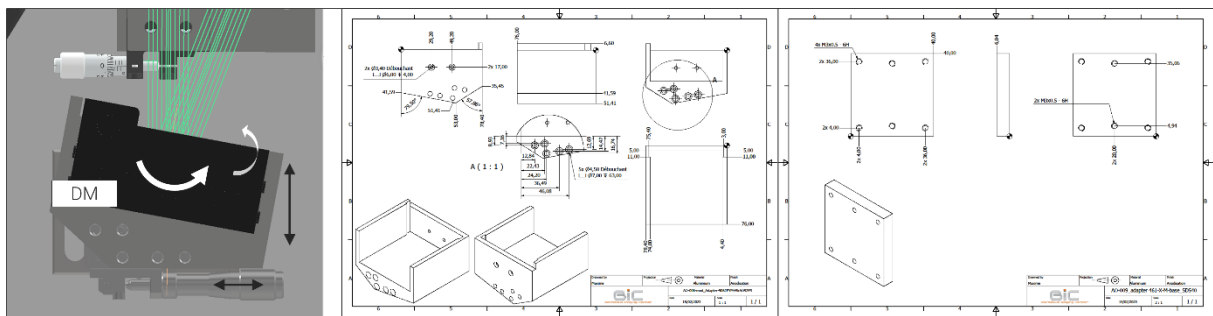
Degrés de libertés des lentilles L2 et L3 et dessins techniques des pièces de jonction conçues.



Degrés de libertés des miroirs M1 et M2 et dessins techniques des pièces de jonction conçues.



Degrés de libertés du « flip » miroir (FM) et des optiques (miroir M3 et lentille L4) menant à l'analyseur de front d'onde (HASO) et dessins techniques des pièces de jonction conçues.



Degrés de liberté du miroir déformable (DM) et dessins techniques des pièces de jonction conçues.

Annexe 3 : Procédure de montage et d'alignement des optiques du bras de détection

Le montage du chemin AO se réalise à l'aide de la visualisation du faisceau de Bessel en fluorescence. Une solution fluorescente concentrée est utilisée comme milieu d'imagerie. L'alignement consiste dans un premier temps à monter l'ensemble des surfaces réfléchissantes entre l'objectif et la caméra (M1, M2, et M4), de placer (« tip-tilt » pour M1 et M2, « pitch-yaw » pour M4), à l'œil nu, le faisceau imagé au centre de chaque optique, jusqu'à imager le faisceau au centre du FOV de la caméra (précisément placée selon les plans 3D). Ensuite, les lentilles sont itérativement montées de L4 à L1 en s'assurant, à chaque étape, de replacer le faisceau de Bessel au centre du FOV à l'aide des translations de la lentille. Enfin, l'intensité du faisceau est maximisée à l'aide de la translation du couple objectif-L1, puis les cinq degrés de liberté du faisceau sont corrigés de telle sorte à placer la feuille sur le plan focal de l'objectif, sans rotation. Pour cette dernière étape, il convient de légèrement corriger l'entrée du faisceau dans l'objectif d'excitation.

Une fois les optiques montées et grossièrement alignées, il faut corriger les artefacts de l'image liés aux légères déviations du faisceau le long de l'axe optique. La solution fluorescente est remplacée par un échantillon contenant des billes fluorescentes de 170 nm de diamètre, imagées pour obtenir la PSF du système. Le « tip-tilt » de la lentille L1 permet de corriger un éventuel astigmatisme. Le décalage de l'angle de réflexion selon l'axe de rotation X' du miroir M2, combiné au déplacement de la caméra selon l'axe S , permettent de modifier l'angle d'incidence des photons sur la surface sensible de la caméra et d'homogénéiser la PSF.

Ensuite, le faisceau de Bessel est recentré au centre de la caméra (en jouant sur l'entrée du faisceau dans l'objectif d'excitation), puis le sous-ensemble comprenant le WFS est placé. En utilisant le miroir « flip », le miroir M3, la translation XY de F75 et la translation Z du HASO, le faisceau de Bessel est focalisé sur la matrice de microlentille est imagée sur la pupille.

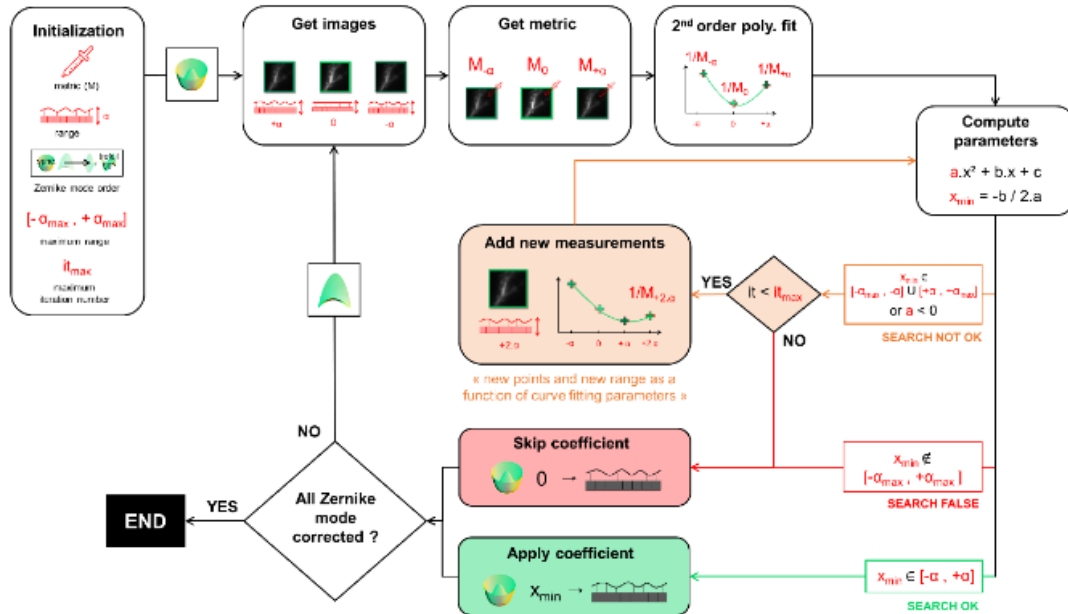
Pour terminer, le miroir M4 est remplacé par le DM. Le remplacement engendre un décalage des angles de réflexion, compensés en remplaçant le faisceau de Bessel à l'aide des platines « pitch-yaw » à la base du bloc.

Annexe 4 : Alignement de la feuille de lumière en routine

Bien qu'une fois monté et aligné le système soit parfaitement aligné, il est important de vérifier régulièrement l'alignement de la LS et les caractéristiques de la PSF. En effet, les optiques n'étant pas complètement protégées, les variations de température et/ou les perturbations extérieures peuvent conduire à un désalignement minimal, mais constant. De plus, il est obligatoire de corriger la position de la LS lorsque les conditions expérimentales changent entre deux manipulations. L'utilisation d'un milieu d'imagerie avec une température différente entraîne une variation des indices de réfraction, décalant le faisceau d'excitation.

Cet alignement consiste principalement à corriger la position de la LS en deux étapes. Premièrement, les degrés de liberté d'entrée de la feuille dans l'objectif d'excitation sont modifiés en visualisant le faisceau de Bessel. Cette correction permet de corriger manuellement la position de la feuille. Dans un second temps, la feuille de lumière est plus précisément focalisée en fonction de la longueur d'onde. Une bille est imagée dans la longueur d'onde souhaitée et un « autofocus » est réalisé en translatant individuellement et successivement la feuille et l'objectif de détection selon l'axe optique de ce dernier. Le plan d'intensité maximum de chaque pile d'images est sondé et le décalage est traduit en « offset » appliqué à un galvanomètre Z qui contrôle la position de la feuille selon l'axe optique.

Annexe 5 : Algorithme 3N+



- i. Une première phase "Initialisation" fixe les paramètres de l'algorithme 3N+ : la métrique mesurée (M), l'amplitude appliquée sur le miroir (plage α), le nombre et l'ordre des modes de Zernike sélectionnés, la limite de recherche du coefficient sur l'ajustement ($[-\alpha_{\max}, +\alpha_{\max}]$) et le nombre maximum d'itérations (it_{\max}) dans le cas de nouvelles mesures qui est une spécificité de notre algorithme 3N+.
- ii. Une aberration est sélectionnée et trois images sont acquises en fonction de l'amplitude appliquée ("Get images"). Ces images sont successivement transférées du logiciel du microscope au logiciel de contrôle de l'AO et trois valeurs de métriques sont mesurées ($M_{-\alpha}$, M_0 , $M_{+\alpha}$) et l'ajustement polynomial de second ordre est calculé sur les valeurs inverses ($1/M_{-\alpha}$, $1/M_0$, $1/M_{+\alpha}$). À ce stade, la courbure (a) et la position du coefficient optimisé (x_{\min}) sont mesurées ("Compute parameters").
- iii. Si x_{\min} est en dehors de la plage $[\alpha, -\alpha]$ ou si la courbure " a " est positive (cas "SEARCH NOT OK"), de nouveaux points sont ajoutés aux mesures précédentes. L'amplitude appliquée au DM et le nombre de nouvelles mesures varient en fonction des paramètres d'ajustement calculés. En outre, le nombre de nouvelles itérations est limité par it_{\max} . Si x_{\min} est en dehors de la plage maximale (cas "SEARCH FALSE"), la correction du mode de Zernike est

interrompue et aucun coefficient n'est appliqué sur DM. Si x_{\min} est trouvé dans la plage mesurée (cas "RECHERCHE OK"), le coefficient x_{\min} est appliqué sur DM.

Passé cette étape, l'algorithme vérifie si toutes les aberrations ont été traitées avant de s'arrêter ("Tous les modes de Zernike corrigés ?"). Si ce n'est pas le cas, il recommence le même processus sur les modes de Zernike suivants jusqu'au dernier.