PSL UNIVERSITÉ PARIS

THÈSE DE DOCTORAT

DE L'UNIVERSITÉ PSL

Préparée à l'Observatoire de Paris - PSL

Analyse et correction des aberrations par optique adaptative pour un microscope d'imagerie biologique de fluorescence

Soutenue par

Jean Commère

Le 17/12/2026

École doctorale n°127

Astronomie et Astrophysique d'Île-de-France

Spécialité

Astronomie et Astrophysique

Composition du jury :

Coralie Neiner	Directrice de recherche, CNRS	*Présidente*
Loïc Le Goff	Chargé de recherche, CNRS	*Rapporteur*
Pedro Mecê	Chargé de recherche, CNRS	*Rapporteur*
Caroline Kulcsar	Professeure, Institut d'Optique Graduate School	*Examinatrice*
Fabrice Harms	Coordinateur scientifique, Imagine Optic	*Examinateur*
Sandrine Thomas	Directrice adjointe des opérations, Rubin Observatory	*Examinatrice*
Jonathan Bradley	Chargé de recherche, Inserm	*Directeur de thèse*
Raphaël Galicher	Maître de conférences, Université Paris Cité	*Directeur de thèse*

LIRA Observatoire de Paris | PSL

Résumé

La visualisation des circuits neuronaux dans des cerveaux de rongeur clarifiés, entiers, et marqués en fluorescence est une méthode couramment utilisée en neuroscience, par exemple, pour l'étude des maladies neurodégénératives. La microscopie confocale est une des méthodes phare pour en effectuer l'imagerie. Si la clarification des cerveaux permet d'en retirer la majorité des structures diffusantes, le cerveau clarifié conserve néanmoins des inhomogénéités d'indice de réfraction qui induisent des aberrations optiques. Ces aberrations dégradent la qualité d'imagerie, en particulier en profondeur.

L'optique adaptative est une technique de correction des aberrations optiques qui peut a priori permettre de retrouver une meilleure qualité d'image en profondeur. Dans ce manuscrit je présente la conception, la réalisation et la caractérisation d'un microscope confocal avec optique adaptative adapté à l'imagerie de cerveaux clarifiés de rongeur. L'optique adaptative implémentée est basée sur l'utilisation d'un analyseur de surface d'onde. Deux types d'analyseur sont utilisés : l'analyseur Shack-Hartmann et l'analyseur Pyramide. J'étudie les conséquences de l'illumination confocale sur les performances de ces deux types d'analyseurs. Je donne également une présentation du logiciel de contrôle de l'optique adaptative dont le développement, initié avant ma thèse, c'est poursuivi pendant celle-ci. J'ai également développé un logiciel de ray tracing dont je fais la présentation et dont je me sers pour caractériser l'instrument. Je présente, pour finir, les premières mesures d'aberrations en transmission effectuées pour établir l'amplitude des aberrations introduites par des échantillons de cerveaux clarifiés.

Le microscope que j'ai développé (optique, mécanique, logiciel de contrôle) sera utilisé pour obtenir des images de cerveaux de rongeur avec une haute résolution spatiale. Les résultats présentés dans ce manuscrit (simulations numériques, et résultats expérimentaux) pourront aussi être utilisés pour améliorer le montage optique.

Abstract

Visualizing neural circuits in whole, clarified, and fluorescently labeled rodent brains is a commonly used method in neuroscience, for example, in the study of neurodegenerative diseases. Confocal microscopy is one of the leading methods for imaging these circuits. While brain clarification removes most scattering structures, the clarified brain nevertheless retains inhomogeneities in refractive index that cause optical aberrations. These aberrations degrade image quality, particularly in depth.

Adaptive optics is a technique for correcting optical aberrations that, in theory, can improve image quality in depth. In this manuscript, I present the design, construction, and characterization of a confocal microscope with adaptive optics suited for imaging clarified rodent brains. The implemented adaptive optics system is based on the use of a wavefront analyzer. Two types of analyzers are used : the Shack-Hartmann analyzer and the Pyramid analyzer. I investigate the consequences of confocal illumination on the performance of these two types of analyzers. I also present the adaptive optics control software, the development of which began before my thesis and continued throughout it. I have also developed a ray-tracing software, which I present and use to characterize the instrument. Finally, I present the first aberration measurements performed in transmission to determine the magnitude of the aberrations introduced by clarified brain samples.

The microscope I developed (optics, mechanics, control software) will be used to obtain high-spatial-resolution images of rodent brains. The results presented in this manuscript (numerical simulations and experimental results) can also be used to improve the optical setup.

Table des matières

1 Introduction **1**
- 1.1 Le rôle du cervelet dans le contrôle moteur . . . 1
- 1.2 Microscopie . . . 4
  - 1.2.1 Limite de diffraction . . . 5
  - 1.2.2 Optique de Fourier . . . 6
  - 1.2.3 Aberrations de phase . . . 8
- 1.3 Clarification des tissus biologiques . . . 10
- 1.4 Microscopie de fluorescence . . . 13
  - 1.4.1 Photoblanchiment . . . 14
  - 1.4.2 Viral tracing . . . 15
  - 1.4.3 Sectionnement optique . . . 16
- 1.5 Optique adaptative . . . 19
  - 1.5.1 Correcteur de surface d'onde . . . 20
  - 1.5.2 Analyseur de surface d'onde . . . 21
  - 1.5.3 Décomposition modale de la phase et polynôme de Zernike . . . 24
  - 1.5.4 Rapport de Strehl et Pseudo-Strehl . . . 26
  - 1.5.5 Microscopie confocale et optique adaptative . . . 27
- 1.6 Objectifs de cette thèse . . . 29

2 Suite logicielle **31**
- 2.1 Historique . . . 31
- 2.2 Rust . . . 32
- 2.3 RTC . . . 33
  - 2.3.1 Mesurer les aberrations . . . 35
  - 2.3.2 Corriger les aberrations . . . 37
- 2.4 Simulation . . . 38

3 Conception et réalisation de l'instrument **41**
- 3.1 Microscope confocal parallélisé avec un DMD . . . 42
- 3.2 Optique adaptative . . . 44
  - 3.2.1 Choix de l'optique correctrice . . . 44
  - 3.2.2 Choix de la position du DM . . . 44
- 3.3 Mécanique . . . 45
- 3.4 Optique . . . 46
  - 3.4.1 Objectif du microscope . . . 47
  - 3.4.2 Miroirs galvanométriques . . . 48
  - 3.4.3 Le trou confocal : fréquence spatiale, repliement et amplitude . . . 50
  - 3.4.4 Détecteur . . . 54

3.4.5 Module source . . . 56
3.4.6 Filtres spectraux et dichroïque . . . 56
3.4.7 Alignement du système optique . . . 56
3.5 Électronique . . . 58
3.5.1 Lasers . . . 58
3.5.2 Balayage des galvanomètres et détection de la fluorescence . . . 59
3.6 Étalonnage . . . 61
3.6.1 Détermination des paramètres du balayage des galvanomètres . . . 61
3.6.2 Photométrie . . . 62
3.6.3 Étalonnage des NCPA et mise à plat du DM . . . 62
3.6.4 Mesures du sectionnement et de la résolution spatiale . . . 63
3.6.5 Démonstration du fonctionnement de l'optique adaptative . . . 65
3.7 Perspectives d'amélioration du système optique . . . 67

4 Ray tracing 69
4.1 Principes de fonctionnement . . . 69
4.1.1 Ray tracing inverse . . . 69
4.1.2 Ray tracing direct . . . 70
4.1.3 Distribution angulaire des rayons . . . 70
4.2 Simulation du système optique . . . 71
4.2.1 Doublet achromatique . . . 71
4.2.2 Analyseur pyramide . . . 74
4.2.3 Analyseur Shack-Hartmann . . . 75
4.2.4 Objectif . . . 76
4.3 Simulation de la fluorescence . . . 76
4.3.1 Ray tracing inverse . . . 77
4.3.2 Ray tracing direct . . . 79
4.4 Modélisation du balayage par les galvanomètres . . . 80
4.4.1 Modélisation d'un galvanomètre . . . 81
4.4.2 Modèle complet . . . 83
4.5 Simulation du sectionnement du microscope confocal . . . 87

5 Mesure des aberrations de phase en fluorescence 91
5.1 Shack-Hartmann sur échantillon épais . . . 91
5.1.1 Comparaison avec la microscopie à feuille de lumière et à deux photons 92
5.1.2 Effet de l'ouverture du faisceau d'illumination . . . 93
5.2 Mesure par corrélation pour le Shack-Hartmann . . . 95
5.2.1 Étoile laser en astronomie . . . 95
5.2.2 Procédure de mesure des aberrations . . . 96
5.2.3 Mise en pratique et complications . . . 98
5.3 Pyramide sur échantillon épais . . . 99
5.4 Perspectives . . . 100

6 Mesures des aberrations de phase en transmission 103
6.1 Premières tentatives . . . 103
6.1.1 Mesures sur Zygo . . . 103
6.1.2 Mesures sur un ancien montage optique . . . 105
6.2 Mesures sur le microscope confocal . . . 108

Conclusion **117**

A Optique adaptative **119**
A.1 Étalonnage des polynômes de Zernike de tip-tilt . . . 119
A.2 Étalonnage du tirage du Shack-Hartmann . . . 120
A.3 Lien entre défocalisation physique et Zernike de défocus . . . 120
A.4 Matrice commandes-pentes . . . 122
A.5 Matrice Zernike-pentes pour un Shack-Hartmann . . . 123
A.6 Moindre carrés pondérés . . . 124
A.7 Diversité de phase . . . 125
A.8 Reconstruction de la phase à partir de ses gradients . . . 125
A.8.1 Reconstructeur de Southwell . . . 126
A.8.2 Reconstruction par transformée de Fourier . . . 127
A.9 Résidu après fermeture de la boucle d'optique adaptative . . . 128

B Photométrie **129**
B.1 Nombre de photons émis . . . 129
B.2 Nombre de photons détectés . . . 130
B.3 Application . . . 132

C Schémas électroniques **133**

D Étalonnage des paramètres du balayage **135**

E Ray tracing **139**
E.1 Rayon . . . 139
E.2 Plan . . . 139
E.3 Surfaces quadratiques . . . 140
E.3.1 Dioptre sphérique . . . 140
E.3.2 Cylindre . . . 140
E.3.3 Cône . . . 141
E.4 Lois de Snell-Descartes . . . 141
E.5 Procédé de Gram-Schmidt . . . 142
E.6 Rayon aléatoire dans un cône de révolution . . . 142
E.7 Formule de rotation de Rodrigues . . . 143
E.8 Diffusion et absorption . . . 143

F Poster Mifobio 2025 **145**

G Proceeding SPIE Medical Imaging 2026 **147**

Bibliographie **157**

Chapitre 1

Introduction

> Durch kein Mikroskop können Theile getrennt (oder die Merkmale einer real vorhandenen Structur wahrgenommen) werden, wenn dieselben einander so nahe stehen, dass auch der erste durch Beugung erzeugte Lichtbüschel nicht mehr gleichzeitig mit dem ungebeugten Lichtkegel in das Objectiv eintreten kann. [1]
>
> Ernst Abbe, 1873

Dans ce chapitre je donne, en première partie, une courte présentation du contexte de la recherche en neurobiologie dans laquelle s'insère mon travail. Puis, dans les parties suivantes, je décris successivement les différentes techniques nécessaires à la réalisation d'un microscope utile à la recherche en neuroscience dont je me servirai dans la suite de ce manuscrit : microscopie, clarification des tissus biologiques, fluorescence, sectionnement optique et optique adaptative.

1.1 Le rôle du cervelet dans le contrôle moteur

L'organisation structurale du contrôle moteur dans le système nerveux est commune chez l'ensemble des vertébrés et s'est donc conservée depuis leur divergence il y a 560 millions d'années[1]. Je donne ci-dessous une présentation à gros traits de cette organisation structurale chez les mammifères chez qui le contrôle des muscles squelettiques est réparti entre les zones suivantes du système nerveux : moelle épinière, tronc cérébral, cortex cérébral, cervelet et ganglions de la base. [2].

Les neurones directement responsables de la contraction musculaire, appelé motoneurones, sont situés dans la moelle épinière (pour les muscles du corps) et dans le tronc cérébral (pour les muscles de la tête). L'activation des motoneurones est régulée par des circuits neuronaux locaux également situés aux mêmes endroits. Ces circuits locaux intègrent les informations en provenance des senseurs proprioceptifs d'une part et les commandes en provenance de l'encéphale d'autre part pour effectuer la dernière étape de régulation de la commande motrice transmise aux motoneurones. Ils contribuent, par exemple, à la coordination entre muscles antagonistes et sont de manière générale capable de générer des motifs d'activation coordonnant des séquences de mouvements fondamentaux comme la marche ou la mastication.

1. «Aucun microscope ne peut séparer des parties (ou percevoir le signe d'une structure présente) quand ces parties se tiennent si proches que le premier faisceau diffracté ne peut pas rentrer dans l'objectif en même temps que le faisceau non diffracté.»
2. La majorité des information de cette section sont tirées de Purves[2]

La planification, l'initiation et le séquencement des mouvements volontaires sont effectués par des neurones du cortex et du tronc cérébral qui communiquent directement avec les neurones des circuits locaux. Les ganglions de la base et le cervelet n'ont de leur côté pas de communication directe avec les circuits locaux. Ils contribuent au contrôle moteur en régulant l'activité des neurones du cortex et du tronc cérébral. Les ganglions de la base permettent, entre autres, d'empêcher l'initiation de mouvements involontaires [1]. Le cervelet quant à lui (voir figure 1.1) réalise une fonction de servomécanisme permettant de minimiser la différence entre les mouvements souhaités et les mouvements effectivement réalisés. C'est lui qui permet d'effectuer des mouvements précis et coordonnés, à la fois par une correction en temps réel et, à plus long terme, par des mécanismes d'apprentissage.

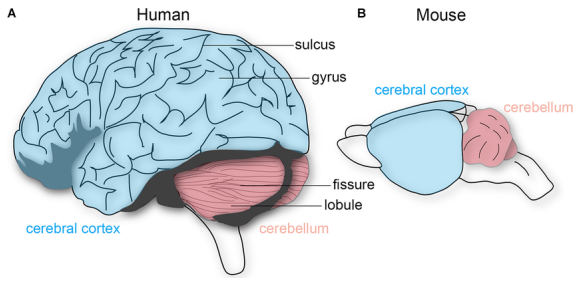


Figure 1.1 – Position du cervelet (cerebellum) dans l'encéphale chez l'homme (gauche) et chez la souris (droite). Source : [3]

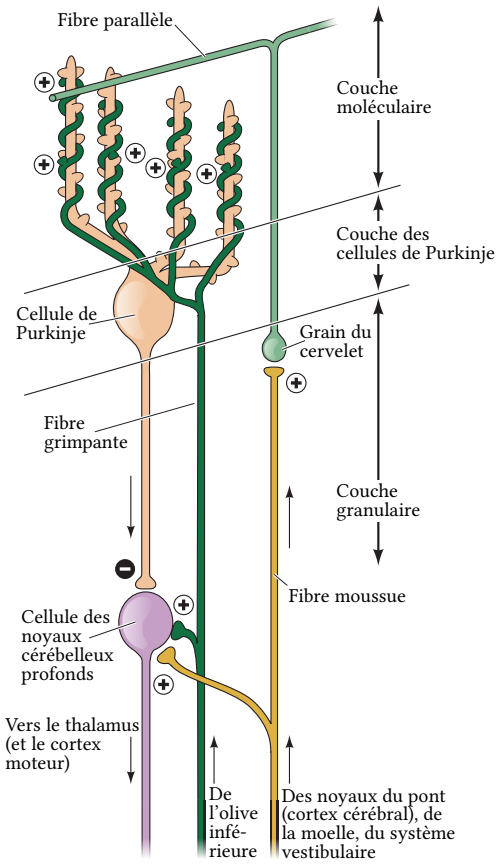


Figure 1.2 – Organisation interne du cervelet. Source : [2]

1. la maladie de Parkinson est une affection des ganglions de la base

La figure 1.2 présente une vue schématique des principaux types de neurones présents dans le cervelet qui, ensemble, forment les boucles de rétroaction permettant une plus grande finesse du contrôle moteur. Ces neurones sont organisés spatialement en différentes couches qui sont bien visibles lorsque l'on observe le cervelet en coupe sagittale (voir figure 1.3). La zone sombre sur l'image correspond à la matière blanche. Les noyaux cérébelleux, principale voie efférante du cervelet sont situés au sein de celle-ci. La matière blanche elle-même est constituée principalement par les axones des neurones afférant dans le cervelet : les fibres moussues et les fibres grimpantes. Les fibres moussues apportent au cervelet les informations sur la commande motrice et des retours sensoriels sur la position effective des muscles. Les fibres grimpantes, en provenance du noyau olivaire inférieur situé dans le tronc cérébral, apportent au cervelet des informations sur l'erreur motrice. Ces deux types de neurone sont connectés aux cellules de Purkinje (indirectement via les grains du cervelet pour les fibres moussues). Les cellules de Purkinje, peuvent ainsi, en prenant en compte toutes ces informations (informations sur la commande motrice, informations sensorielles en provenance des muscles, information sur l'erreur motrice) moduler correctement la commande motrice via les noyaux cérébelleux.

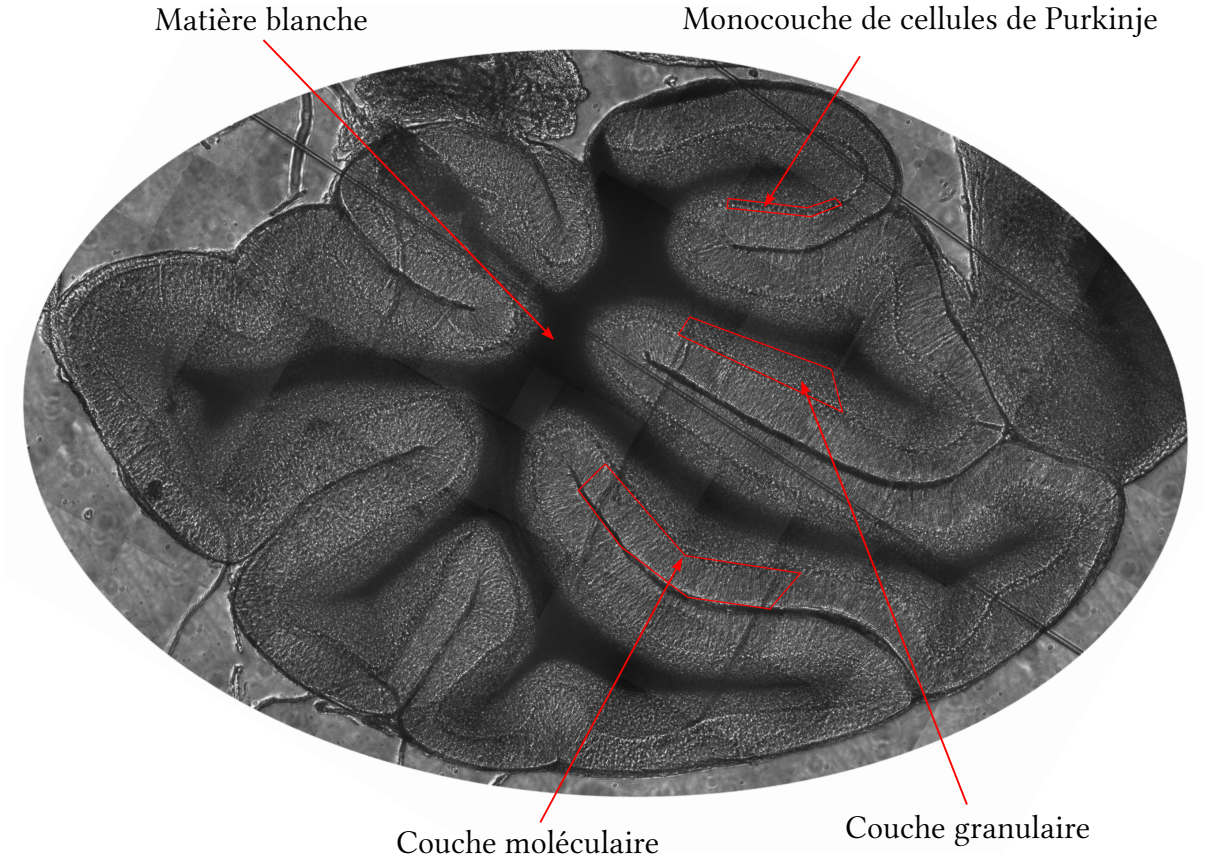


Figure 1.3 – Image en transmission d'une tranche de cervelet de souris non clarifiée en coupe sagittale. Image réalisé au LIRA.

Les mécanismes précis de fonctionnement du cervelet dans la chaîne de contrôle motrice sont imparfaitement compris. Par exemple, si l'on connaît l'organisation somatotopique du contrôle moteur dans le cortex cérébral et au sein du cervelet (voir figure 1.4) l'existence d'une telle organisation dans le tronc cérébral (qui sert d'intermédiaire aux communications entre muscle, cortex et cervelet) est mal connue. Dès lors, on peut se demander comment la spécificité musculaire de l'information est conservée au sein du tronc cérébral. La réalisation de

connectomes, cartes des connexions neuronales de tout ou de parties du cerveau est un des moyens utilisés pour tenter de parfaire notre compréhension des choses. L'interconnexion du cervelet avec les autres zones du cerveau impliquées dans le contrôle moteur étant un élément fondamental du mécanisme d'asservissement, il est nécessaire de réaliser des connectomes du cerveau entier et non pas seulement à l'échelle du cervelet. La suite de ce chapitre présente les méthodes optiques, chimiques et biologiques nécessaires à la réalisation de tel connectomes en insistant sur les méthodes optiques qui m'intéresseront plus particulièrement par la suite.

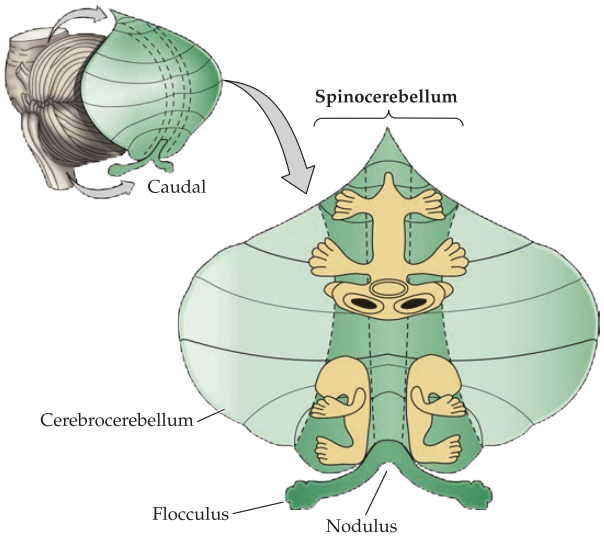


Figure 1.4 – Carte somatotopique montrant la répartition spatiale des zones du corps dans le cervelet. Source : [2]

1.2 Microscopie

Un microscope est un instrument permettant de produire l'image d'un objet à plus grande échelle à l'aide d'un système optique dont l'élément principal est l'objectif de microscope. On utilise aujourd'hui des objectifs envoyant l'image à l'infini suivis d'une lentille dite lentille de tube pour projeter l'image sur le capteur d'un détecteur.

Un objectif de microscope est caractérisé par sa focale f_o et son ouverture numérique NA. On a

$$\mathrm{NA} = n_o \sin \alpha_o \tag{1.1}$$

où n_o est l'indice de réfraction du milieu d'observation et α_o le demi angle d'ouverture du faisceau capté par l'objectif.

Le grandissement obtenu dépend de la focale de la lentille de tube f_t et vaut

$$G = \frac{f_t}{f_o} \tag{1.2}$$

Un système optique de bonne qualité doit suivre la condition des sinus d'Abbe[4] (voir figure 1.5)

$$\frac{n_o \sin \alpha_o}{n_t \sin \alpha_t} = G \tag{1.3}$$

valable y compris pour des grands angles. Cette condition nous donne également le diamètre D du faisceau dans le plan focal arrière de l'objectif

$$D = 2 f_o \mathrm{NA} \tag{1.4}$$

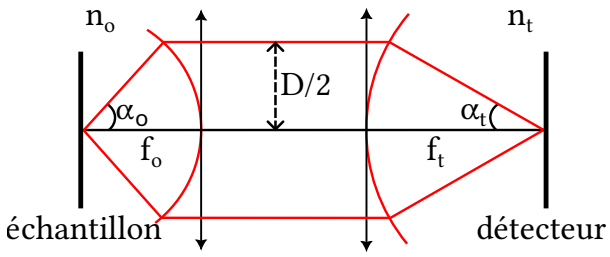


Figure 1.5 – Condition des sinus d'Abbe.

1.2.1 Limite de diffraction

La taille minimale d des structures observables avec le microscope est limitée par la diffraction. C'est Ernst Abbe qui a le premier expliqué l'origine de cette limite pour une illumination en transmission par la diffraction induite par les structures observées et la capacité ou non de l'objectif à collecter cette lumière diffractée[5] [1]. Il a plus tard explicité cette limite par la formule suivante[6]

$$d_{\mathrm{Abbe}} = \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}} \tag{1.5}$$

où λ est la longueur d'onde de la lumière considérée et d_{Abbe} la taille de la plus petite structure observable.

Une autre approche pour expliquer la limite de diffraction est d'étudier la fonction d'étalement du point ou PSF (pour «Point Spread Function»), c'est-à-dire l'image formée par le microscope lorsqu'il observe un point source. Pour un système parfait munie d'une ouverture circulaire l'intensité de cette PSF, appelée tache d'Airy, a la forme[7]

$$PSF_{\mathrm{Airy}} \propto \left| \frac{2 J_1\left(\pi \frac{2\mathrm{NA}}{\lambda} r\right)}{\pi \frac{2\mathrm{NA}}{\lambda} r} \right|^2 \tag{1.6}$$

où r est la distance radiale à l'axe optique et J_1 est la fonction de Bessel de première espèce et d'ordre 1.

La figure 1.6 montre une tache d'Airy et son profil radial d'intensité. Le critère le plus souvent utilisé pour déterminer la limite de résolution du système est le critère de Rayleigh. Celui-ci considère que les images de deux points de même luminosité sont séparables si les deux points sont au moins distants du rayon du premier zéro de la tache d'Airy. C'est-à-dire, à la limite, si le maximum d'une tache correspond au premier minimum de la seconde. On peut voir sur la figure 1.6 que cela correspond a un écartement de

$$d_{\mathrm{Rayleigh}} = 1.22 \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}} \tag{1.7}$$

1. Voir la citation en épigraphe de ce chapitre qui est tirée de cet article

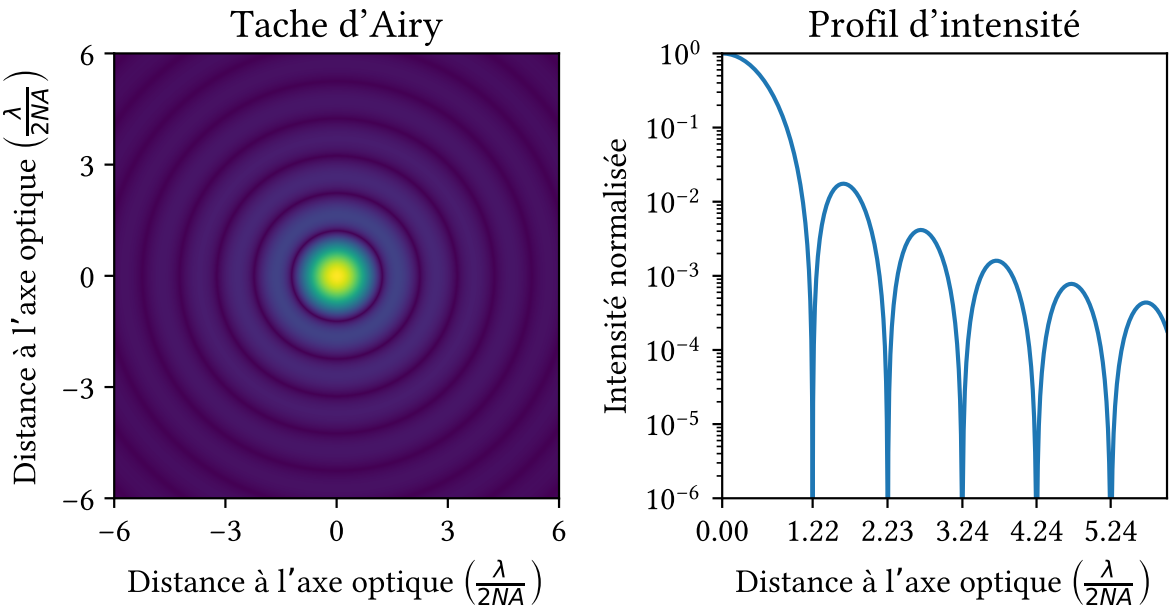


Figure 1.6 – Tache d'Airy (à la puissance 0.4 pour une meilleure visibilité) (gauche) et son profil radial d'intensité en échelle logarithmique (droite).

On définit l'unité d'Airy (AU pour «Airy Unit») comme le diamètre de la tache centrale

$$1\text{AU} = \frac{1.22\lambda}{\text{NA}} \tag{1.8}$$

Le grandissement G et la taille des pixels p du détecteur doivent donc idéalement être choisis de façon à respecter le théorème de Nyquist-Shannon. La limite de résolution selon le critère de Rayleigh dans le plan du détecteur est Gd_{Rayleigh} et on doit donc avoir

$$p \leqslant \frac{Gd_{\text{Rayleigh}}}{2} = 1.22\frac{\lambda G}{4\text{NA}} \tag{1.9}$$

1.2.2 Optique de Fourier

De manière générale le champ électrique E_{pup} en un point (u, v) de la pupille de l'objectif peut s'exprimer

$$E_{\text{pup}}(u, v) = P(u, v) \times A(u, v) \times e^{i\varphi(u,v)} \tag{1.10}$$

où A est l'amplitude du champ électrique, φ sa phase et P la fonction indicatrice de la transmission de la pupille de l'objectif. Pour une pupille circulaire et pleine on a

$$P(u, v) = \begin{cases} 1 & \text{si } \sqrt{u^2 + v^2} < \frac{D}{2} \\ 0 & \text{sinon} \end{cases} \tag{1.11}$$

Dans le cadre de l'approximation de Fraunhofer, le calcul du champ électrique diffracté par la pupille de l'objectif en un point (x, y) du plan focal après la lentille de tube donne[8]

$$E_{\text{focal}}(x, y) \propto \int_{-\infty}^{\infty}\int_{-\infty}^{\infty} E_{\text{pup}}(u, v) \exp\left(-2i\pi\frac{xu + yv}{\lambda f_t}\right) \mathrm{d}u\,\mathrm{d}v \tag{1.12}$$

que l'on peut réécrire

$$E_{\text{focal}}(x, y) \propto \mathscr{F}\Big[E_{\text{pup}}(u, v)\Big] \tag{1.13}$$

où $\mathscr{F}$ est la transformée de Fourier à deux dimensions.

Le détecteur placé dans le plan focal n'est pas sensible à l'amplitude du champ électrique mais seulement à l'énergie moyenne déposée par celui-ci sur le capteur pendant le temps d'intégration, c'est-à-dire à la moyenne temporelle du vecteur de Poynting qui est proportionnelle au module carré du champ. L'image I enregistrée est donc

$$I(x, y) \propto \left|E_{\text{focal}(x,y)}\right|^2 \tag{1.14}$$

Pour un champ électrique uniforme $A(u, v) = 1$ et une phase plane $\varphi(u, v) = \text{cte}$ dans le plan pupille, on retrouve la tâche d'Airy définie à l'équation 1.6

$$I(x, y) \propto |\mathscr{F}[P(u, v)]|^2 = \text{PSF}_{\text{Airy}} \tag{1.15}$$

Dans l'hypothèse d'une PSF invariante dans le champ l'image d'un objet étendu et spatialement incohérent O est la convolution de l'objet avec la PSF du système [1]

$$I(x, y) = (O * \text{PSF})(x, y) \tag{1.16}$$

en utilisant le théorème de convolution on peut aussi écrire

$$\mathscr{F}[I(x, y)] = \mathscr{F}[O(x, y)] \times \text{FTO}(u, v) \tag{1.17}$$

où $[O(x, y)]$ est le spectre de l'objet et FTO est la fonction de transfert optique de l'instrument. Cette FTO contient l'information sur le filtrage des fréquences spatiales effectué par le système d'imagerie dans toutes les directions. La FTO peut aussi s'exprimer comme l'autocorrélation de la pupille

$$\text{FTO}(u, v) = \mathscr{F}[\text{PSF}(x, y)] = E_{pup}(u, v) * E_{pup}(-u, -v) \tag{1.18}$$

La fréquence de coupure F_c est donc égale à

$$F_c = \frac{D}{\lambda f_o} = \frac{2\text{NA}}{\lambda} \tag{1.19}$$

où l'on retrouve bien l'inverse de la limite de diffraction découverte par Abbe (eq.1.5). L'essentiel de l'information utile de la FTO pour analyser la qualité d'un système optique (son effet sur la résolution) est comprise dans la fonction de transfert de modulation définie comme

$$\text{FTM} = |\text{FTO}| \tag{1.20}$$

1. Dans la suite de ce manuscrit j'utilise $*$ pour l'opérateur de convolution et $\times$ pour l'opérateur de multiplication.

1.2.3 Aberrations de phase

En un point (u, v) de la pupille, la phase $\varphi(u, v)$ est liée au chemin optique $W(u, v)$ parcouru par la lumière

$$\varphi(u, v) = \frac{2\pi}{\lambda} W(u, v) \tag{1.21}$$

avec

$$W(u, v) = \int_{\text{rayon}} n(s)\, \mathrm{d}s \tag{1.22}$$

l'intégrale de l'indice de réfraction n le long du rayon lumineux entre sa source et la pupille. Les inhomogénéités du milieu traversé entrainent donc des déformations de la surface d'onde et la surface $W(u, v) = \text{cte}$ n'est plus forcément plane au niveau du plan pupille de l'objectif (voir figure 1.7).

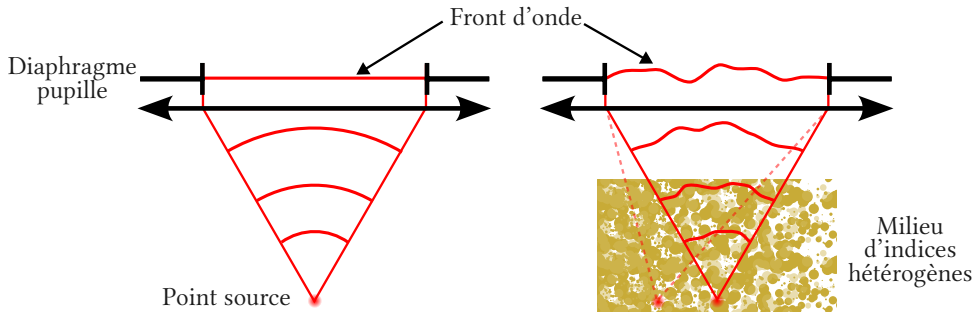


Figure 1.7 – Effet d'un milieu inhomogène sur la surface d'onde d'une source ponctuelle.

Si W varie dans la pupille, on dit que la surface est aberrée (l'onde n'est pas plane). Cela provoque un étalement de la PSF. La convolution de l'objet observé avec cette PSF (eq. 1.16) floute l'image de l'objet formée par le microscope. La figure 1.8 montre l'effet de la diffraction et des aberrations sur l'image produite par un microscope. Sur la colonne de gauche on prend le cas d'une phase uniforme en l'absence de diffraction (pupille du microscope de taille infinie), la PSF correspond alors a une distribution de Dirac et l'image obtenue est identique à l'objet observé. La colonne centrale montre l'effet de la diffraction par la pupille de l'objectif en l'absence d'aberration (phase uniforme), la PSF correspond alors à une tache d'Airy et l'image obtenue, dite «limitée par la diffraction», est la meilleure image que l'on peut obtenir en pratique avec un objectif de cette ouverture numérique. La colonne de droite montre l'effet de la diffraction avec une surface d'onde aberrée. La PSF est davantage étendue spatialement que la tache d'Airy et par conséquence l'image formée par le microscope est floutée. On verra dans la section 1.5 comment l'optique adaptative peut mesurer et corriger les aberrations de phase pour restaurer une qualité d'image limitée par la diffraction.

Comme on le voit sur la figure 1.7, si le point source est décalé, le faisceau ne traverse pas la même zone du milieu. Ainsi, pour deux points différents, la surface d'onde (eq. 1.22) dans la pupille de l'objectif est différente et la PSF correspondante est différente. La taille de la zone dans laquelle on peut déplacer le point source sans changer significativement (selon un critère choisi) les aberrations s'appelle zone d'isoplanétisme. Au-delà de cette zone, la PSF dépend de la position dans le champ, ce qui entraîne l'invalidité du modèle convolutif de l'équation 1.16.

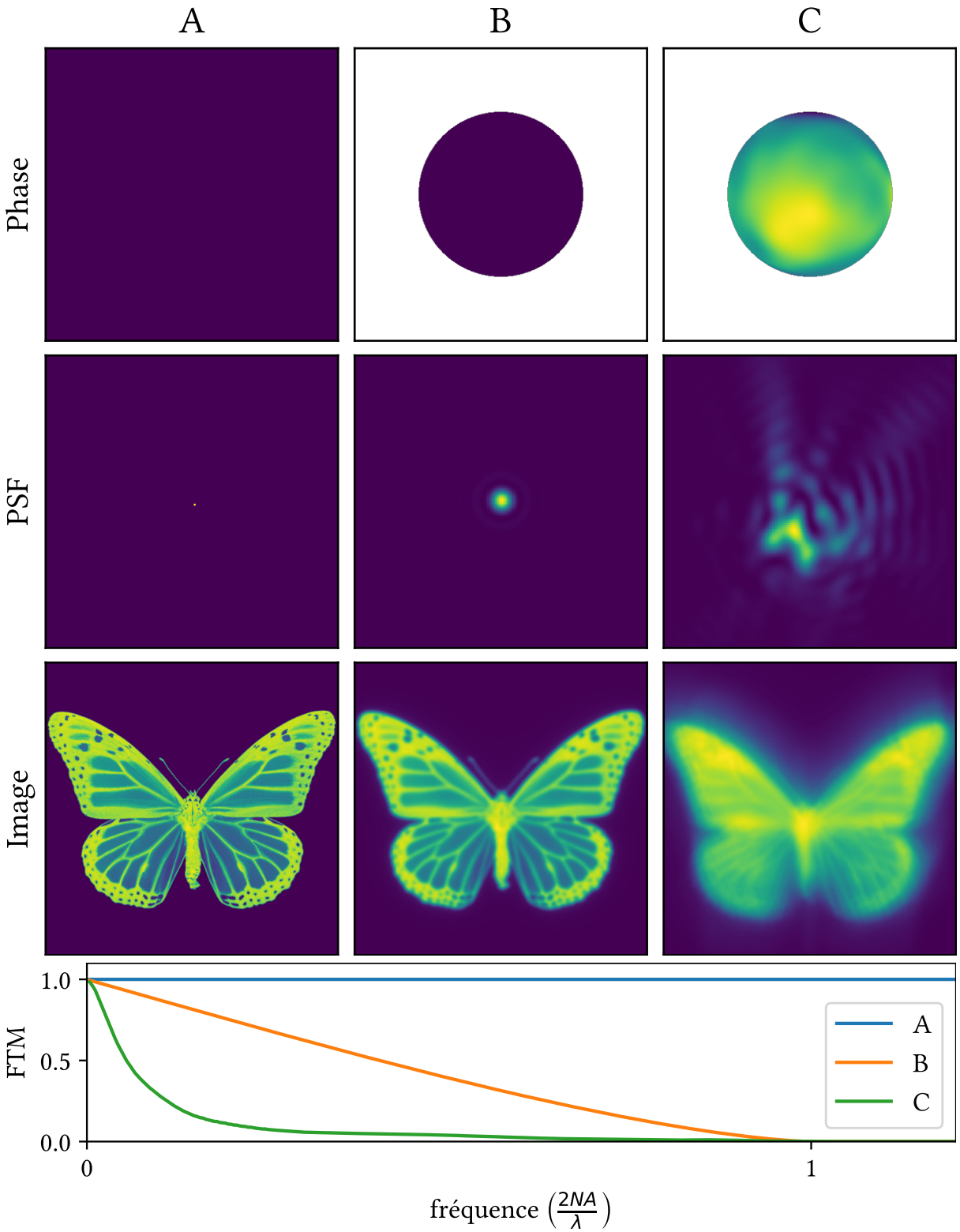


Figure 1.8 – Phase, PSF, convolution d'un objet avec cette PSF et moyenne radiale de la FTM pour trois cas différents : phase uniforme en l'absence de diffraction (A), diffraction par la pupille de l'objectif avec une phase uniforme (B), diffraction par la pupille de l'objectif avec une phase non uniforme (C).

Densité spectral de puissance

La densité spectrale de puissance (DSP) quantifie la répartition des aberrations en fonction de leurs fréquences spatiales. En microscopie, du fait de la géométrie conique du faisceau lumineux, la DSP ne dépend pas seulement de la structure du tissu biologique mais également de sa position dans le faisceau. En effet, en fonction de sa position dans le faisceau, une structure de même taille induira des aberrations de fréquences différentes. Plus cette structure est proche de la source, plus sa taille occupe une grande partie du faisceau et plus l'aberration induite est de basse fréquence spatiale.

Même si des mesures, soit expérimentales[9], soit par simulation numérique[10] ont déjà été menées, la dépendance de la DSP à la fois au type de tissu d'intérêt et à l'ouverture numérique utilisée fait que le spectre des aberrations dans les tissus biologiques reste mal connu, en particulier en comparaison de la situation en astronomie où le spectre des aberrations induites par l'atmosphère a été établi dès les années 1940 par Kolmogorov[11] et Von Kármán[12]. Quelques études semblent toutefois pointées vers une similitude de la DSP induite par les échantillons biologiques avec une DSP de type Kolmogorov[13, 14].

J'ai donné dans cette section une présentation des bases de la microscopie optique et de ses limites physiques (diffraction, aberrations). Je vais maintenant présenter, dans les deux sections suivantes, comment il est possible de s'affranchir de deux limites liées aux échantillons biologiques : la diffusion et le manque de contraste.

1.3 Clarification des tissus biologiques

L'indice de réfraction dans les tissus biologiques varie typiquement de 1.33 à 1.55[15]. Cette variation d'indice conjugée à la présence de très nombreuses structures de petites tailles (cellules, organelles, protéines…) fait que, dès lors que l'épaisseur de tissus à traverser devient supérieure à quelques dizaines de micromètres, la propagation de la lumière donne lieu à un phénomène de diffusion (principalement de la diffusion de Mie[16]). S'il est possible de focaliser un faisceau, même à travers un tissu très diffusant, grâce à une correction par optique adaptative[17], la très faible taille de la zone d'isoplanétisme induite par la diffusion rend cette correction insuffisante pour faire de l'imagerie [1]. Il est alors nécessaire de clarifier les tissus pour pouvoir en faire des images en profondeur.

Dans le cerveau, les axones sont recouverts de myéline, une membrane lipidique qui, en isolant électriquement l'axone du milieu environnant, permet d'accélérer la vitesse de transmission des signaux dans les axones. Cette myéline est un contributeur majeur de la diffusion de la lumière dans le cerveau à cause de la forte différence d'indice de réfraction entre l'eau ($n \approx 1.33$) et les lipides ($n \approx 1.47$)[22] qui la composent (80% de la masse sèche de la myéline[23]) [2].

La première méthode de clarification des tissus a été développée au début du XXe siècle par Spalteholz[25] mais ce n'est que récemment qu'un grand nombre de nouvelles méthodes ont été développées. Couplées à la microscopie de fluorescence (voir section 1.4) elles ont rendu possible l'observation en profondeur du cerveau sans découpe de celui-ci. La figure 1.9 présente une généalogie de ces méthodes et donne une idée du foisonnement de variantes développées ces vingt dernières années. Le principe reste en général le même pour la plupart

1. Même si la taille de la zone d'isoplanétisme n'est pas aussi petite que ce à quoi on pourrait s'attendre grâce à un effet de corrélation appelé «effet mémoire»[18, 19, 20, 21]

2. C'est à cause de cette forte diffusion que la matière blanche, composée en grande partie de myéline, parait sombre sur la figure 1.3 où l'échantillon est illuminé en transmission. Sur une image en réflexion la matière blanche paraitrait au contraire plus claire que les autres zones, d'où son nom.

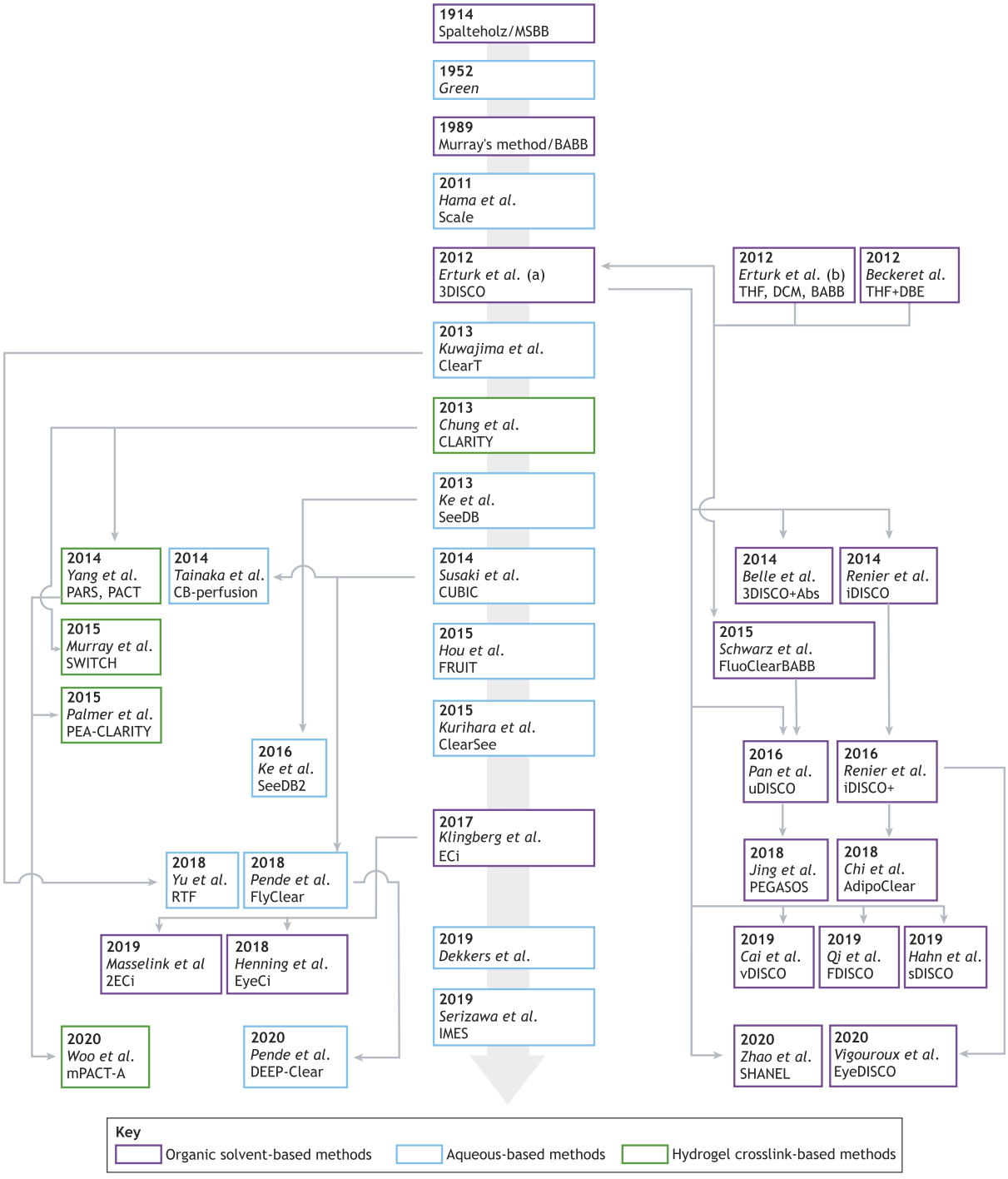


Figure 1.9 – Généalogie des méthodes de clarification. Source : [24]

d'entre elles : suppression des lipides et remplacement des fluides (essentiellement de l'eau) intra et extracellulaire par une solution à l'indice de réfraction proche de celui des éléments restants (essentiellement des protéines)[22]. La figure 1.10 montre la différence entre un cerveau de souris avant et après un processus de clarification.

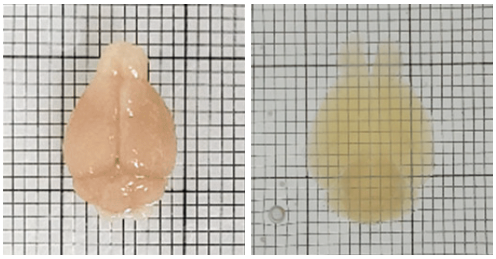


Figure 1.10 – Cerveau de souris avant (gauche) et après (droite) un processus de clarification. Source : [26]

Chaque méthode de clarification a ses avantages et ses inconvénients, certaines utilisent des solvants volatiles toxiques et rendent les tissus rigides et friables, d'autres peuvent dégrader les protéines fluorescentes avec lesquelles les échantillons avait été préalablement marqués. Le temps nécessaire à la clarification est également grandement variable, de quelques heures à plusieurs semaines. Les échantillons de cerveau de souris que je vais utiliser sont clarifiés par la méthode CUBIC[27, 28] qui présente l'avantage de ne pas nécessiter de solvants toxiques et qui préserve bien le marquage fluorescent au prix d'une clarification légèrement moins bonne. La figure 1.11 montre un cerveau de souris clarifié par la méthode CUBIC. On peut y reconnaître, à gauche, la structure plissée du cervelet et, à droite, le cortex cérébral (qui contrairement à celui de l'homme est lisse chez la souris).

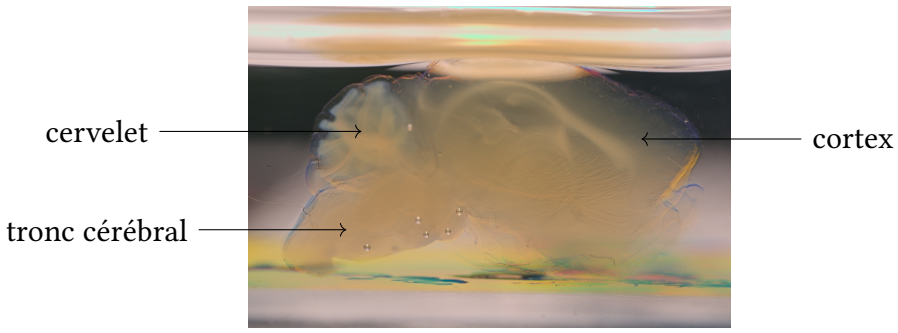


Figure 1.11 – Cerveau de souris clarifié par la méthode CUBIC.

La clarification du cerveau n'est pas à elle seule suffisante pour obtenir des images de qualitées : d'une part la clarification ayant rendu l'échantillon transparent il devient alors impossible d'y distinguer les différentes structures biologiques avec une modalité d'illumination classique en transmission ou en reflexion. D'autre part, même s'il était possible de distinguer les neurones individuels, la grande densité des neurones et les intrications de leurs connexions rendraient quasiment impossible la reconstruction de connectomes. Ces problèmes peuvent être résolus par l'utilisation de la microscopie de fluorescence combinée à une technique de marquage par viral tracing.

1.4 Microscopie de fluorescence

La fluorescence est le phénomène d'émission lumineuse par une molécule, appelée fluorophore, suite à l'absorption d'un photon. La figure 1.12 présente un diagramme de Jablonski du processus de fluorescence. L'absorption d'un photon excite un électron de la molécule depuis un état de basse énergie (sur le schéma l'état singulet fondamental S_0 avec $v = 0$) vers un état électronique et vibrationnel de plus haute énergie (état singulet S_1 avec $v \geqslant 0$). La relaxation vibrationnelle ramène rapidement (en moins d'une picoseconde[29]) la molécule dans l'état vibrationnel fondamental en transmettant son énergie au milieu environnant (dissipation thermique). Le retour vers l'état électronique fondamental (mais dans un état vibrationnel excité) a ensuite lieu par émission d'un photon dans un délai de quelques nanosecondes[29]. L'énergie dissipée par les relaxations vibrationnelles ayant lieu après l'absorption et après l'émission conduit le photon émis à avoir une énergie inférieure à celle du photon initialement absorbé. C'est cette différence d'énergie, appelée déplacement de Stokes, qui rend possible la microscopie de fluorescence en permettant la séparation de la lumière d'excitation de la lumière fluorescente par un filtre dichroïque.

La figure 1.13 présente le schéma de principe d'un microscope de fluorescence. Une source laser se réfléchit sur le filtre dichroïque et est focalisée dans un échantillon par l'objectif de microscope. La fluorescence produite dans l'échantillon est collectée par l'objectif de microscope, traverse le filtre dichroïque et se dirige vers un détecteur. Un filtre d'excitation permet de supprimer d'éventuelles longueurs d'onde indésirables produite par le laser. De même devant le détecteur un filtre d'émission permet de ne laisser passer qu'une bande de longueur d'onde correspondant à la fluorescence.

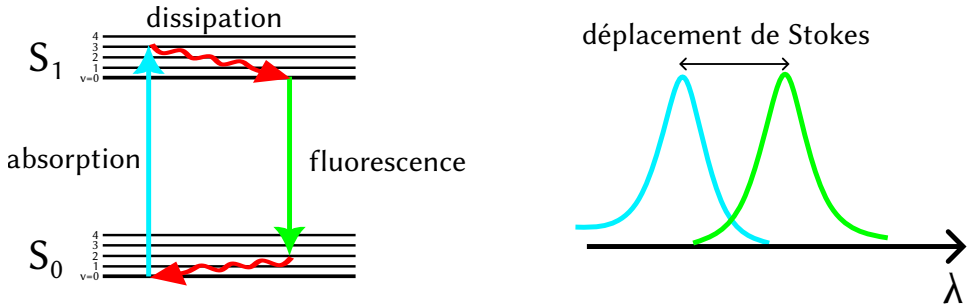


Figure 1.12 – Diagramme de Jablonski du processus de fluorescence (gauche) et spectres d'émission et d'absorption (droite).

Le premier fluorophore découvert, la quinine, l'a été par John F. W. Herschel en 1845[30]. Les avantages d'une émission de lumière par l'échantillon lui-même par rapport aux illuminations en réflexion ou en transmission utilisées jusqu'alors ont été postulé en 1874 par Helmholtz. Les premiers microscopes à fluorescence commerciaux sont apparus dès le début du XXe siècle[31]. C'est cependant la découverte de protéines fluorescentes chez des espèces de Cnidaire dans les années 1960 puis, dans les années 1990, la capacité à les cloner qui a vraiment conduit à l'explosion des usages de la microscopie de fluorescence en biologie. Je vais par la suite faire usage de deux fluorophores différents. La protéine EGFP («Enhanced Green Fluorescent Protein»)[32] qui dérive de la GFP découverte chez la méduse Aequorea victoria en 1962[33] puis clonée en 1992[34] et la protéine tdTomato qui dérive d'une protéine découverte chez une espèce du genre Discosoma[35]. Les spectres d'absorption et d'émission de ces deux fluorophores sont présentés dans la figure 1.14.

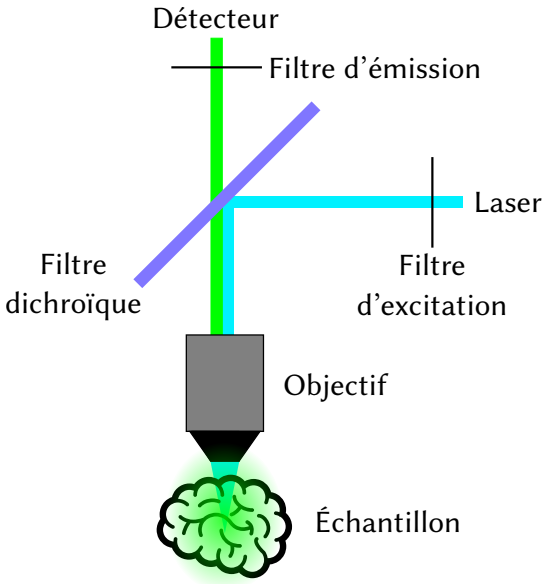


Figure 1.13 – Schéma simplifié d'un microscope de fluorescence.

1.4.1 Photoblanchiment

Le retour à l'état électronique fondamental par fluorescence n'est pas le seul chemin que peut suivre une molécule dans un état électronique excité. Un processus de conversion intersystème peut également amener la molécule dans un état triplet. Le retour à l'état fondamental depuis cet état triplet par un processus radiatif est nommé phosphorescence. Les règles de sélection en mécanique quantique interdisant cette transition, la durée de vie dans l'état triplet est beaucoup plus longue que dans l'état singulet (durée de vie de plusieurs secondes pour l'état triplet par rapport aux quelques nanosecondes de l'état singulet). La plus grande instabilité chimique des molécules dans un état excité couplé à la longue durée de vie de l'état triplet conduit à une probabilité importante de désagrégation du fluorophore lorsqu'il se trouve dans cet état. On nomme photoblanchiment ce processus qui par l'excitation répétée des fluorophores finit par entraîner leur destruction. La dégradation se fait généralement soit par réaction avec du dioxygène soit par réabsorption d'un photon conduisant à un état triplet de plus haute énergie encore plus instable. Plusieurs stratégies de limitation du photoblanchiment peuvent être mises en place. L'une d'entre elles consiste à réduire la quantité de dioxygène présent dans l'environnement du fluorophore. Du point de vue de l'illumination, l'utilisation de lumière pulsée permet également de réduire le photoblanchiment en réduisant la possibilité de réexcitation de l'état triplet. Une autre approche consiste à prendre en compte le spectre d'absorption de l'état triplet en plus de celui de l'état fondamental dans le choix de la longueur d'onde d'excitation utilisée[36]. La figure 1.15 présente un diagramme de Jablonski simplifié des changements d'état que peut suivre un fluorophore. On va voir dans la partie sur le sectionnement optique (section 1.4.3) que la modalité d'illumination choisie a des conséquences importantes sur la vitesse de photoblanchiment.

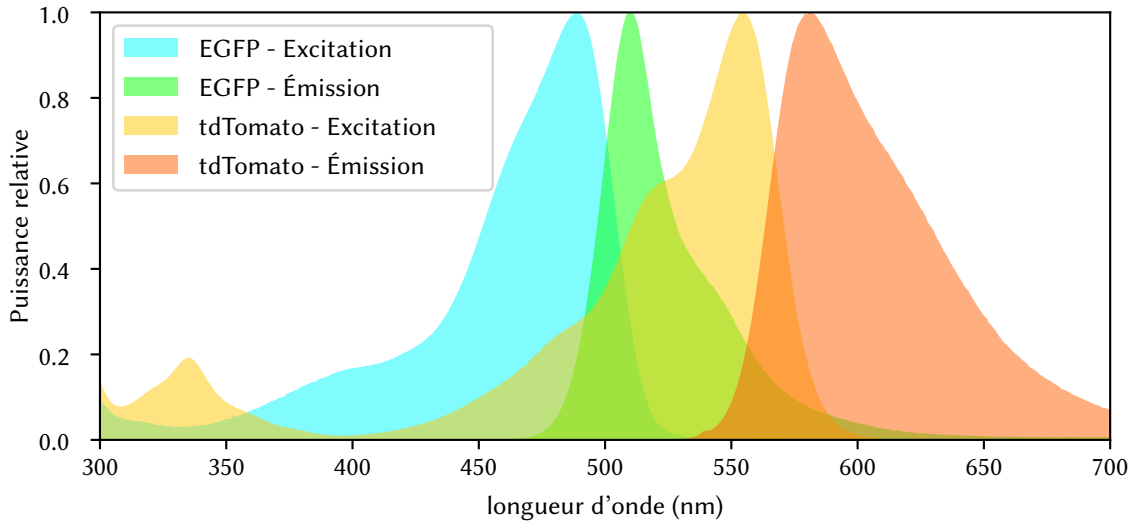


Figure 1.14 – Spectres d'émission et d'absorption des fluorophores EGFP et tdTomato. Source des données : FPbase.

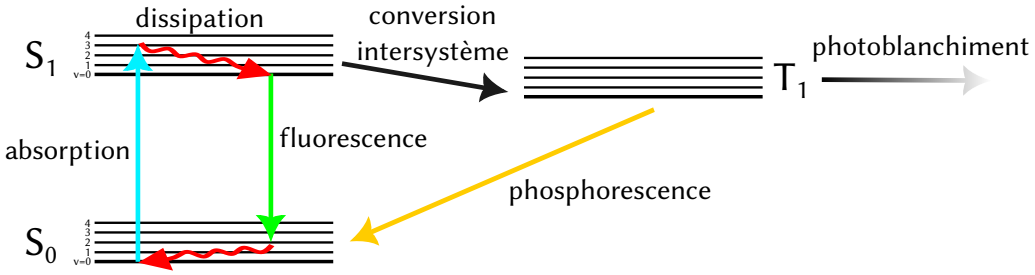


Figure 1.15 – Diagramme de Jablonksi des processus de fluorescence, de phosphorescence et de photoblanchiment.

1.4.2 Viral tracing

La grande utilité des fluorophores en biologie ne vient pas seulement de la résolution du problème du manque de contraste des tissus biologiques. Le fait que certains de ces fluorophores soient des protéines a rendu possible de les utiliser via tout l'arsenal de techniques de biochimie existantes pour les protéines. Il est par exemple possible d'encoder ces protéines directement dans le génome des organismes que l'on souhaite étudier et de restreindre l'expression du fluorophore à un type de cellule donné ou encore de conditionner son activation à la présence d'un processus biochimique donné[37].

Une technique particulièrement utile pour les neurosciences est d'intégrer le gène codant le fluorophore dans le génome d'un virus neurotrope. Ces virus, comme ceux de la rage ou encore de l'herpès, se disséminent en se propageant le long des réseaux neuronaux. Il est alors possible d'injecter à un animal le virus génétiquement modifié pour faire produire le fluorophore par les cellules infectées. Le virus se propage de proche en proche dans l'ensemble des neurones connectés au point d'injection en laissant un marquage fluorescent sur son passage. Il est ensuite possible de réaliser un connectome en lien avec le point d'injection en imageant le fluorophore dans le système nerveux de l'animal. La directionnalité de propagation peut être choisie car certains virus se propagent de façon antérograde, c'est-à-dire qu'ils descendent les axones vers les synapses, et d'autres se propagent de façon rétrograde, c'est-à-dire qu'ils re-

montent les axones depuis les synapses vers le soma. La distance à laquelle le virus se propage peut également être choisie entre polysynaptique (se propage le long de chaînes de plusieurs neurones), monosynaptique (se propage seulement aux neurones voisins) et non transsynaptique (reste confiné au neurone d'injection)[38]. La figure 1.16 représente schématiquement les différents modes de transports possibles. Les échantillons que j'ai utilisés pendant ma thèse ont été marqués à l'IBENS avec cette technique.

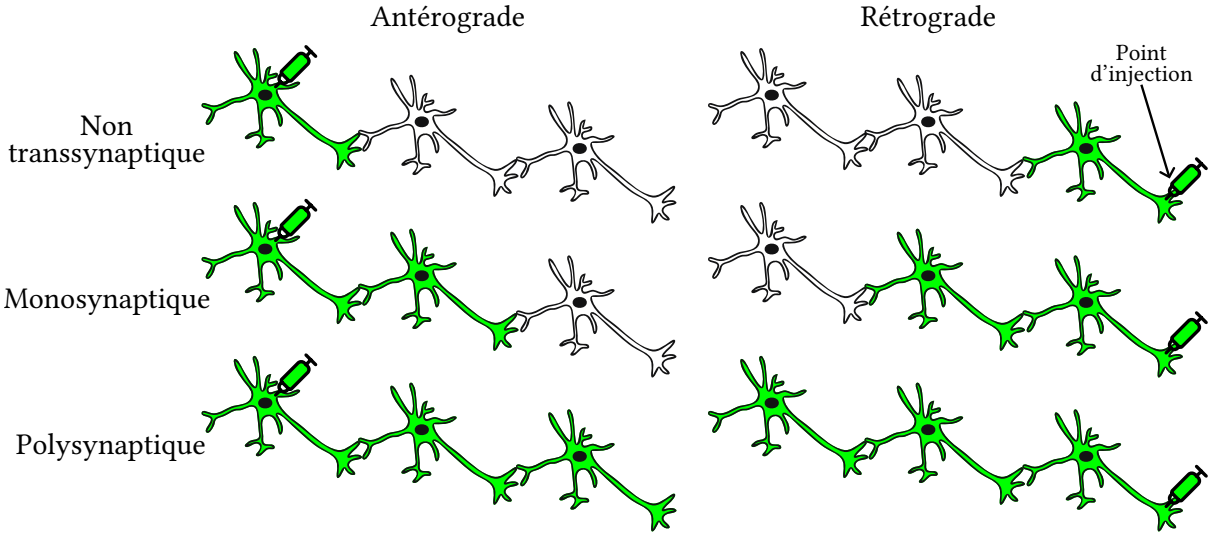


Figure 1.16 – Illustration des modes de propagation possible.

1.4.3 Sectionnement optique

Dans cette section on va voir que, pour être utile, la microscopie de fluorescence doit être combinée à une technique de sectionnement optique. Je présente ensuite le principe des trois techniques de sectionnement les plus couramment utilisées : la microscopie à feuille de lumière, la microscopie confocale et la microscopie à deux-photons.

Comme on peut le voir sur la figure 1.17, dans le cadre d'une illumination en champ large, si un fluorophore est dans un plan situé à une distance z du plan de focus sa contribution à l'illumination d'un point du plan de focus décroît proportionnellement à z^2. Le problème est que, dans le cadre d'un marquage uniforme, le nombre N de fluorophores situés dans le plan distant de z du focus et contribuant à illuminer un point donné de ce dernier croit proportionnellement à z^2 (i.e. proportionnellement à la surface de la base du cône). Ainsi, un plan dense de fluorophores situé à une distance z quelconque du plan de focus contribue à l'illumination du plan de focus de façon proportionnelle à $z^{-2} \times N = 1$, c'est-à-dire autant que s'il était situé dans le plan de focus. [1] Il est donc nécessaire d'adopter une stratégie d'illumination ou de détection différente pour éviter que tout le signal du plan de focus soit noyé par le signal hors focus.

1. Il est possible de montrer ceci formellement en déployant le même formalisme de pupille/PSF/FTO qu'en section 1.2.2 mais en 3D en prenant en considération la dimension axiale. L'absence de sectionnement de la microscopie à champ large vient du «cône manquant» dans la direction axiale de sa FTO.[39] Ce cône manquant implique que la résolution axiale décroît avec la fréquence latérale de l'objet observé et ce jusqu'à atteindre une résolution nulle pour une fréquence spatiale nulle. Ainsi pour un objet uniforme latéralement comme sur la figure 1.17 la résolution axiale est effectivement nulle et l'objet est vu de la même façon quelle que soit sa défocalisation.

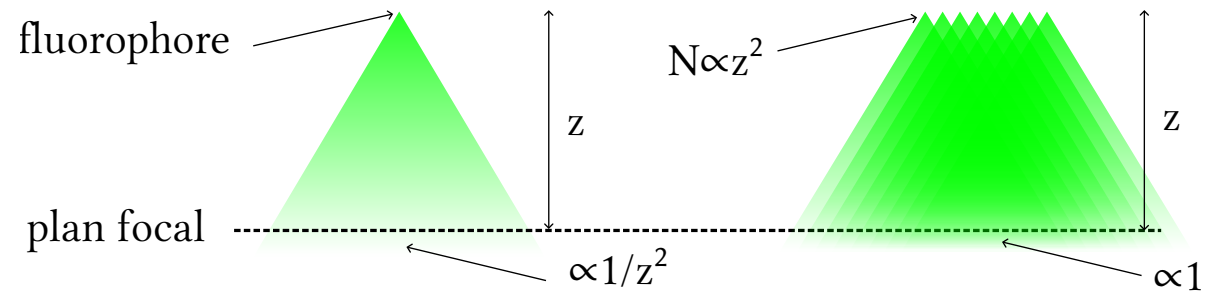


Figure 1.17 – Illustration de la contribution à l'illumination du plan focal d'un fluorophore défocalisé (gauche) et d'une couche uniforme défocalisée de fluorophores (droite).

La figure 1.18 présente une représentation schématique des stratégies d'illumination des principales méthodes de sectionnement ainsi que d'une illumination de champ large pour comparaison. Comme on vient de le discuter, pour une illumination de champ large (première colonne), tous les points de l'échantillon fluorescent et contribuent au signal mesuré.

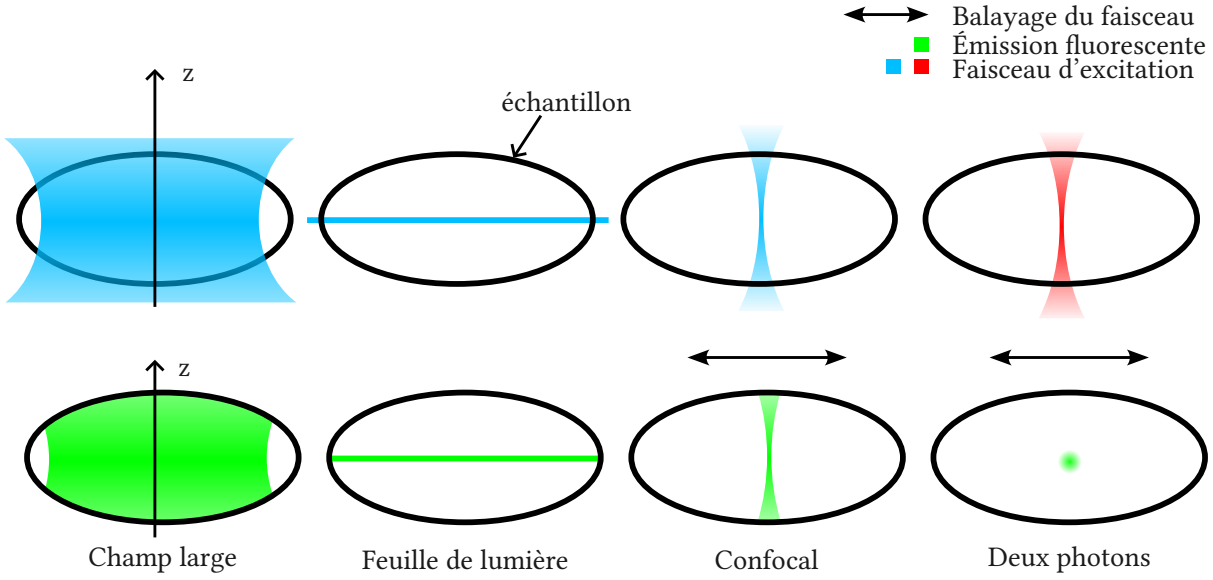


Figure 1.18 – Représentation schématique des différentes méthodes de sectionnement. Excitation (haut) et émission (bas).

Microscopie à feuille de lumière

La microscopie à feuille de lumière[40, 41] (figure 1.18 deuxième colonne) consiste à illuminer l'échantillon avec un angle différent de l'objectif de collecte, en général perpendiculairement. L'utilisation soit d'une lentille cylindrique soit d'un système de balayage permet de créer la feuille de lumière. En illuminant l'ensemble du champ et seulement lui cette technique permet à la fois une acquisition rapide des images (enregistrement simultané de l'intégralité du champ transversal à l'axe optique de détection) et une minimisation du photoblanchiment puisque seul le champ observé est éclairé. Le sectionnement obtenu avec cette méthode dépend de l'épaisseur de la feuille de lumière utilisée.

Microscopie confocale

La microscopie confocale (figure 1.18 troisième colonne) a été inventée par Marvin Minsky en 1955[42, 43] mais c'est son utilisation conjointe avec la microscopie de fluorescence qui l'a propulsée comme une technique d'observation phare en biologie. La figure 1.19 montre le principe de sectionnement par la conjugaison d'un sténopé (trou confocal) au plan de focalisation dans l'échantillon. Cette technique image l'échantillon point par point et nécessite l'utilisation d'un système de balayage sur le champ pour produire une image. Ceci implique une vitesse d'acquisition plus faible que le microscope à feuille de lumière. Le sectionnement étant fait dans la voie de détection, le microscope confocal ne permet pas non plus de réduire le photoblanchiment. Un avantage par rapport au microscope à feuille de lumière est la possibilité d'utiliser un seul objectif commun pour l'illumination et la détection. La fermeture du trou confocal en-deçà d'une unité d'Airy permet d'améliorer la résolution latérale jusqu'à un facteur théorique maximum de $\sqrt{2}$ pour un trou confocal infiniment petit[44]. Cette amélioration se paie toutefois par une perte importante de signal, ce qui la rend peu utilisée en pratique [1]. Le sectionnement atteint dépend de la taille du trou confocal utilisé (voir section 4.5).

L'instrument que j'ai développé pendant ma thèse est basé sur cette technique.

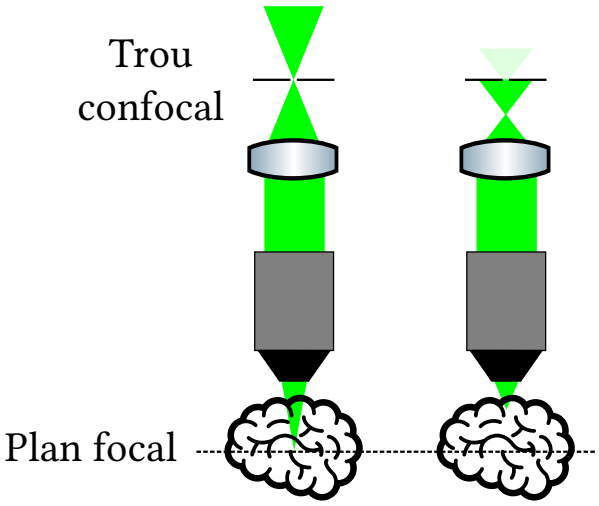


Figure 1.19 – Illustration du sectionnement par le trou confocal. La lumière émise par une source dans le plan focal (gauche) est transmise à travers le trou confocal. Celle d'une source défocalisée (droite) ne l'est pas.

1. Peu utilisée sur les microscopes confocaux classiques mais l'utilisation d'un nouveau type de détecteur nommé SPAD array (voir section 3.4.4) à rendu possible l'utilisation d'une technique nommée ISM (Image Scanning Microscopy) qui permet d'obtenir un gain en résolution sans perte de signal par l'utilisation des pixels du détecteur comme trous confocaux combiné à un algorithme de réassignement des pixels[45, 46]

Microscopie à deux photons

La microscopie à deux photons[47, 48] utilise le même système de balayage que le microscope confocal mais l'illumination utilise le phénomène non linéaire d'absorption à deux photons. Ce phénomène consiste en l'excitation d'une molécule fluorescente par l'absorption de deux photons apportant chacun la moitié de l'énergie nécessaire à la transition. Le laser d'illumination doit ainsi avoir une longueur d'onde double de celle utilisée pour l'absorption à un photon ce qui, pour la plupart des fluorophores, conduit à l'utilisation d'un laser infrarouge. La plus grande transparence des tissus biologiques dans l'infrarouge est un premier avantage par rapport au microscope confocal pour l'observation des tissus en profondeur. Le second avantage par rapport au microscope confocal est que, le phénomène d'absorption n'ayant lieu de façon significative qu'en présence d'une forte intensité, celui-ci n'a lieu qu'au niveau du foyer du faisceau d'illumination. Cela permet de limiter le photoblanchiment des zones hors focus. La faible probabilité d'occurrence du phénomène d'absorption à deux photons nécessite l'utilisation de fortes intensités, atteintes en utilisant des lasers femtoseconde. Le sectionnement atteint dépend de l'ouverture numérique de l'objectif et de l'intensité utilisée.

1.5 Optique adaptative

On a vu dans la section 1.2.3 que des aberrations de phase dégradent la qualité des images. L'optique adaptative est une technique qui permet de corriger les aberrations pour restaurer la qualité des images. Imaginée dès 1953 par H. W. Babcock pour une application à l'observation astronomique (correction de la turbulence atmosphérique terrestre)[49] c'est la création des premiers miroirs déformables dans les années 1970 qui permettra les premières mises en pratique, d'abord pour des applications militaires[50]. Les premiers systèmes pour l'astronomie apparaissent vers la fin des années 1980 avec, en France, le projet Come-On[51, 52]. Les premières applications à la microscopie se feront pour l'imagerie de la rétine[53, 54, 55, 56] et les premières applications sur microscope confocal auront lieu au début des années 2000[57].

L'optique adaptative fonctionne sur un principe de servomécanisme entre un correcteur capable de modifier la phase de l'onde lumineuse et un analyseur de surface d'onde (ASO) capable de la mesurer. La figure 1.20 présente un schéma de la boucle de rétroaction. La surface d'onde aberrée passe sur le correcteur de surface d'onde puis est séparée en deux par une lame séparatrice. Une partie de la lumière est utilisée pour former une image (voie scientifique) et l'autre partie est utilisée pour mesurer la phase grâce à l'analyseur de surface d'onde (voie d'analyse). La quantité de lumière utilisée pour l'analyse doit idéalement être la plus petite possible pour laisser le maximum de flux à la voie scientifique. Un programme nommé RTC (pour «Real Time Calculator») est chargé de récupérer l'image du détecteur de l'analyseur de surface d'onde pour en déduire les aberrations présentes et envoyer au correcteur une commande choisie en conséquence pour minimiser l'impact de ces aberrations. Des techniques dites «sensorless» permettent de se passer d'analyseur en utilisant directement un critère de qualité sur l'image comme mesure et en optimisant itérativement la correction.

Pour arriver à la meilleure correction possible sur le détecteur de la voie scientifique seules les aberrations présentes dans cette voie doivent être corrigées. Les aberrations induites par les imperfections de l'instrument qui ne sont pas communes aux voies d'analyse et scientifique sont appelées NCPA pour «Non-Common Path Aberrations». Une attention particulière doit être apporté à l'étalonnage de ces NCPA pendant la conception de l'instrument, de sorte à ce que le système ne corrige pas les aberrations induites dans la voie de l'analyseur et corrige

bien celle induite dans la voie du détecteur.

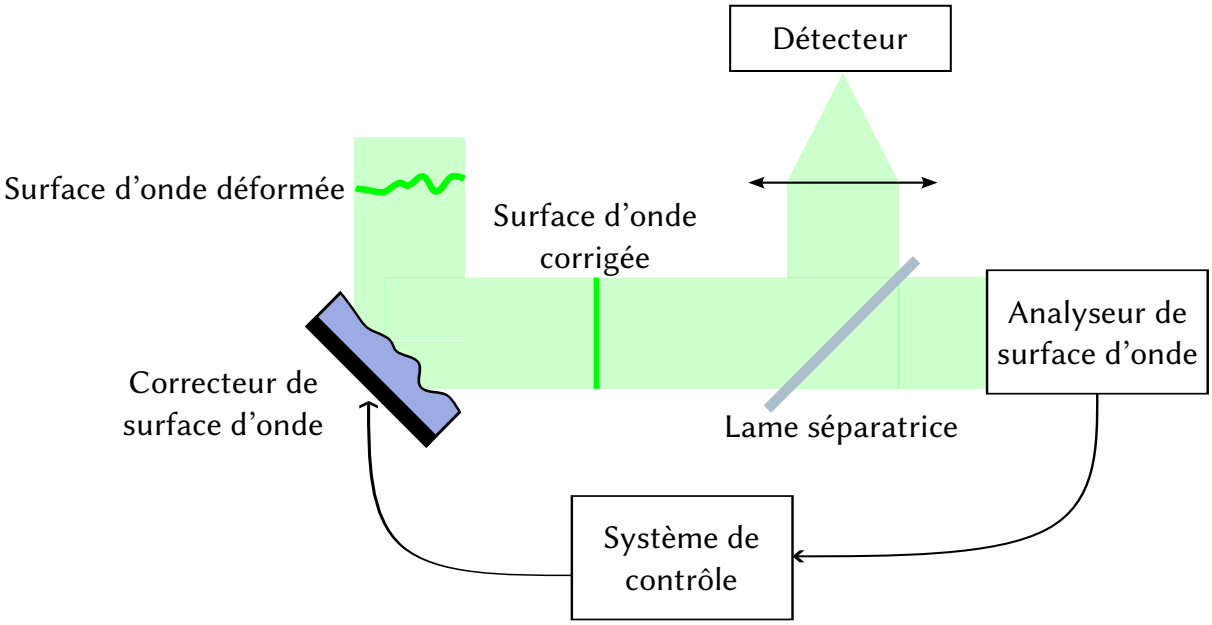


Figure 1.20 – Schéma de principe du fonctionnement de l'OA en boucle fermée.

1.5.1 Correcteur de surface d'onde

Deux types de dispositifs sont couramment utilisés pour la correction des aberrations de la surface d'onde : les miroirs déformables (DM) et les modulateurs spatiaux de lumière (SLM). La figure 1.21 présente des schémas de ces différentes technologies.

Un miroir déformable est constitué d'une membrane réfléchissante qui peut être déformée par le réseau d'actionneurs sur laquelle elle est placée. Les différences de marche induites par la déformation de la surface du DM se répercutent donc directement sur la surface d'onde. Les miroirs déformables possèdent aujourd'hui typiquement de quelques dizaines à quelques milliers d'actionneurs[58].

Il existe deux types de SLM : les SLM à cristaux liquides (LCoS) et les SLM à micro miroirs (DMD). Un LCoS consiste en une matrice de cristaux liquides dont l'orientation peut être individuellement pilotée par l'électronique associée. L'indice de réfraction des cristaux liquides dépendant de leur orientation, il est alors possible de modifier spatialement la phase d'un faisceau incident sur le SLM. Un DMD consiste en une matrice de micro miroirs ayant chacun deux orientations possibles. Chaque micro miroir peut ainsi agir comme un interrupteur qui laisse ou non passer la lumière. Il n'est donc pas possible avec un DMD de manipuler directement la phase comme avec un DM ou un LCoS SLM. La correction des aberrations reste toutefois possible de manière indirecte par holographie[59, 60].

Les SLM ont aujourd'hui des matrices de plusieurs millions d'éléments sur des surfaces d'environ 1cm² et permettent donc un contrôle de la phase avec une meilleure résolution que les miroirs déformables. On va toutefois voir dans la suite de ce manuscrit que cet avantage n'est pas réellement utile. En effet la principale difficulté de l'optique adaptative pour la microscopie se situe dans la mesure de la phase et la résolution offerte par les miroirs déformables est bien suffisante pour atteindre la résolution de la mesure. Les SLM ont du reste également de nombreux désavantages par rapport aux miroirs déformables (diffraction de la lumière par

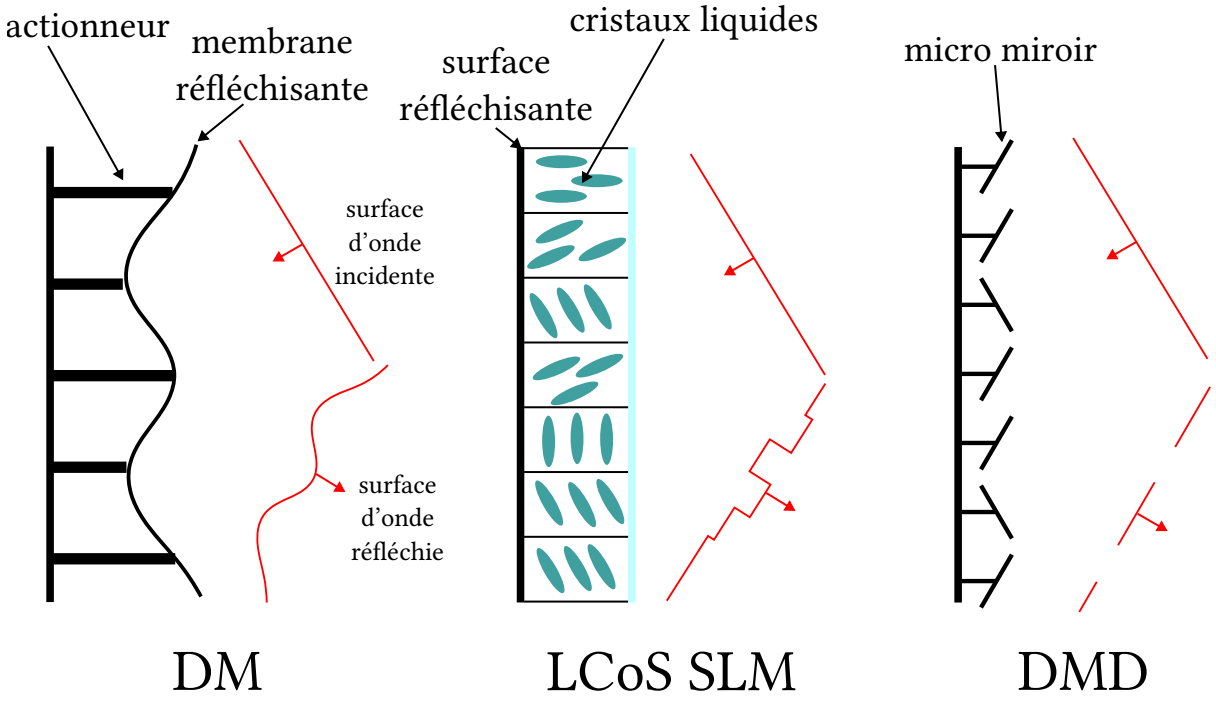


Figure 1.21 – Différentes technologies de correction de la surface d'onde. Miroir déformable (gauche), SLM à cristaux liquides (centre) et SLM à micro miroirs (droite).

le réseau formé par la matrice du SLM entraînant une perte importante de flux, obligation de travailler en lumière polarisée pour les LCoS SLM, chromaticité...).

1.5.2 Analyseur de surface d'onde

Shack-Hartmann

L'analyseur Shack-Hartmann[61] se compose d'une matrice de microlentilles suivie d'un détecteur. La matrice de microlentilles est placée dans un plan pupille et chaque microlentille focalise la lumière sur le détecteur. La figure 1.22 illustre le fonctionnement du Shack-Hartmann (SH). Pour l'observation d'une source ponctuelle, appelée étoile guide, et pour un faisceau non aberré, la surface d'onde est plane et chaque microlentille produit un spot de référence sur le détecteur. Pour un faisceau aberré, le spot produit par chaque microlentille se décale du spot de référence d'une distance qui dépend de la pente locale moyenne de la surface d'onde en amont de la microlentille. La mesure du décalage de l'ensemble des spots dans les deux directions sur l'image produite par le détecteur permet de déduire les gradients de la surface d'onde. Pour un décalage $(\Delta u, \Delta v)$ du spot dans une sous-pupille on a

$$\frac{1}{S}\iint_S \frac{\partial W}{\partial u}\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v = \frac{\Delta u}{f_{\mu L}} \tag{1.23}$$

et

$$\frac{1}{S}\iint_S \frac{\partial W}{\partial v}\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v = \frac{\Delta v}{f_{\mu L}} \tag{1.24}$$

où S est la surface de la sous-pupille et $f_{\mu L}$ la focale des microlentilles.

Le nombre de microlentilles doit (idéalement) être choisi pour échantillonner correctement la plus haute fréquence spatiale présente dans la phase pour éviter une contamination

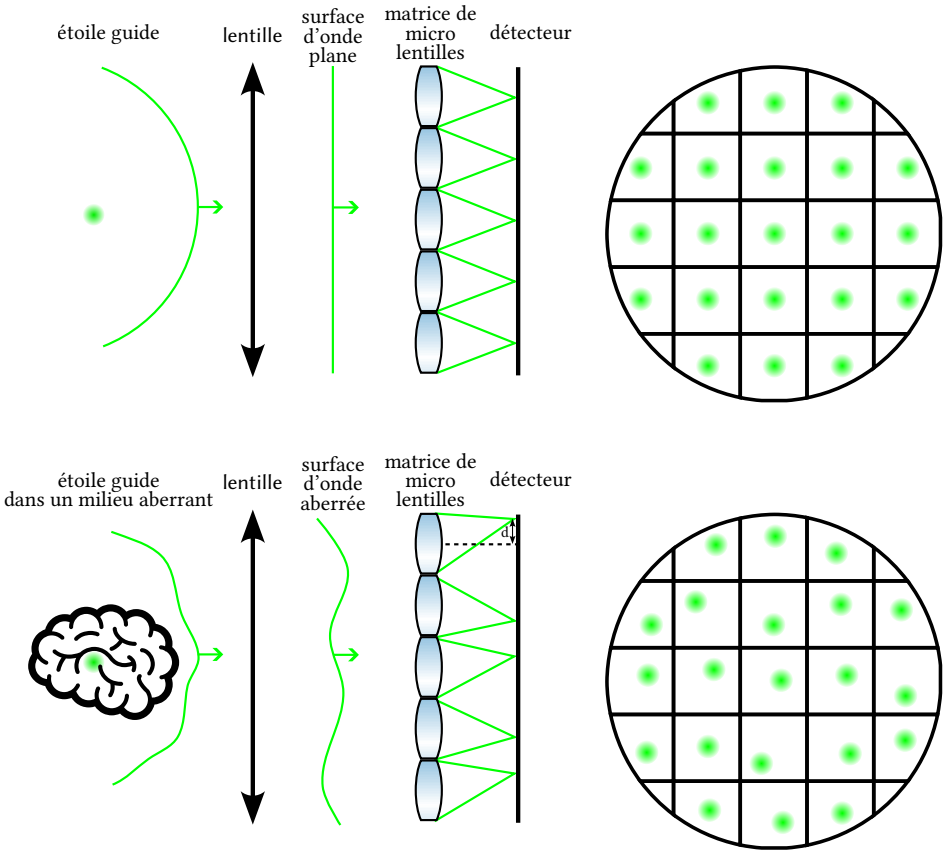


Figure 1.22 – Shack-Hartmann en l'absence d'aberrations (haut) et en présence d'aberrations (bas).

de la mesure des basses fréquences par un repliement des hautes fréquences. Outre ce problème d'échantillonnage, les variations de la phase au sein d'une microlentille conduisent à la formation d'une PSF aberrée sur le détecteur. La mesure du centre du spot (i.e. de la PSF d'une microlentille) peut alors être biaisée, ce qui fausse la valeur des gradients de la phase mesurée. La figure 1.23 illustre la distorsion des spots en présence d'aberrations hautes fréquences sur un SH non dimensionné pour ces fréquences. L'image du Shack-Hartmann n'est pas exploitable dans ce cas.

Pyramide

L'analyseur pyramide[62] utilise un prisme à quatre faces dont le sommet est placé au centre d'un plan focal. Une lentille relais permet de reformer quatre images de pupille sur un détecteur. La figure 1.24 présente un schéma de l'analyseur pyramide.

Le principe de mesure dérive de celui du couteau de Foucault[63]. L'étalement de la PSF au sommet du prisme provoqué par les aberrations change la distribution de l'intensité lumineuse entre les quatre pupilles. En mesurant la répartition de cette intensité il est possible de remonter aux gradients de la surface d'onde. La relation entre ces gradients et les différences d'intensité entre les quatre pupilles est fortement non linéaire. On peut le voir en imaginant l'effet d'un grand tilt décalant l'ensemble de la PSF sur une seule face de la pyramide : une seule pupille est alors illuminée et aucune information sur une éventuelle variation locale de la forme de la surface d'onde ne peut être obtenue. Pour pallier cet inconvénient, la pyramide peut être modulée, ce qui consiste à faire tourner la PSF autour du sommet du prisme. La dy-

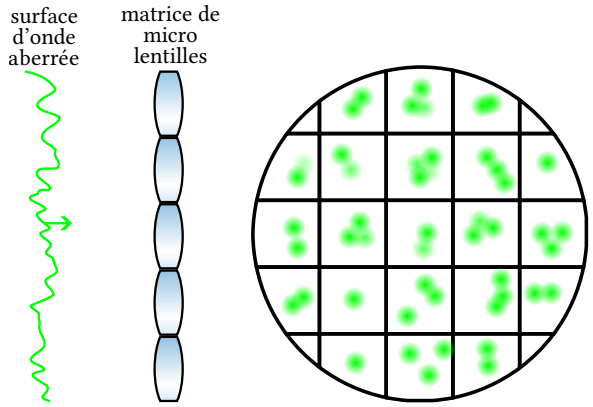


FIGURE 1.23 – Shack-Hartmann en présence d'aberrations comportant des hautes fréquences.

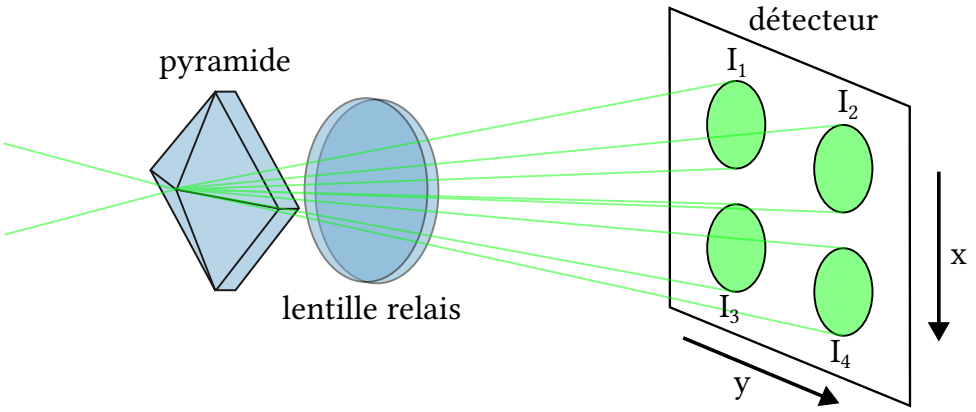


FIGURE 1.24 – Schéma de principe de l'analyseur pyramide.

namique de l'analyseur (i.e. l'amplitude maximale des aberrations mesurables) croît avec le rayon de modulation au prix d'une diminution de sa sensibilité.

Dans le régime linéaire, les gradients de la surface d'onde au niveau du pixel i dans la pupille sont donnés par

$$\frac{\partial W(i)}{\partial u} \propto \frac{I_1(i) + I_2(i) - I_3(i) - I_4(i)}{I_1(i) + I_2(i) + I_3(i) + I_4(i)} \tag{1.25}$$

et

$$\frac{\partial W(i)}{\partial v} \propto \frac{I_1(i) + I_3(i) - I_2(i) - I_4(i)}{I_1(i) + I_2(i) + I_3(i) + I_4(i)} \tag{1.26}$$

L'analyseur pyramide présente l'avantage d'une plus grande flexibilité que le SH, d'une part grâce à la possibilité de choisir le compromis effectué entre dynamique et sensibilité par le choix du rayon de modulation et d'autre part par la possibilité de choisir la résolution de la mesure (i.e. le nombre de points de mesure dans la pupille) en modifiant le binning de la caméra de détection.

1.5.3 Décomposition modale de la phase et polynôme de Zernike

Une fois les aberrations mesurées il peut être utile de pouvoir les décomposer sur une base modale pour en comprendre l'origine ou pour s'adapter à l'élément correcteur.

Les polynômes de Zernike[64] sont une suite de polynômes orthogonaux sur le disque unité. Ils forment une base adaptée pour la décomposition de la phase. De plus, les premiers modes correspondent aux aberrations communément rencontrées en optique : tip, tilt, focus, astigmatisme, coma… J'utilise la convention de Noll[65] pour la numérotation et la normalisation des polynômes de Zernike. On a

$$Z_j(r,\theta) = \begin{cases} \sqrt{2(n+1)} R_n^m(r)\cos(m\theta) & \text{si } j \text{ est pair et } m \neq 0 \\ \sqrt{2(n+1)} R_n^m(r)\sin(m\theta) & \text{si } j \text{ est impair et } m \neq 0 \\ \sqrt{n+1} R_n^m(r) & \text{si } m = 0 \end{cases} \tag{1.27}$$

où r est la coordonnée radiale normalisée au rayon de la pupille, θ la coordonnée azimutale, n l'ordre radial du mode, m l'ordre azimutal du mode et $R_n^m(r)$ sont les polynômes radiaux

$$R_n^m(r) = \sum_{s=0}^{(n-m)/2} \frac{(-1)^s (n-s)!}{s!\left(\frac{n+m}{2}-s\right)!\left(\frac{n-m}{2}-s\right)!} r^{n-2s} \tag{1.28}$$

La figure 1.25 montre la forme des 21 premiers polynômes de Zernike ainsi que les PSF correspondantes.

Une relation de récurrence sur les polynômes radiaux dérivée par Shakibaei et Parameswaran[66]

$$R_n^m(r) = r\left(R_{n-1}^{|m-1|}(r) + R_{n-1}^{m+1}(r)\right) - R_{n-2}^m(r) \tag{1.29}$$

rend possible le calcul d'ordres très élevés (voir figure 1.26) qui sont, dans le cadre de ma thèse, parfaitement inutiles.

La décomposition de la surface d'onde sur les polynômes de Zernike s'écrit

$$W(r,\theta) = \sum_{j=1}^{+\infty} a_j Z_j(r,\theta) \tag{1.30}$$

avec

$$a_j = \int_0^{2\pi} \int_0^1 W(r,\theta) Z_j(r,\theta)\, \mathrm{d}r\, \mathrm{d}\theta \tag{1.31}$$

Les polynômes de Zernike (excepté le piston) sont de moyenne nulle et leur variance est égale à 1. Ces deux propriétés couplées à celle d'orthogonalité fait que la variance spatiale d'une surface d'onde peut s'exprimer très simplement à partir de sa décomposition en coefficients de Zernike

$$\sigma_W^2 = \sum_{j=2}^{+\infty} a_j^2 \tag{1.32}$$

Quand on choisit le nombre N de modes utilisés pour décomposer la phase, on veille à choisir un nombre égal à un nombre triangulaire

$$N = \frac{a(a+1)}{2} \tag{1.33}$$

de façon à toujours inclure l'ensemble des ordres azimutaux du plus haut ordre radial.

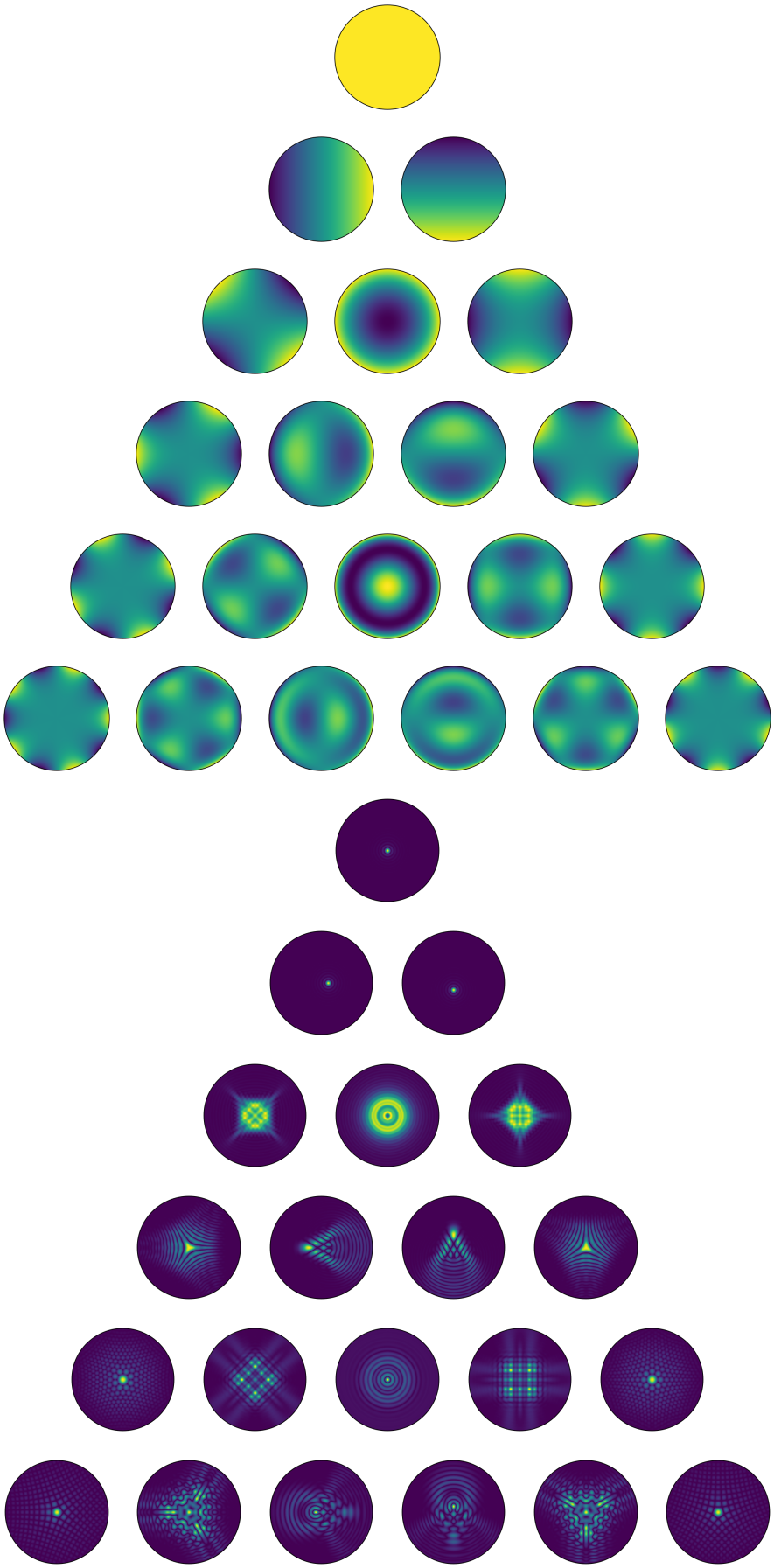


Figure 1.25 – Premiers polynômes de Zernike (haut) et PSF des aberrations de phase correspondantes (bas) ordonnés verticalement par ordre radial et horizontalement par ordre azimutal.

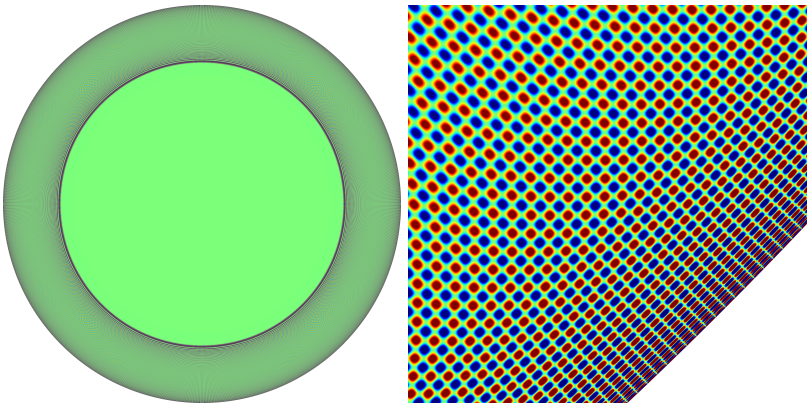


Figure 1.26 – Millionième polynôme de Zernike (gauche) et zoom sur un de ses bords (droite).

1.5.4 Rapport de Strehl et Pseudo-Strehl

Pour mesurer les performances d'un système d'OA, plusieurs critères peuvent être utilisés.

Le rapport de Strehl[67] est une mesure de la qualité d'une PSF, il est défini comme le rapport entre l'intensité de la PSF au centre du plan image et l'intensité au centre du plan image d'une PSF sans aberration, il peut donc être calculé en intégrant les FTO de ces deux PSF

$$S = \frac{\iint \mathrm{FTO}_{\mathrm{PSF}}(u)\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v}{\iint \mathrm{FTO}_{\mathrm{diff}}(u)\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v} \tag{1.34}$$

Pour des aberrations de faible amplitude le rapport de Strehl peut être approché en fonction de la variance de la phase par la formule de Mahajan[68]

$$S \approx \exp\left(-\sigma_\varphi^2\right) = \exp\left(-\left(\frac{2\pi}{\lambda}\sigma_w\right)^2\right) \tag{1.35}$$

Dans la pratique mesurer le rapport de Strehl sur une image de PSF n'est pas une opération facile[69]. Pour faciliter les mesures et en particulier pour ignorer l'effet du tip/tilt j'ai défini dans *Commère et al.* (2024)[70] un critère alternatif, que j'appelle le Pseudo-Strehl (PS) et qui se calcule comme

$$\mathrm{PS} = \frac{\iint \mathrm{FTM}_{\mathrm{PSF}}(u)\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v}{\iint \mathrm{FTM}_{\mathrm{diff}}(u)\,\mathrm{d}u\,\mathrm{d}v} \tag{1.36}$$

L'utilisation de la FTM au lieu de la FTO implique que le Pseudo-Strehl est invariant par translation de la PSF. Le fait d'ignorer la phase de la FTO implique également que la valeur obtenue est toujours plus élevée que le rapport de Strehl réel (typiquement jusqu'à 10%[69]). Le Pseudo-Strehl ne doit donc pas être utilisé en comparaison avec des rapports de Strehl mais reste très utile pour effectuer des comparaisons relatives entre valeurs de Pseudo-Strehl.

1.5.5 Microscopie confocale et optique adaptative

Je m'intéresserai principalement à la microscopie confocale dans la suite de ce manuscrit. Il est donc utile de regarder de plus près les spécificités de cette méthode de sectionnement quand on l'associe à l'optique adaptative.

Étoile guide

Les analyseurs SH et pyramide ont besoin d'une source ponctuelle (appelée étoile guide) pour effectuer leurs mesures. On va voir que la reconstruction d'image par balayage point à point de l'ensemble du champ de la microscopie confocale (et de la microscopie à deux photons) permet d'avoir accès à une telle étoile guide. La figure 1.27 présente le fonctionnement du balayage sur un microscope confocal. Un miroir galvanométrique est placé dans un plan pupille du microscope, l'inclinaison de ce miroir permet de déplacer latéralement le point de focalisation derrière l'objectif. Le miroir est commun aux voies d'illumination et de détection et la fluorescence est un processus quasi-instantané par rapport à la vitesse de balayage du miroir (quelques nanosecondes de durée de vie pour un fluorophore dans l'état excité par rapport à quelques microsecondes par pixel pour le balayage). La lumière émise par la fluorescence est donc «débalayée» par le miroir et son faisceau suit, dans le sens inverse, le même chemin optique que le faisceau d'illumination. Ceci permet l'utilisation d'un trou confocal fixe et la lumière focalisée au centre de ce trou confocal peut alors servir d'étoile guide pour l'analyseur de surface d'onde. Je reviendrai plus en détail sur l'impact de la méthode de sectionnement choisie pour l'optique adaptative dans le chapitre 5.

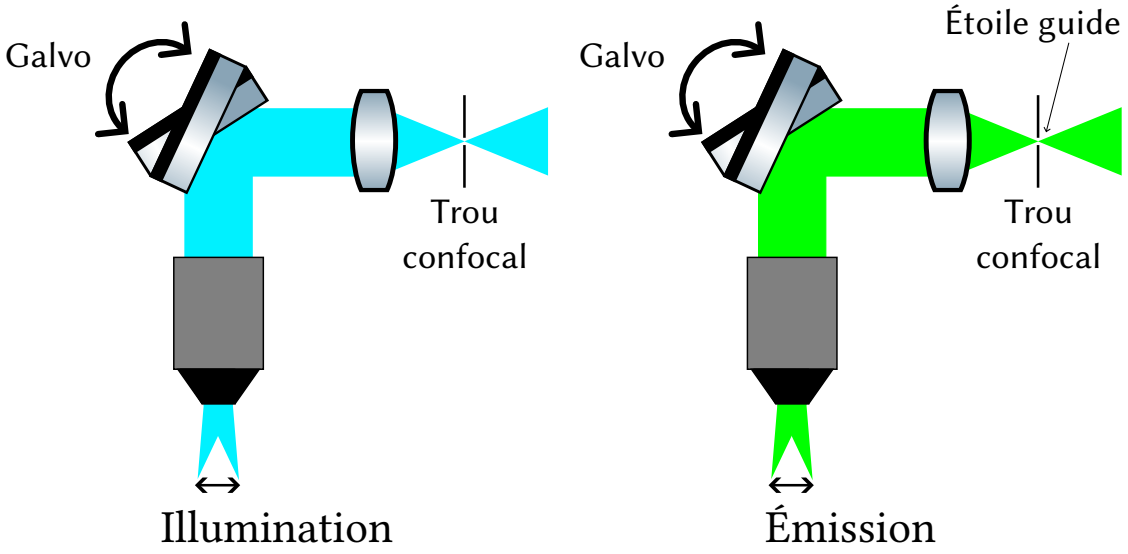


Figure 1.27 – Illustration du processus de «débalayage» dans le cas d'un microscope confocal. Le faisceau d'illumination (gauche) et le faisceau d'émission (droite) suivent le même chemin optique en sens opposé. En particulier, ils passent par le même trou confocal.

Effet de l'optique adaptative

La PSF d'un microscope confocal (i.e. la PSF par laquelle il faut convoluer à l'objet pour obtenir l'image produite par le microscope) dépend à la fois de la PSF de la voie d'illumination $\mathrm{PSF}_{\mathrm{illu}}$, de la PSF de la voie de détection $\mathrm{PSF}_{\mathrm{det}}$ et de la fonction indicatrice P de la transmission du trou confocal. La PSF résultante est[71]

$$\mathrm{PSF}(x,y) = \mathrm{PSF}_{\mathrm{illu}}(x,y) \times (\mathrm{PSF}_{\mathrm{det}} * P)(x,y) \tag{1.37}$$

Pour obtenir la meilleure qualité d'image possible il est donc important de corriger à la fois la voie d'illumination et la voie de détection. La figure 1.28 est une représentation schématique d'un microscope confocal avec optique adaptative. On voit que, en plus des galvanomètres de balayage, le miroir déformable est également commun aux voies d'illumination et de détection. Avec un miroir déformable, la différence de longueur d'onde entre illumination et émission n'est pas un problème tant que la chromaticité des différences de marches (i.e. des aberrations) introduites par l'échantillon est faible.

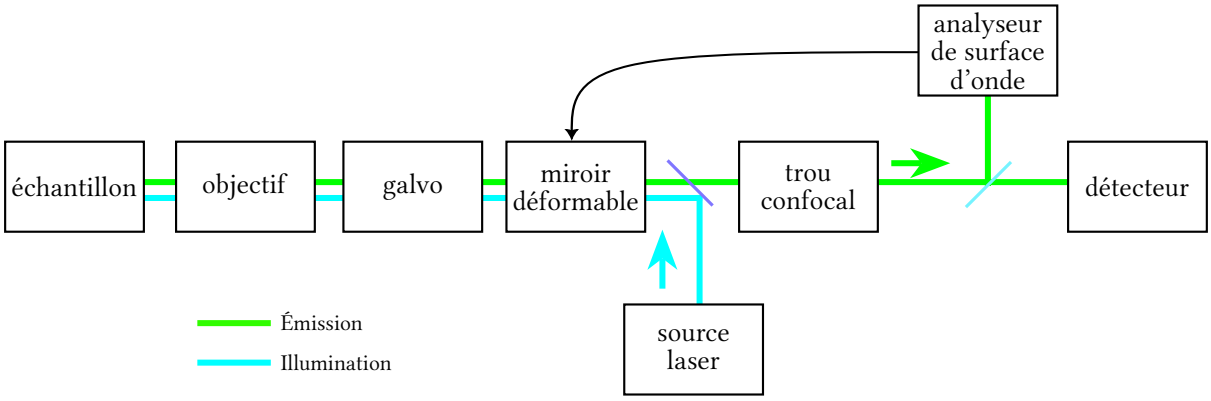


Figure 1.28 – Schéma d'un microscope confocal avec optique adaptative.

La figure 1.29 montre les effets respectifs de la correction de la voie d'illumination et de la correction de la voie de détection. La correction de la voie d'illumination permet de réduire la zone illuminée dans le plan de focus dans l'échantillon. Pour une puissance délivrée par le laser donnée, cela permet d'augmenter le signal en augmentant la puissance du faisceau sur la zone d'intérêt (ou alternativement de diminuer le photoblanchiment en permettant une diminution de la puissance du laser utilisée). La correction de la voie de détection permet de réduire la zone illuminée dans le plan du trou confocal et donc de maximiser le signal transmis à travers celui-ci.

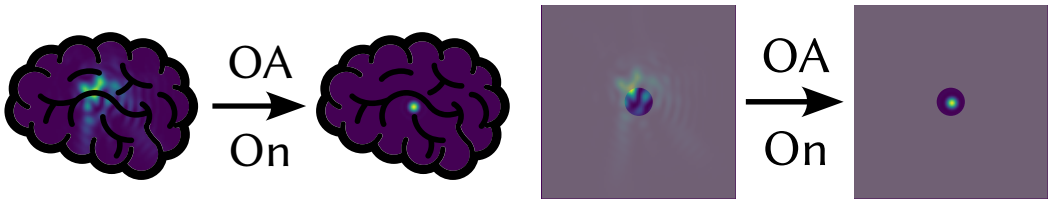
Pour mieux comprendre l'impact de la correction de chaque voie, on peut envisager les effets obtenus par une correction indépendante de chacune d'entre elles. Ces effets vont entre autres dépendre de l'ouverture du trou confocal. J'étudie trois cas : trou confocal de taille infinie [1], trou confocal de taille intermédiaire et trou confocal infinitésimal. Pour un trou confocal de taille infinie la PSF (eq. 1.37) vaut

$$\mathrm{PSF}_{P=\infty}(x,y) = \mathrm{PSF}_{\mathrm{illu}}(x,y) \tag{1.38}$$

et pour un trou confocal infinitésimal

$$\mathrm{PSF}_{P=\delta}(x,y) = \mathrm{PSF}_{\mathrm{illu}}(x,y) \times \mathrm{PSF}_{\mathrm{det}}(x,y) \tag{1.39}$$

1. On considère que le détecteur situé derrière le trou confocal est également de taille infinie.



Correction de l'illumination Correction de l'émission

Figure 1.29 – Effet de la correction de la voie d'illumination (gauche) et de la voie de détection (droite).

Quelle que soit la taille du trou confocal la correction de la PSF d'illumination permet un gain en signal et en résolution en réduisant l'extention de la PSF. La correction de la PSF de détection dépend par contre de la taille du trou confocal. Pour un trou de taille infinie la correction n'apporte rien, l'ensemble du signal étant transmis à travers le trou que ce soit avec ou sans correction. Pour un trou confocal infinitésimal la correction apporte un gain en signal (en augmentant la transmission du signal en provenance du point de l'échantillon aligné avec le trou confocal) et en résolution (en réduisant la transmission du signal en provenance des points de l'échantillon non alignés avec le trou confocal). Pour un trou de taille intermédiaire le gain apporté par la correction de la PSF de détection dépendra de l'extension de la PSF aberrée par rapport à la taille du trou.

1.6 Objectifs de cette thèse

Cette thèse prend place au sein d'une collaboration entre l'équipe «Applications Biomédicales» du LIRA, spécialisée dans l'application de l'optique adaptative au domaine biomédical et une équipe de neurobiologistes de l'IBENS (Institut de Biologie de l'ENS) qui étudie le fonctionnement du contrôle moteur chez la souris. L'équipe de l'IBENS dispose d'un microscope confocal commercial pour imager (ex vivo) des cerveaux de souris clarifiés et marqués en fluorescence dans le but d'en réaliser des connectomes. La figure 1.30 présente une image réalisée avec ce microscope. Ce microscope présente deux limitations importantes : un temps d'acquisition trop important (jusqu'à plusieurs jours pour un cerveau entier) et une perte de contraste lors de l'observation des cerveaux en profondeur. Le travail de l'équipe du LIRA consiste en la réalisation d'un microscope levant ces deux limitations. Mon travail se concentre principalement sur l'aspect perte de contraste. Deux phénomènes peuvent en être à l'origine : la présence d'aberrations optiques et la présence de diffusion (que l'on peut également voir comme des aberrations à haute fréquence spatiale). Il me faut donc, dans un premier temps, déterminer lequel de ces deux phénomènes prédomine, puis, dans un second temps et s'il y a effectivement des aberrations optiques importantes dans les cerveaux clarifiés, construire le microscope avec optique adaptative capable de les corriger. Dans la pratique, les choses ne se sont finalement pas déroulées dans cet ordre, la construction du microscope avec optique adaptative s'étant avérée nécessaire pour pouvoir mesurer les aberrations des échantillons.

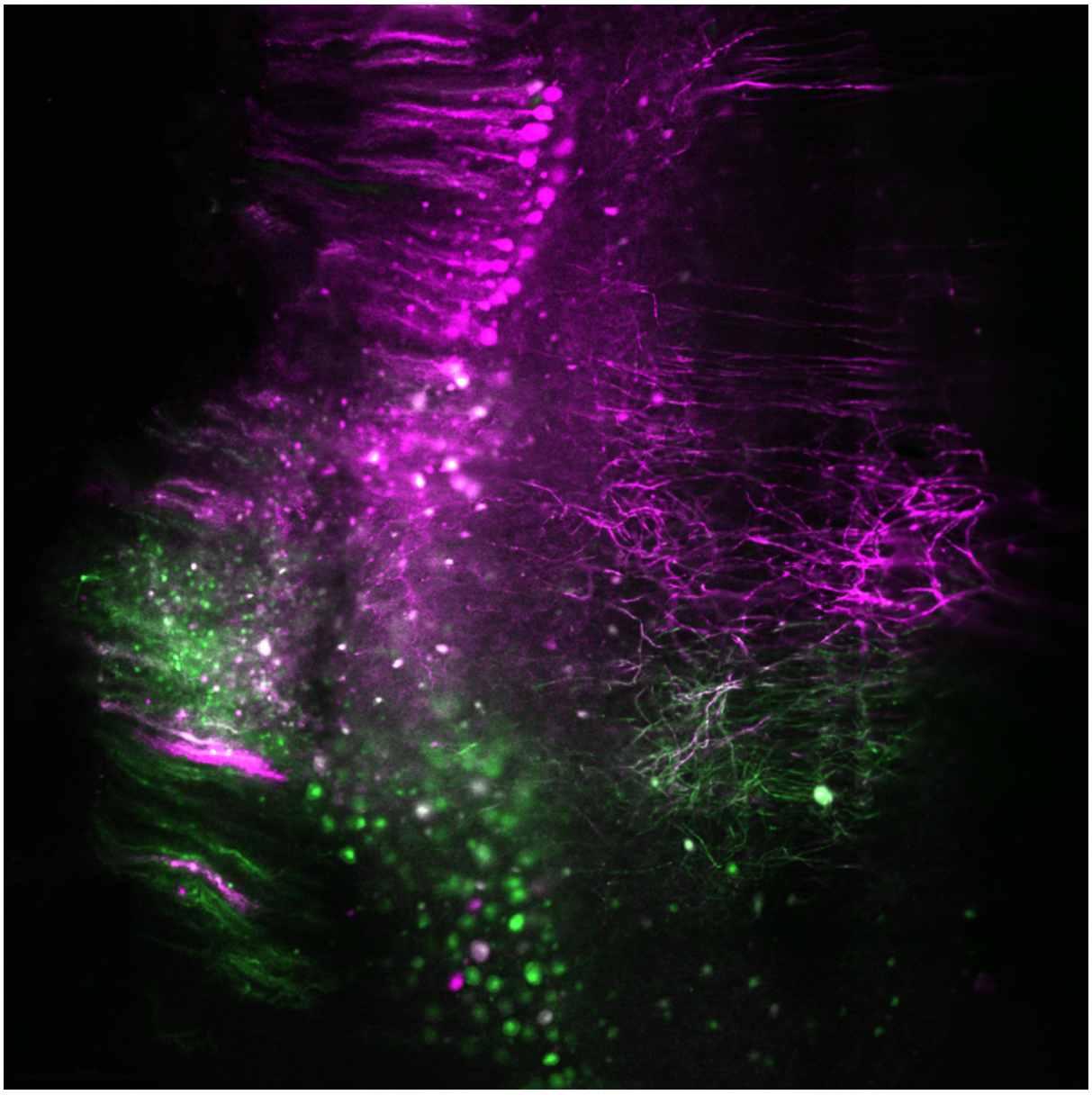


Figure 1.30 – Exemple d'image réalisée avec le microscope confocal de l'IBENS dans un cerveau de souris clarifié préalablement injecté avec deux virus dérivés du virus de la rage pour une expression conditionnelle de la EGFP (vert) et de tdTomato (magenta). Les gros corps cellulaires de la colonne centrale appartiennent à des cellules de Purkinje.

Chapitre 2

Suite logicielle

> Il y avait à l'académie des sciences un Fourier célèbre que la postérité a oublié et dans je ne sais quel grenier un Fourier obscur dont l'avenir se souviendra.
>
> Victor Hugo, Les Misérables

Le développement d'une suite logicielle pour contrôler le banc optique est un travail que j'ai commencé avant le début de ma thèse, pour remplacer les programmes Labview existant, trop peu flexibles, et difficilement modifiables. Cette suite logicielle comprend aujourd'hui : un logiciel de visualisation de caméra (camgui), des librairies de contrôle pour caméras Hamamatsu et Allied Vision (Cam), un logiciel de visualisation pour le MPPC (mppcgui), un logiciel de contrôle de SLM (slmgui), des librairies de contrôle pour les platines motorisées (Picomotors) et les lasers (lasergui), un module permettant la communication par le réseau entre les différents programmes (rpc), un logiciel dit «RTC» pour contrôler l'optique adaptative (rtcgui) et un logiciel de simulation d'optique adaptative (simugui). Ces deux derniers étant deux interfaces construites sur une même librairie dédiée à l'optique adaptative (rustao), la pièce centrale de cette suite. Un module d'interfaçage avec Python (pyao) et la librairie de contrôle des caméras Allied Vision (VimbaX) ont été en partie développés par Mohamed Tabkioui dont j'ai encadré le stage de deuxième année d'école d'ingénieur en 2025. L'ensemble du code source est disponible sur Gitlab sous licence MIT [1]. La figure 2.1 présente un graphe de dépendance entre les éléments de la suite logicielle.

Ce chapitre ne se veut nullement exhaustif et se concentrera sur les éléments directement liée à l'optique adaptative (principalement rustao).

2.1 Historique

Le logiciel de contrôle de l'optique adaptative anciennement utilisé par l'équipe a été fourni par Alpao lors de l'achat du miroir déformable. Il consiste en une interface en Labview, communiquant avec un module Matlab, lui-même communiquant avec le AlpaoCoreEngine, module propriétaire dont nous n'avons pas le code source. L'interface de ce programme est visible en figure 2.2.

La construction du RTC autour d'une boite noire (le AlpaoCoreEngine) rendait difficiles, voire impossibles, certaines modifications. Ces problèmes ainsi que la volonté de s'affranchir de toutes dépendances à des environnements propriétaires (Matlab, Labview) m'ont conduit

1. https://gitlab.com/Gaumut/rustao

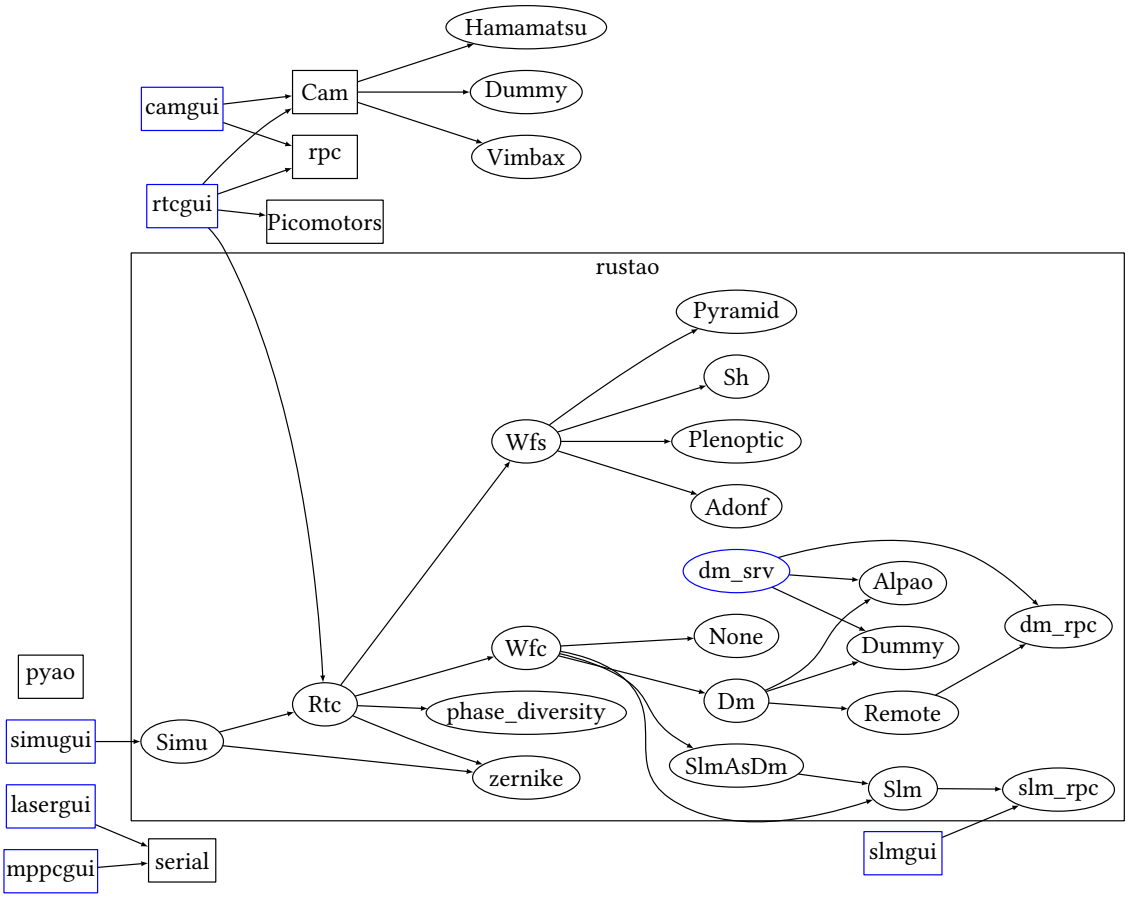


Figure 2.1 – Architecture générale de la suite logicielle. Les rectangles bleu représentent les exécutables.

au remplacement progressif de ce programme dès mon arrivée dans l'équipe en 2019. Le développement a débuté dans un mélange de C et de Python et s'est poursuivi intégralement en Rust à partir de 2022.

2.2 Rust

L'intérêt de remplacer le mélange C et Python par Rust est multiple. Premièrement bénéficier de la rigidité d'un langage bas niveau, qui, même si elle augmente le temps de développement initial, se solde par un gain de temps à plus long terme grâce à la solidité donnée à l'architecture logicielle. Deuxièmement la simplification induite par l'utilisation d'un seul langage au lieu de deux. Troisièmement le choix de Rust plutôt que de continuer à utiliser du C permet de bénéficier de la sûreté des accès mémoire apporté par Rust, ce qui permet d'une part une parallélisation plus facile du code et d'autre part de produire des applications qui, une fois compilées, présentent moins de risque de plantage[72]. La relative nouveauté de Rust implique par ailleurs quelques désavantages, notamment un écosystème de librairies non mature, en particulier pour le calcul scientifique, ce qui m'a obligé à implémenter moi-même certaines fonctionnalités qui aurait été disponibles immédiatement en Python ou en C.

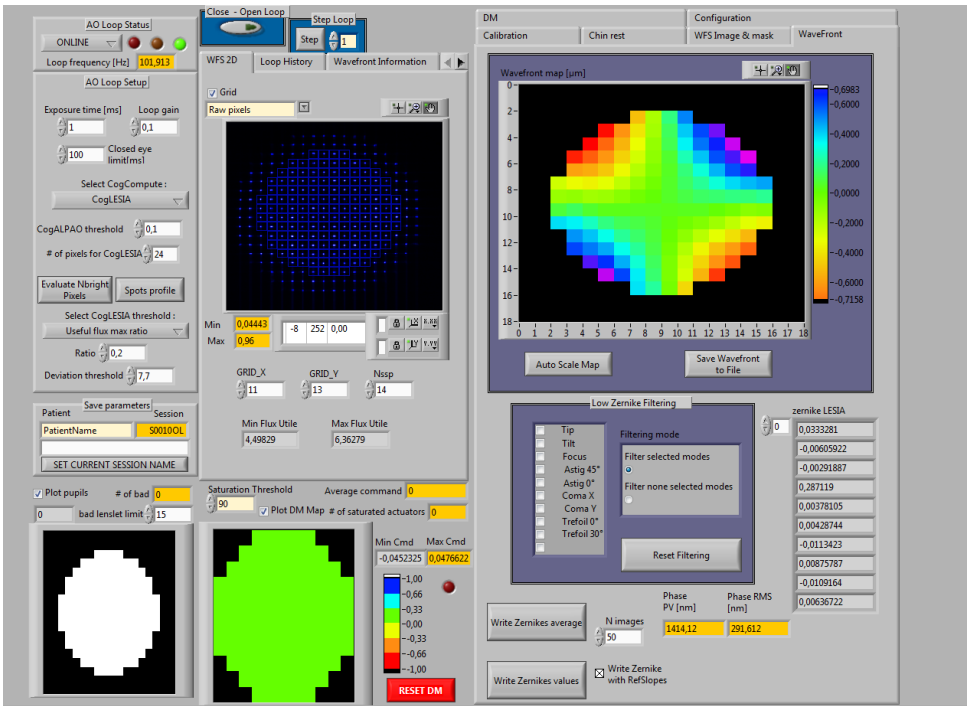


Figure 2.2 – Interface de l'ancien RTC en labview.

2.3 RTC

Le rôle du RTC est de faire le lien entre d'un côté l'analyseur de surface d'onde et de l'autre le correcteur de surface d'onde tout en affichant les informations sur la mesure et la correction à l'utilisateur. Le RTC doit composer avec trois bases différentes d'expressions des aberrations : la base des Zernike principalement utilisée pour la communication avec l'utilisateur, la base dite des pentes tel que fournie par l'analyseur (appelée ainsi car correspondant à une mesure du gradient local de la surface d'onde) et la base de commandes attendues par le correcteur de surface d'onde. La figure 2.3 présente une capture d'écran de l'interface graphique associée au RTC (rtcgui).

Le RTC présente deux modes de fonctionnement fondamentalement différents. Le premier, consiste à reconstruire directement des cartes de phase à partir de la mesure (méthode que je n'ai implémentée qu'avec l'analyseur pyramide). Quand le RTC est utilisé avec un (LCoS) SLM ces cartes de phase peuvent ensuite être directement appliquées comme correction. J'ai utilisé ce mode de fonctionnement pendant une courte période au début de ma thèse pour tenter de mesurer les aberrations induites par les cerveaux clarifiés. Pour le reste j'ai utilisé exclusivement le second mode de fonctionnement, présenté ci-dessous, qui consiste en l'utilisation de matrice d'interaction pour passer entre les différentes base de travail du RTC.

Je note $\mathbf{D}$ la matrice d'interaction commandes-pentes telle que

$$\mathbf{s} = \mathbf{D}\mathbf{c} \tag{2.1}$$

où $\mathbf{s}$ est un vecteur dans l'espace des pentes et $\mathbf{c}$ un vecteur dans l'espace des commandes envoyées au correcteur. De même on note $\mathbf{M}$ la matrice d'interaction Zernike-pentes [1] telle que

$$\mathbf{s} = \mathbf{M}\mathbf{z} \tag{2.2}$$

1. Voir annexes A.4 et A.5 pour la construction des matrices $\mathbf{D}$ et $\mathbf{M}$.

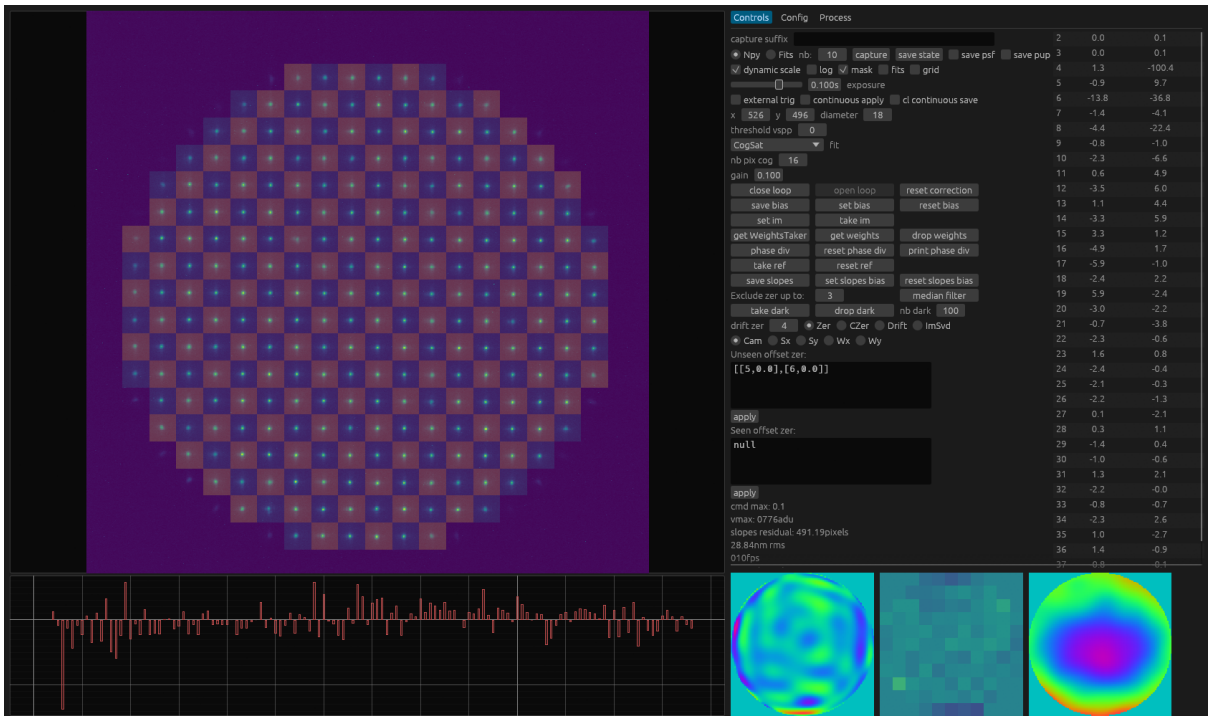


Figure 2.3 – Capture d'écran de rtcgui. On peut y voir, en haut à gauche l'image fournie par l'analyseur de surface d'onde, en bas de gauche à droite les coefficients de Zernike mesurés, la phase mesurée, la carte des actionneurs du DM et une image de la phase corrigée par le DM.

où $\mathbf{z}$ est un vecteur de coefficients de Zernike. Les matrice $\mathbf{D}^+$ et $\mathbf{M}^+$ permettant la projection dans le sens inverse

$$\mathbf{c} = \mathbf{D}^+\mathbf{s} \tag{2.3}$$

et

$$\mathbf{z} = \mathbf{M}^+\mathbf{s} \tag{2.4}$$

sont les pseudo-inverses de $\mathbf{D}$ et $\mathbf{M}$. Le pseudo-inverse est calculé par une décompositions en valeur singulière (SVD). Pour une matrice $\mathbf{A}$ on a

$$\mathbf{A} = \mathbf{U}\mathbf{\Sigma}\mathbf{V}^t \tag{2.5}$$

et le pseudo-inverse de $\mathbf{A}$ est

$$\mathbf{A}^+ = \mathbf{V}\mathbf{\Sigma}^{-1}\mathbf{U}^t \tag{2.6}$$

On peut profiter de cette inversion pour filtrer les valeurs singulières les plus faibles de la matrice $\mathbf{D}$ (correspondant aux modes mal vus par l'analyseur). Ce filtrage permet d'augmenter la stabilité de la boucle d'OA au détriment de la correction de quelques modes (généralement de haute fréquence spatiale).

À chaque itération la commande $\mathbf{c_{wfc}}$ appliquée sur le correcteur de surface d'onde par le RTC est

$$\mathbf{c_{wfc}} = \mathbf{D}^+\mathbf{M}\left(\mathbf{z_{so}} + \mathbf{z_{uo}}\right) + \mathbf{c_c} + \mathbf{c_b} \tag{2.7}$$

où $\mathbf{z_{so}}$ et $\mathbf{z_{uo}}$ sont deux vecteurs de coefficients de Zernike, $\mathbf{c_c}$ est la commande de correction à appliquer et $\mathbf{c_b}$ est un biais sur la commande.

Les vecteurs $\mathbf{z_{so}}$ et $\mathbf{z_{uo}}$ sont deux vecteurs d'offset choisit par l'utilisateur. $\mathbf{z_{so}}$ est «vu» par la procédure de fermeture de boucle et est donc automatiquement corrigé dès lors que la boucle est fermée, ce vecteur permet par exemple de vérifier que la mesure fournie par l'analyseur est correcte : si le système n'est pas capable de mesurer et de corriger une aberration qu'il a lui même appliqué c'est que la mesure est mauvaise (ou qu'il y a un autre problème). $\mathbf{z_{uo}}$ est ignoré par la procédure de fermeture de boucle (car il est soustrait de la mesure, voir eq 2.9) il permet par exemple de pouvoir travailler en boucle fermée avec une aberration résiduelle choisie (en général du tip-tilt ou du défocus).

En boucle fermée la correction $\mathbf{c_c}$ est mise à jour par un intégrateur de sorte que sa valeur à l'itération $i+1$ soit

$$\mathbf{c_c}(i+1) = l\mathbf{c_c}(i) - g\mathbf{D}^{+}\mathbf{s} \tag{2.8}$$

où l est la fuite de l'intégrateur, g le gain de la boucle et $\mathbf{s}$ les pentes calculées comme suit

$$\mathbf{s} = \mathbf{s_{raw}} - \mathbf{s_b} - \mathbf{s_r} - \mathbf{M}\mathbf{z_{uo}} \tag{2.9}$$

où $\mathbf{s_{raw}}$ sont les pentes brutes mesurées sur l'image fournie par la caméra de l'analyseur à l'itération $i+1$, $\mathbf{s_b}$ est un biais sur les pentes (typiquement les NCPA étalonnés entre l'analyseur et le détecteur), $\mathbf{s_r}$ un autre biais sur les pentes pouvant être ajouté à tout moment par l'utilisateur et $\mathbf{z_{uo}}$ le vecteur de Zernike d'offset non vu par l'analyseur qui doit être soustrait ici pour être effectivement ignoré lors de la fermeture de boucle.

2.3.1 Mesurer les aberrations

J'ai implémenté quatre types d'analyseurs de surface d'onde (Wfs sur la figure 2.1) : Shack-Hartmann, pyramide, plénoptique[73, 74, 75] et «Adonf» (un type d'analyseur de Horwitz)[76, 77]. Je donne ci-dessous quelques détails sur le fonctionnement des analyseurs utilisés pendant ma thèse (Shack-Hartmann et pyramide), du point de vue du RTC.

Analyseur Shack-Hartmann

Le RTC construit un masque numérique de sous-pupilles qui est aligné par l'utilisateur sur l'image de l'analyseur. La forme de ce masque (et également des masques de tous les autres types d'analyseur) est calculée automatiquement à partir de la géométrie de la pupille telle que spécifiée par l'utilisateur dans le fichier de configuration du RTC. Cette géométrie n'est pas limitée à un disque mais peut prendre des formes ellipsoïdales ou polygonales quelconques et être éventuellement trouée en son centre.[1] (Voir figure 2.4 pour un exemple de pupille polygonale tronquée.) Le RTC procède ensuite au calcul des centroïdes des PSF de chaque sous-pupille. L'ensemble de ces mesures forme le vecteur $\mathbf{s_{raw}}$ mentionné ci-dessus. J'ai implémenté différentes méthodes pour le calcul de ce centroïde

- Calcul par centre de gravité
- Calcul par fit gaussien de la PSF.
- Calcul par mesure de la phase des premiers coefficients de la transformée de Fourier de la sous-pupille[78].

1. Voir https://math.stackexchange.com/q/4160104 pour l'équation de polygones réguliers quelconques (éventuellement lissés).

— Calcul par corrélation croisée avec une sous-pupille de référence.
— Calcul par corrélation avec une image de référence fournie par l'utilisateur (qui peut être différente pour chaque sous-pupille, voir section 5.2.2).

Les deux dernières méthodes permettent de faire des mesures sur des sources étendues. La méthode par centre de gravité est celle que j'utilise le plus couramment. Elle donne les déplacements m_x et m_y du spot dans les deux directions au sein de la sous-pupille par les calculs suivants après numérotation des pixels par intensité décroissante

$$\begin{aligned} m_x &= \frac{\sum_{i=1}^{N} x_i \left(I_i - I_{N+1}\right)}{\sum_{i=1}^{N} I_i - I_{N+1}} \\ m_y &= \frac{\sum_{i=1}^{N} y_i \left(I_i - I_{N+1}\right)}{\sum_{i=1}^{N} I_i - I_{N+1}} \end{aligned} \tag{2.10}$$

où I_i est la valeur du pixel situé à la position (x_i, y_i) par rapport au centre de la sous-pupille. Le nombre N de pixels utilisés pour le calcul peut être fixé par l'utilisateur, soit directement soit par le choix d'un seuil.

La possibilité est donnée de désactiver des sous-pupilles, soit choisies par l'utilisateur, soit de manière automatique lorsque le flux dans la sous-pupille passe sous un seuil donné. Le RTC utilise alors des matrices d'interaction **D** et **M** où les lignes correspondantes aux sous-pupilles désactivées sont supprimées. Les matrices inverses doivent alors être recalculées. Un système de mise en cache est utilisé pour ne pas avoir à recalculer ces matrices à chaque itération. Alternativement à la désactivation le RTC implémente également un système de pondération des sous-pupilles (voir annexe A.6).

Analyseur pyramide

Comme expliqué dans l'introduction l'analyseur pyramide permet une plus grande résolution de mesure et surtout une plus grande flexibilité sur cette résolution qu'il est possible de changer en binnant différemment les pixels de la caméra pyramide. Deux modes de fonctionnement ont été implémentés pour l'analyseur pyramide, le mode par matrice d'interaction présenté ci-dessus et un mode de reconstruction directe de la phase qui contient lui même deux méthodes différentes de reconstruction. La première, une méthode proposée par Southwell[79] est une méthode matricielle tandis que la deuxième utilise les propriétés de la transformée de Fourier. Le principe de ces deux méthodes est présenté en annexe A.8.2.

2.3.2 Corriger les aberrations

Le RTC permet d'utiliser un miroir déformable ou un (LCoS) SLM comme correcteur de surface d'onde. Ces correcteurs peuvent être situés sur le même ordinateur ou sur un ordinateur distant, le contrôle ce fait alors par le réseau via le module *rpc* de la suite logicielle.

Miroir déformable

La commande du DM peut s'effectuer soit directement dans la base des actionneurs soit dans une autre base de l'espace de commande dite «base de Gendron»[80]. Cette base est construite pour minimiser la covariance des modes de correction par rapport à la turbulence atmosphérique, une propriété qui, a priori, ne m'intéresse pas ici. La base est néanmoins utile car ses deux premiers modes correspondent à des modes de tip-tilt ce qui permet de faciliter l'exclusion de ceux-ci de la correction (voir ci-dessous).

SLM

Le RTC implémente deux modes de contrôle d'un SLM. Un mode d'application directe de cartes de phase sur les pixels du SLM, utilisable avec la pyramide dans son mode de mesure directe et avec un SH par application directe des modes de Zernike mesurés. Un autre mode de fonctionnement permet de simuler un miroir déformable en modélisant les fonctions d'influence du DM sur les pixels du SLM. Le nombre d'actionneurs et la forme et l'extension spatiale de leur fonction d'influence sont configurables par l'utilisateur. Ce mode de fonctionnement permet d'utiliser le même formalisme de matrice d'interaction qu'avec un véritable DM.

La première méthode est bien adaptée à la mesure et la correction d'aberrations avec une très grande résolution mais présente d'importante difficulté pour l'alignement du montage optique. En effet dans cette configuration l'analyseur et le correcteur doivent être alignés à une fraction de pixel du SLM près. Le mode de fonctionnement par simulation de DM simplifie l'alignement puisque le processus de mesure d'une matrice d'interaction aligne automatiquement la commande avec la mesure.

Diversité de phase

J'ai implémenté une méthode de mesure des aberrations par diversité de phase[81], particulièrement utile pour la calibration des NCPA.

La diversité de phase consiste à appliquer successivement sur le correcteur de surface d'onde des amplitudes v_k choisies sur un mode Z_d (dans mon cas un mode de Zernike) donné et à enregistrer les images $I_k(x, y)$ des PSF correspondantes. Connaissant la fonction pupille P et la longueur d'onde λ il est ensuite possible de retrouver les coefficients a_n des modes de Zernike permettant de décomposer la phase φ en calculant

$$(a_2, a_3, ..., a_N) = \underset{a_2,a_3,...,a_N}{\operatorname{argmin}} \sum_k \sum_x \sum_y \left(I_k(x, y) - \left| \mathscr{F}\left[P e^{i\varphi(k)} \right] \right|^2 (x, y) \right)^2 \tag{2.11}$$

où $N - 1$ est le nombre de modes utilisés pour la reconstruction et où

$$\varphi(k) = \frac{2\pi}{\lambda} \left(v_k Z_d + \sum_n^N a_n Z_n \right) \tag{2.12}$$

On choisit généralement le défocus ($d = 4$) comme mode de diversité et on applique au moins trois amplitudes v_k différentes. J'ai implémenté ce processus de minimisation avec l'algorithme de Levenberg-Marquardt [1].

Exclusion des modes de tip-tilt de la correction

On verra en section 3.6.5 que le double passage par le DM dans le montage du microscope confocal conduit à une invisibilité des modes de tip-tilt pour les analyseurs. Il est donc indispensable de pouvoir exclure ces modes de la correction sous peine de les voir s'accumuler jusqu'à saturation du DM. L'implémentation diffère selon que la correction s'effectue sur les modes de Gendron ou non. Si c'est le cas, et dans la mesure où les deux premiers modes de Gendron correspondent à des modes de tip-tilt, on peut simplement mettre les deux premiers éléments de $\mathbf{c_c}$ à zéro. Si la correction ne s'effectue pas sur les modes Gendron, on projette $\mathbf{c_c}$ dans la base des Zernike, on met tous les éléments du vecteur obtenu à zéro excepté les modes de tip-tilt, on projette le résultat dans la base de commande et on soustrait le vecteur obtenu à la commande initiale, soit [2]

$$\mathbf{c_c}^* = \mathbf{c_c} - \mathbf{D}^+\mathbf{M}(\mathbf{t} \cdot \mathbf{M}^+\mathbf{D}\mathbf{c_c}) \tag{2.13}$$

où $\mathbf{t}$ est le vecteur $(1, 1, 0, ..., 0)$ dans la base des Zernike (sans piston), $\mathbf{c_c}^*$ est le vecteur de commande sans tip-tilt et l'opérateur $\cdot$ représente le produit de Hadamard.

Il faut noter ici que si ces deux méthodes fonctionnent convenablement dans le cas d'un Shack-Hartmann ce n'est pas le cas avec un analyseur pyramide. La non linéarité de la pyramide non modulée conduit à d'importantes erreurs lors du passage d'une base à l'autre et la seconde méthode ne fonctionne pas convenablement. C'est pourquoi on utilise toujours une correction sur les modes de Gendron lorsque l'on utilise la pyramide. Les deux premiers modes de Gendron étant des modes de tip-tilt, ceux-ci sont filtrés directement dans l'espace du correcteur de surface d'onde.

Plus généralement, les trois espaces (du correcteur, de l'analyseur et des Zernike) n'étant pas de même taille, l'aller-retour entre l'espace du correcteur et l'espace des modes de Zernike comporte nécessairement des pertes et la soustraction des modes peut donc être imparfaite. Si le système est correctement dimensionné ces pertes doivent toutefois être minimales pour les modes de basse fréquence spatiale comme le tip-tilt.

2.4 Simulation

Le programme de simulation permet à l'utilisateur de simuler les signaux enregistrés par tous les détecteurs du montage (SH, Pyramide, PSF, image du champ, ...). Les aberrations à introduire sont configurables et peuvent être appliquées dans un ou plusieurs plans (par propagation de Fresnel) et également être variables dans le temps. Le RTC décrit dans la section précédente est ensuite utilisé pour mesurer et corriger les aberrations appliquées. La simulation peut s'effectuer sur source ponctuelle ou sur source étendue spatialement incohérente (Voir [82] pour la méthode de simulation de source étendue). Une capture d'écran de l'interface, visible en figure 2.4, montre la simulation d'une fermeture de boucle sur SLM avec une

1. L'annexe A.7 donne l'expression du jacobien utilisé par Levenberg-Marquardt pour effectuer la minimisation.

2. Pour que cette méthode fonctionne il faut que la matrice d'interaction $\mathbf{D}$ puisse transmettre les modes de tip-tilt, il faut donc que $\mathbf{D}$ ait été enregistrée en simple passage sur le DM.

pyramide à cinq faces, une pupille en forme d'étoile trouée et une source étendue en forme de papillon.

Faute de savoir quel spectre d'aberrations utiliser pour simuler les échantillons de cerveaux, le programme de simulation a été peu utilisé dans ma thèse. Une simulation réaliste implique la simulation de plusieurs couches d'aberrations dans l'épaisseur de l'échantillon pour prendre en compte les effets de scintillation. Il est alors nécessaire d'effectuer de la propagation de Fresnel, et la grande ouverture du faisceau couplée à l'épaisseur importante des échantillons pose des difficultés pour maintenir un échantillonnage adéquat dans les plans pupille et champ simultanément. Le programme de simulation a toutefois été très utile comme outil de test du RTC.

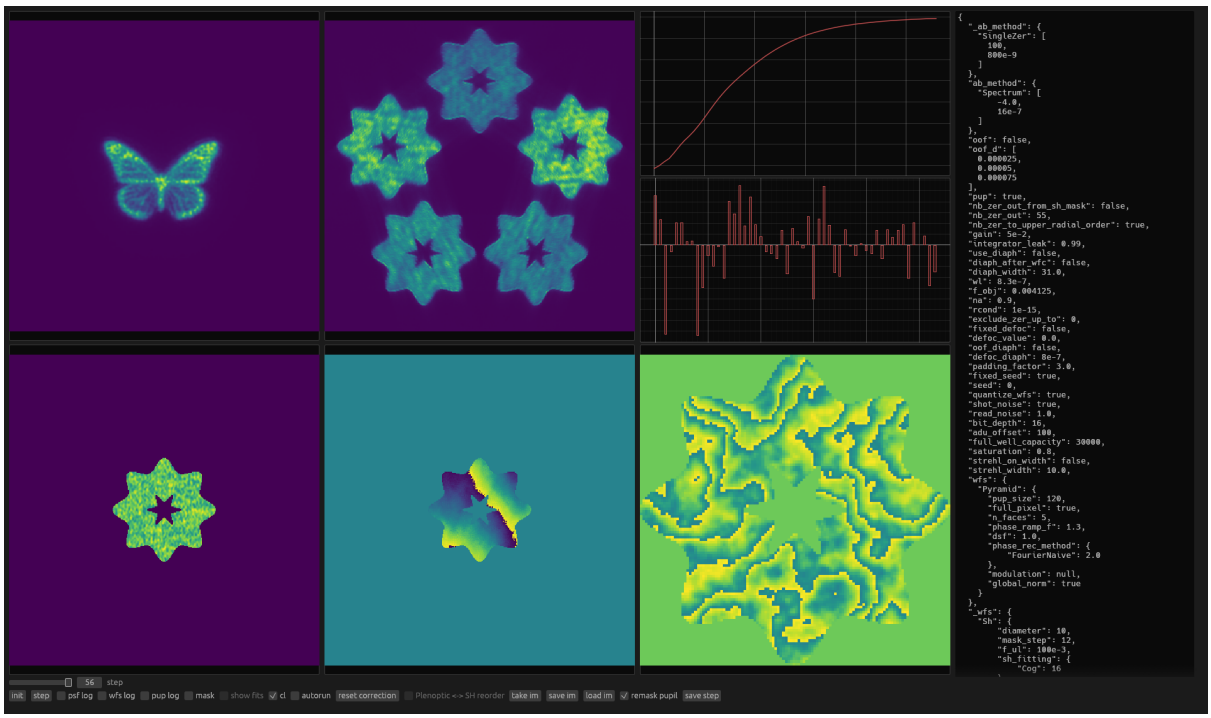


Figure 2.4 – Capture d'écran de l'interface de simugui. De gauche à droite et de haut en bas, image du champ (i.e. objet dont on fait l'image), image de l'analyseur, mesure de la qualité de la correction (Pseudo-Strehl), mesure sur les coefficients de Zernike de la phase résiduelle (qui n'a ici pas de sens étant donnée la forme de la pupille), image de l'intensité pupillaire, image de la phase pupillaire simulée, image de la phase commandée au correcteur de surface d'onde.

Chapitre 3

Conception et réalisation de l'instrument

> [...] tout ce qui nous environne peut nous fournir un sujet d'examen, d'amusement et d'instruction ; cependant plusieurs personnes savent si peu combien l'usage des microscopes est étendu, et sont tellement embarrassées à trouver des objets à examiner, qu'après en avoir considéré quelques-uns des plus communs, soit seuls, soit avec des amis, ils abandonnent leurs microscopes, comme n'étant pas d'un grand usage. Nous tâcherons de les détromper par quantité de faits que nous mettrons, dans l'occasion, sous les yeux du lecteur ; et peut-être que par ce moyen nous engagerons des curieux à employer agréablement et utilement leurs heures de loisir dans la contemplation des merveilles de la nature, au lieu de les passer dans une oisiveté pleine d'ennui, ou dans la poursuite de quelque passion ruineuse ; mais avant que de discuter l'examen des objets microscopiques, il faut parler de l'instrument qui les grossit à nos yeux.
>
> Louis de Jaucourt, Encyclopédie

Comme présenté dans l'introduction l'objectif du projet est double. Il s'agit de réduire le temps nécessaire pour faire l'image d'un cerveau entier et clarifié de souris d'une part et d'améliorer la résolution et/ou le rapport signal bruit des images d'autre part. Pour l'accélération de l'imagerie, nous avons envisagé un éclairement par feuille de lumière ou un microscope confocal parallélisé (section 3.1) et pour l'amélioration de la résolution, une optique adaptative. Pendant ma thèse, j'ai proposé un système fonctionnant en deux temps : une imagerie rapide à basse résolution ($\approx$ 10µm^3) avec un éclairement par feuille de lumière, suivie de l'imagerie des zones d'intérêt par un microscope confocal associé à une optique adaptative avec une résolution de ($\approx$ 1µm^3). Pendant ma thèse, j'ai conçu et construit le microscope confocal et son optique adaptative. La voie d'éclairement par feuille de lumière sera intégrée par l'équipe par la suite. Dans ce chapitre, après une section résumant l'étude d'un microscope confocal parallélisé et une section sur les choix fondamentaux de l'OA à développer, je résume toutes les étapes de la conception (mécanique, optique, électronique) et je donne des pistes d'amélioration pour le prochain prototype.

3.1 Microscope confocal parallélisé avec un DMD

Il est possible de rendre le processus d'imagerie par un microscope confocal plus rapide en parallélisant l'acquisition de l'image : au lieu d'utiliser un seul faisceau pour balayer l'ensemble du champ point à point, on utilise plusieurs faisceaux simultanément. Une méthode pour réaliser cette parallélisation est d'utiliser un disque de Nipkow[83]. Ce disque est constitué d'un grand nombre de trous confocaux répartis sur le disque de sorte qu'une rotation complète balaye l'ensemble du champ. Ce système présente toutefois l'inconvénient d'être assez peu flexible ; le diamètre des trous confocaux ainsi que leurs espacements sont fixes. Le DMD, que j'ai déjà présenté en section 1.5.1, peut être utilisé comme une alternative au disque de Nipkow offrant plus de flexibilité. Le DMD est placé dans un plan champ et ce sont les micro miroirs «ouverts» qui entourés de micro miroirs «fermés» font office de trou confocaux. En changeant l'orientation des miroirs le long du DMD, il est possible de balayer l'ensemble du champ (voir figure 3.1). La flexibilité vient du fait qu'il est possible de combiner plusieurs micro miroirs «ouverts» ainsi que de modifier l'espacement entre ceux-ci pour changer la taille et l'espacement des trous confocaux en fonction du besoin.

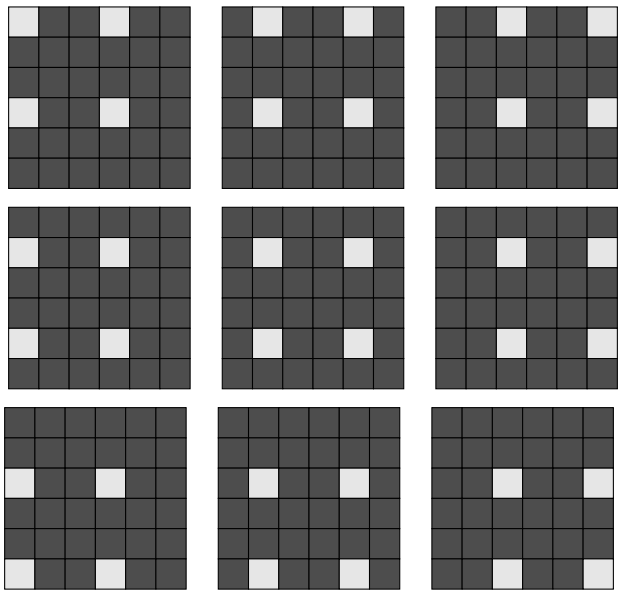


Figure 3.1 – Balayage des trous confocaux sur l'ensemble du champ par le DMD. L'utilisation successive des neuf configurations permet d'éclairer tout le champ quatre fois plus vite qu'avec un seul faisceau. Credit : Louis Malosse.

Pour l'acquisition de l'image cette façon de faire implique de remplacer le détecteur monopixel utilisé par une caméra. Pour l'optique adaptative, l'absence de débalayage par des miroirs galvanométriques implique l'absence d'étoile guide. Des techniques de mesures différentes, similaires à ce qui peut se faire en microscopie à feuille de lumière[84], doivent être mises en œuvre. J'aurai l'occasion de revenir sur ces techniques dans le chapitre 5.

Des expériences ont été menées par notre équipe du LIRA sur un DMD DLP9500 de Texas Instrument contrôlé par un module Vialux V9501. Je présente ci-dessous les difficultés rencontrées qui m'ont conduit à abandonner l'idée d'utiliser un DMD.

La principale difficulté vient du fait que le DMD forme un réseau blazé. La figure 3.2 montre l'image de la surface d'un DMD, on peut y voir que les micromiroirs pivotent suivant l'une de leurs diagonales. Le schéma de gauche représente le réseau blazé obtenu sur une ligne aligné sur cette diagonale.

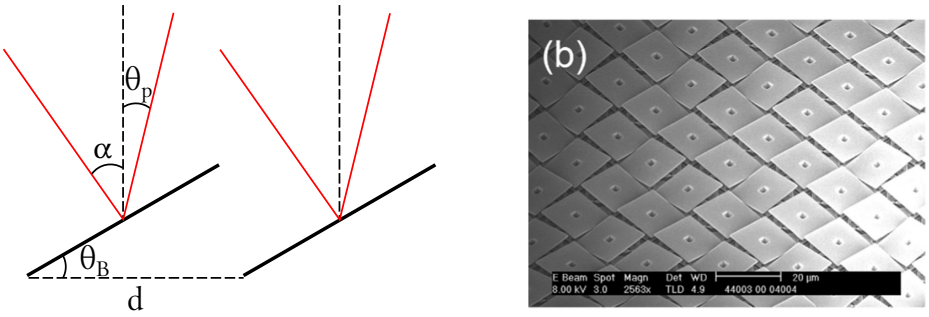


Figure 3.2 – Schéma d'un réseau blazé (gauche) et image de la surface d'un DMD au microscope électronique, source :[85] (droite).

Pour avoir des interférences constructives on doit avoir

$$\sin\theta_p + \sin(\alpha) = n\frac{\lambda}{d} \tag{3.1}$$

et le maximum d'intensité de l'enveloppe est observé dans la direction[59]

$$\theta_{max}^{enveloppe} = 2\theta_B - \alpha \tag{3.2}$$

L'article de *Popoff et al.*[59], auquel a participé l'équipe du LIRA, propose une méthode pour optimiser l'alignement d'un ordre de diffraction avec le maximum de l'enveloppe. La dépendance de l'équation 3.1 à la longueur d'onde fait qu'il n'est possible d'effectuer cette optimisation que pour une longueur d'onde donnée. Cette chromaticité du DMD constitue un problème pour la microscopie confocale pour laquelle on utilise des lasers de longueurs d'onde différentes (pour exciter différents fluorophores) et où le spectre d'émission des fluorophores est large. Plusieurs techniques sont envisageables pour compenser ce chromatisme aux prix d'une complexification importante du montage : prisme, triplet d'Offner, réseau (éventuellement un second DMD).

Ces deux raisons (complexité accrue due à la chromaticité et impact sur la méthode de mesure du système d'OA) m'ont conduit à abandonner le DMD et à faire le choix d'un microscope confocal classique avec OA, doublé d'une illumination à feuille de lumière pour la vitesse d'acquisition.

3.2 Optique adaptative

Pour dimensionner correctement le système d'OA, j'ai tenté en vain de mesurer les aberrations dans des échantillons de cerveaux clarifiés avant de construire le microscope confocal. Ces tentatives seront présentées dans le chapitre 6.

3.2.1 Choix de l'optique correctrice

L'équipe étant déjà en possession d'un LCoS SLM et d'un miroir déformable il a fallu décider quelle technologie utiliser. La possibilité d'utiliser le SLM a été abandonnée pour plusieurs raisons. Premièrement, il implique l'utilisation de lumière polarisée ce qui engendrerait une perte de 50% du flux fluorescent. Deuxièmement, à cause de la présence d'une réflexion parasite sur la surface avant du SLM ; ce signal dont la phase n'est pas corrigée vient se superposer au signal corrigé. Une solution est d'appliquer une défocalisation importante (via le SLM) sur la phase corrigée qui est ensuite compensée par une lentille. Ceci permet d'étaler le signal parasite sur une plus grande surface du champ mais pas de s'en débarrasser totalement. Troisièmement l'avantage d'un plus grand nombre d'actionneurs apporté par le SLM est peu utile dans la mesure où, on va le voir par la suite, la difficulté de l'OA pour la microscopie se situe dans la mesure de la phase et non dans sa correction. Il n'est donc pas utile de pouvoir corriger des ordres spatiaux élevés si l'on est incapable de les mesurer. La taille de la zone d'isoplanétisme est de plus d'autant plus faible que la fréquence spatiale est élevée. Ainsi la correction des fréquences élevées ne serait utile que sur une petite partie du champ alors que nous recherchons à avoir des images grand champ. C'est pour toutes ces raisons que j'ai décidé d'utiliser un miroir déformable.

3.2.2 Choix de la position du DM

Une fois le choix de la technologie de correction de surface d'onde effectué, il a fallu choisir où placer ce correcteur : conjugué à la pupille de l'objectif ou conjugué à l'échantillon. En astronomie et en imagerie de la rétine, on conjugue généralement le miroir déformable

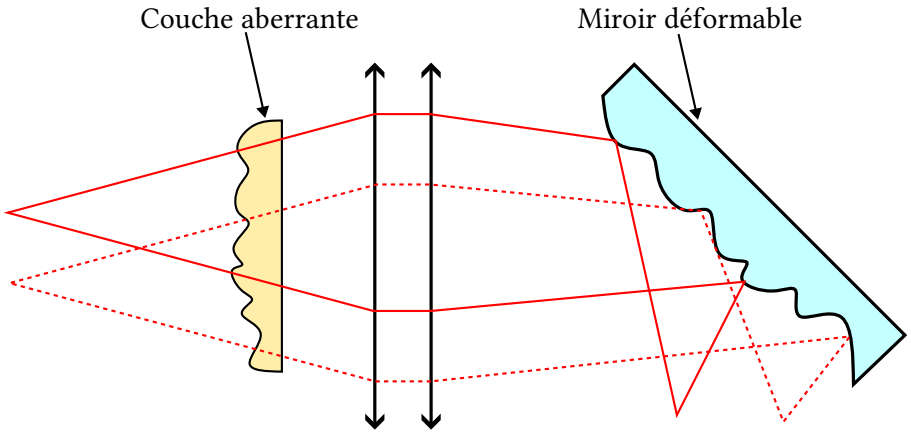


Figure 3.3 – Schéma de principe d'une conjugaison du miroir déformable avec l'échantillon.

avec la pupille de l'instrument où se trouve la majorité des aberrations de phase à corriger. En microscopie le milieu aberrant ne se situe pas dans un plan pupille mais est situé entre le plan champ et la couche supérieure de l'échantillon. Pour corriger les aberrations de phase au mieux il est intéressant de placer le miroir au plus près d'un plan conjugué au plan dans

lesquelles celles-ci sont générées. L'avantage obtenu est un agrandissement de la zone d'isoplanétisme[86]. En effet, comme on peut le voir sur la figure 3.3, le DM peut alors corriger différemment chaque point du champ et ainsi prendre en compte l'anisoplanétisme des aberrations. Conjuguer le DM avec l'échantillon présente des désavantages. Le premier est que les aberrations ne sont pas toutes introduites dans le même plan. Il faudrait donc plusieurs DM conjugués à des profondeurs différentes pour tout corriger correctement, une technique connue sous le nom de MCAO pour «Multi-Conjugate Adaptive Optics»[87]. La complexité induite par la MCAO et les avantages incertains qu'elle apporterait dans le cas des cerveaux clarifiés m'a conduit à faire le choix d'une optique adaptative à un seul DM. Le deuxième désavantage est qu'en imaginant qu'on arrive à définir le plan idéal de conjugaison du DM en fonction de la profondeur observée dans l'échantillon, il faudrait pouvoir continuellement déplacer le DM pour s'adapter à la profondeur observée. De plus, cette configuration rend plus difficile la correction d'aberrations invariantes spatialement comme une aberration sphérique induite par un choc d'indice global au passage dans l'échantillon. Pour toutes ces raisons, j'ai choisi de conjuguer le DM avec le plan pupille.

3.3 Mécanique

J'ai conçu la mécanique du bras échantillon ainsi que des porte-échantillons avec FreeCAD en tâchant de n'utiliser aucun composant fait sur mesure. La figure 3.4 présente la modélisation 3D du bras porte échantillon réalisée en assemblant les modèles 3D fournis par Thorlabs pour ses composants. Seule la partie qui porte directement l'échantillon (la plaque située sous la cuvette sur la figure) est réalisée sur mesure en impression 3D.

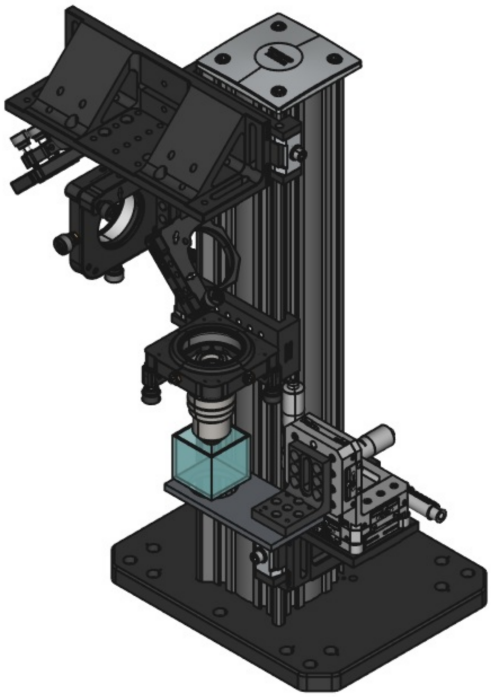


Figure 3.4 – Modélisation 3D du bras échantillon.

3.4 Optique

J'ai conçu le schéma optique du système présenté sur la figure 3.5 avec la contrainte de réutiliser les éléments suivants pour minimiser les coûts : le miroir déformable (Alpao 97 actionneurs, Ø15mm), le Shack-Hartmann (20×20 sous-pupilles, Ø7.68mm), deux lasers (Lasos 488nm et 561nm), deux prismes pouvant être assemblés pour former une pyramide à 4 faces et trois caméras Hamamatsu dont une déjà adaptée au SH. Il reste donc à choisir : l'objectif, les miroirs galvanométriques, le trou confocal, le détecteur et l'ensemble des lentilles relais et des filtres.

Le fonctionnement du montage suit le schéma déjà présenté en figure 1.28. Les galvanomètres sont placés au plus près de l'objectif pour réduire le transport d'un champ non nul à un nombre minimal de lentilles pour minimiser les distorsions du champ d'observation. Le miroir déformable est commun aux voies d'illumination et de détection pour les raisons expliquées dans l'introduction (section 1.5.5). Les diviseurs de faisceau à pellicule (PBS2, PBS3 et PBS4) sont retirables et interchangables en fonction des éléments utilisés et des besoins en flux. Je présente dans les sections suivantes comment les différents éléments ont été choisis en commençant par l'objectif du microscope, car la taille de sa pupille détermine l'ensemble des grandissements dans le reste du montage.

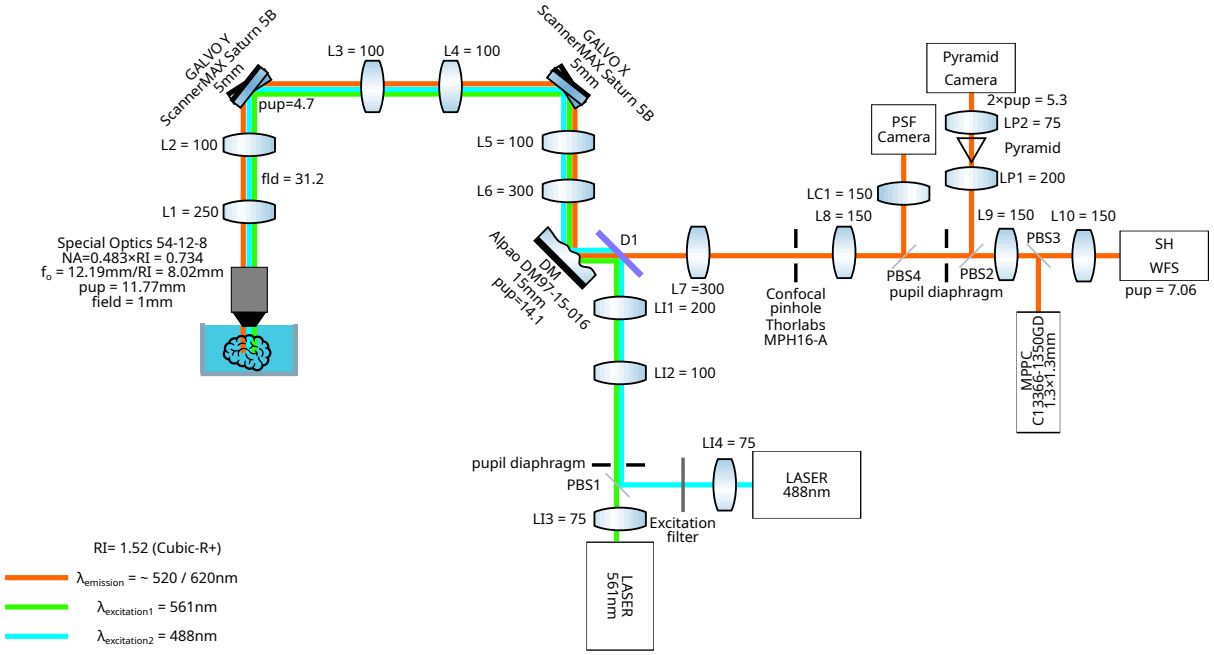


Figure 3.5 – Schéma du montage optique. Les distances entre les lentilles sont toutes égales à la somme des focales des deux lentilles considérées. La pupille de l'objectif, les deux miroirs galvanométriques, le miroir déformable, le capteur de la caméra pyramide, la matrice de microlentille du SH et les deux diaphragmes pupilles sont tous conjugués optiquement (plan pupille). De même, le plan focal de l'objectif, le trou confocal, le capteur de la caméra SH, la pointe de la pyramide et le capteur de la caméra PSF sont tous conjugués optiquement (plan champ). Le capteur du MPPC est lui, légèrement décalé par rapport au plan champ.

3.4.1 Objectif du microscope

L'objectif doit satisfaire plusieurs contraintes. Une première est la compatibilité avec le milieu d'immersion utilisé par le protocole de clarification CUBIC et idéalement avec les autres protocoles les plus communément utilisés en cas de changement dans le futur. Cela implique à la fois une compatibilité avec l'indice de réfraction du milieu d'immersion mais aussi une résistance des matériaux constituant l'objectif à l'agression chimique par le milieu d'immersion. Le protocole CUBIC utilise une huile d'immersion d'indice $n_{\text{cubic}} = 1.52$[28], pour le protocole CLARITY on a $n_{\text{clarity}} = 1.45$[88] et pour une clarification au cinnamate d'éthyle on a $n_{\text{ce}} = 1.56$[89]. Une deuxième contrainte importante est la valeur de la distance de travail. Celle-ci doit être d'au moins 1cm pour pouvoir accéder à toute l'épaisseur du cerveau. Enfin l'ouverture numérique doit être la plus grande possible ou en tout cas suffisante pour résoudre la largeur des axones ($\approx$ 1µm) et le champ de vue doit également être le plus grand possible pour minimiser le nombre de déplacements latéraux et donc le temps d'acquisition pour faire l'image de l'ensemble du cerveau [1].

J'ai trouvé deux objectifs qui répondaient à ces contraintes : le XLPLN10XSVMP de Olympus (10×, 0.6NA, 8mmWD, n=1.33 à 1.52, 1.8mmFOV) et le 54-12-8 de Special Optics (23.8×, 0.7NA, 10mmWD, n=1.33 à 1.56, 1mmFOV). Les deux objectifs ont environ le même prix de 25000$.

L'objectif Olympus n'est pas compatible avec une clarification au cinnamate d'éthyle, il est de plus conçu pour la microscopie à deux photons et sa correction des aberrations chromatiques est optimisée pour la bande de 690 à 1300nm alors que le Special Optics est corrigé dans la bande de 480 à 720nm. Nous avons donc choisi de prendre le Special Optics, qui a aussi l'avantage d'être le même objectif qu'utilise actuellement l'équipe de l'IBENS. Les caractéristiques de cet objectif sont données dans le tableau 3.6.

milieu d'immersion (n)	1.33 - 1.56 ($n_{\text{cubic}} = 1.52$)
NA	$0.483n$ (0.734 @ 1.52)
focale effective (f_o)	$12.19\text{mm}/n$ (8.02mm @ 1.52)
distance de travail	10mm
champ de vue	1mm ø
transmission	$\approx$ 85% (480 - 1000nm)

Figure 3.6 – Spécifications de l'objectif Special Optics 54-12-8.

Une particularité intéressante de cet objectif est que sa distance de travail ne dépend pas du milieu d'immersion utilisé. En effet la première lentille de l'objectif est concave avec un centre de courbure centré sur le plan focal ainsi les rayons traversent cette lentille perpendiculairement à sa surface et ne sont donc pas réfractés. Ceci permet également d'éviter la génération d'une aberration sphérique dépendante de l'indice du milieu sans avoir à ajuster un collier de correction [2].

La distance d en millimètre entre la bride de l'objectif et son plan focal arrière dépend par contre de l'indice du milieu d'immersion de la façon suivante

$$d = -11.75 - 22.90 \times n + 5.87 \times n^2 \tag{3.3}$$

1. Pour une revue des contraintes liées à l'imagerie des milieux clarifiés et une proposition intéressante d'objectif catadioptrique pour y répondre voir[89].

2. Pour plus de détails sur cet objectif voir https://asiimaging.com/docs/multi-immersion_objectives

La conjugaison du plan pupille avec les miroirs galvanomètriques et le miroir déformable ne pourra donc être exacte que pour un milieu d'immersion donné.

Les résultats de simulations Zemax du rapport de Strehl en différents points du champ de cet objectif sont donnés dans le tableau 3.1. Ces valeurs sont très satisfaisantes et seule l'extrémité du champ enregistre une très légère baisse.

Distance au centre du champ (mm)	rapport de Strehl
0	0.91
0.1	0.92
0.2	0.93
0.3	0.95
0.4	0.94
0.5	0.8

Table 3.1 – Rapports de Strehl de l'objectif Special Optics 54-12-8 obtenus sur Zemax en différents points du champ en simulant uniquement cet objectif suivi d'une lentille paraxiale.

Utilisé avec le protocole CUBIC le diamètre de la pupille de l'objectif est de

$$D_o = 2 f_o \mathrm{NA} = 2 \times 8.02 \times 0.734 = 11.77\mathrm{mm} \tag{3.4}$$

Cette valeur connue, il est maintenant possible de passer au choix des miroirs galvanométriques.

3.4.2 Miroirs galvanométriques

Pour que la pupille de la voie de détection en aval des miroirs galvanométriques soit immobile, il est nécessaire de placer ces miroirs dans des plans qui soient conjugués à la pupille. Une erreur de conjugaison conduirait la pupille à se déplacer sur le DM et sur les ASO et entraînerait une dépendance de la mesure et de la correction à la position dans le champ. On peut voir ce décalage comme l'introduction d'un anisoplanétisme qui viendrait s'ajouter à celui de l'échantillon. L'importance de cette conjugaison de pupille m'a conduit à placer un relais optique entre les deux miroirs galvanométriques plutôt que d'utiliser un système où ceux-ci sont placés proches l'un de l'autre avec le plan pupille situé entre les deux.

Le plan pupille, défini par la pupille de l'objectif, est perpendiculaire à l'axe optique. Dans un cas idéal, il faudrait que les miroirs galvanométriques soient également perpendiculaires à l'axe optique pour assurer une conjugaison optique parfaite. Il est cependant nécessaire d'incliner ces miroirs pour permettre la propagation du faisceau. Pour minimiser l'erreur de conjugaison optique, je minimise l'angle d'incidence θ_0 sur les miroirs. Ceci induit une première contrainte : les focales des lentilles L2, L3, L4 et L5 doivent être suffisamment importantes et/ou les diamètres de ces lentilles doivent être suffisamment petits pour qu'il soit mécaniquement possible de les placer. En négligeant la place prise par les montures des lentilles, l'angle minimal entre l'axe optique incident et l'axe optique réfléchi sur les miroirs est

$$\theta_0^{min} = 2 \arctan\left(\frac{D}{2f}\right) \tag{3.5}$$

avec D le diamètres des lentilles et f leurs focales.

Une deuxième contrainte vient du choix de la lentille de tube (L1 sur la figure 3.5), c'est la focale [1] de celle-ci qui couplée à celle de l'objectif détermine la taille du champ que devront

1. Dans la suite du manuscrit je note f_x les focales des lentille Lx présentes sur la figure 3.5.

balayer les miroirs. L'angle maximal θ_{max} nécessaire aux miroirs pour pouvoir balayer un champ donné dépend de la focale de la lentille placée devant eux. Plus θ_{max} est petit et plus les miroirs pourront effectuer le balayage rapidement. Cette contrainte est couplée avec la précédente car le diamètre des lentilles doit également être au moins égal à celui du champ pour éviter tout vignetage. L'objectif de microscope choisi possède un demi-champ de d_o = 500µm et en choisissant la même focale pour les lentilles L2, L3, L4 et L5 l'angle maximal balayé par les miroirs doit être de

$$\theta_{max} = \arctan\left(d_o \frac{f_1}{f_0 f_2}\right) \tag{3.6}$$

Le grandissement déterminé par les deux lentilles L1 et L2 entre l'objectif et les miroirs détermine la taille de la pupille au niveau de ces derniers. Sachant qu'un petit miroir possède une plus faible inertie et permet un balayage plus rapide il est souhaitable d'avoir une taille de pupille D_{galvo} assez petite ce qui constitue une troisième contrainte :

$$D_{\text{galvo}} = D_o \frac{f_2}{f_1} \tag{3.7}$$

En prenant en compte ces trois contraintes et en restant sur un choix de lentilles disponibles «sur étagère» je suis arrivé au compromis suivant : f_1 = 250mm et $f_2 = f_3 = f_4 = f_5$ = 100mm avec des lentilles de deux pouces et les miroirs galvanomètres «Saturn 5» de l'entreprise ScannerMax. Ce qui me donne θ_{max} = 8.93°, D_{galvo} = 4.7mm et θ_0^{min} = 29° (dans la pratique j'utilise θ_0 = 60° en raison de l'encombrement des montures). La pupille du miroir déformable étant de 15mm je choisis un grandissement d'un facteur 3 entre les miroirs galvanométriques et le DM de sorte que f_6 = 300mm. La pupille utile au niveau du DM est donc de 14.1mm. L'angle du faisceau sur le DM doit également être minimal pour les mêmes raisons de conjugaison de pupille que pour les miroirs galvanométriques. En pratique j'utilise un angle du faisceau sur le DM d'environ 30°.

La figure 3.7 donne la réflectance des miroirs galvanométriques fournis par ScannerMax pour un revêtement optimisé dans le visible. On voit que la réflectance reste acceptable avec environ 99% malgré l'angle de 60° sur les miroirs.

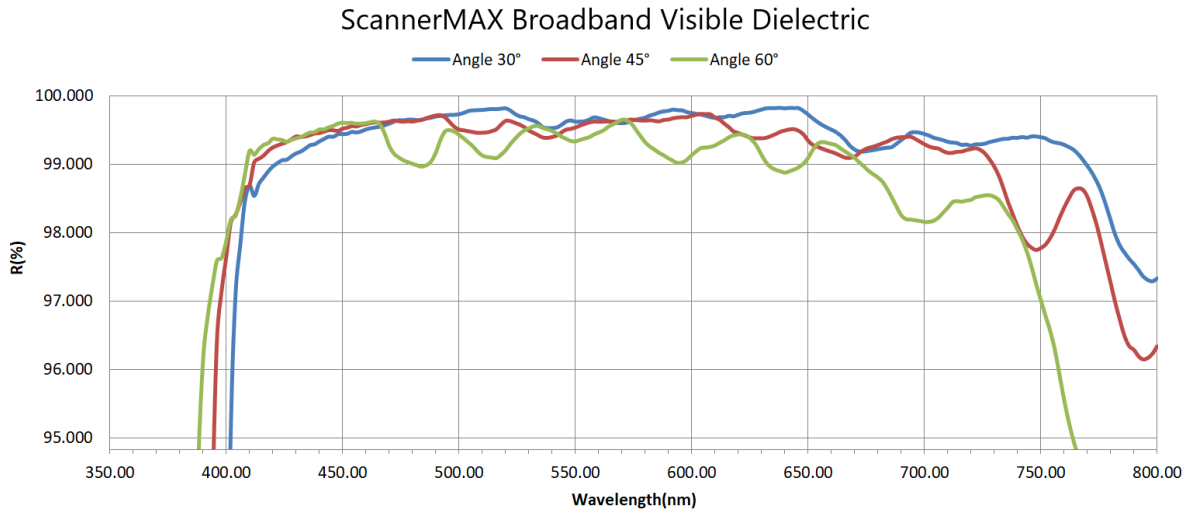


Figure 3.7 – Réflectance des miroirs galvanométriques. Source : ScannerMax.

3.4.3 Le trou confocal : fréquence spatiale, repliement et amplitude

Le diamètre du trou confocal et le grandissement entre son plan et le plan de l'échantillon détermine la valeur du sectionnement optique. On a vu dans l'introduction que si le sectionnement optimal est obtenu pour un trou infiniment étroit, on utilise en pratique des diamètres plus importants pour ne pas trop réduire le signal collecté. Un trou confocal de 1AU est un compromis idéal entre signal transmis et sectionnement dans le cas d'une PSF non aberrée. La présence d'aberrations conduit souvent à utiliser des valeurs un peu plus grandes, typiquement 1.6AU. Il aurait été idéal d'avoir un trou confocal dont le diamètre soit continûment réglable mais je n'ai pas trouvé de matériel satisfaisant proposant cela et j'ai donc dû me rabattre sur un système à roue motorisée proposé par Thorlabs (MPH16-A) avec 16 trous de diamètre variant de 25µm à 2000µm. Le grandissement entre l'échantillon et le plan des trous confocaux doit idéalement permettre d'atteindre les valeurs typiques de 1 et 1.6AU. J'ai choisi $f_7 = 300$mm de sorte à conserver la taille de champ présente après L1. Le tableau 3.2 donne la liste des diamètres disponibles et la correspondance en AU avec le grandissement de $G = f_1/f_o = 31.2$ entre l'échantillon et le trou confocal et pour les deux longueurs d'onde utilisées avec $n = 1.52$.

taille physique (µm)	AU @ 520nm	AU @ 600nm	$\frac{\lambda}{2\text{NA}}$ @ 520nm	$\frac{\lambda}{2\text{NA}}$ @ 600nm
25	0.93	0.80	2.26	1.96
30	1.11	0.97	2.72	2.35
35	1.30	1.13	3.17	2.75
40	1.48	1.29	3.62	3.14
45	1.67	1.45	4.08	3.53
50	1.86	1.61	4.53	3.92
60	2.23	1.93	5.43	4.71
70	2.60	2.25	6.34	5.49
80	2.97	2.57	7.25	6.28
90	3.34	2.90	8.15	7.06
100	3.71	3.22	9.06	7.85
125	4.64	4.02	11.32	9.81
200	7.42	6.43	18.11	15.70
300	11.13	9.65	27.17	23.55
1000	37.12	32.17	90.56	78.49
2000	74.23	64.33	181.13	156.98

Table 3.2 – Équivalence entre la taille physique des trous et leurs tailles exprimées au niveau de l'échantillon aux longueurs d'onde d'émission de la GFP et de tdTomato pour l'ouverture maximale NA=0.734.

Outre le sectionnement optique, il est utile d'avoir un diaphragme de filtrage spatial pour empêcher le repliement des hautes fréquences spatiales sur la mesure des ASO. En effet, le théorème de Nyquist-Shannon indique que pour éviter tout repliement la fréquence maximale du signal échantillonné doit être égale ou inférieure à la moitié de la fréquence d'échantillonnage f_{ech}. La figure 3.8 illustre le repliement en accordéon des hautes fréquences sur les basses fréquences lorsque cette condition n'est pas respectée.

En l'absence de filtrage spatial la fréquence mesurée f_{mes} pour une fréquence d'entrée f

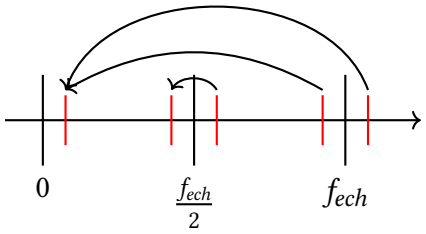


Figure 3.8 – Repliement des hautes fréquences.

est

$$f_{mes} = \frac{f_{ech}}{2} - \left| \frac{f_{ech}}{2} - f \bmod (f_{ech}) \right| \tag{3.8}$$

Ainsi, si $f < f_{ech}/2$ on obtient bien $f_{mes} = f$. En revanche, si $f > f_{ech}/2$, on mesure un repliement du signal à une fréquence comprise entre 0 et $f_{ech}/2$ ce qui entraîne une perturbation de la mesure des basses fréquences dont l'impact exact va dépendre de la DSP des aberrations.

Pour le Shack-Hartmann et la pyramide, le diamètre du diaphragme de champ (projeté sur l'échantillon) qui permet d'éviter le repliement est

$$d_{\mathrm{ASO}} = N_{\mathrm{ASO}} \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}} \tag{3.9}$$

où N_{ASO} est le nombre de sous-pupilles du SH ou le nombre de pixels dans le diamètre de la pupille sur la caméra de l'ASO pyramide.

Dans notre montage optique, il y a 11 actionneurs dans le diamètre du DM et 94% de ce diamètre est utilisé. Ceci implique que la zone d'influence du DM est

$$d_{\mathrm{DM}} = 11 \times 0.94 \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}} = 10.34 \frac{\lambda}{2\mathrm{NA}} \tag{3.10}$$

Une autre utilité du diaphragme de champ est d'éviter le crosstalk entre les sous-pupilles du SH [1].

Le tableau 3.9 présente l'ensemble des diamètres dans le champ correspondant aux différentes limites présentées ci-dessus. On voit qu'il n'est pas possible de satisfaire ces différents critères simultanément. La zone d'influence du miroir déformable étant plus petite que la limite de repliement sur les analyseurs, le placement d'un diaphragme pour éviter ce repliement n'entraînera pas de perte des capacités de correction. On voit par contre qu'il est impossible d'avoir un sectionnement optique satisfaisant sans une grande perte sur les capacités de mesures et de correction de l'OA. En effet, pour un sectionnement de 1.6AU, on ne mesurerait que 1/7 des fréquences spatiales accessibles à l'analyseur SH. Une solution possible serait de fermer le trou confocal au fur et à mesure que la boucle d'OA se ferme. Cette solution est toutefois très peu pratique surtout avec le système de roue utilisé pour passer d'un trou confocal à l'autre. Dans la pratique on choisira le trou confocal le plus grand lors de la phase de fermeture de boucle avant de mettre en place le trou confocal utilisé pour l'imagerie. Je reviendrai sur les raisons de ce choix au chapitre 5.

Dans toute cette partie j'ai supposé un modèle linéaire entre fréquence spatiale dans la pupille et distance à l'axe optique dans le champ. Je propose dans la partie suivante une analyse des conditions qui rendent cette supposition valide.

1. Il existe toutefois des méthodes permettant de suivre les spots au-delà du champ de leur sous-pupilles respectives, cf. par exemple [90]

limite	diamètre projeté dans l'échantillon $\left(\frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}\right)$
sectionnement 1.6AU	3.9
d_{DM}	10.34
d_{SH}	18
d_{pyramide}	331 / 166 / 83 / 41 / 21 (selon le binning)
Ø sous-pupilles SH	211 @ 520nm

Figure 3.9 – Diamètre du diaphragme de champ pour différentes limites : sectionnement optique, zone d'influence du DM, repliement des hautes fréquences sur les analyseurs et champ des sous-pupilles du SH.

Influence de l'amplitude des aberrations

La distribution d'intensité *PSF* dans le plan champ pour une aberration de phase induite par une différence de marche W dans la pupille P s'écrit

$$PSF(x,y) = \left|\mathscr{F}\left[Pe^{i\frac{2\pi}{\lambda}W(u,v)}\right]\right|^2 = \left|\mathscr{F}[P] * \mathscr{F}\left[e^{i\frac{2\pi}{\lambda}W(u,v)}\right]\right|^2 \tag{3.11}$$

La non linéarité de l'exponentielle complexe fait que la fréquence spatiale des aberrations n'est pas le seul paramètre qui détermine la position de la lumière dans le plan champ. L'amplitude de l'aberration joue également un rôle important. Pour une aberration sinusoïdale d'amplitude a et avec b cycles dans le diamètre D de la pupille selon la coordonnée u, on a

$$W(u,v) = a\sqrt{2}\sin\left(2\pi b\frac{u}{D}\right) \tag{3.12}$$

Le facteur $\sqrt{2}$ a été choisi de sorte que la variance spatiale σ_W^2 vaille a^2 pour permettre une comparaison directe de l'amplitude a avec les coefficients de Zernike. On a par la formule de Jacobi-Anger

$$e^{i\frac{2\pi}{\lambda}W(u,v)} = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2}\right)e^{2\pi i n b\frac{u}{D}} \tag{3.13}$$

où J_n est la fonction de Bessel du premier type d'ordre n. On a alors

$$\begin{aligned}\mathscr{F}\left[e^{i\frac{2\pi}{\lambda}W(u,v)}\right] &= \mathscr{F}\left[\sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2}\right)e^{2\pi i n b\frac{u}{D}}\right] \\ &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2}\right)\mathscr{F}\left[e^{2\pi i n b\frac{u}{D}}\right] \\ &= \sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2}\right)\delta\left(x - nb\frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}, y\right)\end{aligned} \tag{3.14}$$

soit

$$PSF(x,y) = \left|\sum_{n=-\infty}^{\infty} J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2}\right)\delta\left(x - nb\frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}, y\right) * \mathscr{F}[P]\right|^2 \tag{3.15}$$

Dans l'hypothèse où b est suffisamment grand ($b > 1$ car la PSF non aberrée a une largeur d'environ $\lambda/(2\text{NA})$) pour que les différentes copies de $\mathscr{F}[P]$ n'interfèrent pas entre elles, on peut écrire

$$PSF(x,y) \approx \sum_{n=-\infty}^{\infty} \left| J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda} a\sqrt{2}\right)\right|^2 \delta\left(x - nb\frac{\lambda}{2\text{NA}}, y\right) * |\mathscr{F}[P]|^2 \tag{3.16}$$

Ansi, la PSF est constituée de copies de la PSF non aberrée ($|\mathscr{F}[P]|^2$) d'amplitude $|J_n(2\pi a\sqrt{2}/\lambda)|^2$ et positionnée en $x = nb\lambda/(2\text{NA})$ avec n entier. La figure 3.10 montre la répartition de l'énergie sur les différentes harmoniques n en fonction de l'amplitude a de l'aberration sinusoïdale. L'ordre $n = 1$ correspond au modèle linéaire que j'ai considéré dans la partie précédente mais on voit que les ordres $n > 1$ deviennent rapidement non négligeables lorsque l'amplitude augmente.

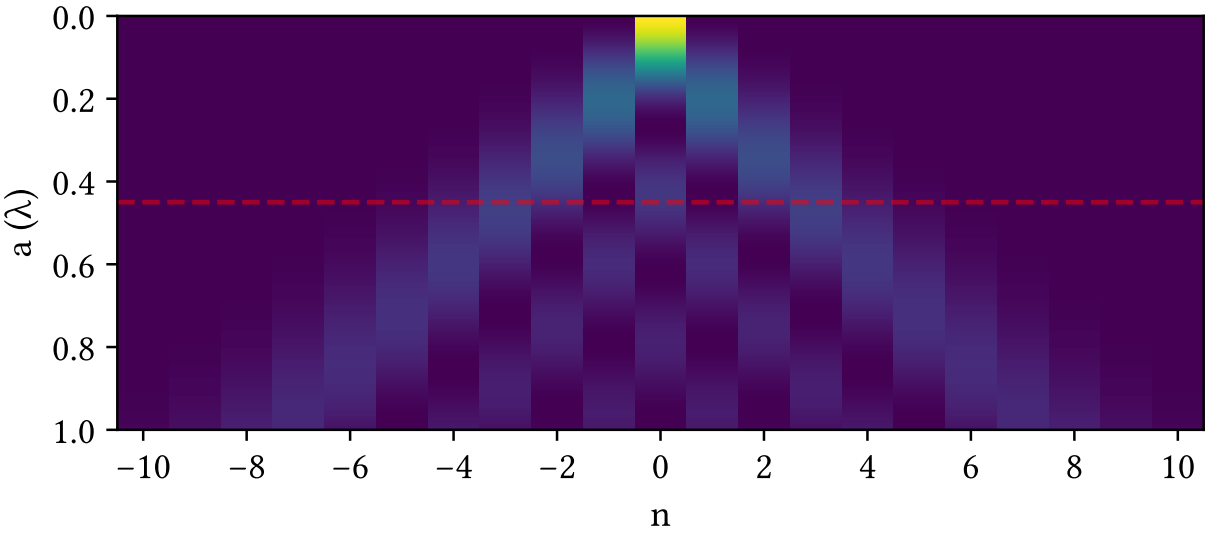


Figure 3.10 – Valeurs du module carré des fonctions de Bessel $\left|J_n\left(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2}\right)\right|^2$ en fonction du numéro de l'harmonique n et de l'amplitude a. La ligne rouge correspond à l'amplitude a=0.45λ.

La figure 3.11 montre la PSF résultante d'une aberration de phase sinusoïdale pour $a = 0.45\lambda$. La distribution de l'énergie dans les différentes taches d'Airy est donnée par la ligne rouge sur la figure 3.10.

De manière générale si l'on utilise un diaphragme de champ de rayon

$$r = N\frac{\lambda}{2\text{NA}} \tag{3.17}$$

pour que le système puisse «voir» toutes les fréquences b dans $[0, N]$ il faut que $a(b)$ respecte

$$J_n(\frac{2\pi}{\lambda}a(b)\sqrt{2}) \approx 0 \qquad \forall n \geqslant \frac{N}{2b} \tag{3.18}$$

pour $b \in [0, N]$. Cela permet à toutes les harmoniques de chaque fréquence b de se propager à travers le diaphragme ce qui permet à l'analyseur de surface d'onde de mesurer correctement la fréquence b.

L'ajustement linéaire de la valeur n pour laquelle $J_n(\frac{2\pi}{\lambda}a\sqrt{2})$ est maximum [1] pour une valeur a donnée est

$$n_{max} = \frac{a}{1.05}\frac{2\sqrt{2}\pi}{\lambda} \tag{3.19}$$

1. Le maximum global d'une fonction de Bessel correspond toujours à son premier maximum local.

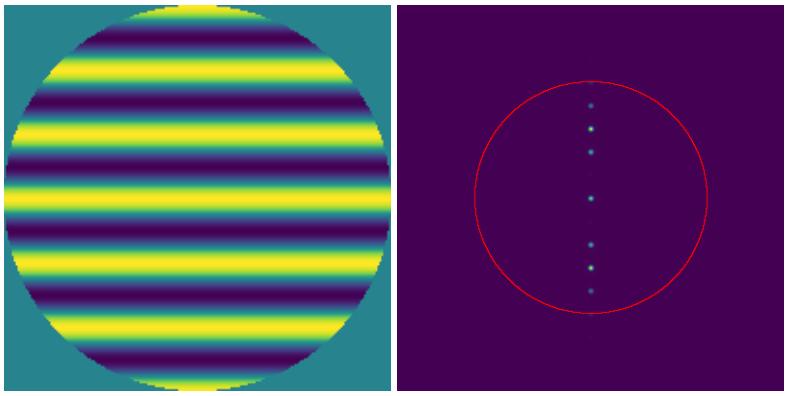


Figure 3.11 – Simulation d'une aberration sinusoïdale. Phase (gauche) et PSF (droite) pour une amplitude a de 0.45λ et une fréquence $b = 6$. Le cercle rouge correspond au rayon $r = nb\frac{\lambda}{2\text{NA}}$ pour $n = 5$.

D'après 3.18, on veut $n_{max} < \frac{N}{2b}$ ce qui s'écrit

$$a(b) < 1.05\frac{\lambda N}{4\sqrt{2\pi}}b^{-1} \tag{3.20}$$

On trouve alors qu'il faut que la DSP des aberrations, qui est proportionnelle à $a^2(b)$ soit telle que

$$\text{DSP}(b) \propto b^{-\alpha} \tag{3.21}$$

avec $\alpha \geqslant 2$.

Si la turbulence des aberrations est assimilable à un spectre de Kolmogorov (voir section 1.2.3) cette condition est bien vérifiée $\left(\alpha = \frac{11}{3}\right)$, ce qui justifie le modèle linéaire utilisé ci-dessus où je ne considèrais que $n = 1$.

3.4.4 Détecteur

La construction des images par balayage point à point permet d'utiliser un détecteur monopixel. J'ai effectué une revue des technologies les plus courantes de détecteurs monopixels : PMT (PhotoMultiplier Tube), HPD (Hybrid PhotoDiode), APD (Avalanche photodiode), SPAD (single-photon avalanche diode), SPAD array et MPPC (Multi-Pixel Photon Counter).

Les technologies basées sur l'utilisation d'une photocathode comme le PMT et la HPD ont le gros désavantage d'être fragiles, une exposition à une intensité lumineuse trop importante entraînant la destruction de la photocathode. Ceci m'a conduit à les mettre de côté quand bien même la HPD présente les meilleures caractéristiques de tout point de vue (le prix excepté) : bruit, sensibilité et dynamique.

Il restait alors toutes les variantes basées sur l'utilisation de photodiodes. La figure 3.12 présente l'impact des différents modes de fonctionnement sur la détection. Le gain unitaire de la PD (production d'un électron par photon incident) la rend inutilisable en microscopie de fluorescence de part le flux insuffisant produit par la fluorescence. L'APD fonctionne de façon similaire à la PD mais avec un gain supérieur ce qui la rend utilisable pour des applications où l'intensité fluorescente est relativement importante. Les SPAD fonctionnent dans un régime saturé où un seul électron incident déclenche une avalanche continue d'électrons ce qui les rend extrêmement sensibles et adaptés aux applications nécessitant la détection de photons

uniques. Une SPAD présente toutefois un long délai d'inactivation après réception d'un photon qui la rend inadaptée à la détection de flux importants (faible dynamique). Les SPAD array et les MPPC sont deux manières de contourner le problème en utilisant des matrices de SPAD qui, en répartissant le flux incident sur un grand nombre de SPAD, augmente le temps moyen entre photons successifs sur une SPAD donnée. Dans le cas des MPPC les signaux de sortie sont additionnés, la hauteur du signal de sortie fournie donc l'information sur le nombre de photons détectés simultanément. Dans le cas des SPAD array chaque SPAD est adressé séparément à la manière d'une caméra. Les SPAD array ne sont donc pas à strictement parler des détecteurs monopixels mais leur nombre de pixels, tout au plus quelques dizaines, reste très inférieur à ceux d'une caméra.

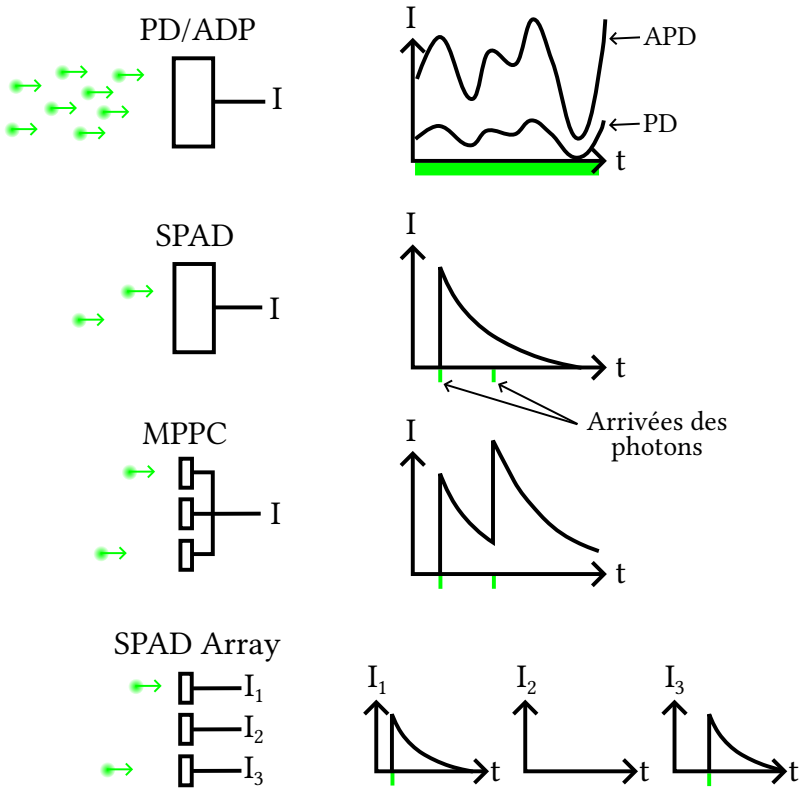


Figure 3.12 – Signaux fournis par différentes technologies de détecteur basées sur des photodiodes.

Le choix de la technique dépend donc en premier lieu des flux attendus. L'annexe B présente une dérivation du signal détecté à partir de la puissance laser d'illumination utilisée et de la concentration molaire en fluorophore. Je n'ai pas pu l'utiliser pour guider mon choix de détecteur car je n'ai pas trouvé d'estimation des concentrations volumiques de fluorophores attendues dans mes échantillons. J'ai exclu les SPAD array à cause de leur coût trop important quand bien même celles-ci sont particulièrement adaptées à la microscopie confocale puisque ce sont elles qui permettent de faire de l'ISM (voir note 1 p18). J'ai finalement choisi un MPPC avec sortie numérique (Hamamatsu C13366-1350GD) dont les caractéristiques sont données dans le tableau 3.3. Je développerai les conséquences de ce choix sur la dynamique de la détection dans la section 3.5.2.

Taille du capteur	1.3×1.3mm
Nombre de SPAD	667
Dark count	2500/s
Rendement quantique	37% @ 520nm, 27% @ 600nm
Saturation (@0.5p.e.)	$\approx 4 \times 10^6$photons/s

Table 3.3 – Caractéristique du MPPC C13366-1350GD de Hamamatsu.

3.4.5 Module source

Le laser à 488nm est fibré et diverge fortement en sortie de fibre ce qui lui permet d'illuminer une surface suffisante de la lentille LI4 pour remplir le diaphragme pupille situé après celle-ci (cf. figure 3.5). Le laser à 561nm n'est en revanche pas fibré et présente une très faible divergence. Son passage à travers un objectif de microscope Olympus PLN 40x 0.65NA (non représenté sur le schéma du montage) permet d'obtenir une divergence suffisante pour remplir le diaphragme pupille après passage par LI3. Le relais optique LI2-LI1 image ensuite le diaphragme pupille sur le DM.

3.4.6 Filtres spectraux et dichroïque

La qualité optique du filtre dichroïque (D1 sur la figure 3.5) est particulièrement critique. La partie du montage situé entre le DM et le trou confocal ne doit présenter aucune aberration car celle-ci ne serait pas corrigeable par le DM. En effet les éléments optiques en question (le filtre dichroïque et L7) ne sont pas communs au faisceau aller et retour et donc la correction de leurs aberrations entraînerait une dégradation du faisceau d'illumination. Il en va de même pour toute la voie d'injection des lasers, les lentilles LI1, LI2, LI3 et LI4 doivent être parfaitement alignées car il n'est pas possible de corriger leurs aberrations avec le DM sans dégrader la qualité du faisceau retour. D1 doit réfléchir les lasers pour l'illumination et transmettre la fluorescence, j'ai choisi le filtre Di03-R488/561-t3-25x36 de Semrock qui présente des défauts de surface inférieurs à 0.2λ P-V à 632.8nm sur la surface d'onde réfléchie. La figure 3.13 donne les spectres de la dichroïque ainsi que des filtres spectraux (MF525-39 et MF630-69) placés dans la voie de détection. La figure montre également le spectre des lasers d'excitation et les spectres d'excitation et d'émission des fluorophores utilisés. Un filtre étroit centré sur 488nm est utilisé en sortie du laser de 488nm car celui-ci présente des fréquences parasites vues par les caméras des analyseurs.

3.4.7 Alignement du système optique

Le banc optique faisant 150×180cm il a fallu déterminer comment déployer le montage sur celui-ci de sorte à utiliser le moins de miroirs de renvoi possible. La figure 3.14 présente l'organisation que j'ai proposée à l'équipe et qui permet de n'utiliser aucun miroir supplémentaire tout en respectant le choix des angles minimum sur les miroirs galvanométriques (60°) et sur le DM (30°).

Dans un premier temps, nous avons aligné le banc en partant des lasers jusqu'à l'objectif du microscope puis dans un second temps en partant du DM jusqu'aux analyseurs. Une fois un premier analyseur placé, le deuxième est placé de telle sorte à être conjugué optiquement au premier. Une caméra PSF (Alvium 1800 U-500) est ensuite placée précisément en focus et enfin le trou confocal est placé en dernier en s'aidant de son image sur la caméra PSF. En plus

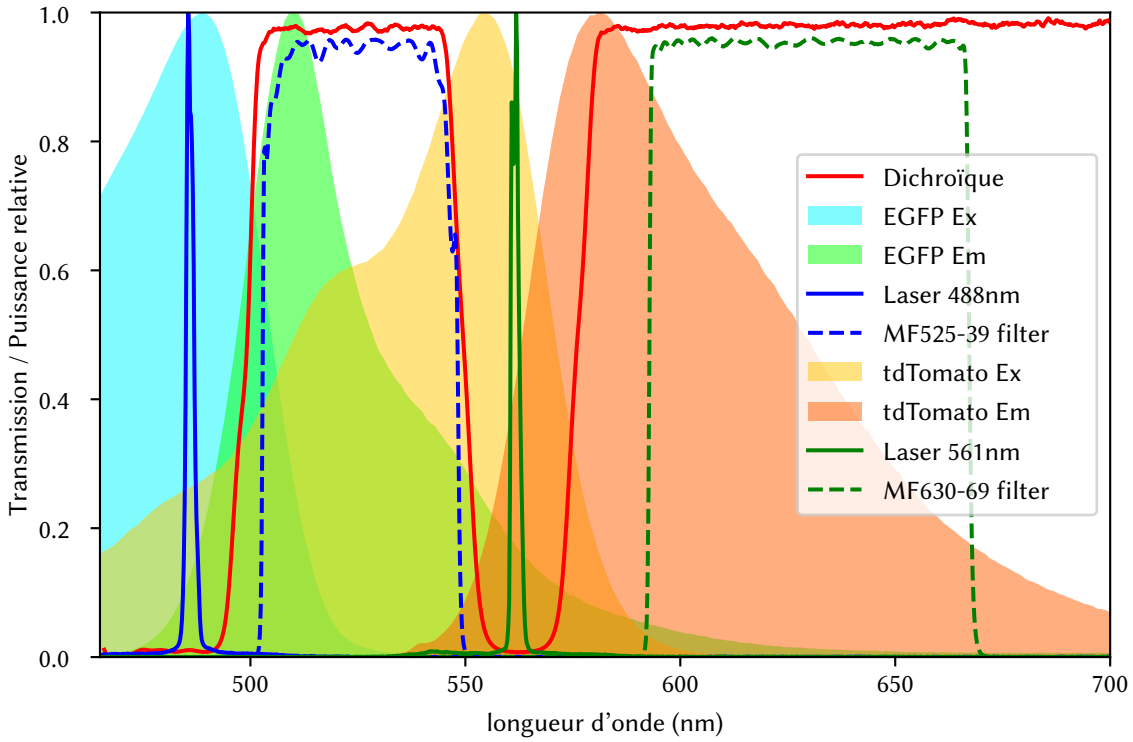


Figure 3.13 – Spectres d'émission et d'absorption des fluorophores EGPF et tdTomato (source : FPbase), spectres de transmission de la dichroïque (source : Semrock), spectres des filtres d'émission (source : Thorlabs) et spectres mesurés des lasers.

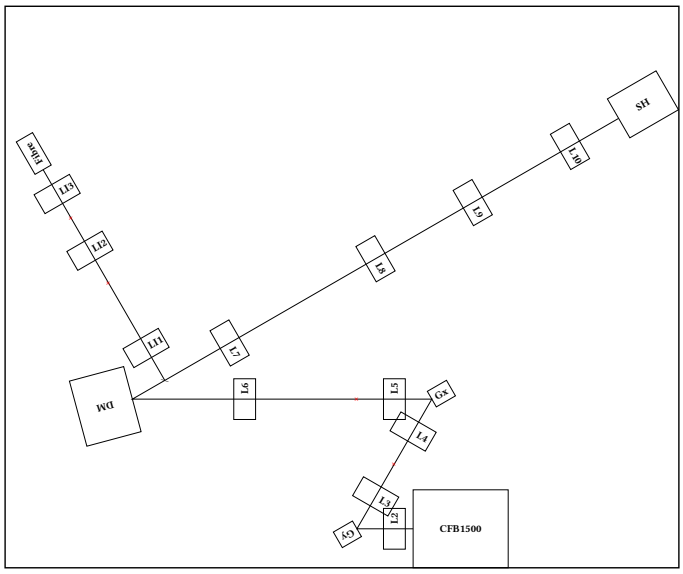


Figure 3.14 – Représentation à l'échelle de l'étalement d'une partie des éléments sur le banc optique qui mesure 180cm x 150cm.

de permettre l'alignement du trou confocal, cette caméra servira dans le chapitre 6 pour la mesure de PSF en transmission à travers le cerveau. Le détecteur MPPC est quant à lui placé légèrement défocalisé pour que le faisceau s'étale sur son capteur. La figure 3.15 montre une photo du montage.

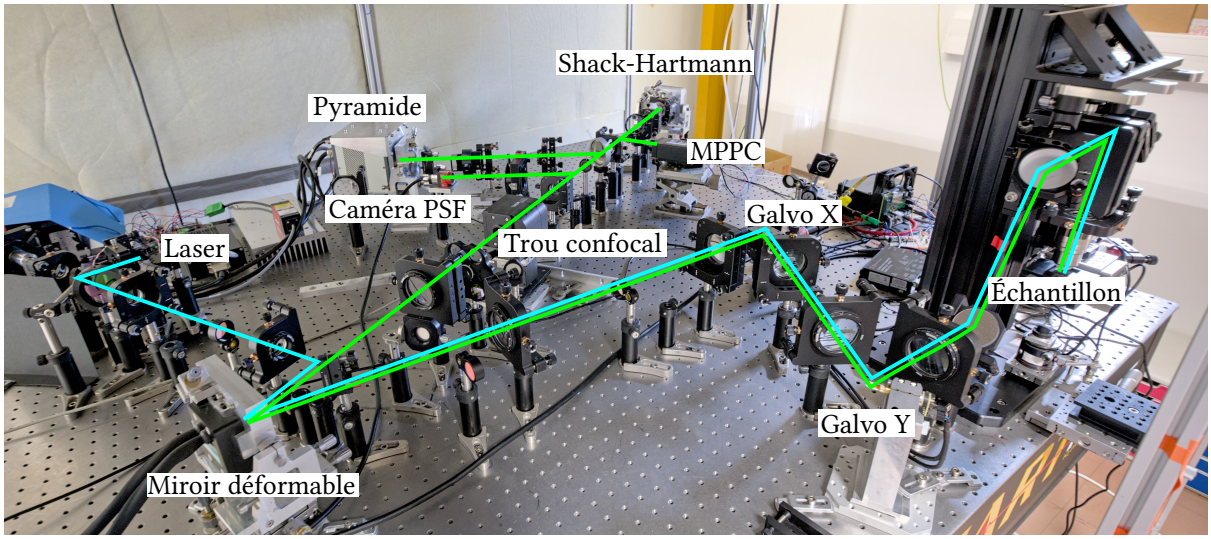


Figure 3.15 – Photographie du banc optique (septembre 2026).

3.5 Électronique

3.5.1 Lasers

Trois lasers ont été récupérés dans un vieil instrument «LaVision Ultramicroscope II» démantelé. N'étant en possession d'aucune documentation ni du logiciel de contrôle, il a fallu faire de la rétro-ingénierie pour déterminer la fonction des 6 fils de leurs connecteurs. Un laser a été blessé dans l'opération. J'ai ensuite conçu un système électronique à base d'Arduino pour pouvoir contrôler les deux lasers restants depuis un ordinateur (voir figure C.1 et C.2 en annexe). La puissance des lasers doit être contrôlée en faisant varier une tension entre 0 à 5V. Cette tension est générée grâce aux sorties PWM (modulation de largueur d'impulsion) de d'Arduino suivi d'un circuit RC pour lisser cette modulation en une tension continue. Le port de commande des lasers peut consommer un courant important (jusqu'à plusieurs centaines de mA) et l'Arduino n'étant capable de fournir qu'un maximum de 40mA, j'utilise des amplificateurs opérationnels de puissance (modèle TCA0372) en mode suiveur entre la sortie du circuit RC et les lasers.

Pour le laser à 561nm, le contrôle de la puissance de sortie a été réalisé avec un modulateur acousto-optique par le fabricant et même pour une commande de 0V une partie de la puissance continue de passer dans le premier mode diffracté du modulateur acousto-optique. Pour ce laser j'ai donc ajouté un petit obturateur contrôlé par un moteur lui-même piloté via l'Arduino. Une première version d'un pont en H conçu avec les transistors que j'avais sous la main n'a pas tenu longtemps avant de griller (à cause du courant important tiré par le moteur). J'ai finalement remplacé ces transistors par un module L298N contenant un pont en H.

En plus de ce problème de modulateur acousto-optique, les amplificateurs opérationnels de puissance que j'utilise ne sont pas «rail to rail» et la tension de commande des lasers ne

peut jamais être de zéro. Cela empêche leur utilisation à très faible puissance. Il faudrait remplacer l'alimentation actuelle des amplificateurs opérationnels (un transformateur 0-12V) par une alimentation symétrique. Pour le moment le problème est contourné en utilisant deux polariseurs linéaires que l'on croise plus ou moins en fonction de l'intensité lumineuse souhaitée à basse intensité. Ces polariseurs sont placés entre LI1 et D1 (en faisceau collimaté).

3.5.2 Balayage des galvanomètres et détection de la fluorescence

J'ai développé le système électronique de contrôle du balayage et d'acquisition des images à l'aide d'un GBF déjà présent au laboratoire et de deux cartes Teensy 4. Les Teensy sont des microcontrôleurs monocartes très bon marché (≈30€) similaires aux Arduino mais avec des microcontrôleurs plus rapides (ARM Cortex-M7 à 600 MHz pour les Teensy 4). Un premier Teensy est utilisé pour contrôler numériquement la position d'un des galvanomètres, le deuxième Teensy est utilisé pour l'acquisition d'image. La figure 3.16 présente un schéma des interactions entre les différents éléments participant au balayage du champ (les galvanomètres Gx et Gy, leur contrôleur et le GBF) et les éléments nécessitant une synchronisation avec le balayage (les caméras des ASO, Pyr CAM et SH CAM, et le système d'acquisition d'image, Teensy 2).

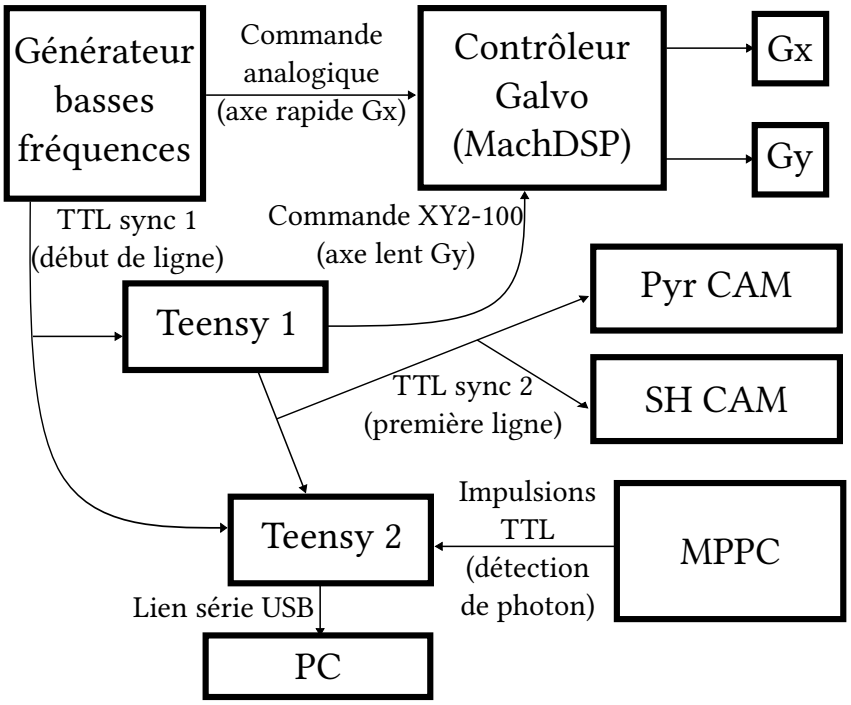


Figure 3.16 – Schéma représentant les interactions entre les différents éléments participant au balayage ou synchronisé avec lui.

Les deux galvanomètres (Gx et Gy) sont connectés à la carte de contrôle fournie par le fabricant (MachDSP). Le pilotage des galvanomètres avec la carte de contrôle peut s'effectuer soit analogiquement soit numériquement via un protocole nommé «XY2-100». L'axe rapide (le balayage le long d'une ligne) est effectué par le galvanomètre Gx contrôlé analogiquement par le signal généré par un GBF. Ce GBF fournit en même temps un signal de synchronisation (TTL sync 1) de même fréquence que le signal analogique de contrôle. Ce signal de synchronisation est reçu par Teensy 1 qui déclenche alors la génération de la trame au protocole XY2-100

indiquant au controleur des galvanomètres de déplacer Gy sur la ligne suivante [1]. Le Teensy 2 reçoit simultanément ce signal et déclenche l'acquisition d'une nouvelle ligne de données par le MPPC [2].

La figure 3.17 présente un chronogramme du processus d'acquisition. Une limitation du GBF utilisé est qu'il est impossible de régler le déphasage entre le signal analogique généré et le signal de synchronisation «TTL sync 1», ceci entraîne un temps mort K_w pendant lequel le galvanomètre commence à balayer la ligne mais sans que l'enregistrement de l'image ait débuté. L'enregistrement ne se fait pas en aller-retour mais seulement dans un sens. Le signal généré par le GBF est un signal en dents de scie pour minimiser le temps K_s de retour à la ligne.

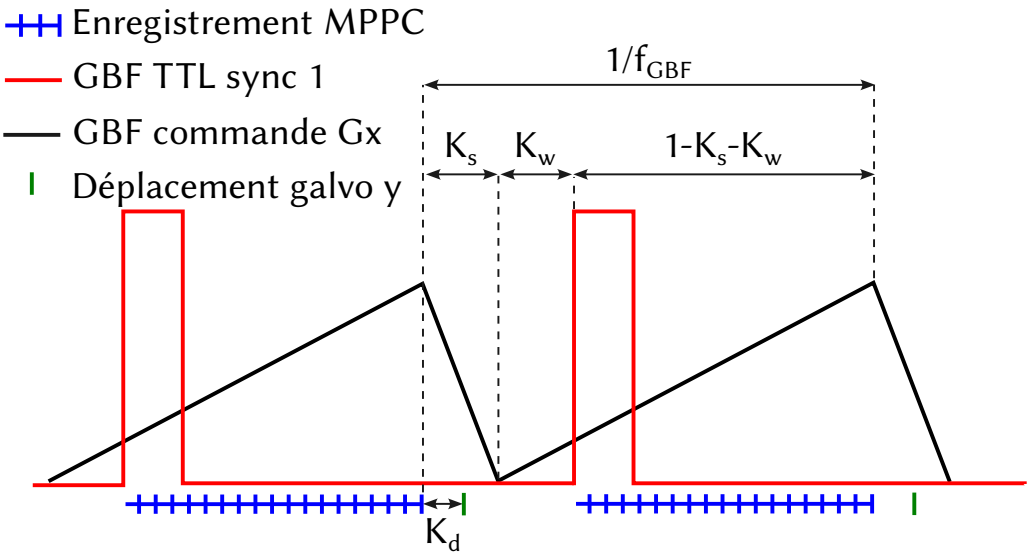


Figure 3.17 – Chronogramme de synchronisation des différents éléments.

Le MPPC envoie un pulse TTL d'une durée τ égale à 20ns à chaque fois que la somme du signal généré par les SPAD passe au-dessus de la valeur seuil de son comparateur. Teensy 2 compte le nombre d'impulsions dans le temps d'intégration de chaque pixel pour leur attribuer leur valeur. Le passage d'un pixel à l'autre d'une même ligne est géré par un timer interne à Teensy 2 qui déclenche périodiquement la procédure de passage au pixel suivant. Le temps d'exécution de cette procédure a été optimisé autant que possible pour permettre l'utilisation de temps d'intégration les plus courts possibles. En l'état, il est possible de descendre jusqu'à 200 nanosecondes par pixel.

Ce fonctionnement du MPPC est problématique lorsque le flux sur le détecteur devient trop important : le signal de sortie n'a pas le temps de redescendre avant l'arrivée de l'impulsion TTL suivante et tout se passe comme si l'impulsion précédente avait une durée supérieure à τ. Le nombre d'impulsions m mesurées en fonction du nombre de photons n détectés par le MPPC est donc[91]

$$m = ne^{-n\tau} \tag{3.22}$$

La figure 3.18 montre la courbe correspondante. La saturation provoque une inversion du contraste sur l'image lorsque le flux photonique est supérieur à 50MHz (soit 1.9mW à 520nm).

1. Pour la génération des trames XY2-100 j'ai utilisé le code suivant : https://github.com/open-galvo/OPAL/blob/master/lib/XY2_100/XY2_100.cpp

2. Le code exécuté sur les teensy est disponible dans le dépôt de Rustao.

On retrouve ici le problème de temps mort après la détection de chaque photon qui était le défaut des détecteurs SPAD et que j'avais cherché à éviter en choisissant un MPPC. Le choix d'une sortie numérique pour le MPPC, bien que pratique, réduit donc la dynamique de celui-ci approximativement au même niveau qu'une SPAD. Il existe tout de même un avantage aux MPPC à sortie numérique qui est la taille de leurs capteurs. Un grand capteur est par exemple utile en microscopie à deux photons où l'on souhaite intégrer l'ensemble du signal de fluorescence même diffusé. En microscopie confocale où on place un trou confocal devant le capteur cet avantage n'existe pas et le seul petit avantage restant du MPPC *à sortie numérique* par rapport à une SPAD vient de la possibilité de régler le seuil du comparateur pour travailler dans des régimes de flux différents. Sur le modèle choisi ce seuil est réglable de 0.5 à 8.5 photoélectrons mais on travaillera toujours avec le seuil minimum pour maximiser la sensibilité de la détection et ainsi minimiser le photoblanchiment des échantillons.

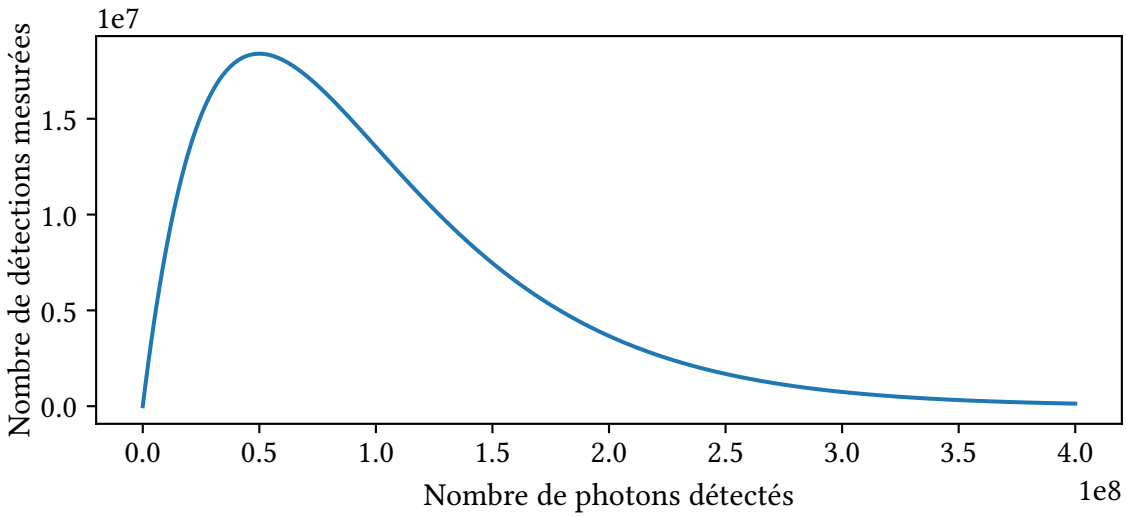


Figure 3.18 – Courbe de saturation théorique du détecteur.

3.6 Étalonnage

3.6.1 Détermination des paramètres du balayage des galvanomètres

La procédure pour déterminer les différents paramètres du balayage d'une région d'une taille donnée avec un échantillonnage à Shanon est décrite en détails dans l'annexe D. On constate d'après cet étalonnage que la commande de Galvo Y doit être corrigée d'un facteur environ égal à $\left(\cos\frac{\theta_0}{2}\right)^{-1} = 1.15$ ($\theta_0 = 60°$ étant l'angle formé entre l'axe optique incident et réfléchi sur les galvanomètres) par rapport à galvo X pour obtenir un déplacement de même grandeur sur les deux axes. Je donnerai dans le chapitre suivant (section 4.4) une analyse détaillée de l'origine de ce facteur.

Une fois la procédure d'étalonnage suivie, il est possible de changer la taille du champ balayé en changeant les amplitudes de commande dans le programme de contrôle des galvanomètres (les valeurs C_x et C_y dans l'annexe D). Les champs obtenus de cette façon ne sont pas échantillonnés à Shanon mais ceci permet un changement simple et rapide de la zone observée. La figure 3.19 montre le résultat du balayage de la surface d'une lamelle recouverte d'un trait de marqueur fluorescent séché avec entre chaque image une multiplication par deux

de la commande angulaire des galvanomètres. Seule l'image de gauche est échantillonnée à Shanon. Le champ sur l'image de droite est supérieur au 1mm annoncé par le fabricant car l'objectif est ici utilisé dans l'air et, par conséquent, (voir tableau 3.6) sa focale est plus longue et le grandissement est moins important. Ceci explique le vignetage important sur cette image. J'ai vérifié sur ces images que les champs obtenus étaient proportionnels à la commande des galvanomètres (multiplication par deux du champ entre chaque image). La réponse des galvanomètres est donc linéaire à la commande dans la gamme d'angles dans laquelle je les utilise.

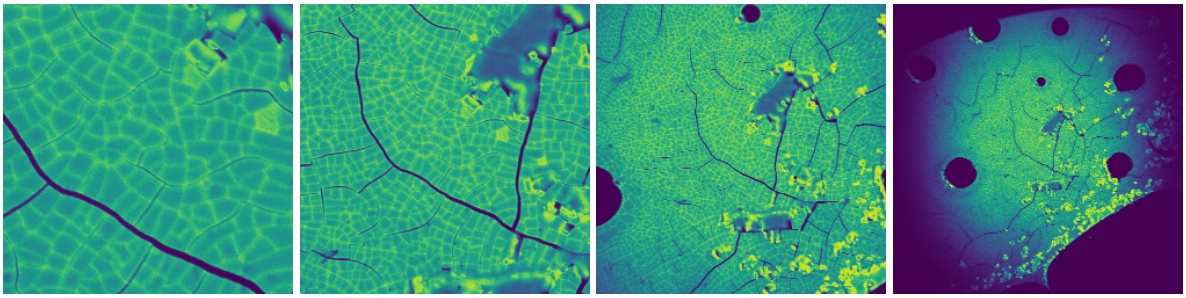


Figure 3.19 – Marqueur fluorescent séché sur une lamelle. De gauche à droite champs de 180×180µm, 360×360µm, 720×720µm et 1440×1440µm.

3.6.2 Photométrie

Les résultats de mesures photométriques faites sur le montage sont données en figure 3.20. La puissance du laser à 488nm est mesurée depuis le plan champ situé entre les lentilles LI1 et LI2 puis dans tous les plans champs jusqu'au plan de l'échantillon. La mesure de la photométrie du bras de détection est faite avec un laser à 520nm depuis le plan champ situé entre les lentilles L1 et L2 et jusqu'à l'arrière de la lentille L9.

3.6.3 Étalonnage des NCPA et mise à plat du DM

La «mise à plat» du DM s'effectue en plaçant une caméra dans le champ entre L2 et L1 et en optimisant la PSF à cet endroit par diversité de phase. Il faudrait idéalement mettre la caméra directement sous l'objectif mais la PSF y est trop petite pour être résolue correctement par le capteur d'une caméra. Pas question non plus d'utiliser un système optique pour agrandir la PSF après l'objectif car cela risquerait d'introduire des aberrations supplémentaires qui détérioreraient la mesure. La forme obtenue sur le DM (i.e. son vecteur de commande) est sauvegardée et systématiquement appliquée par le RTC par la suite (biais $\mathbf{c_b}$ dans l'équation 2.7).

Dans un microscope confocal la qualité de la PSF doit être optimale au niveau du trou confocal. Les aberrations présentes entre le trou confocal situé entre L7 et L8 et chacun des analyseurs, appelées NCPA (Non-Common Path Aberration), sont vues par les analyseurs mais ne doivent pas être corrigées pour ne pas dégrader la PSF au niveau du trou. L'étalonnage de ces NCPA s'effectue en plaçant une source ponctuelle (une tête de fibre) au niveau du trou confocal via un miroir de renvoi placé pour l'occasion entre le trou confocal et L8. Les pentes mesurées par les analyseurs sont enregistrées et par la suite systématiquement appliquées dans le vecteur $\mathbf{s_b}$ de l'équation 2.9 pour être soustraites à la mesure.

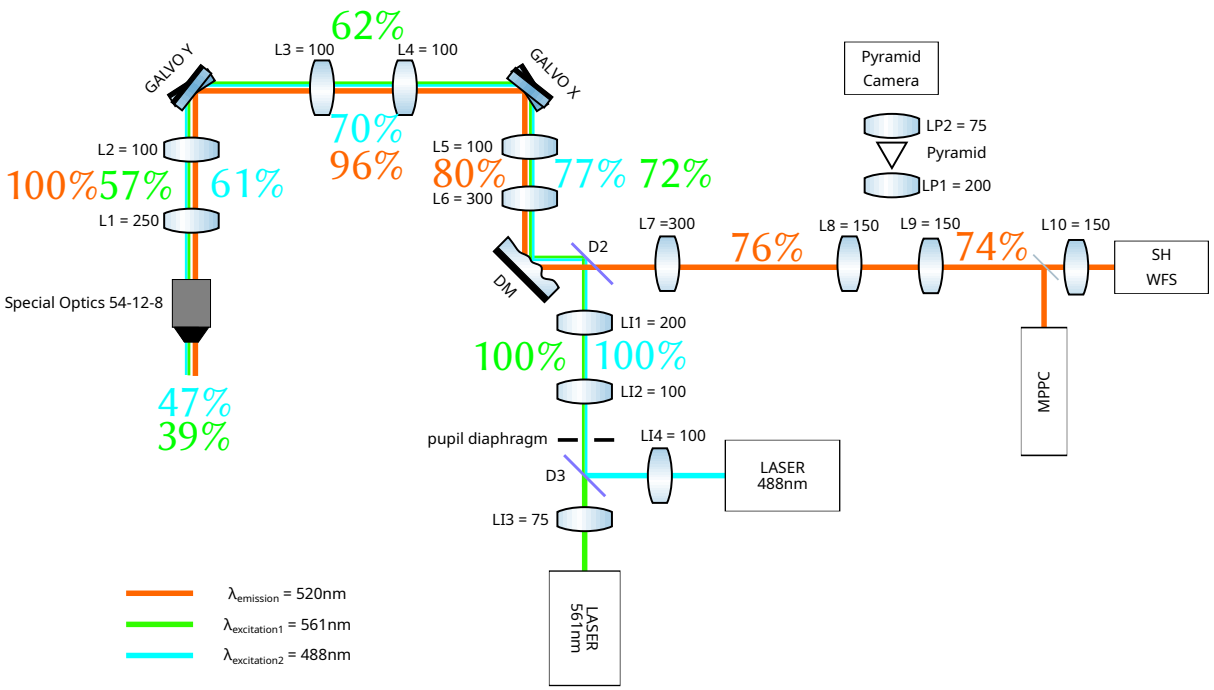


Figure 3.20 – Photométrie du montage à 488nm et 561nm pour le bras d'illumination et à 520nm dans le bras de détection.

3.6.4 Mesures du sectionnement et de la résolution spatiale

Pour tester le fonctionnement du sectionnement optique, des images de pollen ont été réalisées en utilisant des espèces de fleurs trouvées dans le parc de l'Observatoire de Meudon. Les images ont été réalisées avec une illumination à 488nm et avec le filtre d'émission de la GFP. La surface externe du pollen, l'exine, présente une autofluorescence importante ainsi que de nombreuses structures de petites tailles dépendant de l'espèce. La figure 3.21 montre le type d'images qui peuvent être obtenues avec à gauche une image de pollen de Stellaria holostea prise sur le microscope confocal (trou confocal ouvert à 1mm) et à droite une image réalisée au microscope électronique tirée de la base de donnée PalDat pour comparaison. La figure 3.22 présente deux images de pollen de l'espèce Geranium robertianum réalisées avec les trous confocaux de 2mm et de 100µm. Les petits points de fluorescence, bien résolus [1] sur l'image de gauche, sont des excroissances de l'exine, nommé *clavae*, d'un diamètre d'environ 1µm[92, 93]. La résolution cible de 1µm est donc atteinte. Il est plus difficile d'estimer la qualité du sectionnement obtenu. On verra dans le chapitre suivant (tableau 4.1) que les sectionnements attendus pour des trous de 2mm et 100µm sont de l'ordre de 150µm et 8µm respectivement ce qui semble compatible avec les images observées étant donné que les grains de pollen de Geranium robertianum ont un diamètre d'environ 50µm. La figure 3.23 montre une image prise dans un cerveau clarifié entier à une profondeur faible (environ 1mm). On voit que la fermeture du trou confocal de 1mm à 300µm permet de faire ressortir l'image des axones.

1. Malgré une utilisation de l'objectif dans l'air conduisant à une ouverture numérique et donc une résolution plus faible.

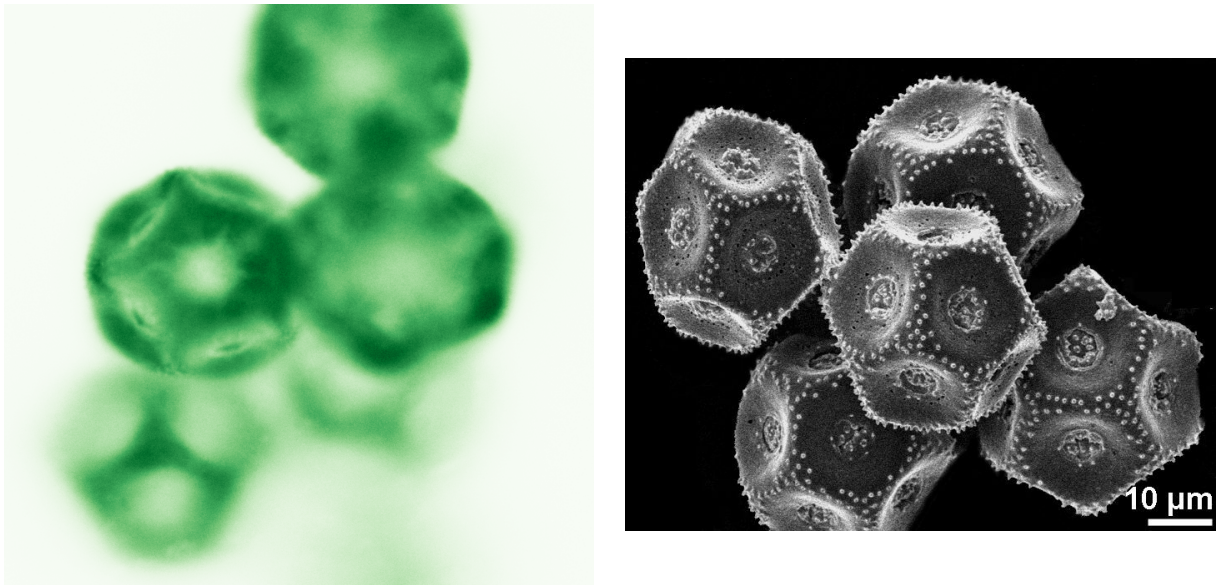


Figure 3.21 – Pollen de Stellaria holostea avec un trou confocal de 1mm et sur un champ de 90x90µm (gauche) et image au microscope électronique (droite). Les grains de pollen ont une forme dodécagonale. Source de l'image de droite : [94]

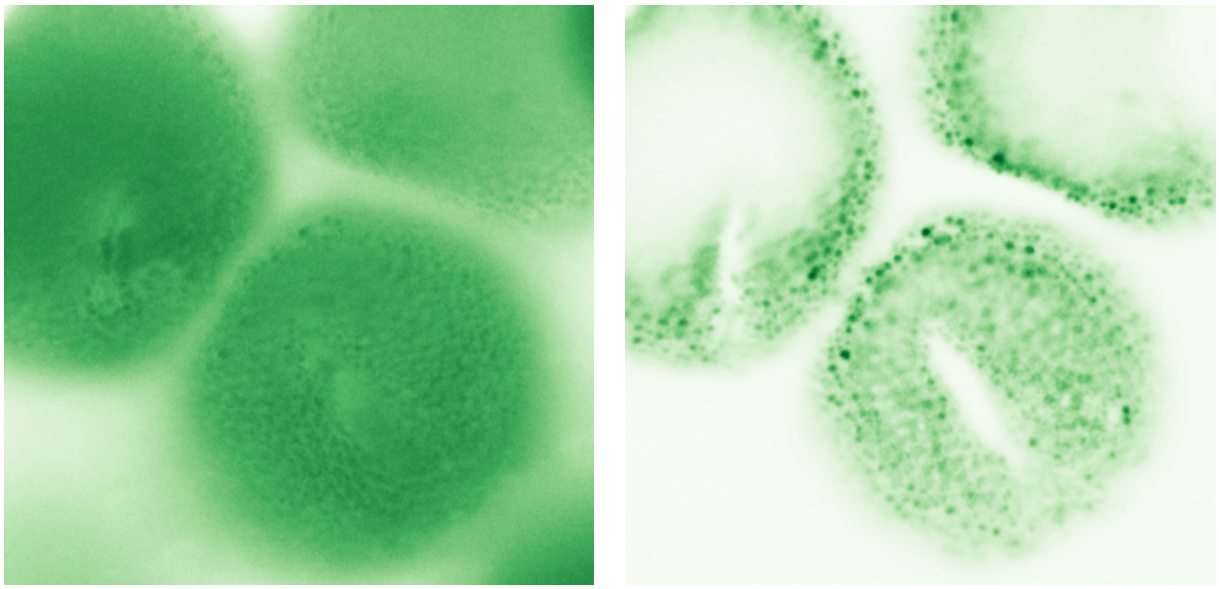


Figure 3.22 – Pollen de Geranium robertianum avec un trou confocal de 2mm (gauche) et un trou confocal de 100µm (droite). Champ de 90×90µm.

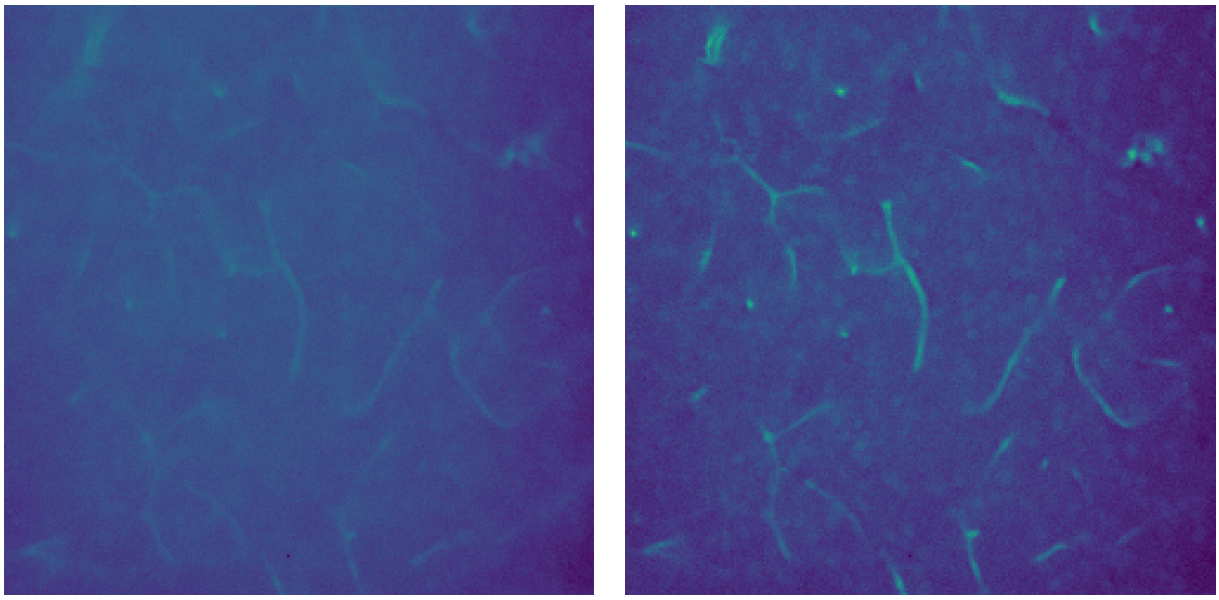


Figure 3.23 – Image prise proche de la surface dans un cerveau clarifié avec le protocole CUBIC et marqué avec de la EGFP. Trou confocal de 1mm (gauche) et 300µm (droite). Champ de 500×500µm.

3.6.5 Démonstration du fonctionnement de l'optique adaptative

Le bon fonctionnement de l'optique adaptative a été testé sur un échantillon fantôme consistant en du marqueur fluorescent séché sur la face supérieure d'une lamelle de 170µm d'épaisseur. Une lame fluorescente d'une épaisseur de 1.7mm (Thorlabs FSK2) est placée sous la lamelle pour simuler la fluorescence hors focus. Un masque de phase avec une DSP de type Kolmogorov est placé au-dessus de l'ensemble pour simuler des aberrations induites par l'échantillon. L'objectif est focalisé sur la couche de marqueur avec le laser à 488nm et l'image formée par les craquelures dues au séchage du marqueur est enregistrée (image boucle ouverte) avec différentes tailles de trou confocal (300, 100, 50 et 25µm). La boucle d'OA est ensuite fermée avec le plus grand trou confocal (2mm) jusqu'à convergence de la correction. Après convergence, l'OA est arrêtée tout en maintenant fixe la correction appliquée par le DM. Les images sont alors de nouveau enregistrées avec les mêmes trous confocaux que pour les images boucle ouverte. La figure 3.24 montre les différentes images obtenues et le tableau 3.4 montre la somme du signal enregistré dans les deux zones correspondantes aux carrés bleu (background) et rouge (signal).

Taille du trou confocal		300µm	100µm	50µm	25µm
Signal	AO OFF	96862	5961	1168	264
	AO ON	235176	39883	9188	1005
Background	AO OFF	760	160	96	76
	AO ON	669	156	121	79
Signal/Background	AO OFF	127.5	37.3	12.2	3.5
	AO ON	351.5	255.7	75.9	12.7
Signal (AO ON) / Signal (AO OFF)		2.4	6.7	7.9	3.8

Table 3.4 – Signal mesuré dans les zones bleu et rouge de la figure 3.24.

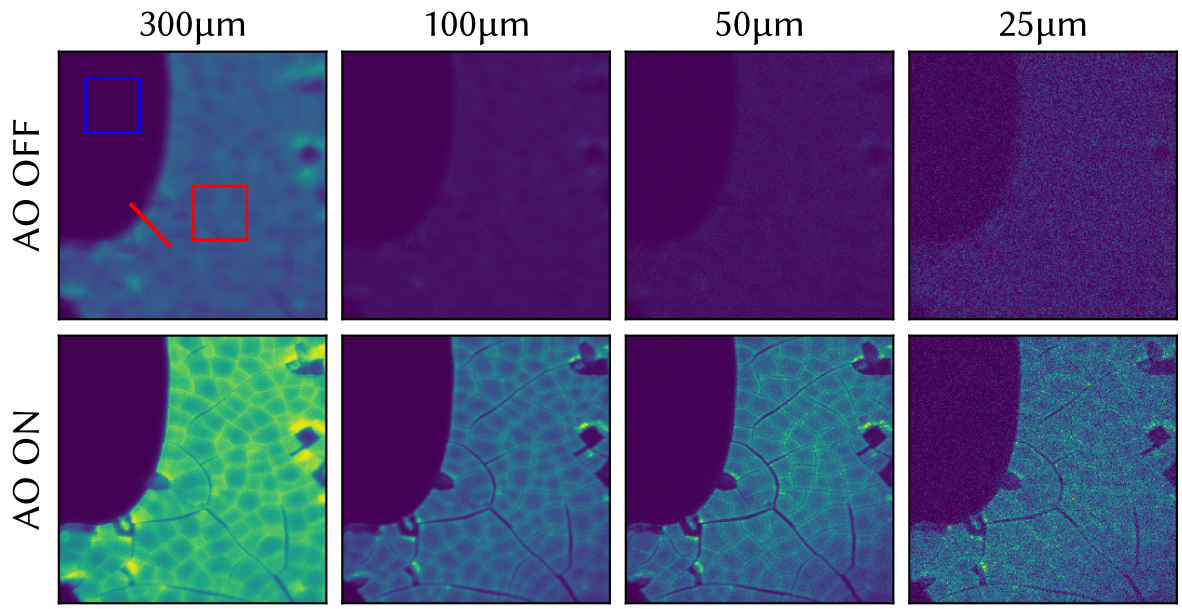


Figure 3.24 – Image en boucle ouverte et fermée avec différentes tailles de trou confocal. Le champ est de 125×125µm et l'échelle de couleurs est la même pour une colonne donnée.

On voit que plus le trou confocal est fermé plus le background est faible [1]. On observe un gain en signal entre boucle ouverte et boucle fermée dans toutes les configurations. Le meilleur gain est obtenu pour le trou confocal de 50µm. En effet un trou plus grand laisse passer une partie importante de la PSF aberrée en boucle ouverte et le trou plus petit (25µm = 0.63AU) coupe une partie du signal même en boucle fermée. La figure 3.25 montre les profils d'intensité pris le long de la ligne rouge sur la figure 3.24 pour les différentes configurations. On y voit le gain en résolution (structure détectée autour de 20µm) et en signal apporté par l'OA.

Cas particulier des modes de tip, tilt et focus

L'expérience précédente a été réalisée en excluant les Zernike de tip et de tilt. En effet le double passage sur le miroir déformable conduit à une invisibilisation de ces deux modes car le DM débalaye le faisceau retour de la même manière que le font les galvanomètres. Si on laissait au DM la possibilité de produire du tip/tilt leur invisibilité pour l'ASO pourrait conduire à une accumulation progressive de ces modes jusqu'à saturation du DM. La procédure d'exclusion de modes de Zernike est décrite dans la section 2.3.2.

Il se produirait le même phénomène de compensation aller-retour pour la défocalisation sur un échantillon épais. Lorsque l'on imagera un échantillon épais comme le cerveau il faudra alors exclure le tip, le tilt et le focus de la correction.

Il faut toutefois noter que ces modes ne sont tout à fait invisibles que lorsque l'échantillon est homogène (latéralement pour le tip/tilt et longitudinalement pour le défocus). Pour un échantillon non homogène l'effet produit est un peu différent, le système d'OA va alors «accrocher» la fluorescence et faire converger les modes de tip/tilt/défocus vers le lieu où celle-ci

1. Ce signal de background est dans tous les cas très faible, en effet on verra dans le chapitre suivant section 4.5 que pour les tailles de trou confocal utilisées l'écart de 170µm entre la couche de marqueur et la lame fluorescente est trop important : dans tous les cas, presque toute la fluorescence en provenance de la lame épaisse est rejetée.

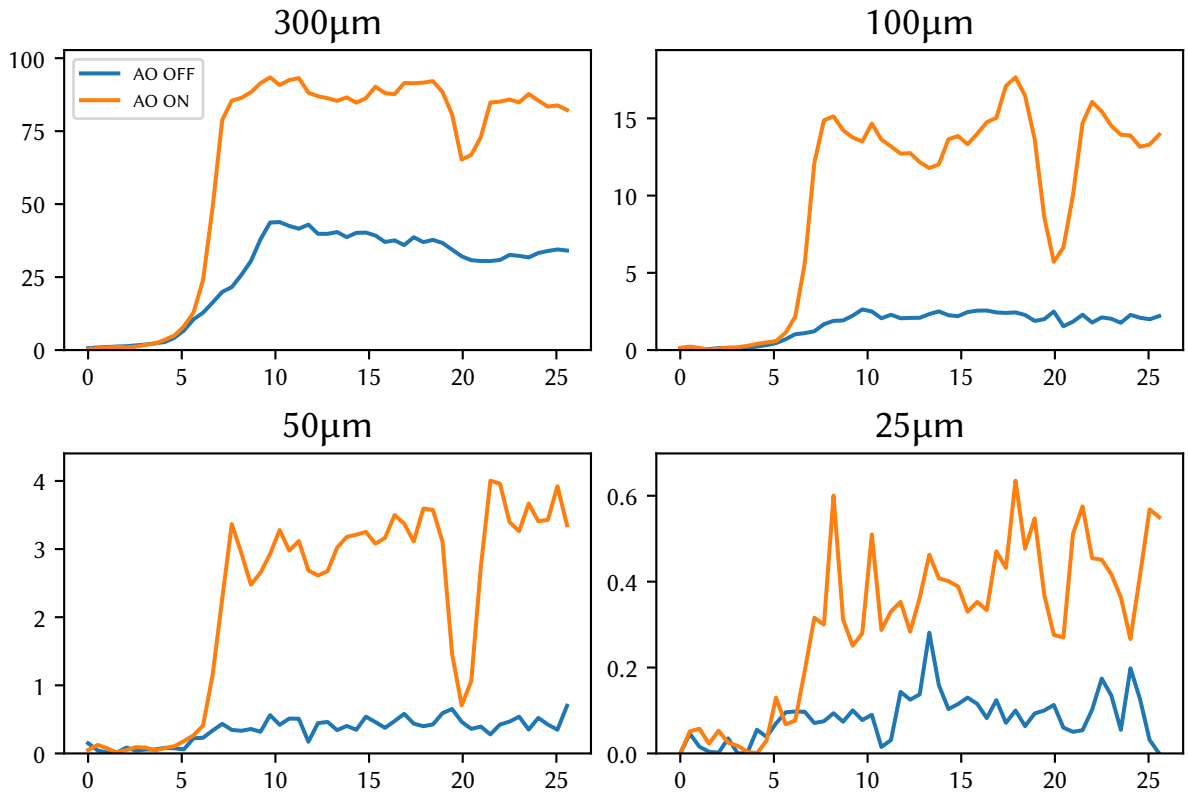


Figure 3.25 – Profil le long de la ligne rouge sur la figure 3.24, AO OFF (courbe bleu) et AO ON (courbe orange). L'abscisse est en micromètres.

est la plus importante. Un comportement qui peut être souhaitable ou non selon l'objectif de la correction.

3.7 Perspectives d'amélioration du système optique

Le montage actuel présente une mauvaise photométrie liée au nombre important de lentilles et à la mauvaise transmission de l'objectif (85%). De plus, pour le fluorophore tdTomato on peut voir sur la figure 3.13 qu'une partie importante du flux émis est filtrée. Il faudrait remplacer le filtre MF630 par un filtre plus large.

Un trou confocal de taille continûment variable permettrait d'expérimenter une fermeture progressive concomitante avec la fermeture de la boucle d'optique adaptative.

Le passage du faisceau sur le bord des lentilles L1 à L4 lors du balayage du bord du champ introduit des aberrations de champ [1]. Ces aberrations ne sont pas corrigeables par l'OA car elles dépendent de la position dans le champ et la vitesse de balayage de celui-ci est bien plus rapide que la vitesse de correction par le miroir déformable. L'utilisation de lentilles de scan pour les lentilles L1 à L4 permettrait d'augmenter la qualité de l'image sur les bords du champ. Toutefois les lentilles de scan proposées par Thorlabs ont une mauvaise transmission (environ 85% à 520nm pour les CLS-SL), le passage par quatre de ces lentilles conduirait donc à une perte de presque la moitié du flux !

1. Ces aberrations sont visibles sur l'image de gauche de la figure 4.10 dans le chapitre suivant : le damier au bord de l'image est légèrement flou par rapport au centre

Chapitre 4

Ray tracing

> Here was another task ideally suited to the computer's particular form of high-speed idiocy.
>
> James Gleick, Chaos : Making a New Science

Initialement développé par jeu pendant mes vacances, il est vite apparu qu'il était possible d'obtenir un programme de ray tracing fonctionnel et suffisamment complet pour être effectivement utile. J'ai donc pourvuivi le développement, avec l'idée de développer une méthode de mesure du déplacement des spots sur un Shack-Hartmann utilisé sur échantillon fluorescent épais. Le principe de cette idée sera présenté en détail dans le chapitre 5. Dans ce chapitre je présente le fonctionnement technique du ray tracing (sections 4.1 à 4.3) ainsi que deux applications à la modélisation du microscope confocal (sections 4.4 et 4.5).

Le code source du programme, écrit en Rust, est disponible sur Gitlab sous licence MIT[1].

4.1 Principes de fonctionnement

Le ray tracing consiste à simuler la propagation de rayons lumineux d'une source vers une caméra (ou l'inverse) à travers un système optique constitué d'une suite de surfaces (dioptres, miroirs ou diaphragmes) simulées par les lois de Snell-Descartes[2].

4.1.1 Ray tracing inverse

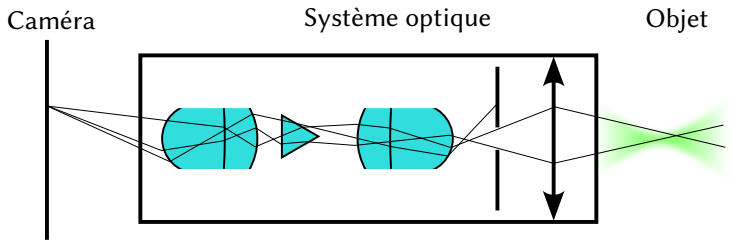


FIGURE 4.1 – Schéma de fonctionnement du ray tracing inverse.

Dans la configuration ray tracing inverse (Fig. 4.1) les rayons sont lancés depuis la caméra vers l'objet. Une image est ainsi reconstruite en lançant des rayons avec différents angles

1. https://gitlab.com/Gaumut/raytracing
2. La formulation vectorielle des lois de Snell-Descartes est donnée en annexe E.4

depuis chaque pixel de l'image et en calculant quelle quantité d'énergie ils transportent. C'est la configuration historiquement la plus utilisée dans le domaine du rendu 3D[95]. Les rayons étant lancés depuis la caméra on ne perd pas de temps à traiter des rayons qui ne seront pas vus par celle-ci. C'est pour ces raisons que j'ai initialement choisi cette façon de faire. On va voir plus loin qu'elle pose un certain nombre de problèmes qui vont finalement me conduire à adopter la méthode du ray tracing direct présenté dans la section suivante.

4.1.2 Ray tracing direct

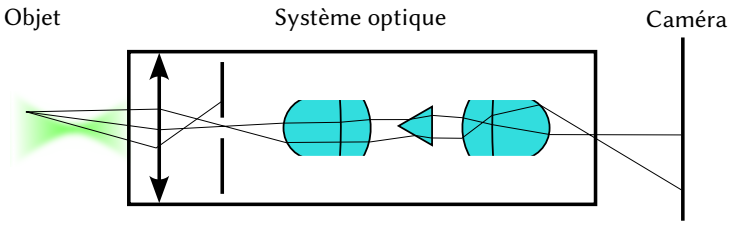


Figure 4.2 – Schéma de fonctionnement du ray tracing direct.

Dans la configuration ray tracing direct (Fig. 4.2) les rayons sont lancés depuis l'objet lumineux vers la caméra. Pour tenir compte des variations spatiales de luminosité de l'objet, on peut soit choisir d'attribuer une énergie différente aux rayons en fonction de la position de départ, soit jouer sur le nombre de rayons lancés depuis chaque position.

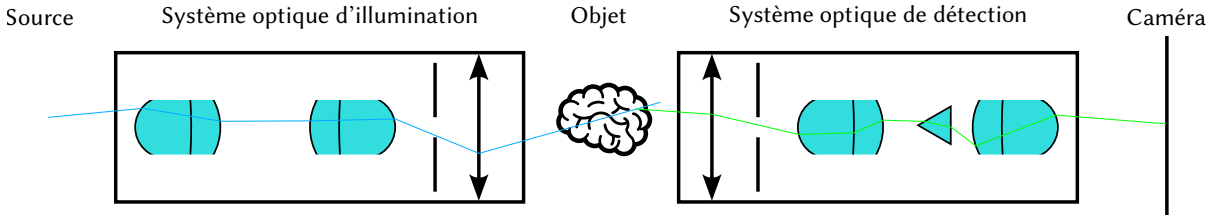


Figure 4.3 – Schéma de fonctionnement du ray tracing direct avec simulation de l'excitation et de l'émission fluorescente.

Dans le cadre du ray tracing direct on peut aussi envisager une simulation complète du processus d'imagerie en microscopie de fluorescence avec simulation successive de l'excitation et de l'émission (Fig. 4.3). Ceci permet également de prendre en compte la différence de longueur d'onde dans les deux voies.

4.1.3 Distribution angulaire des rayons

Que l'on fasse du ray tracing inverse ou direct se pose la question de la distribution angulaire qu'il faut donner aux rayons issus du point de départ (les pixels de la caméra ou l'objet source). Dans le cas du ray tracing direct elle dépend de l'objet source (elle est par exemple différente selon que la source est lambertienne ou non). Dans le cas de la fluorescence, on peut considérer que l'émission est isotrope [1].

La situation pour le ray tracing inverse est plus compliquée car la distribution angulaire à utiliser pour les rayons qui partent de la caméra ne dépend pas uniquement du type d'objets

1. Ce qui n'est en général pas vrai pour un fluorophore donné mais est vrai en moyenne sur l'ensemble des fluorophores qu'on suppose orientés aléatoirement.

sources (et de leurs formes) mais également du système optique entre ces objets et la caméra. Or, l'effet du système optique sur les rayons n'est pas connu à priori. De plus cet effet est dépendant de la position de départ sur la caméra. Dans la pratique, je choisis de lancer depuis la caméra des rayons avec une distribution soit uniforme angulairement soit uniforme spatialement sur la première optique rencontrée dans le système. De plus, pour des raisons d'optimisation, on cherche à ne pas lancer de rayons inutiles, on veut donc que tous les rayons lancés soit dirigés vers la première optique du système. Cette première optique a, généralement, la forme d'un disque, qui est vu comme une ellipse depuis un point quelconque de la caméra. On veut donc générer une distribution de vecteurs tous dirigés vers l'ellipse. Il est difficile de générer une distribution uniforme angulairement sur une ellipse[96]. On choisit donc soit de lancer les rayons de façon à ce qu'ils soient répartis uniformément sur la surface, soit on génère des rayons répartis uniformément angulairement dans un cône de révolution [1] dont l'ouverture est suffisamment grande pour toujours contenir l'élément visé quelle que soit la position sur la caméra.

Dans le cas du ray tracing direct, la distribution à donner aux rayons ne dépend pas du système optique, et une simulation exacte est donc possible. Ce plus grand réalisme physique du ray tracing direct est la première des raisons qui m'ont conduit à le préférer au ray tracing inverse. La deuxième raison, une plus grande simplicité pour modéliser la forme de la source, sera abordée dans la section 4.3.

4.2 Simulation du système optique

Dans le domaine du rendu 3D par ray tracing, la scène est composée d'un certain nombre d'objets qui peuvent être traversés dans un ordre qui n'est pas connu à priori[95]. La situation pour simuler un système optique est plus simple puisque les différents éléments du train optiques doivent être traversés séquentiellement. Les sections suivantes présentent les méthodes utilisées pour simuler les éléments optique présents sur le banc : doublet achromatique, analyseur pyramide et Shack-Hartmann.

4.2.1 Doublet achromatique

Thorlabs et Edmund Optics, les deux fournisseurs chez qui les lentilles du microscope ont été achetées, fournissent, pour l'ensemble de leur doublet, les rayons de courbure des trois dioptres, l'épaisseur centrale des deux lentilles et la dénomination des verres utilisés [2]. On a alors tous les éléments nécessaires pour simuler exactement les doublets en combinant trois hémisphères [3]

Toutefois on ne peut pas placer les doublets à la bonne position dans le chemin optique car ni Thorlabs ni Edmund Optics ne fournissent la position des plans principaux. [4] On doit donc calculer la position de ces plans. J'utilise un formalisme de matrice ABCD[97] qui est présenté dans le paragraphe suivant. La position et l'écart entre les plans principaux dépend

1. Voir annexe E.6.
2. Les indices de réfraction correspondants ont été pris sur le site https://refractiveindex.info.
3. Pour le calcul de l'intersection d'un rayon avec un hémisphère voir annexe E.3. L'effet de vignettage dû au diamètre fini des lentilles est simulé par un diaphragme de même diamètre et situé en leurs centres.
4. On pourrait calculer la position du deuxième plan principal à partir de la longueur focale effective combinée à la longueur focale arrière mais on ne peut pas faire la même chose pour le premier plan principal car la valeur de la longueur focale avant n'est pas fournie.

de la longueur d'onde (via les indices de réfraction des milieux). En pratique, quand on simulera le système optique complet, on calculera la position des lentilles à une longueur d'onde intermédiaire entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les lentilles ainsi placées seront ensuite traversées à des longueurs d'onde différentes à l'aller et au retour.

Calcul de la position des plan principaux d'un doublet

Soient n_0 et n_3 les indices des milieux avant et après le doublet, n_1 et n_2 les indices des deux verres du doublet, R_0, R_1 et R_2 les rayons de courbure des trois dioptres et t_0 et t_1 l'épaisseur centrale des deux lentilles du doublet. On construit la matrice ABCD du doublet en multipliant les matrices ABCD des trois dioptres et les deux matrices ABCD de propagation entre ces dioptres. On utilise ici la convention

$$\begin{pmatrix} x_o \\ \theta_o \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_i \\ \theta_i \end{pmatrix} \tag{4.1}$$

où x_i et x_o sont les distances transverses à l'axe optique et θ_i et θ_o sont les angles avec l'axe optique avant et après passage par l'élément représenté par la matrice. La matrice de propagation dans un milieu d'indice n est

$$\begin{pmatrix} 1 & \frac{d}{n} \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \tag{4.2}$$

où d est la distance parcourue. La matrice de propagation à travers un dioptre sphérique d'un indice n_1 vers un indice n_2 est

$$\begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_1 - n_2}{R n_2} & \frac{n_1}{n_2} \end{pmatrix} \tag{4.3}$$

où R est le rayon de courbure de la surface. La matrice représentant un doublet est donc

$$M = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_2 - n_3}{R_2 n_3} & \frac{n_2}{n_3} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & t_1 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_1 - n_2}{R_1 n_2} & \frac{n_1}{n_2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & t_0 \\ 0 & 1 \end{pmatrix} \begin{pmatrix} 1 & 0 \\ \frac{n_0 - n_1}{R_0 n_1} & \frac{n_0}{n_1} \end{pmatrix} \tag{4.4}$$

On note $L = t_0 + t_1$ l'épaisseur du doublet et on cherche la position p_2 du deuxième plan principal à partir de la première surface de la lentille d'absisse 0 sur la figure 4.4. On rappelle que le deuxième plan principal est le plan perpendiculaire à l'axe optique qui contient les points d'intersections entre les rayons incidents parallèles à l'axe optique et les rayon émergents du système. On note EFL la distance focale effective de la lentille (la distance entre le plan principal et le plan de focalisation).

On note x_f l'intersection entre le rayon émergent et le plan perpendiculaire à l'axe optique et tangent à la dernière surface de la lentille, θ_f l'angle du rayon émergent avec l'axe optique et x_0 la distance à l'axe optique du rayon incident sur le système (voir figure 4.4). On note BFL la distance focale arrière de la lentille (la distance entre sa dernière surface et son plan de focalisation). On a

$$\begin{pmatrix} x_f \\ -\theta_f \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{4.5}$$

et donc

$$\begin{cases} x_f = A x_0 \\ \theta_f = -C x_0 \end{cases} \tag{4.6}$$

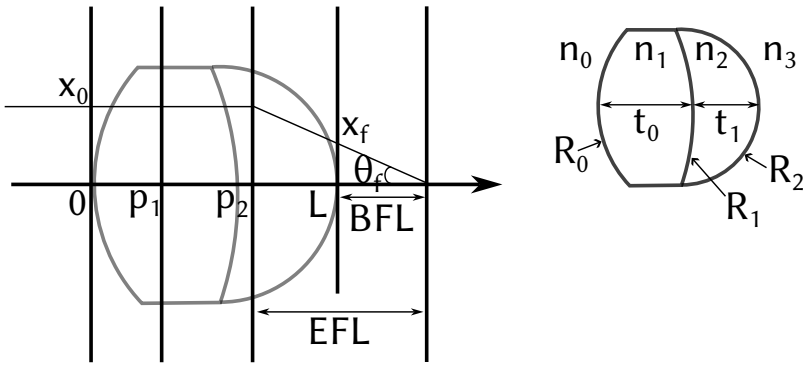


Figure 4.4 – Focalisation d'un faisceau collimaté.

par ailleurs on a

$$\begin{cases} x_f = BFL \tan\theta_f \\ x_0 = EFL \tan\theta_f \end{cases} \tag{4.7}$$

on a donc

$$p_2 = L - EFL + BFL = L - \frac{x_0}{\tan\theta_f} + \frac{x_f}{\tan\theta_f} \tag{4.8}$$

soit pour un petit angle ($\tan\theta_f \approx \theta_f$)

$$p_2 \approx L + \frac{x_0}{Cx_0} - \frac{Ax_0}{Cx_0} = L + \frac{1-A}{C} \tag{4.9}$$

De même dans l'autre sens, pour la position p_1 du premier plan principal qui est le plan perpendiculaire à l'axe optique qui contient les points d'intersections entre les rayons émergents parallèles à l'axe optique et les rayons incidents du système (voir figure 4.5). On note x_0 la distance à l'axe optique du rayon émergent du système, x_i l'intersection du rayon incident avec le plan perpendiculaire à l'axe optique et tangent à la première surface de la lentille et θ_i l'angle du rayon incident avec l'axe optique. On note FFL la distance focale avant de la lentille (la distance entre son plan de focalisation et sa permière surface). On a

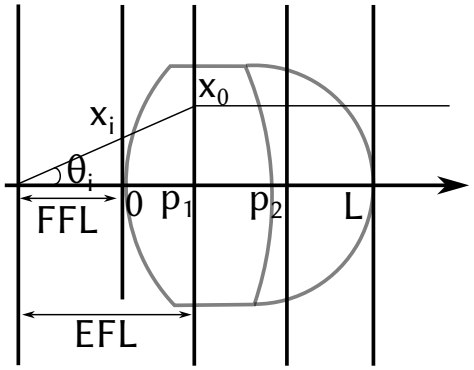


Figure 4.5 – Collimation d'un point source.

$$\begin{pmatrix} x_0 \\ 0 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} A & B \\ C & D \end{pmatrix} \begin{pmatrix} x_i \\ \theta_i \end{pmatrix} \tag{4.10}$$

soit

$$\begin{cases} x_0 = Ax_i + B\theta_i \\ 0 = Cx_i + D\theta_i \end{cases} \tag{4.11}$$

et donc

$$\begin{cases} x_i = -\dfrac{D}{C}\theta_i \\ x_0 = \left(\dfrac{-AD}{C} + B\right)\theta_i \end{cases} \tag{4.12}$$

On a par ailleurs

$$\begin{cases} x_0 = EFL \tan\theta_i \\ x_i = FFL \tan\theta_i \end{cases} \tag{4.13}$$

on a donc

$$p_1 = EFL - FFL = \frac{x_0}{\tan\theta_i} - \frac{x_i}{\tan\theta_i} \approx -\frac{AD}{C} + B + \frac{D}{C} = -\frac{AD - BC - D}{C} = -\frac{\det(M) - D}{C} \tag{4.14}$$

Or le déterminant d'une matrice ABCD est toujours égal au rapport des indices d'entrée et de sortie du système[98] comme on peut le vérifier ici en se rappelant que le déterminant d'un produit de matrices est égal aux produits des déterminants

$$\det(M) = \frac{n_2}{n_3} \times 1 \times \frac{n_1}{n_2} \times 1 \times \frac{n_0}{n_1} = \frac{n_0}{n_3} \tag{4.15}$$

on a donc finalement

$$p_1 = -\frac{\frac{n_0}{n_3} - D}{C} \tag{4.16}$$

La connaissance de la position des plans principaux d'une lentille par rapport à ses surfaces avant et arrière permet ensuite de placer cette lentille exactement à la bonne position dans le train optique (typiquement de sorte que la distance entre les plans champ/pupille précédent/suivant la lentille et les plans principaux de celle-ci soit exactement égale à sa focale effective).

4.2.2 Analyseur pyramide

On définit l'orientation de la pyramide $\mathbf{n}$ (voir figure 4.6), le vecteur position de son sommet $\mathbf{c}$, sa hauteur h, deux vecteurs $(\mathbf{n_a}, \mathbf{n_b})$ d'une base orthogonale à $\mathbf{n}$ et α l'angle entre l'orientation de la pyramide $\mathbf{n}$ et la normale de ses faces. La pyramide est simulée par cinq plans : la base de la pyramide perpendiculaire à son orientation à une distance h de son sommet et quatre plans passant par son sommet et dont les normales sont

$$\begin{aligned} \mathbf{n_1} &= -\cos\alpha\,\mathbf{n} + \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_a} + \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_b} \\ \mathbf{n_2} &= -\cos\alpha\,\mathbf{n} - \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_a} + \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_b} \\ \mathbf{n_3} &= -\cos\alpha\,\mathbf{n} - \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_a} - \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_b} \\ \mathbf{n_4} &= -\cos\alpha\,\mathbf{n} + \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_a} - \frac{\sqrt{2}}{2}\sin\alpha\,\mathbf{n_b} \end{aligned} \tag{4.17}$$

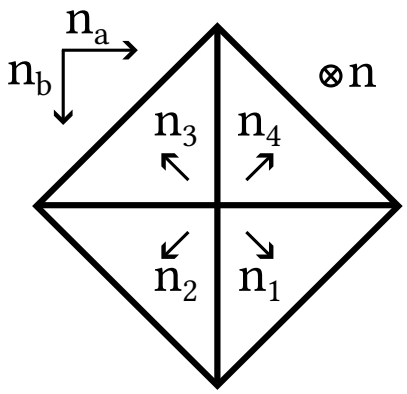


Figure 4.6 – Schéma de la pyramide vue du dessus.

Pour chaque rayon on calcule successivement les points d'intersections $\mathbf{p}$ avec les quatre plans précédents en s'arrêtant sur celui pour lequel $(\mathbf{p}-\mathbf{c})\cdot\mathbf{n_a}$ et $(\mathbf{p}-\mathbf{c})\cdot\mathbf{n_b}$ ont le bon signe (dépendant du plan en question, par exemple ces deux valeurs doivent être positives pour le plan définit par $\mathbf{n_1}$ sinon c'est qu'on a intercepté ce plan au dessus d'une autre face de la pyramide et c'est l'intersection avec cet autre plan qui doit être considéré). On calcule ensuite la déviation du rayon par ce plan puis par le plan de base de la pyramide.

Alternativement j'ai aussi implémenté une pyramide constituée de deux prismes se faisant face, comme celle que j'utilise sur le banc optique, ce qui me permet de prendre en compte l'effet induit par l'écartement entre les sommets de ces deux prismes.

Cette façon de simuler une pyramide ignore totalement les effets diffractifs qui ne sont pourtant pas négligeables[99]. On verra dans le chapitre suivant que ce modèle géométrique permet tout de même de reproduire correctement certains des effets observés sur le microscope confocal utilisé sur des échantillons épais.

4.2.3 Analyseur Shack-Hartmann

Les microlentilles du Shack-Hartmann sont moulées dans de la résine et je ne connais pas leur forme exacte. J'ai choisis de les simuler par des lentilles plano-convexes (voir figure 4.7) ce qui doit être une approximation acceptable étant donné que les rayons incidents sur la matrice de microlentilles sont des rayons paraxiaux. Je rappelle la «lensmaker's formula»[98] dans un milieu d'indice n_m et pour un matériau d'indice n_l et deux dioptres de rayons R_1 et R_2

$$\frac{1}{f} = \frac{n_l - n_m}{n_m}\left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} + \frac{n_l - n_m}{n_m}\frac{d}{n_l R_1 R_2}\right) \tag{4.18}$$

Pour simuler une lentille plano-convexe de focale f on associe donc un plan ($R_2 = \infty$) à un hémisphère de rayon $R_1 = R$ avec

$$R = \pm\frac{n_l - n_m}{n_m} f \tag{4.19}$$

le signe étant choisi en fonction de l'orientation de la lentille. Les positions des plans principaux sont calculables de la même façon que pour les doublets achromatiques (Section 4.2.1). Pour un rayon incident donné, il faut déterminer quelle est la microlentille interceptée puis propager le rayon à travers cette microlentille.

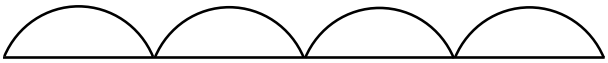


Figure 4.7 – Schéma d'une matrice de microlentilles modélisée par des lentilles plano-convexes.

4.2.4 Objectif

Contrairement aux doublets achromatiques, on ne connaît pas la formule optique de l'objectif Special Optics. Dans la mesure où un objectif de microscope de qualité [1] doit suivre la condition des sinus d'Abbe, j'ai choisi de simuler une optique qui obéit exactement à cette condition. J'ai implémenté la méthode publiée par Jeffrey P. Wilde [100] pour simuler une telle optique, nommée lentille cardinale par l'auteur.

4.3 Simulation de la fluorescence

Ayant établi comment simuler l'intégralité des éléments de notre système optique, il reste à modéliser l'échantillon. La problématique est sensiblement différente selon que l'on travail en raytracing inverse ou direct.

Le ray tracing direct permet une simulation à la fois de la voie d'excitation et de la voie de détection. Pour un échantillon fin (plan de fluorescence uniforme) il suffit alors de calculer la position d'intersection des rayons incidents (voie d'excitation) avec le plan, puis de lancer de nouveaux rayons (dans la voie de détection) depuis ce point avec une distribution uniforme angulairement (isotropie de l'émission fluorescente). Une variabilité spatiale de la fluorescence du plan peut être simulée en choisissant le nombre de nouveaux rayons lancés en fonction de la position d'impact du rayon incident. Pour un échantillon épais, il n'y a plus un point unique d'impact du rayon incident car celui-ci traverse toute une épaisseur de milieu fluorescent. Il faut ajouter une étape pour choisir aléatoirement la (ou les) profondeur depuis laquelle lancer les nouveaux rayons. Cet nouvelle étape rend difficile la simulation d'un échantilon non uniformément fluorescent puisque la loi de probabilité utilisée pour le choix de la profondeur devrait alors dépendre de la répartition de la fluorescence dans l'échantillon [2].

En ray tracing inverse, seule la voie de détection est raisonablement simulable. Il est alors nécessaire d'avoir un modèle du cône de fluorescence dans l'échantillon. Je suppose ici que l'échantillon est non diffusant et uniformément fluorescent. Je peux alors considérer le faisceau de lumière produit par l'objectif indépendamment de l'échantillon. L'angle d'ouverture de ce faisceau correspond à l'ouverture numérique de la voie d'illumination. En toute rigueur le faisceau n'est ni un faisceau gaussien ni un faisceau diffracté par une ouverture circulaire uniforme mais un faisceau gaussien tronqué[101]. Toutefois, par raison de simplicité, je vais considérer un faisceau gaussien classique, même si le faisceau réel est plus proche d'un faisceau diffracté par une ouverture circulaire uniforme. Je considère ci-dessous deux modèles différents. Le premier est adapté au ray tracing inverse et le second au ray tracing direct (pour le cas où l'on ne souhaite simuler que la voie de détection en ray tracing direct).

1. Ce qui est le cas du Special Optics, voir tableau 3.1

2. J'ai par ailleurs également implémenté un modèle de diffusion permettant la simulation de celle-ci dans l'échantillon (cf. annexe E.8) mais sans prendre le temps de l'utiliser.

4.3.1 Ray tracing inverse

Intégration le long d'un rayon à travers un faisceau gaussien

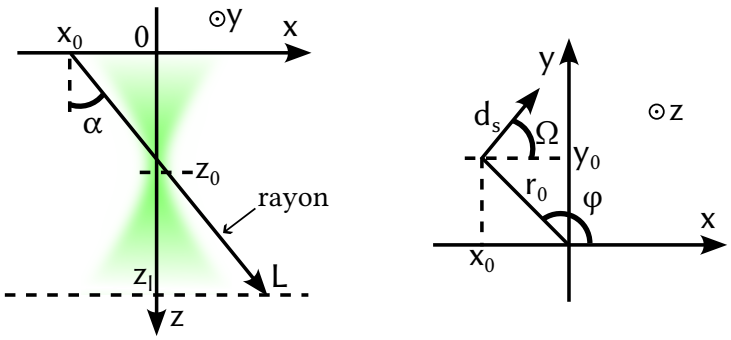


Figure 4.8 – Rayon traversant un faisceau gaussien.

La contribution de chaque rayon en provenance de la caméra à la valeurs du pixel d'où il est parti dépend de la facon dont il intercepte le cône de fluorescence. Comme on considère que la fluorescence est isotrope, la fluorescence émise dans la direction du rayon est proportionnelle à l'intensité du faisceau gaussien intégré le long de ce rayon. Je définis un rayon générique (Fig. 4.8) faisant l'angle α avec l'axe z et traversant le plan (x, y) en $x_0 = r_0 \cos\varphi$ et $y_0 = r_0 \sin\varphi$. On choisit un plan limite en $z = z_l$ pour prendre en compte la taille finie de l'échantillon. On calcule le point d'intersection du rayon avec ce plan et on note $L = \frac{z_l}{\cos\alpha}$ la longueur du rayon entre les deux plans. On note s la position le long du rayon entre les deux plans à partir du plan $z = 0$ et on note $\mathbf{d_s}$ l'orientation du rayon dans le plan (x, y).

$$\begin{cases} x = s\sin\alpha\cos\Omega + x_0 \\ y = s\sin\alpha\sin\Omega + y_0 \\ z = s\cos\alpha \end{cases} \tag{4.20}$$

L'expression d'un faisceau gaussien est

$$I(r,z) = \frac{I_0}{1+\left(\frac{z}{z_0}\right)^2}\exp\left(\frac{-2r^2}{w_0^2\left(1+\left(\frac{z}{z_0}\right)^2\right)}\right) \tag{4.21}$$

avec w_0 le waist du faisceau et z_0 sa position et avec

$$r = \sqrt{x^2+y^2} \tag{4.22}$$

On a l'intégrale du faisceau gaussien le long du rayon entre les deux plans

$$I(x_0,y_0,\alpha,\Omega) = I_0\int_0^L \frac{\exp\left(\frac{-\frac{2}{w_0^2}\left((s\sin\alpha\cos\Omega+x_0)^2+(s\sin\alpha\sin\Omega+y_0)^2\right)}{1+\left(\frac{s\cos\alpha}{z_0}\right)^2}\right)}{1+\left(\frac{s\cos\alpha}{z_0}\right)^2}\mathrm{d}s \tag{4.23}$$

Je ne sais pas résoudre cette intégrale analytiquement. Je pourrais la calculer numériquement mais cela prendrait trop de temps étant donné le nombre de rayons lancés dans une simulation (typiquement plusieurs centaines de milliards). Pour pouvoir estimer l'énergie qui arrive au pixel de la caméra avec une formule analytique, je remplace dans la section suivante le faisceau gaussien par un modèle de cône plus cylindre.

Modèle cône plus cylindre

Je modélise le faisceau gaussien par un cône dont la partie centrale (sur la moitié de la distance de Rayleigh de part et d'autre du centre) est remplacée par un cylindre. On a toujours nos deux plans limites modélisant la taille finie de l'échantillon et on a donc trois zones : deux troncs de cône et un cylindre (voir figure 4.9). La conservation de l'énergie impose que l'intensité soit constante au sein du cylindre et décroisse avec la distance au sommet dans les deux cônes. Les intégrales le long d'un rayon, dans le cylindre et dans les cônes, sont alors faciles à calculer connaissant les deux points d'entrée et de sortie $\mathbf{p_1}$ et $\mathbf{p_2}$ de chaque zône. La distance le long du rayon correspondant au point $\mathbf{p_1}$ et $\mathbf{p_2}$ est paramétrisée par t_1 et t_2. On combine ensuite les trois intégrales (qui peuvent être nulles si le rayon n'intercepte pas les trois zones) en faisant attention à bien raccorder les intensités dans les cônes et dans le cylindre Les méthodes de calcul des intersections d'un rayon avec un cône et avec un cylindre sont données en annexe E.3.

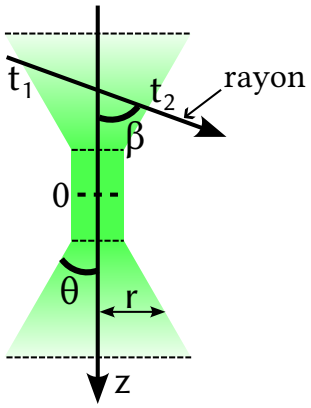


Figure 4.9 – Modélisation du cône de fluorescence par la combinaison de deux troncs de cône et d'un cylindre.

Le rayon du disque formé par un cône à l'altitude z est $r = z\tan\theta$ avec $z = t\cos\beta$ et $I = \frac{I^0}{\pi r^2}$, on a donc

$$\begin{aligned} I_{cone}(t_1,t_2) &= \int_{t_1}^{t_2} \frac{I^0}{\pi r^2}\mathrm{d}t = \int_{t_1}^{t_2} \frac{I^0}{\pi t^2\cos^2\beta\tan^2\theta}\mathrm{d}t \\ &= \frac{I^0}{\pi\cos^2\beta\tan^2\theta}\left[\frac{-1}{t}\right]_{t_1}^{t_2} = \frac{I^0}{\pi\cos^2\beta\tan^2\theta}\left(\frac{t_2-t_1}{t_1t_2}\right) \\ &= \frac{I_0\sqrt{(\mathbf{p_2}-\mathbf{p_1})\cdot(\mathbf{p_2}-\mathbf{p_1})}}{\pi(\mathbf{p_1}\cdot\mathbf{z})(\mathbf{p_2}\cdot\mathbf{z})\tan^2\theta} \end{aligned} \tag{4.24}$$

L'intensité dans le cylindre est constante, on a donc

$$I_{cylindre}(t_3,t_4) = \int_{t_3}^{t_4} I^0\mathrm{d}t = I^0\sqrt{(\mathbf{p_4}-\mathbf{p_3})\cdot(\mathbf{p_4}-\mathbf{p_3})} \tag{4.25}$$

4.3.2 Ray tracing direct

Le modèle précédent nous oblige à choisir, quelque peu arbitrairement, la longueur à donner au cylindre central. Faire du ray tracing direct permet d'éviter ce problème puisque qu'on peut alors simuler un vrai faisceau gaussien sans tomber sur les difficultés d'intégration de la section précédente. Comme expliqué dans la section 4.1.3, cette façon de faire résout de plus la problématique de la distribution angulaire des rayons à lancer : la fluorescence étant supposée isotrope les rayons doivent être lancés uniformément angulairement dans 4π stéradians.

Le waist d'un faisceau gaussien est environ égal à[102]

$$w_0 \approx \frac{\lambda}{\theta \pi n} \tag{4.26}$$

avec λ la longueur d'onde, n l'indice de réfraction du milieu et θ l'angle de divergence du faisceau. La distance de Rayleigh est

$$z_r = \frac{n\pi w_0^2}{\lambda} \tag{4.27}$$

et le rayon du faisceau à une disance z de la position du waist

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_r}\right)^2} \tag{4.28}$$

L'intensité totale dans les plans perpendiculaires à la direction de propagation étant constante, on peut simuler l'émission par un faisceau gaussien de la manière suivante :

1. On choisit une position aléatoire le long de l'axe de propagation du faisceau uniformément distribuée en z entre z_{min} et z_{max} qui définissent la taille de la zone fluorescente considérée.
2. On génère les positions latérales r_1 et r_2 selon deux axes perpendiculaires à l'axe de propagation distribuées selon une loi normale de moyenne nulle et d'écart type [1] $\frac{w(z)}{2}$.
3. On lance un rayon depuis la position obtenue (r_1, r_2, z) avec une orientation aléatoire dans 4π stéradians. On peut réduire cet angle pour des raisons d'optimisation du temps de calcul mais il doit rester indépendant de la position de lancement (la direction peut changer en fonction de la position mais l'angle lui-même doit être constant et toujours contenir entièrement le premier élément du système optique).

Ayant établi comment simuler l'intégralité du système optique je vais maintenant utiliser ces simulations pour mieux comprendre le système.

1. $w(z)$ est la distance à l'axe correspondant à $\frac{1}{e^2}$ de l'intensité centrale ($I(r) \propto e^{\frac{-2r^2}{w(z)^2}}$). Une loi normale a la forme $f(r) \propto e^{\frac{-r^2}{2\sigma^2}}$. On doit donc avoir $\sigma = \frac{w(z)}{2}$.

4.4 Modélisation du balayage par les galvanomètres

J'ai écrit dans la section 3.6.1 que l'amplitude de Galvo Y devait être corrigée d'un facteur $\left(\cos\frac{\theta_0}{2}\right)^{-1}$ où $\frac{\theta_0}{2}$ est l'angle entre l'axe optique et la normale au galvanomètre Galvo X. J'utilise ci-dessous le logiciel de ray tracing pour mettre en évidence les raisons de sa présence.

Dans toute cette partie, la simulation par ray tracing modélise le processus complet de formation d'image sur le MPPC : on lance les rayons depuis le laser jusqu'à l'objectif en passant par les deux galvanomètres, on place un damier fluorescent au foyer de l'objectif depuis lequel on lance des rayons dans le sens inverse jusqu'au plan du MPPC en repassant par les galvanomètres (voir schéma général du montage sur la figure 3.5). On prend 488nm pour longueur d'onde d'excitation et 520nm pour longueur d'onde d'émission. Les lentilles sont alignées à la longueur d'onde de 500nm (par le calcul des positions de leurs plans principaux, cf. section 4.2.1). Les cases du damier font 50µm de large. On choisit une l'amplitude de balayage initiale sur les galvanomètres de façon à avoir un champ de presque 1mm×1mm (le champ maximum de l'objectif Special Optics).

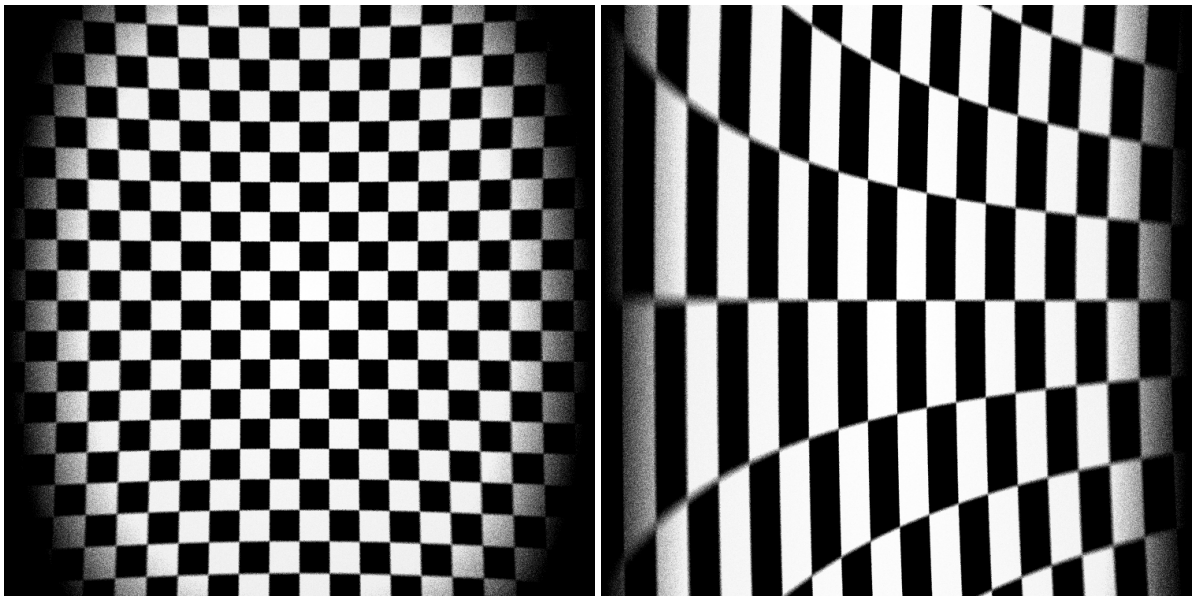


Figure 4.10 – Image d'un damier par ray tracing avec la même amplitude angulaire sur les deux galvanomètres. $\theta_0 = 0°$ (gauche) et $\theta_0 = 150°$ (droite). L'axe de balayage de galvo X est horizontal et celui de galvo Y vertical.

La figure 4.10 présente le résultat de la simulation pour des angles θ_0 de 0° et 150° (choisi élevé pour faire ressortir les effets de distorsions) avec une commande linéaire et de même amplitude sur les deux axes. On voit clairement que pour $\theta_0 = 150°$ le déplacement résultant sur l'axe de Galvo Y (axe horizontal) est inférieur à celui de Galvo X (axe vertical). On voit également que même avec $\theta_0 = 0°$ il subsiste une légère distorsion du champ. Celle-ci est causée par les aberrations de champ des lentilles, également responsables du vignettage (phénomène davantage visible sur l'axe contrôlé par le Galvo X à cause de la présence de deux lentilles supplémentaires sur cet axe).

On va maintenant modéliser analytiquement le déplacement induit par les galvanomètres pour trouver la correction à appliquer sur la commande pour obtenir un champ sans distorsion.

4.4.1 Modélisation d'un galvanomètre

Je commence par modéliser le déplacement dans le champ dû au balayage par un seul galvanomètre dont la normale est inclinée de $\frac{\theta_0}{2}$ par rapport au rayon incident (angle au repos, centre du champ). Je choisis une base cartésienne $(\mathbf{a}, \mathbf{b}, \mathbf{c})$ (voir figure 4.11). Je note $\mathbf{r_1}$ le rayon incident sur le galvanomètre et parallèle à $\mathbf{a}$ soit

$$\mathbf{r_1} = \mathbf{a} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{4.29}$$

Je note $\mathbf{k}$ le vecteur perpendiculaire à l'axe optique et situé dans le plan (a, b) après le galvanomètre

$$\mathbf{k} = \begin{pmatrix} \sin\theta_0 \\ -\cos\theta_0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{4.30}$$

Si on ajoute un angle θ_x pour balayer le champ selon l'axe $\mathbf{k}$ la normale $\mathbf{n}$ à la surface du miroir galvanométrique forme un angle $\theta_0/2 + \theta_x$ avec $\mathbf{a}$. Cette normale $\mathbf{n}$ fait également un angle θ_y avec le plan (a, b) pour le balayage du champ selon l'axe $\mathbf{c}$ on a donc

$$\mathbf{n} = \begin{pmatrix} -\cos\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\cos\theta_y \\ -\sin\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\cos\theta_y \\ \sin\theta_y \end{pmatrix} \tag{4.31}$$

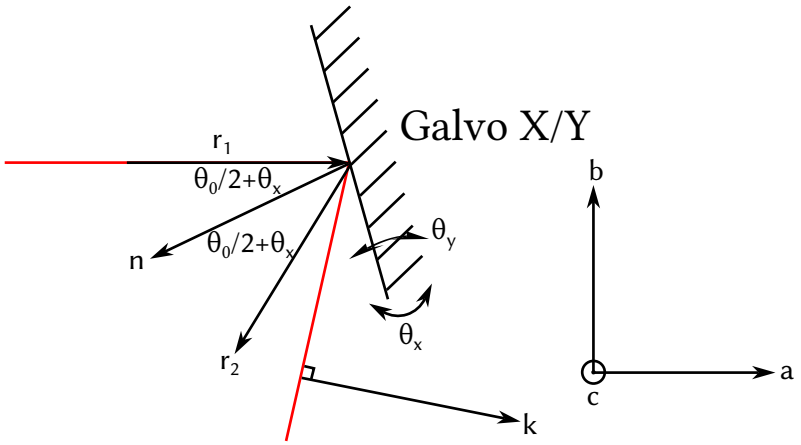


Figure 4.11 – Modélisation du balayage sur un seul galvanomètre.

On a de manière générale le vecteur réfléchi $\mathbf{r_2}$ qui vaut [1]

$$\mathbf{r_2} = \mathbf{r_1} - 2(\mathbf{n} \cdot \mathbf{r_1})\mathbf{n} \tag{4.32}$$

soit dans notre cas

$$\mathbf{r_2} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} + 2\cos\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\cos\theta_y \begin{pmatrix} -\cos\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\cos\theta_y \\ -\sin\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\cos\theta_y \\ \sin\theta_y \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 - 2\cos^2\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\cos^2\theta_y \\ -\sin\left(\theta_0 + 2\theta_x\right)\cos^2\theta_y \\ \cos\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\sin\left(2\theta_y\right) \end{pmatrix} \tag{4.33}$$

1. Voir Annexe E.4.

Pour $\theta_x = 0$ on a le déplacement dans le champ selon $\mathbf{c}$

$$\mathbf{r_2} \cdot \mathbf{c} = \cos\left(\frac{\theta_0}{2}\right) \sin\left(2\theta_y\right) = d_y \tag{4.34}$$

et pour $\theta_y = 0$ on a le déplacement dans le champ selon $\mathbf{k}$

$$\begin{aligned} \mathbf{r_2} \cdot \mathbf{k} &= \left(1 - 2\cos^2\left(\frac{\theta_0}{2} + \theta_x\right)\right) \sin\theta_0 + \sin\left(\theta_0 + 2\theta_x\right) \cos\theta_0 \\ &= -\cos\left(\theta_0 + 2\theta_x\right) \sin\theta_0 + \sin\left(\theta_0 + 2\theta_x\right) \cos\theta_0 \\ &= \sin\left(2\theta_x\right) = d_x \end{aligned} \tag{4.35}$$

Le déplacement selon chaque axe dans le champ sous l'objectif est ensuite obtenu en multipliant 4.34 et 4.35 par le grandissement $f_2 \frac{f_o}{f_1}$.

On voit que, selon ce premier modèle, la commande corrigée θ_y^c pour avoir la même amplitude de déplacement sur les deux axes, c'est à dire des déplacements

$$\begin{cases} d_x = \sin(2\theta_x) \\ d_y = \sin(2\theta_y^c) \end{cases} \tag{4.36}$$

n'est pas

$$\theta_y^{c0} = \frac{\theta_y}{\cos\frac{\theta_0}{2}} \tag{4.37}$$

comme supposée dans la section 3.6.1 mais

$$\theta_y^{c1} = \frac{1}{2} \arcsin\left(\frac{\sin(2\theta_y)}{\cos\left(\frac{\theta_0}{2}\right)}\right) \tag{4.38}$$

où dans les deux cas θ_y est la commande linéaire initiale.

La figure 4.12 montre l'effet des deux corrections précédentes. On voit que la différence entre les deux est faible. En effet, l'amplitude angulaire de θ_y est faible ($\pm 4.5°$) et la correction (4.38) est équivalente à la correction (4.37) dans l'approximation des petits angles. On voit par ailleurs surtout que si au milieu du champ les deux axes ont maintenant la même échelle ce n'est plus le cas lorsqu'on s'éloigne du centre. On peut pressentir qu'il s'agit là de l'effet de l'angle de balayage θ_x sur Galvo X qui vient s'ajouter à l'angle initial θ_0. La partie suivante présente une analyse complète du système qui permet la prise en compte de la variation de θ_x en plus de θ_0 sur la correction appliquée à θ_y. On va de plus chercher à avoir les commandes permettant un balayage sans distorsion du champ et non pas seulement un balayage équivalent sur les deux axes.

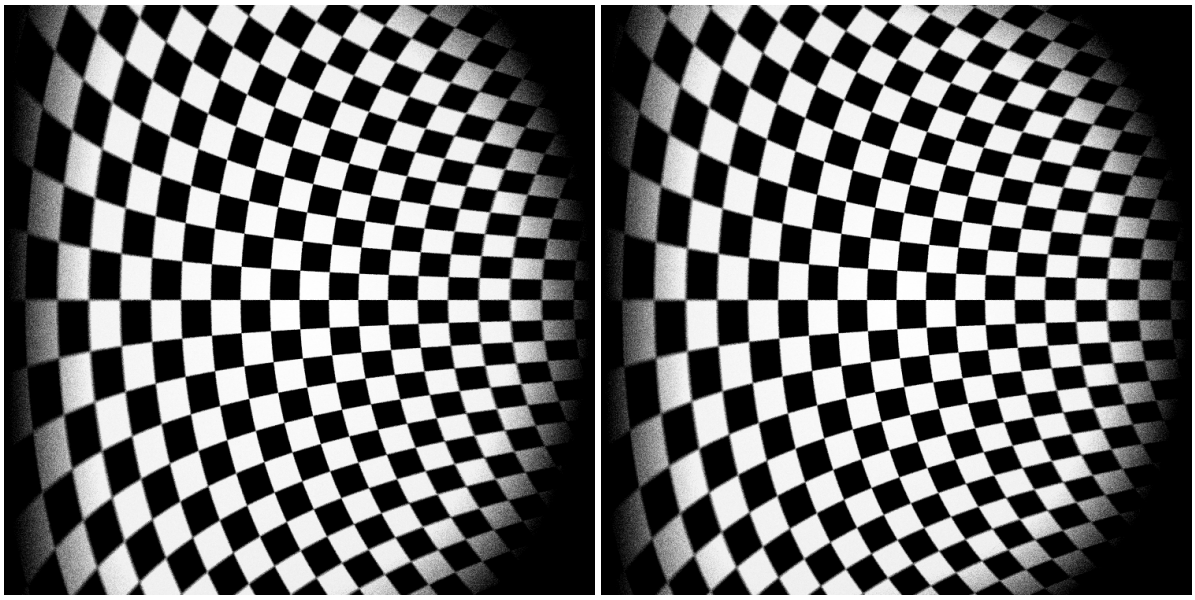


Figure 4.12 – Image d'un damier par ray tracing avec compensation de l'angle de Galvo Y pour $\theta_0 = 150°$ avec les corrections (4.37) (gauche) et (4.38) (droite). L'axe de balayage de galvo X est horizontal et celui de galvo Y vertical.

4.4.2 Modèle complet

On modélise maintenant le système complet présenté sur la figure 4.13. On a le rayon incident $\mathbf{r_1}$ parallèle à $\mathbf{a}$ et on cherche le rayon de sortie $\mathbf{r_4}$ après passage par les deux galvanomètres Galvo X et Galvo Y de normale $\mathbf{n_1}$ et $\mathbf{n_2}$ ainsi que les deux lentilles L4 et L3. $\mathbf{k}$ est la normale à l'axe optique entre les deux galvanomètres. L'angle de $\mathbf{n_1}$ par rapport à $\mathbf{a}$ permet de balayer le champ selon l'axe $\mathbf{b}$ en sortie du système et la rotation de $\mathbf{n_2}$ par rapport au plan (a, b) permet de balayer le champ selon l'axe $\mathbf{b}$. On a

$$\mathbf{n_2} = \begin{pmatrix} \cos\frac{\theta_0}{2}\cos\theta_y \\ \sin\frac{\theta_0}{2}\cos\theta_y \\ \sin\theta_y \end{pmatrix} \tag{4.39}$$

$$\mathbf{d} = \mathbf{r_2}(\theta_x = 0) = \begin{pmatrix} -\cos\theta_0 \\ -\sin\theta_0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{4.40}$$

$$\mathbf{k} = \begin{pmatrix} \sin\theta_0 \\ -\cos\theta_0 \\ 0 \end{pmatrix} \tag{4.41}$$

On calcule la direction $\mathbf{r_2}$ du rayon après son passage sur Galvo X à partir du premier modèle en prenant $\theta_y = 0$

$$\mathbf{r_2} = \begin{pmatrix} -\cos(\theta_0 + 2\theta_x) \\ -\sin(\theta_0 + 2\theta_x) \\ 0 \end{pmatrix} \tag{4.42}$$

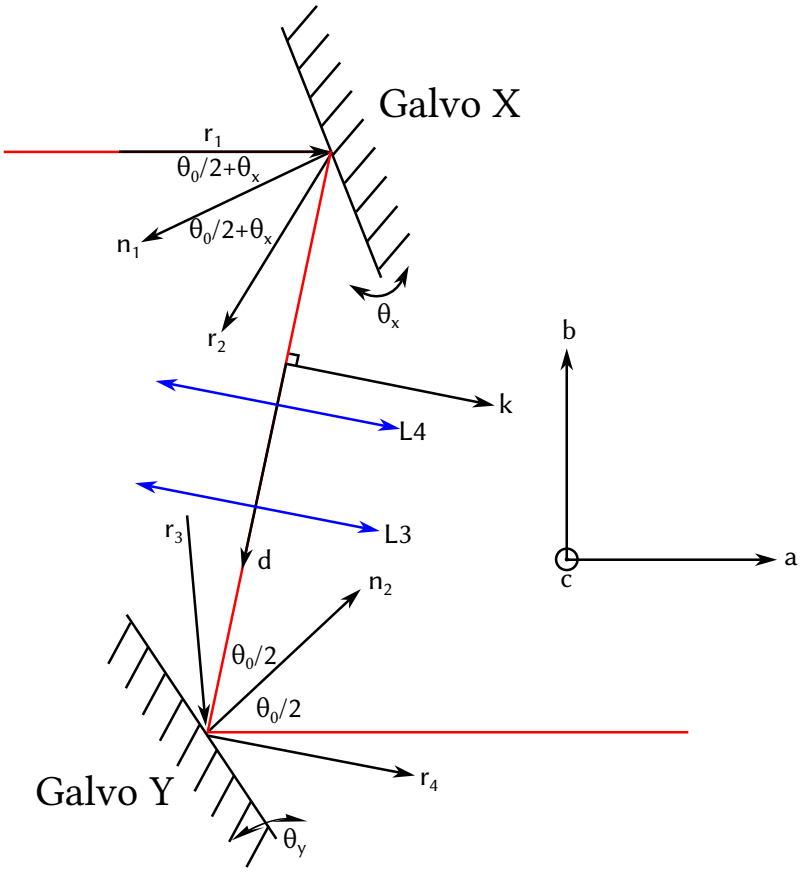


Figure 4.13 – Modélisation du balayage sur les deux galvanomètres.

on peut alors calculer $\mathbf{r_3}$ le rayon en sortie du relais de lentilles L4/L3 de focales égales

$$\begin{aligned}\mathbf{r_3} &= (\mathbf{r_2}\cdot\mathbf{d})\mathbf{d} - (\mathbf{r_2}\cdot\mathbf{k})\mathbf{k} \\ &= \cos(2\theta_x)\mathbf{d} - \sin(2\theta_x)\mathbf{k} \\ &= \begin{pmatrix} -\cos(\theta_0 - 2\theta_x) \\ -\sin(\theta_0 - 2\theta_x) \\ 0 \end{pmatrix}\end{aligned} \tag{4.43}$$

puis $\mathbf{r_4}$

$$\begin{aligned}\mathbf{r_4} &= \mathbf{r_3} - 2(\mathbf{n_2}\cdot\mathbf{r_3})\mathbf{n_2} \\ &= \mathbf{r_3} + 2\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x\right)\cos\theta_y\mathbf{n_2} \\ &= \begin{pmatrix} -\cos(\theta_0 - 2\theta_x) + 2\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x\right)\cos\left(\frac{\theta_0}{2}\right)\cos^2\theta_y \\ -\sin(\theta_0 - 2\theta_x) + 2\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x\right)\sin\left(\frac{\theta_0}{2}\right)\cos^2\theta_y \\ \cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x\right)\sin(2\theta_y) \end{pmatrix}\end{aligned} \tag{4.44}$$

On s'intéresse aux déplacements selon les directions **b** (axe de Galvo X) et **c** (axe de Galvo Y)

$$\mathbf{r_4}\cdot\mathbf{b} = -\sin(\theta_0 - 2\theta_x) + 2\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x\right)\sin\left(\frac{\theta_0}{2}\right)\cos^2\theta_y = d_x \tag{4.45}$$

$$\mathbf{r_4}\cdot\mathbf{c} = \cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x\right)\sin(2\theta_y) = d_y \tag{4.46}$$

On veut, pour tout point du champ (d_x, d_y), trouver les commandes correspondantes θ_x et θ_y telles que

$$\theta_y(d_x, d_y) = \frac{1}{2} \arcsin\left(\frac{d_y}{\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x(d_x, d_y)\right)} \right) \tag{4.47}$$

et

$$\begin{aligned} &-\sin(\theta_0 - 2\theta_x(d_x, d_y)) \\ &\quad + 2\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x(d_x, d_y)\right) \sin\left(\frac{\theta_0}{2}\right) \cos^2\left(\frac{1}{2}\arcsin\left(\frac{d_y}{\cos\left(\frac{\theta_0}{2} - 2\theta_x(d_x, d_y)\right)}\right)\right) = d_x \end{aligned} \tag{4.48}$$

On peut résoudre cette équation numériquement et ainsi précalculer pour chaque pixel du champ la valeur de la commande (θ_x, θ_y) à envoyer aux galvanomètres. Une comparaison avec les angles à appliquer quand $\theta_0 = 0°$ est visible sur la figure 4.14. On voit en particulier que l'amplitude angulaire à appliquer sur Galvo Y est environ quatre fois plus élevée que celle de Galvo X quand $\theta_0 = 150°$.

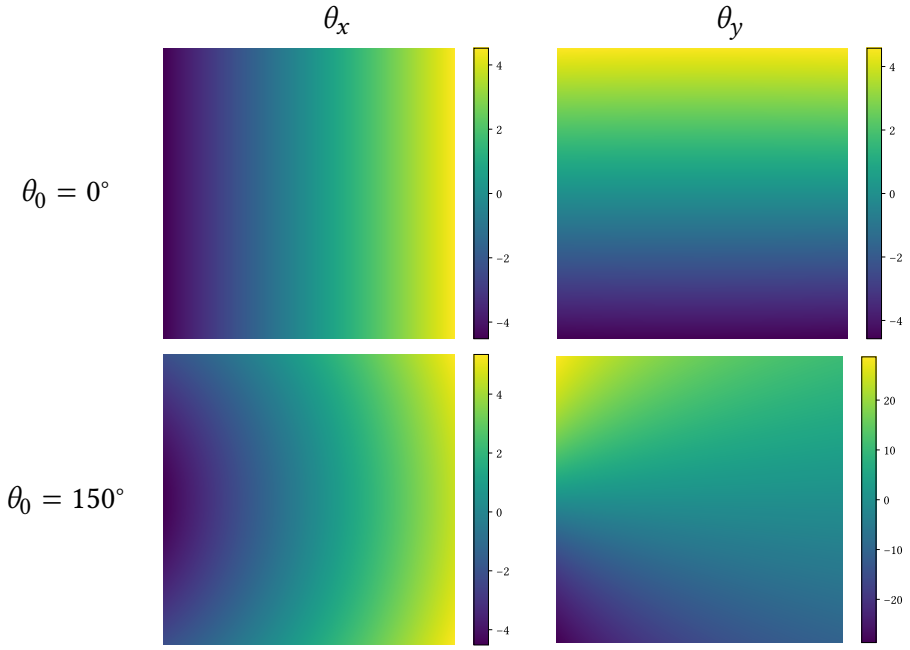


Figure 4.14 – Valeurs des angles en degrés sur le champ pour θ_x (gauche) et θ_y (droite) et pour $\theta_0 = 0°$ (haut) et $\theta_0 = 150°$ (bas).

La figure 4.15 montre l'effet de la correction complète, on voit que le vignettage n'est pas le même que sur l'image pour $\theta_0 = 0°$. Ceci s'explique par le fait que la correction de l'angle sur le Galvo X fait passer le faisceau différemment à travers les lentilles L4 et L3.

Sur le banc optique, l'angle θ_0 a été choisi le plus petit possible pour avoir la meilleure conjugaison possible des pupilles, on voit ici que ce choix est également avantageux pour minimiser les distorsions du champ. Comme on a $\theta_0 = 60°$ une simple mise à l'échelle de θ_y par $\left(\cos\frac{\theta_0}{2}\right)^{-1}$ permet d'avoir une distorsion acceptable et simplifie considérablement la commande des galvanomètres. Du reste, s'il est envisageable de corriger la commande de

Galvo Y, la commande analogique de Galvo X ne permettrait de toute façon pas d'appliquer facilement une correction non linéaire sur cet axe.

On peut voir sur la figure 4.16 une comparaison d'une image prise sur banc (à droite) avec la simulation (à gauche) pour une même taille de champ de 750×750µm qui montre une bonne concordance entre ma simulation et la distorsion réelle.

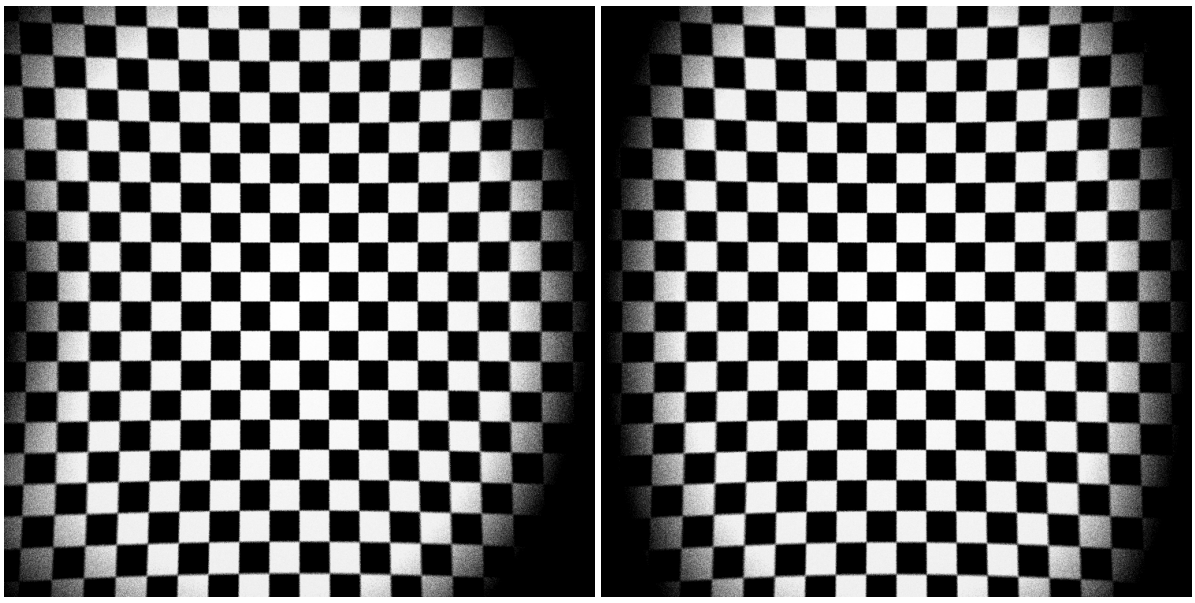


Figure 4.15 – Image d'un damier par ray tracing avec correction exacte de la commande pour $\theta_0 = 150°$ (gauche) et image sans distorsions ($\theta_0 = 0°$) pour comparaison (droite). L'axe de balayage de galvo X est horizontal et celui de galvo Y vertical.

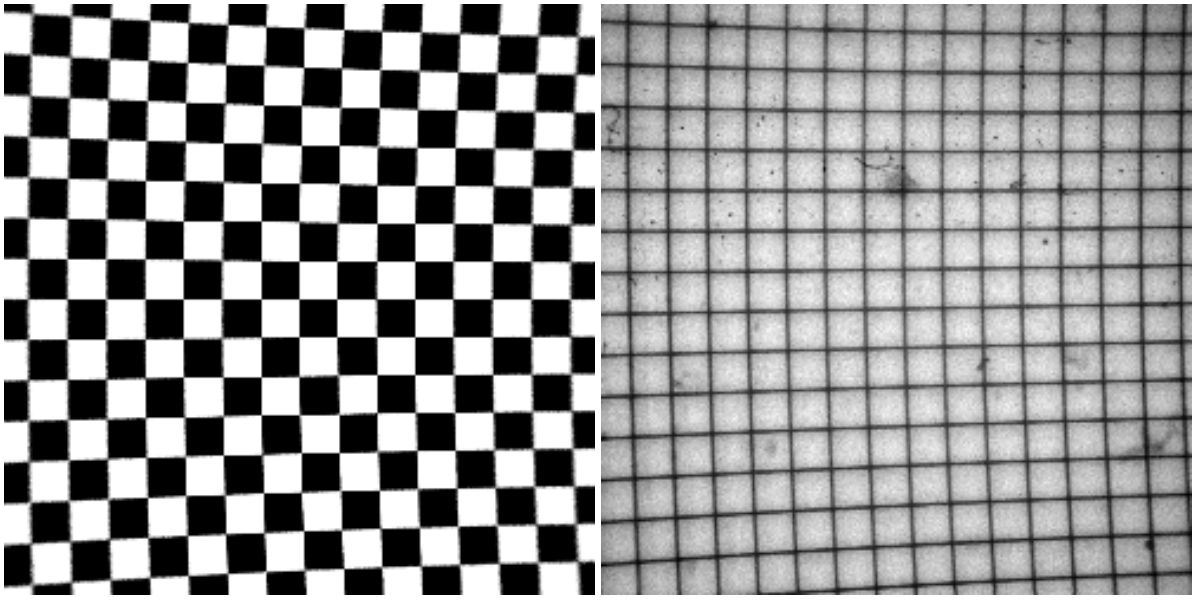


Figure 4.16 – Image d'un damier par ray tracing avec compensation simple (eq. 4.37) de l'angle de Galvo Y pour $\theta_0 = 60°$ et avec la même amplitude de balayage que sur le banc (gauche) et image correspondante sur banc (droite).

4.5 Simulation du sectionnement du microscope confocal

On définit le sectionnement comme la transmission par le microscope confocal du signal d'un plan de fluorescence spatialement uniforme. Le sectionnement pour un trou confocal infiniment petit évolue en z^{-2} où z est le décalage du plan de fluorescence par rapport au plan de focalisation[39]. Ce n'est plus le cas lorsque l'on considère un trou confocal de taille finie. Pour connaître les valeurs de sectionnement des différents trous confocaux du microscope je fais une simulation complète du système, comme dans la section précédente, en remplaçant le damier par un plan uniformément fluorescent. Je peux alors mesurer la quantité de signal qui passe par un trou confocal de diamètre P, en chaque point du champ (déterminé par la commande des galvanomètres avec compensasion simple comme sur le banc optique), en faisant varier la position longitudinale z du plan de fluorescence derrière l'objectif (voir figure 4.17).

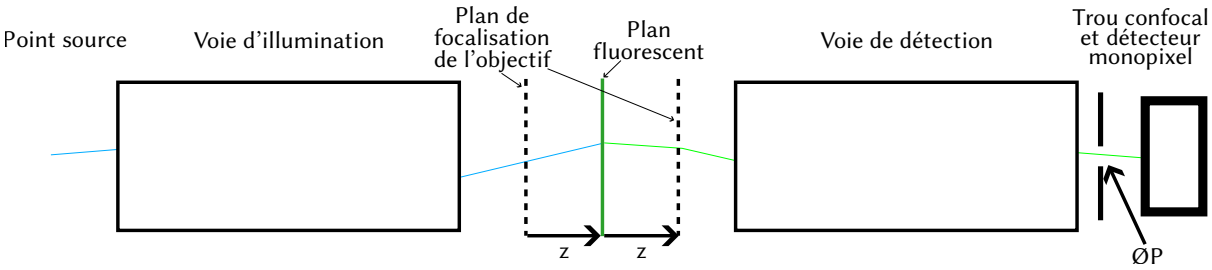


Figure 4.17 – Schéma du modèle utilisé pour la simulation du sectionnement en fonction de la position z du plan de fluorescence et du diamètre P du trou confocal. Chaque pixel du champ est simulé en faisant varier la position des miroirs galvanométriques situés dans le système optique des deux voies. Le modèle est représenté «déplié» pour la lisibilité du schéma.

Je note le sectionnement normalisé $S^P(z)$ sur une zone D du champ

$$S^P(z) = \frac{\int_D I_z^P(x,y)\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y}{\int_D I_0^\infty(x,y)\,\mathrm{d}x\,\mathrm{d}y} \tag{4.49}$$

où $I_z^P(x,y)$ est la valeur du pixel à la position (x,y) du champ avec le trou confocal de diamètre P et pour une distance z entre le plan de focalisation de l'objectif et le plan fluorescent. La figure 4.18 montre les courbes de sectionnement $S^P(z)$ obtenues, intégrées sur l'ensemble du champ simulé de 1mm×1mm. La légère pente sur la courbe correspondant au trou confocal de diamètre infini vient du sectionnement induit par le diamètre fini des lentilles du système. On observe par ailleurs une diminution du signal maximum, pour les trous de 100µm et moins ainsi qu'un très léger décentrage par rapport à zéro. On peut voir sur la figure 4.19 l'influence de la position dans le champ sur le sectionnement. La transmission est réduite pour les courbes correspondant au bord du champ et ce d'autant plus que le trou confocal est petit. Le plan de meilleure transmission est de plus décalé plus loin de l'objectif. Ce sont ces deux effets, dus aux aberrations de champ, qui causent la réduction de la transmission et le décalage par rapport à zéro des courbes de la figure 4.18.

On peut comparer les largeurs à mi-hauteur (FWHM) des courbes de sectionnement obtenues avec la formule donnée par Wilson[44]

$$FWHM = 0.67\frac{\lambda}{n - \sqrt{n^2 - \mathrm{NA}^2}}\sqrt{1+P^2} \tag{4.50}$$

avec λ la longueur d'onde, n l'indice du milieu d'immersion, NA l'ouverture numérique et P la taille du trou confocal exprimé en unité d'Airy.[1] Une comparaison des résultats, pour le tiers central du champ avec cette formule est donnée dans le tableau 4.1. Ma simulation donne une évolution linéaire de la valeur du sectionnement en fonction de la taille du trou ce qui n'est pas le cas du modèle de Wilson pour les petites tailles de trou car celui-ci tient compte de la diffraction.

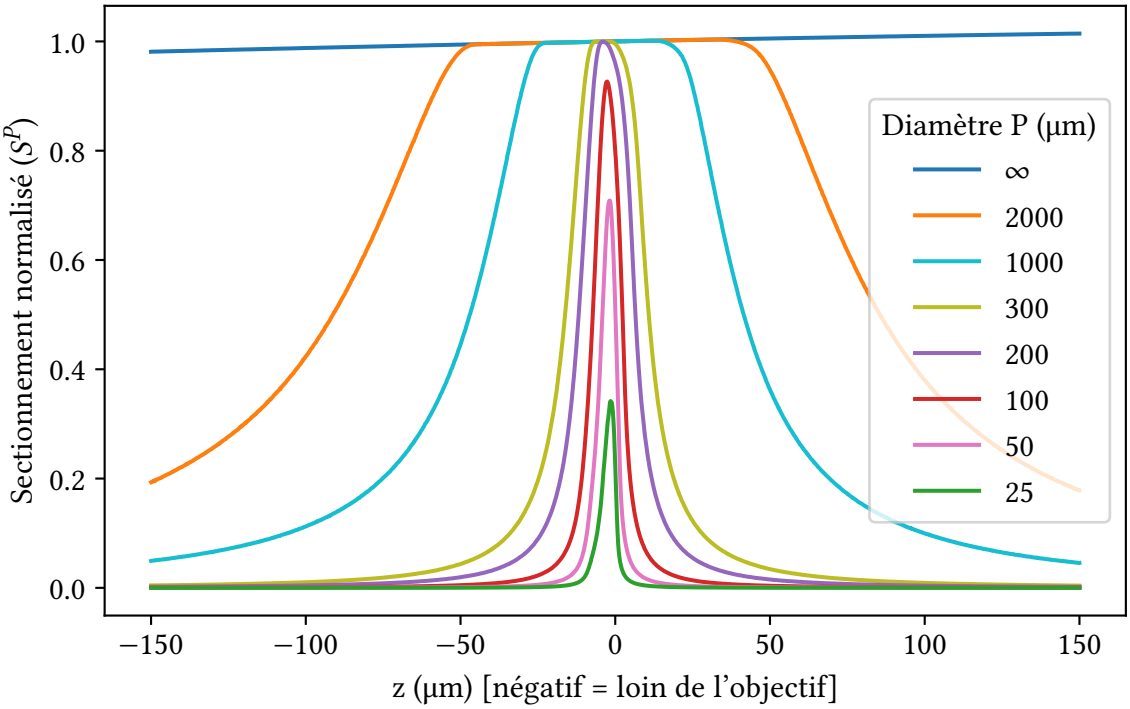


Figure 4.18 – Courbes de sectionnement normalisé pour différentes tailles P de trou confocal.

Diamètre P du trou confocal (µm)	$S^P(z)$ FWHM (µm) (Wilson)	$S^P(z)$ FWHM (µm) (simulation)
2000	141.9	177.0
1000	71.0	88.5
300	21.4	26.6
200	14.3	17.7
100	7.4	8.9
50	4.1	4.4
25	2.7	2.2

Table 4.1 – Largeurs à mi-hauteur des courbes de sectionnement selon Wilson[44] et simulées sur le tiers central du champ.

1. La taille des trous confocaux en unité d'Airy est donnée dans le tableau 3.2.

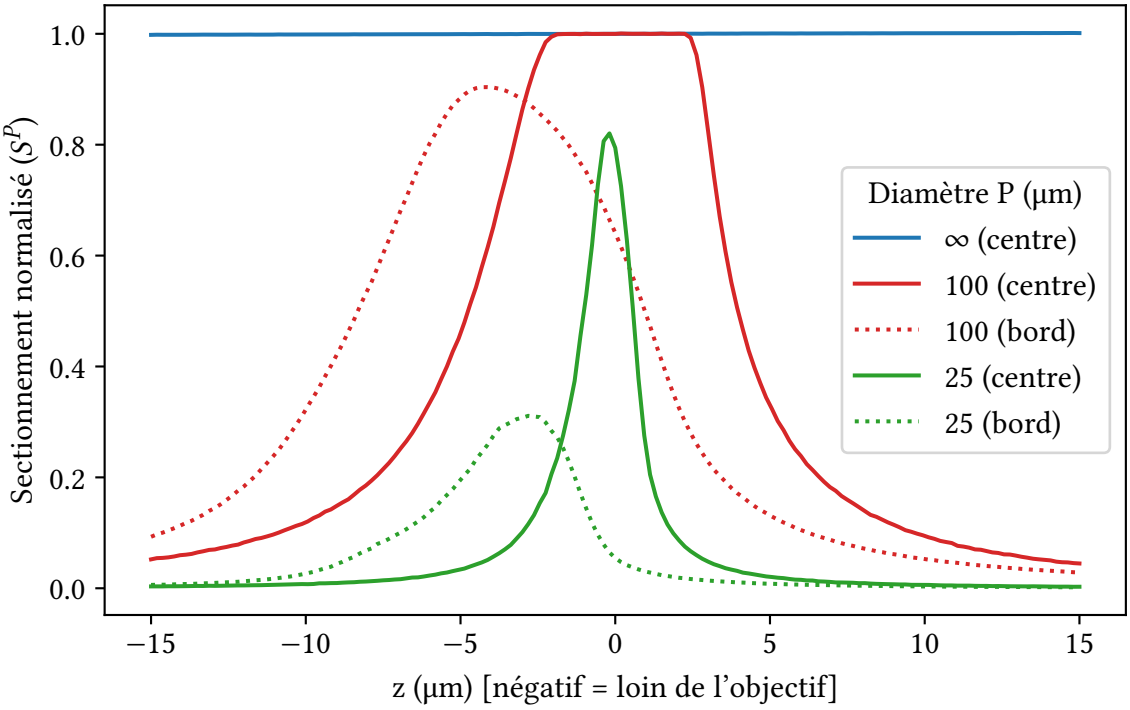


Figure 4.19 – Courbes de sectionnement normalisé pour le tiers central du champ (courbes continues) et pour le tiers en coin de champ (courbes discontinues) pour différentes tailles P de trou confocal.

Chapitre 5

Mesure des aberrations de phase en fluorescence

> Atteint d'hypropisie, il ne fit pas confiance aux médecins qui voulaient le soigner mais s'enduisit lui-même entièrement de bouse de vache et s'exposa au soleil pour être asséché : ainsi couché, des chiens survinrent qui le dévorèrent.
>
> Sextus Empiricus

On a vu dans l'introduction (section 1.5.5) comment le faisceau «débalayé» du microscope confocal pouvait servir d'étoile guide pour l'ASO. Dans ce chapitre, on va voir que les choses ne sont en fait pas si simples. Effectivement, l'utilisation de la fluorescence issue du faisceau «débalayé» comme étoile guide n'est équivalent à la présence d'une source ponctuelle dans l'échantillon que pour un échantillon fin. Dans un échantillon épais, le faisceau d'illumination forme un cône fluorescent dans le volume de l'échantillon et l'étoile guide obtenue en débalayant est alors une source étendue longitudinalement. Je me concentre ci-dessous sur une présentation du problème pour l'analyseur SH avec, dans un premier temps, une comparaison de la situation du microscope confocal avec les deux autres grandes méthodes de sectionnement : feuille de lumière et deux photons. Dans un second temps, je présente la méthode développée pour tenter de résoudre le problème pour le SH. Le chapitre se conclut par une rapide présentation du problème posé par l'extension longitudinale de la source pour l'analyseur pyramide.

5.1 Shack-Hartmann sur échantillon épais

Sur le détecteur du SH, chaque sous-pupille forme une image du cône de fluorescence. La figure 5.1 présente un schéma de la situation sur un échantillon épais comme le cerveau. On voit que chaque sous-pupille image le cône depuis un angle de vue différent qui dépend de sa position dans la pupille. Ceci s'explique par le fait que les sous-pupilles « regardent » toutes le centre du cône, les sous-pupilles centrales depuis le centre et celles du bord depuis le bord, voire même, quand l'ouverture de l'illumination est fermée, depuis l'extérieur du cône (voir figure 5.2). Cet « effet de cône » implique qu'une méthode de mesure des aberrations basée sur un algorithme de type centre de masse est biaisée par la forme du cône observé qui, excepté pour une éventuelle sous-pupille centrale, n'est pas à symétrie circulaire. Le cône étant de plus vu différemment par chaque sous-pupille le biais est différent pour chacune d'entre elles.

On pourrait être ici tenté de fermer le trou confocal pour ne garder que la lumière en provenance du plan de focalisation. Malheureusement le trou confocal est optiquement conjugué

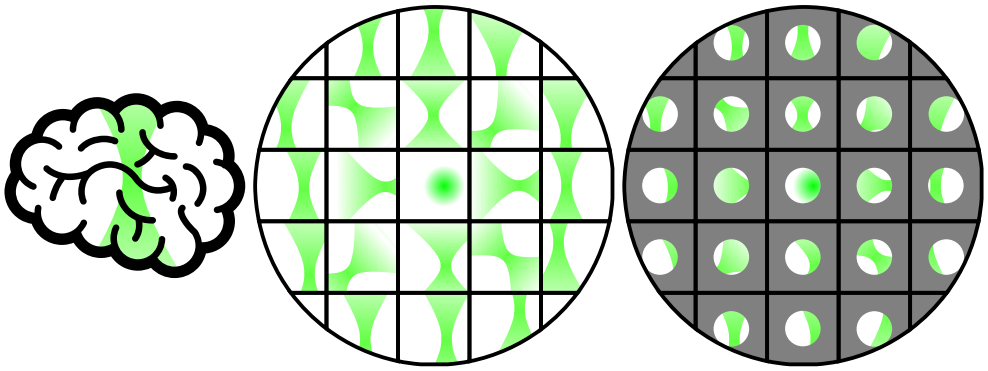


Figure 5.1 – Shack-Hartmann sur microscope confocal avec échantillon épais. Schéma de l'illumination dans l'échantillon (gauche), image sur le SH (centre) et image sur le SH avec trou confocal fermé (droite).

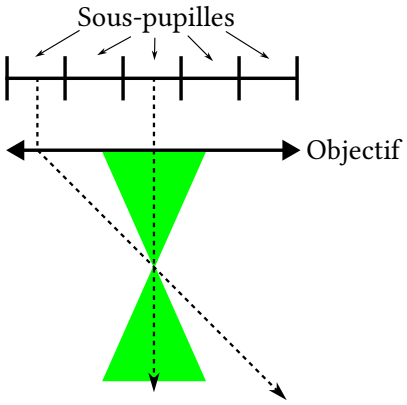


Figure 5.2 – Illustration de l'angle de vue des sous-pupilles en fonction de leurs positions.

à la caméra du Shack-Hartmann et sa fermeture ne fait que réduire le champ utile dans les sous-pupilles (voir figure 5.1). La fermeture du trou confocal est alors doublement néfaste. D'une part en présence d'aberrations le cône risque d'être déplacé au-delà du champ permis par le trou, empêchant toute mesure de sa position. D'autre part, seuls les pixels immédiatement derrière le trou seront illuminés (que ce soit par de la lumière en provenance du plan de focus ou non) biaisant la mesure de la position des spots vers la position du trou. À la limite, pour un trou très fermé, la mesure deviendra indépendante des aberrations et dépendra uniquement de la position du trou (qui, s'il est aligné correctement, doit se trouver au centre des sous-pupilles et donc fournir une mesure d'aberration nulle).

5.1.1 Comparaison avec la microscopie à feuille de lumière et à deux photons

La figure 5.3 présente une comparaison avec les deux autres principales techniques de sectionnement, la microscopie à feuille de lumière et la microscopie à deux photons.

Sur un microscope à deux photons l'échantillon est illuminé à une longueur d'onde égale à deux fois la longueur d'onde d'excitation du fluorophore utilisé. Le sectionnement est réalisé grâce à la nature hautement non linéaire de l'absorption à deux photons : la probabilité de cette absorption étant proportionnelle au carré de l'intensité elle n'a lieu de façon significative qu'aux alentours du point de focalisation du faisceau d'excitation. Du point de vue du SH, on

se retrouve alors dans le cas idéal d'un point source situé dans l'échantillon. [1]

Sur un microscope à feuille de lumière l'illumination est perpendiculaire à la direction de détection, le sectionnement est ainsi obtenu directement, en illuminant uniquement le plan d'intêret. Le SH peut être dimensionné pour que chaque sous-pupille forme l'image de l'ensemble du champ. La mesure des aberrations peut alors s'effectuer par corrélation croisée de chacune de ces images pour mesurer leurs décalages relatifs. Cette façon de mesurer par corrélation croisée est inutilisable dans le cas du confocal sur échantillon épais puisque chaque sous pupille présente une image du cône vu sous un angle différent, ces différentes images ne sont donc pas corrélables entre elles.

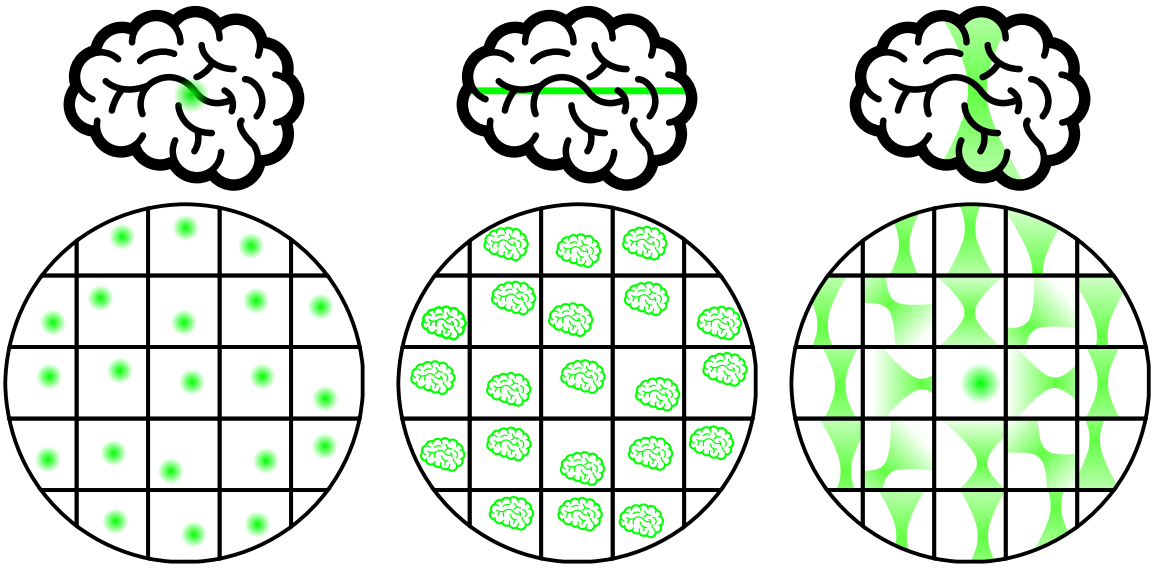


Figure 5.3 – Schéma de la fluorescence dans l'échantillon et de l'image correspondante sur un Shack-Hartmann pour différentes techniques de microscopie : deux-photons (gauche), feuille de lumière (centre) et confocal (droite).

5.1.2 Effet de l'ouverture du faisceau d'illumination

En jouant sur l'ouverture du diaphragme pupille de la voie d'illumination on peut changer l'ouverture du faisceau d'illumination sans changer l'ouverture de la voie de détection qui elle reste toujours grande ouverte (sa fermeture reviendrait à réduire le nombre de sous-pupilles considérées sur le SH). La figure 5.4 montre l'impact de l'ouverture de l'illumination sur une lamelle fluorescente épaisse (Thorlabs FSK2, 1.7mm d'épaisseur). Les images sur les sous-pupilles centrales sont proches d'avoir une symétrie circulaire (cône vu depuis l'intérieur et centré) alors que celles qui sont proches du bord ressemblent davantage à un cône (cône vu depuis le bord, voire, quand l'ouverture du faisceau d'illumination est fermée, depuis l'extérieur du cône). On peut également voir, en particulier pour l'ouverture la plus faible, un léger décentrage du motif (de l'ordre d'une demie sous-pupille). J'ai montré par des simulations en ray tracing (voir figure 5.5) que cet effet vient d'un décalage de la pupille de la voie d'illumination par rapport à l'axe optique.

1. Le deux photons est généralement utilisé dans des échantillons très diffusant grâce à la moindre diffusion de la lumière proche infra rouge dans les échantillons biologiques. Cette diffusion importante peut alors générer des effets de distorsions des spots posant des problèmes similaires au problème du cône en microscopie confocal.[103] Je ne considère pas ce problème ici et je me concentre sur une comparaison des différentes techniques

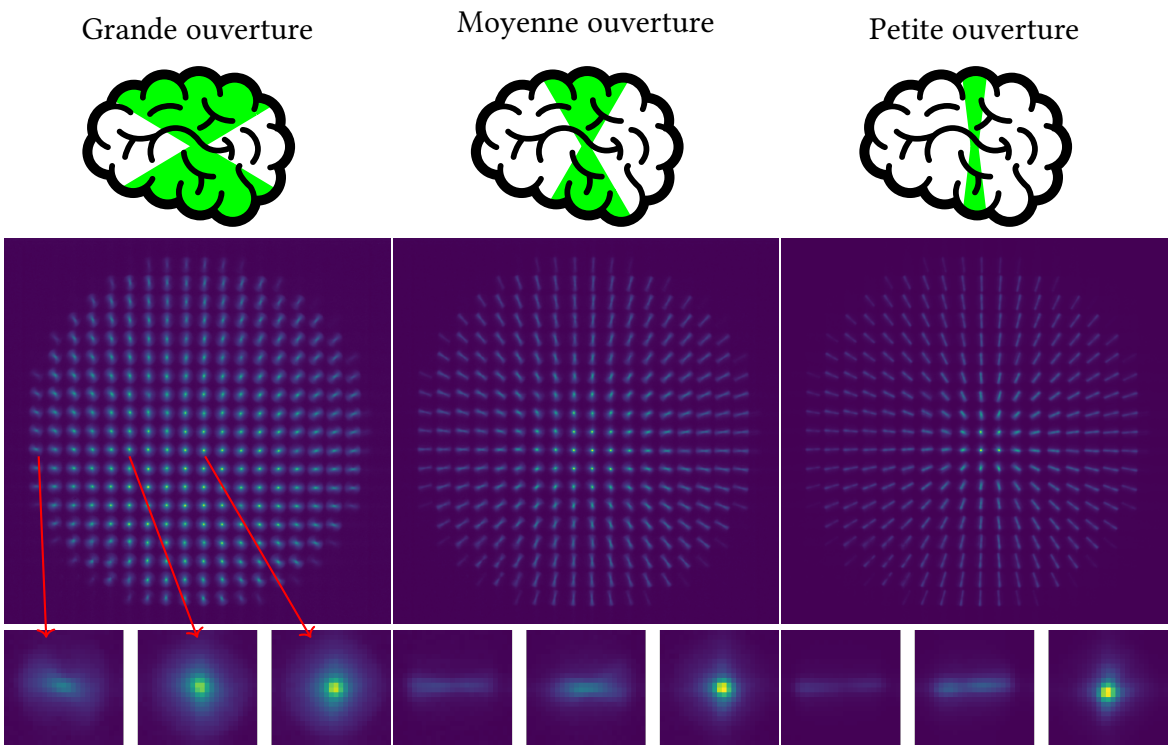


Figure 5.4 – Images de Shack-Hartmann pour différentes ouvertures du faisceau d'illumination dans une lamelle fluorescente épaisse. L'ouverture correspondante à chaque configuration est représentée en haut. Les vignettes du bas correspondent à un zoom sur trois des sous-pupilles plus ou moins éloignées de l'axe optique.

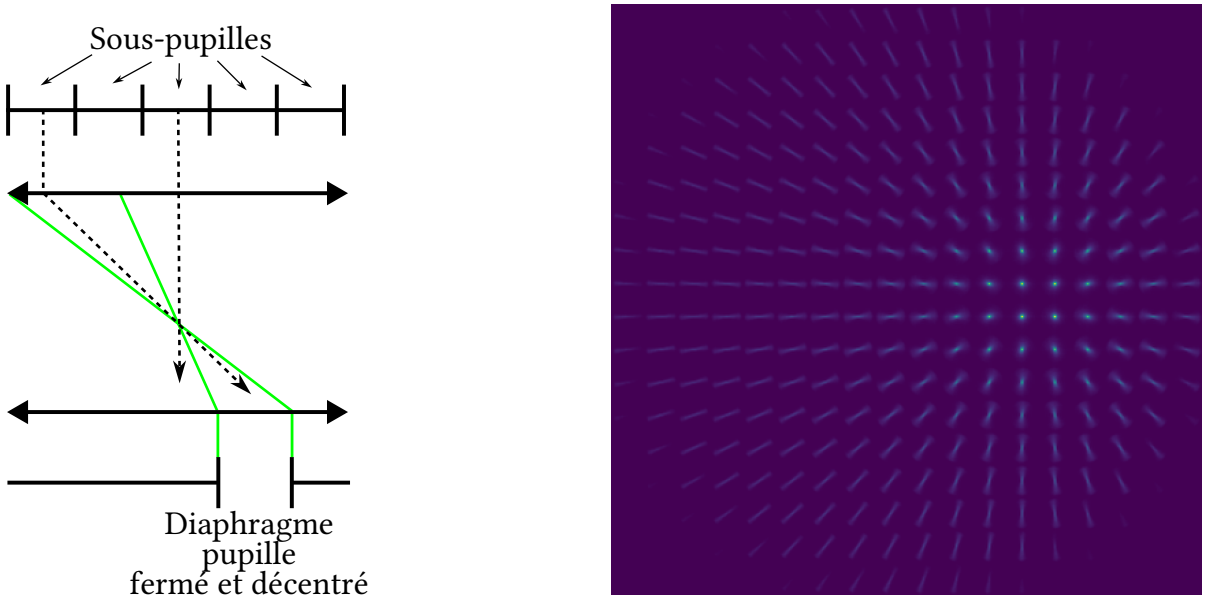


Figure 5.5 – Effet du décalage de la pupille de la voie d'illumination par rapport à l'axe optique. Schéma de principe (gauche) et résultat d'une simulation par ray tracing pour un décalage de la pupille de l'équivalent de quatre sous-pupilles (droite).

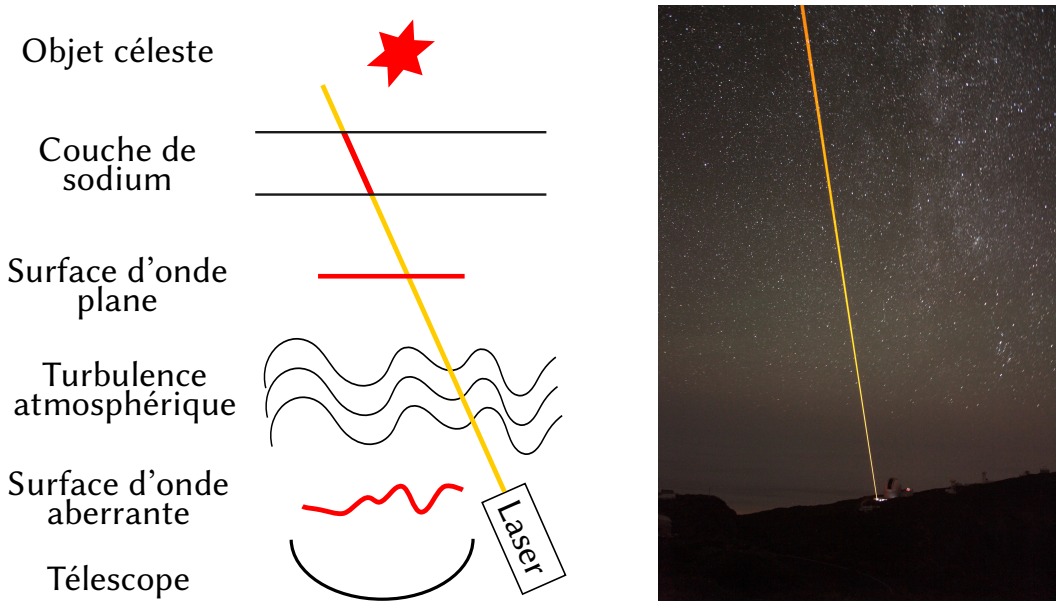


Figure 5.6 – Schéma de principe d'une étoile laser en astronomie (gauche) et photographie d'un télescope utilisant une étoile laser (droite). Sur cette photographie, on observe la diffusion Rayleigh du laser dans la basse atmosphère et non la fluorescence du sodium. (Source photo : Isaac Newton Group - La Palma).

5.2 Mesure par corrélation pour le Shack-Hartmann

On a vu dans les sections précédentes comment l'extension longitudinale de la fluorescence posait problème pour mesurer les aberrations. Dans cette partie, je présente une méthode de mesure pour le Shack-Hartmann inspirée de ce qui se fait sur les étoiles laser en astronomie.

5.2.1 Étoile laser en astronomie

Les étoiles laser ont été développées en astronomie pour rendre l'optique adaptative utilisable même en l'absence d'étoile suffisamment brillante pour servir d'étoile guide à proximité de l'objet astronomique d'intérêt. Le principe consiste à exciter la couche de sodium de l'atmosphère (située entre 95 et 105km d'altitude) avec un laser à 589nm (voir figure 5.6), la fluorescence émise par les atomes de sodium est alors utilisée comme source pour la mesure des aberrations.[104] La couche de sodium étant épaisse la source fluorescente générée est étendue impliquant des problèmes similaires à ceux que j'ai présentés dans la section précédente pour la microscopie confocale sur échantillon épais. La figure 5.7 montre deux images de SH pour des lasers situés sur le côté du télescope et au centre du télescope. Les images obtenues sont très similaires à ce qu'on obtient sur le microscope confocal avec une petite ouverture du faisceau d'illumination (figure 5.4). [1]

Des méthodes ont été développées par les astronomes pour pallier le problème de l'extension des spots sur le SH[105, 106]. Dans la section suivante je présente une adaptation de ces techniques pour la microscopie confocale.

de sectionnement à échantillon équivalent.

1. J'ai appelé « effet de cône » la formation de l'image du cône d'illumination par les sous-pupilles et les difficultés qu'elle pose pour la mesure des aberrations. En astronomie l'appellation « effet de cône » désigne la

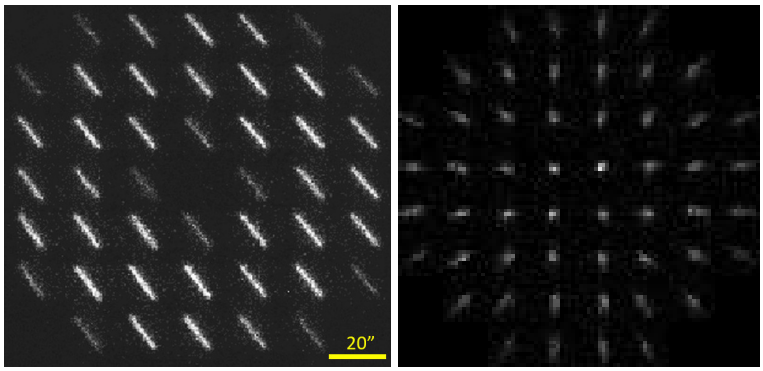


Figure 5.7 – Image d'un SH sur une étoile laser tirée depuis le côté du télescope (gauche) et depuis le centre du télescope (droite) (Source : Isaac Newton Group - La Palma & [105])

5.2.2 Procédure de mesure des aberrations

Le principe général consiste à remplacer le calcul du centre de masse qui est biaisé par la forme du spot par une mesure par corrélation. La mesure par corrélation est couramment utilisé en OA pour l'imagerie du soleil[107] et également en microscopie à feuille de lumière[108]. Elle consiste à choisir une image de référence, typiquement une des sous-pupilles du SH choisie arbitrairement, puis la corrélation de cette image de référence est calculée avec les autres sous-pupilles du SH. Un algorithme type centre de masse peut ensuite être utilisé pour calculer la position du maximum de la corrélation obtenue, cette position correspondant au déplacement de l'image de la sous-pupille par rapport à l'image de référence.

Dans mon cas, comme dans le cas d'une étoile laser et comme on l'a vu en section 5.1.1, on ne peut pas corréler les images des différentes sous-pupilles entre elles car chaque sous-pupille voit la source avec un angle de vue différent. Il faut donc fournir une image de référence pour chaque sous-pupille et j'utilise le programme de ray tracing que j'ai développé pour générer ces images de référence (voir figure 5.8). Plusieurs paramètres doivent être optimisés pour maximiser la ressemblance des images de référence avec les images réelles : grandissement entre l'objet et la caméra SH, ouverture du faisceau d'illumination et désalignement entre voie d'illumination et voie de détection (cf. section 5.1.2). L'optimisation de ces paramètres est, pour le moment, effectuée à la main (et à l'œil).

Le faible champ des sous-pupilles par rapport à la taille de la source oblige à placer un diaphragme de champ devant le SH pour éviter le recouvrement entre les images des différentes sous-pupilles. La visibilité résultante de ce diaphragme de champ dans toutes les sous-pupilles conduirait à un biais dans la mesure de la corrélation si je procédais directement avec la méthode décrite ci-dessus (corrélation, par exemple par transformée de Fourier, puis calcul du centre de masse sur le résultat). J'utilise donc une méthode différente, présentée ci-dessous.

Dans un premier temps, je simule l'image de référence I_k^{ref} pour chaque sous-pupille k. La simulation est effectuée en l'absence de diaphragme de champ et sur un champ deux fois plus grand que la taille des sous-pupilles. La méthode de mesure des déplacements s_x et s_y dans la

différence entre les régions parcourues dans l'atmosphère par la lumière en provenance de l'objet astronomique d'intérêt et la lumière en provenance de l'étoile laser. La première vient de l'infini et forme donc une région cylindrique, la seconde vient d'une distance finie et est donc conique. C'est cette différence et l'erreur qu'elle implique sur la correction de l'OA qui porte le nom «effet de cône» en astronomie[104]. Ce problème peut également exister, quoi que de manière plus secondaire, en microscopie confocale, par exemple si l'imagerie et la mesure d'OA se fait sur des marqueurs différents, non colocalisés. Ce problème est de même nature que celui posé par l'anisoplanétisme.

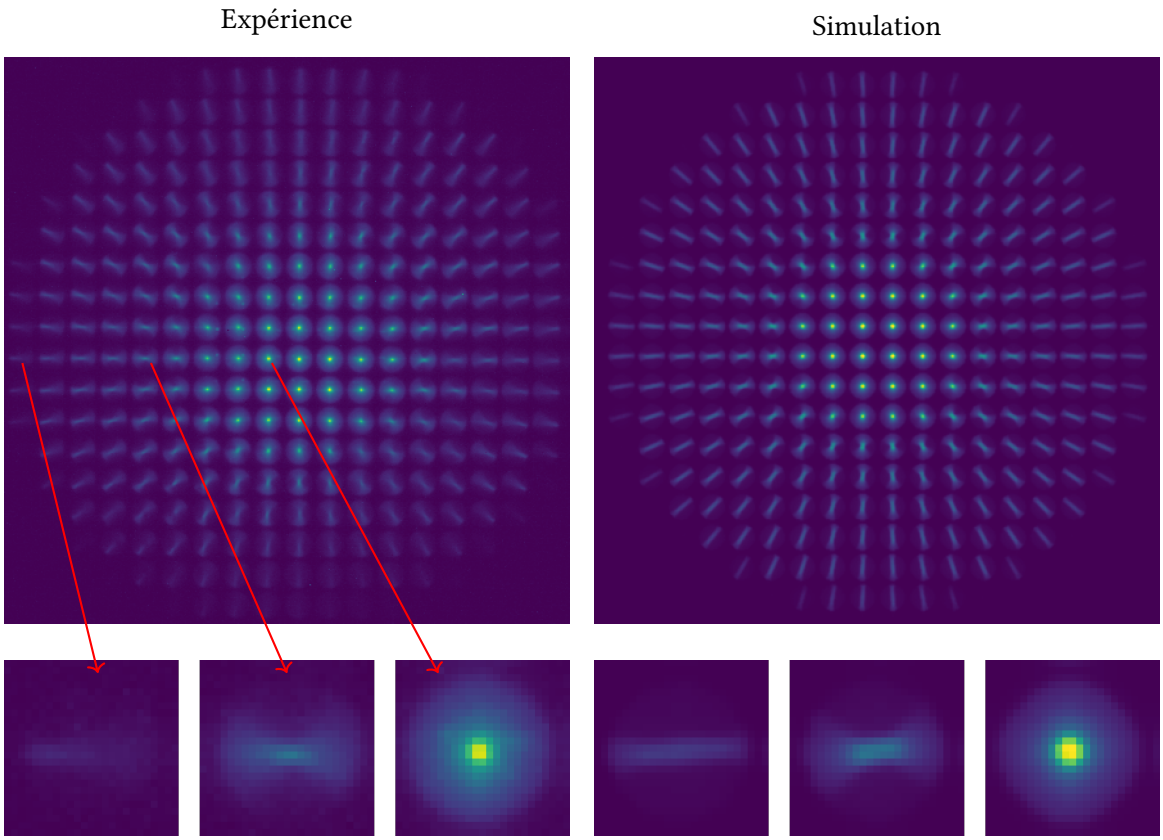


Figure 5.8 – Image de Shack-Hartmann pour une ouverture moyenne du faisceau d'illumination prise dans le cerveau (gauche) et simulée (droite). Les vignettes du bas correspondent à un zoom sur trois des sous-pupilles plus ou moins éloignées de l'axe optique.

sous-pupille k consiste ensuite en la procédure de minimisation suivante

$$(s_x, s_y) = \underset{s_x, s_y}{\operatorname{argmin}} \sum_{x=1}^{N_x} \sum_{y=1}^{N_y} \left\| I_k(x, y) - \left(I_k^{ref}(x - s_x, y - s_y) \times P \right) * A \right\|^2 \tag{5.1}$$

où I_k est l'image réelle de la sous-pupille k, N_x et N_y sont le nombre de pixels dans les deux dimensions de I_k, P est l'image du diaphragme de champ du SH, A est la tache d'Airy correspondant à la limite de diffraction d'une sous-pupille. L'image I_k^{ref} est interpolée à la volée pour pouvoir obtenir les décalages s_x et s_y avec une précision sub-pixel. Avant soustraction les deux images sont normalisées de sorte que leur valeur maximale soit égale à un. La minimisation est effectuée par l'algorithme de Nelder-Mead. La figure 5.9 illustre la procédure suivie.

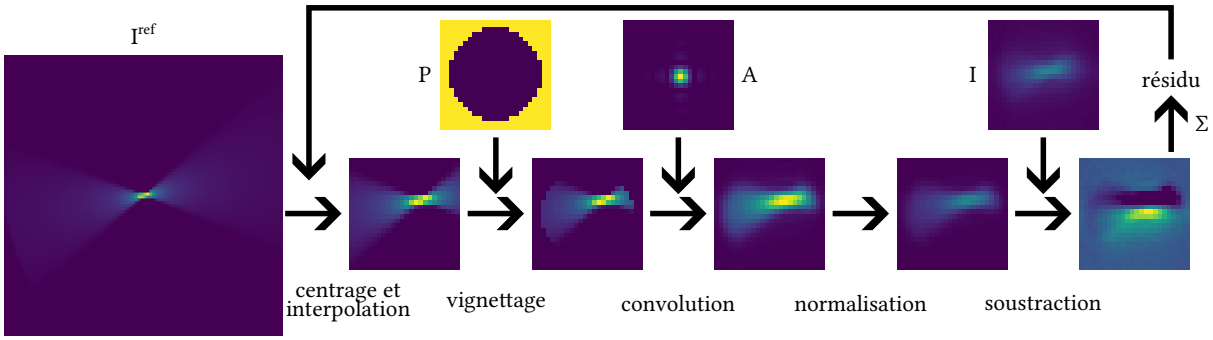


Figure 5.9 – Illustration du processus de calcul du résidu (équation 5.1).

5.2.3 Mise en pratique et complications

La méthode présentée précédemment marche assez mal en pratique et ceci, possiblement, pour plusieurs raisons, impliquant toute une différenciation entre les images de cône attendues théoriquement dans les sous-pupilles et les images obtenues en réalité.

La première raison est l'homogénéité du marquage, les images de référence sont simulées avec une fluorescence homogène ce qui n'est évidemment pas le cas dans les échantillons sur lesquels les mesures sont effectuées [1]. Cette inhomogénéité ne peut bien sûr pas être connue a priori et n'est donc pas simulable. Le même genre de problème existe en astronomie où la couche de sodium ne possède pas une densité homogène[104]. Une solution utilisée par les astronomes est de privilégier des images de référence mesurées expérimentalement, une solution difficilement applicable dans mon cas à cause de la présence du diaphragme de champ. Une solution de contournement du problème serait de faire travailler l'OA sur un marqueur différent du marqueur utilisé pour l'imagerie et rendu le plus homogène possible.

Une deuxième raison du mauvais fonctionnement de la méthode est le photoblanchiment et la saturation de la fluorescence. Deux phénomènes qui n'ont pas lieu de façon uniforme dans l'échantillon mais qui se produisent en premier lieu là ou l'intensité est la plus importante c'est-à-dire au centre du cône. Ces deux phénomènes conduisent à une diminution relative de l'intensité centrale du cône sur les images réelles par rapport aux images simulées.

Une troisième raison est la présence d'aberrations haut-ordre et/ou de grande amplitude qui conduisent à une déformation de l'image du cône sur le SH. Ces aberrations ne sont pas connues a priori et ne sont donc pas simulables.

En général, le fait de balayer pour effectuer une mesure moyenne sur un champ permet de réduire ces trois problèmes et ce d'autant plus que le champ est grand (homogénéisation du cône de fluorescence, moyennage des aberrations haut-ordre, retardement du photoblanchiment).

Des essais de fermeture de boucle dans le cerveau ont montré que la méthode de mesure par corrélation entre images simulées et images réelles ne fonctionne en l'état pas mieux qu'une mesure par centre de masse effectuée avec la pupille d'illumination grande ouverte. De nombreuses pistes d'améliorations restent à explorer avant d'abandonner la méthode. Les tentatives que j'ai effectuées ont été réalisées avec des images de référence générées en ray tracing inverse à partir du modèle «cône plus cylindre», le passage à la méthode de ray tracing direct avec un vrai faisceau gaussien permettrait de générer des images de référence plus réalistes. Il faudrait d'autre part ajuster les paramètres d'ouverture et de décentrage des pupilles

1. Puisque c'est précisément cette inhomogénéité que l'on veut imager avec le microscope. C'est également cette inhomogénéité qui rend la mesure par corrélation possible avec un SH sur un microscope à feuille de lumière.

d'illumination et de détection plus précisément. On peut ensuite imaginer combiner cette méthode avec une méthode de pondération de la matrice de commande (voir annexe A.6), par exemple en utilisant la valeur du résidu de minimisation. Je suis actuellement également limité par la caméra SH qui possède un rendement quantique faible et dont le temps de pose maximale est limité, le remplacement de cette caméra par une plus récente permettrait d'effectuer les tests de fermeture de boucle dans de meilleures conditions. Une méthode alternative que je n'ai pas eu le temps de mettre en œuvre mais qui me semble intéressante serait de faire des mesures actives : on pourrait par exemple comparer le déplacement mesuré des spots du SH pendant l'application sur le DM d'aberrations connues et comparer les déplacements obtenus par rapport au déplacement théorique attendue (tel que mesurés dans la matrice d'interaction prise hors du cerveau). La différence entre les deux pourrait ensuite être utilisée pour pondérer la matrice de commande.

5.3 Pyramide sur échantillon épais

Contrairement au SH, l'analyseur pyramide effectue sa mesure dans un plan pupille et permet donc une fermeture du trou confocal. L'utilisation de cet analyseur pose toutefois également des problèmes avec des échantillon épais.

La figure 5.10 présente des images expérimentales d'analyseur pyramide sur échantillons fin (du marqueur fluorescent sur une lamelle) et épais (une lame fluorescente de 1.7mm d'épaisseur). La boucle d'OA a été fermée sur un échantillon fin pour corriger les aberrations du système et la correction obtenue a été conservée pour la prise d'image sur l'échantillon épais. Sur l'image prise sur échantillon fin on voit une bonne homogénéité de l'éclairement sur les quatre pupilles, signe que les aberrations résiduelles sont faibles. L'homogénéité obtenue est de plus indépendante de l'ouverture du faisceau d'illumination (non illustré ici). Pour l'échantillon épais en revanche, bien que les aberrations résiduelles soient les mêmes que dans le cas précédent on observe une perte d'homogénéité, liée à la présence de lumière hors focus, et ce de façon d'autant plus marquée que l'ouverture du faisceau d'illumination est fermée. Cette inhomogénéité est un problème car elle est interprétée comme une aberration par la procédure classique de fermeture de boucle avec l'ASO pyramide (voir figure 5.11).

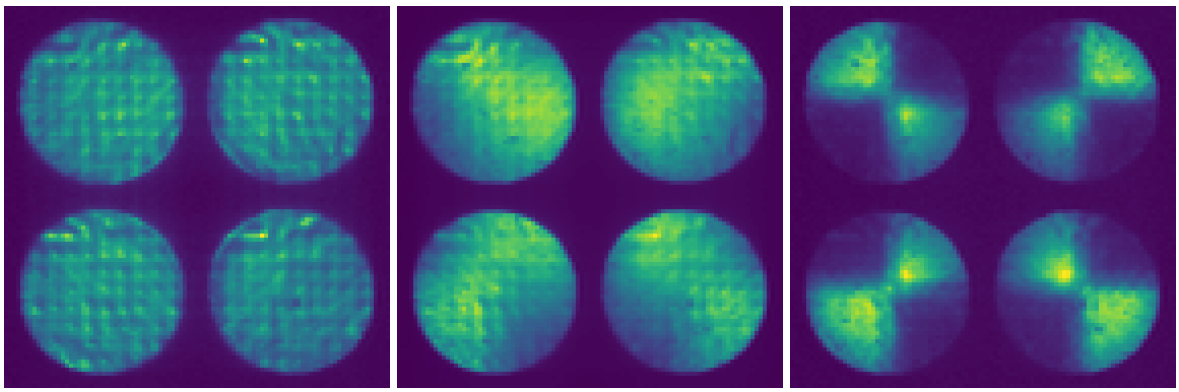


Figure 5.10 – Image de l'analyseur pyramide sur échantillon fin (gauche) et épais avec illumination grande ouverte (centre) et fermée (droite). Échantillon fin : marqueur fluorescent sur une lamelle. Échantillon épais : lamelle fluorescente (Thorlabs FSK2).

La figure 5.12 présente des images d'analyseur pyramide simulées par ray tracing pour trois ouvertures différentes du faisceau d'illumination sur un échantillon épais de 150µm. Le

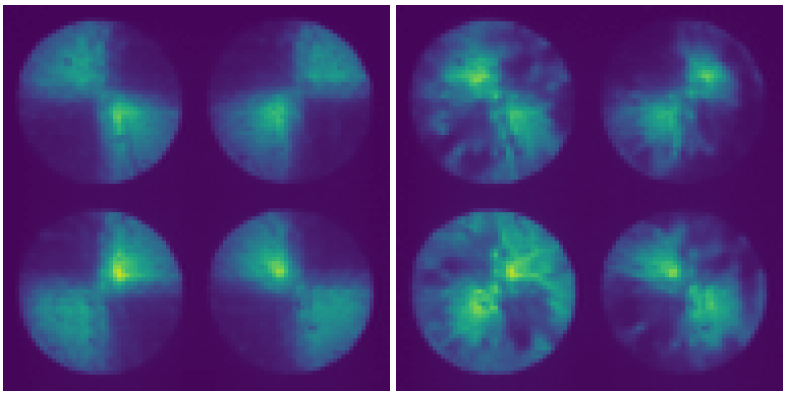


Figure 5.11 – Fermeture de boucle sur la pyramide dans un échantillon épais avec une illumination très fermée. Boucle ouverte (gauche) et boucle fermée (droite). La fermeture de boucle diverge car l'inhomogénéité de l'éclairement dans les quatre pupilles due à l'extension longitudinale de l'illumination est interprétée comme une aberration à corriger.

cône d'illumination est découpé en trois parties, une partie centrée sur le point de focalisation et les deux parties au-dessus et en dessous de celui-ci. La partie du cône située sous le point de focalisation contribue à l'illumination des coins intérieurs des pupilles alors que la partie du cône située au-dessus contribue à l'illumination des coins extérieurs. Plus le faisceau est fermé, plus cet effet est visible.

La figure 5.13 montre l'effet du trou confocal sur les images obtenues. On voit que même un diaphragme de 50µm (sectionnement d'environ 8µm d'épaisseur, cf. figure 4.18) sur le faisceau le plus ouvert ne permet pas d'obtenir des pupilles homogènes. Il n'est du reste pas souhaitable de fermer le trou confocal à ce point quand bien même la pyramide le permet. En effet pour mesurer les aberrations il faut les voir et le trou confocal doit donc être suffisamment ouvert pour laisser passer la PSF aberrée. La taille optimale du trou confocal est alors déterminée par le nombre d'actionneurs du DM (qui est ici le facteur limitant, la pyramide étant bien plus résolue) et vaut environ 125µm (cf. section 3.4.3).

5.4 Perspectives

Il apparaît de ce qui précède que le microscope confocal *sur échantillon épais* semble peu adapté à l'utilisation des analyseurs SH et pyramide. Il reste cependant des pistes à explorer. Des tests plus poussés et d'éventuels perfectionnements des algorithmes de mesures pourraient permettre d'arriver à une OA fonctionnelle sur le confocal, au moins avec le SH. L'implémentation d'une méthode de correction sensorless, type méthode 3N[109], permettrait d'avoir une référence utile pour comparer l'efficacité des approches avec analyseur.

Il serait intéressant de voir si un microscope à feuille de lumière corrigé par optique adaptative permet une mesure et une correction des aberrations facile sur les échantillons de cerveau entier de souris clarifiés. Si c'est le cas il est sans doute inutile de dépenser plus d'effort pour faire fonctionner une OA sur un microscope confocal peu adaptée à ce type d'échantillons.

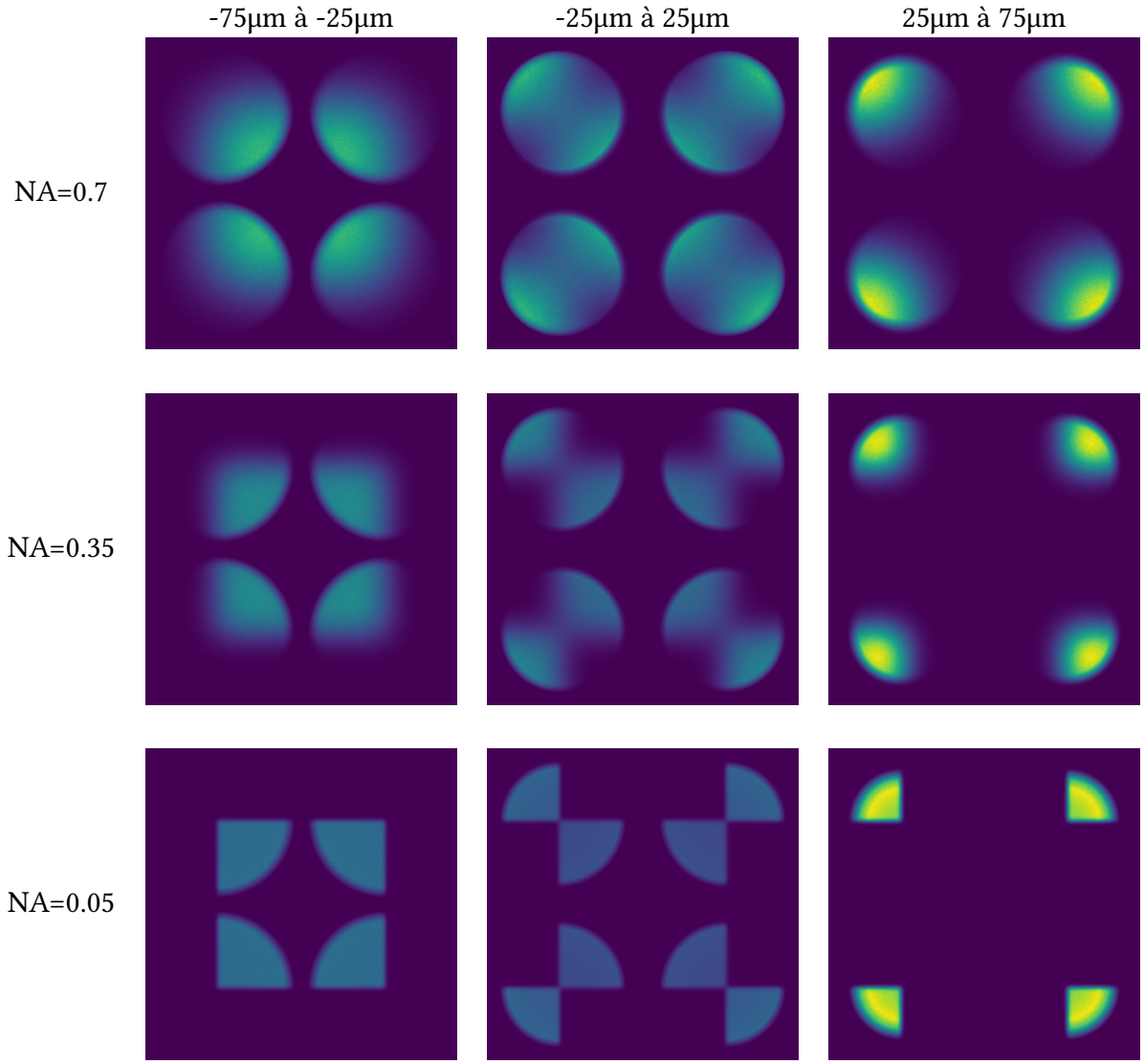


Figure 5.12 – Simulation en ray tracing de l'image formée par un analyseur pyramide sur un échantillon fluorescent de 150µm d'épaisseur. Partie du cône situé entre -75µm et -25µm (gauche), entre -25µm et +25µm (centre) et entre +25µm et +75µm (droite). Ouverture du cône d'illumination de 0.7NA (haut), 0.35NA (centre) et 0.05NA (bas) pour une ouverture de l'objectif de détection de 0.7NA. Trou confocal de 2mm.

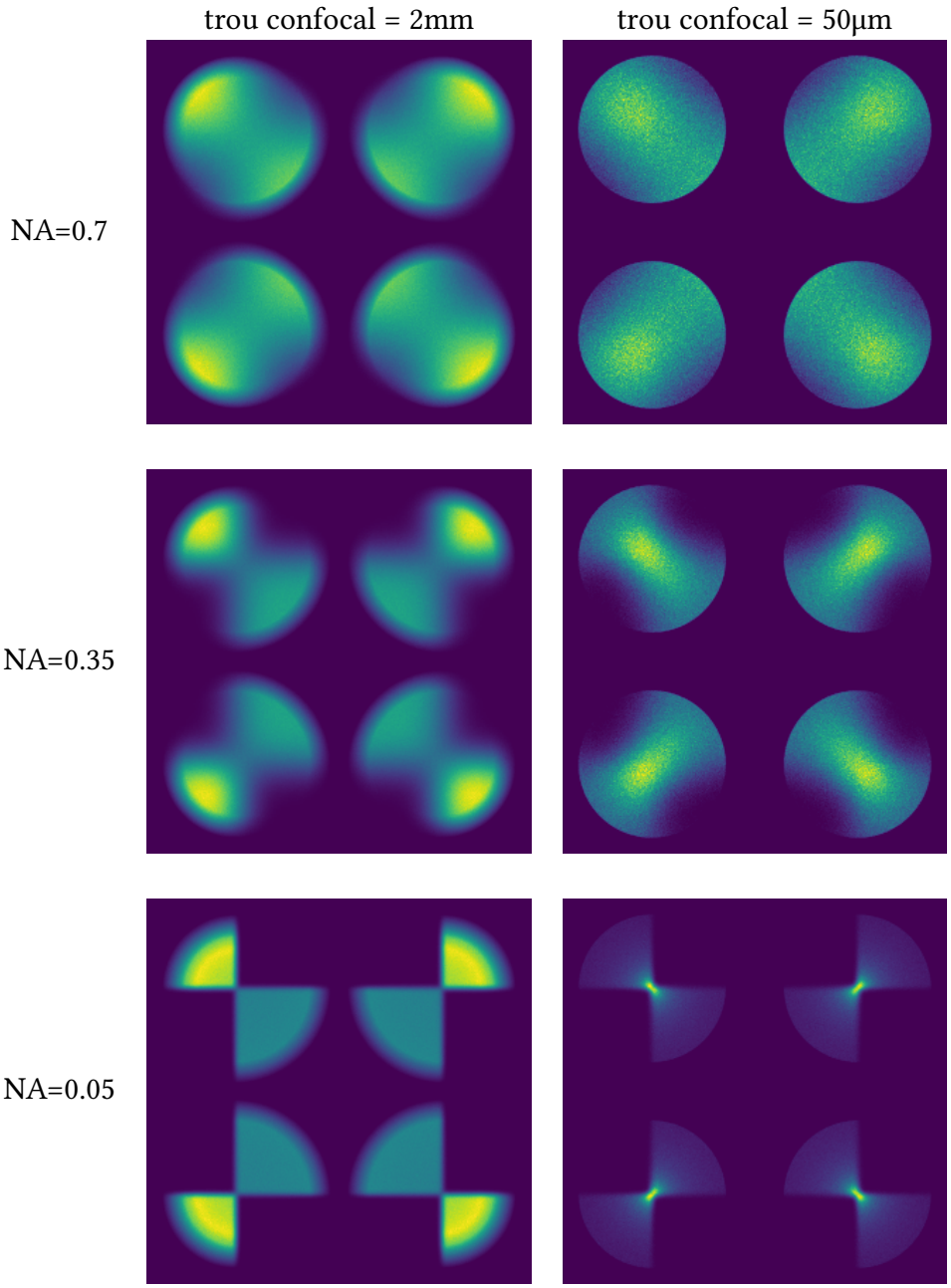


Figure 5.13 – Simulation en ray tracing de l'image formée par un analyseur pyramide sur échantillon fluorescent de 150µm d'épaisseur. Ouverture du cône d'illumination de 0.7NA (haut), 0.35NA (centre) et 0.05NA (bas). Trou confocal de 2mm (gauche) et de 50µm (droit).

Chapitre 6

Mesures des aberrations de phase en transmission

C'est dommage de gaspiller toute cette bonne confiture sur d'aussi tristes tartines.
Gaston Lagaffe

On a vu dans le chapitre précédent que mesurer les aberrations en fluorescence dans le cerveau sur le microscope confocal présente des difficultés. Je vais dans ce chapitre procéder à la mesure des aberrations introduites par des échantillons de cerveaux en transmission (i.e. sans fluorescence) afin d'établir si ces aberrations sont suffisamment importantes pour rendre leur correction par optique adaptative utile. Je vais dans le même temps procéder à une mesure de la zone d'isoplanétisme pour établir sur quelle taille de champ une correction est valable sachant que le champ maximal de l'objectif est de 1mm×1mm. Je commence ci-dessous par présenter les tentatives de mesures précédant la conception du microscope décrit au chapitre 3 avant de passer aux mesures réalisées sur celui-ci.

6.1 Premières tentatives

Les premières tentatives de mesure des aberrations introduite par les cerveaux de souris clarifiés ont eu lieu au début du projet, avant de commencer la conception du microscope confocal. L'objectif était d'obtenir une estimation de l'amplitude des aberrations à corriger dans le but de pouvoir concevoir un système d'optique adaptative adapté.

6.1.1 Mesures sur Zygo

Le Zygo Verifire est un interféromètre de Fizeau commercial conçu pour la mesure de la topographie de surfaces par interférométrie à décalage de phase avec une précision sub-nanométrique. La figure 6.1 présente un schéma simplifié du fonctionnement du système de mesure. On voit que la géométrie du montage impose de mesurer les aberrations induites par un double passage dans l'échantillon. Les mesures sont effectuées à 632nm.

Plusieurs essais ont été menés, d'abord sur le cerveau entier (environ 1cm d'épaisseur) clarifié avec CUBIC, placé dans une cuvette remplie d'une huile de même indice de réfraction que le cerveau. La figure 6.2 montre les franges d'interférence obtenues. On voit que les franges sont complètement brouillées dans le cerveau et présentes d'importantes distorsions même

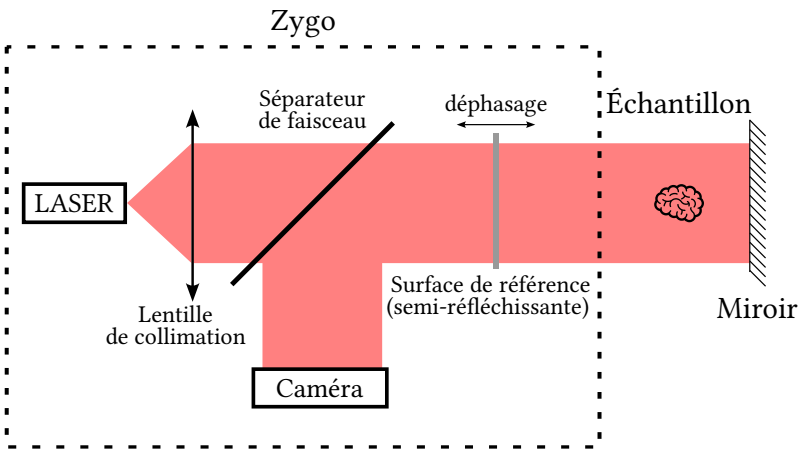


Figure 6.1 – Schéma de principe de la mesure sur le Zygo.

dans l'huile [1]. La figure 6.3 montre la tentative de reconstruction de la phase dans l'huile effectuée par le Zygo sur la zone représentée par un cercle sur la figure 6.2. La reconstruction est incomplète, les essais dans le cerveau n'ont absolument pas fonctionné. Des essais ont ensuite été effectués sur une tranche de cerveau de 1mm d'épaisseur, sans plus de succès. Je n'ai pas trouvé dans la documentation d'information claire sur les limites de l'instrument. Il semble en tout cas que le cerveau même clarifié soit un milieu trop complexe pour le Zygo que ce soit à cause d'aberrations de fréquences spatiales et/ou d'amplitudes trop importantes ou à cause d'une diffusion/absorption trop importante.

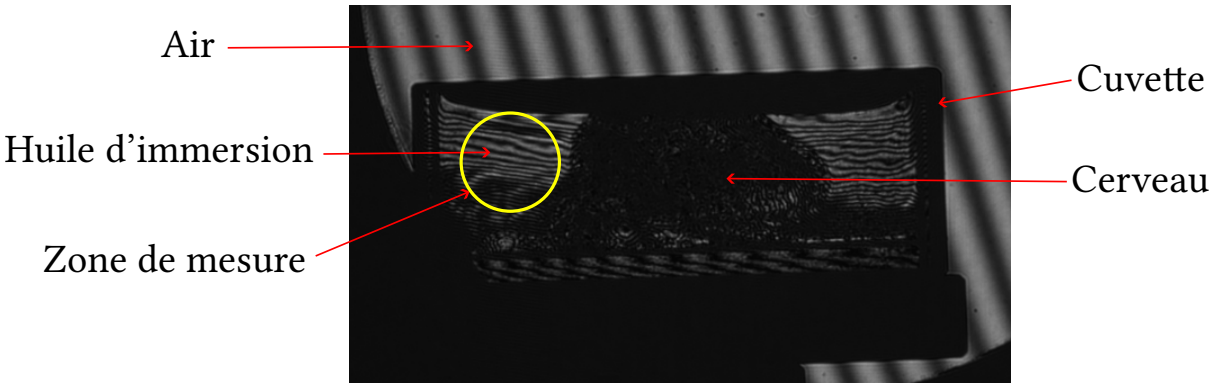


Figure 6.2 – Franges d'interférences obtenues sur le Zygo pour le cerveau entier placé dans une cuvette d'huile de même indice de réfraction.

1. La présence d'aberrations dans l'huile s'explique par la formation d'un précipité due à la trop faible température ambiante pendant la réalisation de l'expérience.

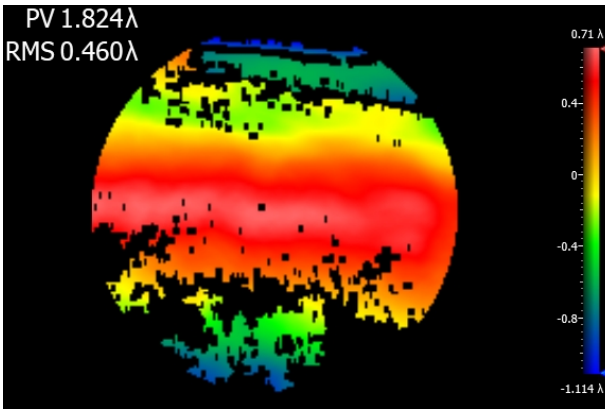


Figure 6.3 – Phase mesurée par le Zygo dans l'huile.

6.1.2 Mesures sur un ancien montage optique

Une seconde série d'essais a été faite sur un montage optique qui avait été initialement conçu pour mesurer les aberrations dans des tranches de cerveau de souris non clarifié de quelques centaines de micromètres d'épaisseur placées entre deux objectifs[70]. La distance de travail insuffisante des deux objectifs ne me permettait pas de placer de cerveau entier entre ceux-ci. Les mesures ont donc été réalisées avec le cerveau immergé dans une cuvette remplie d'huile le tout placé dans un plan pupille du montage (voir figure 6.4). L'analyseur pyramide a été ajouté au montage pour l'occasion. Les mesures sont effectuées à 830nm sur le même échantillon qu'en section 6.1.1 (cerveau entier clarifié avec CUBIC). Le diamètre du faisceau dans le cerveau est de 5.7mm.

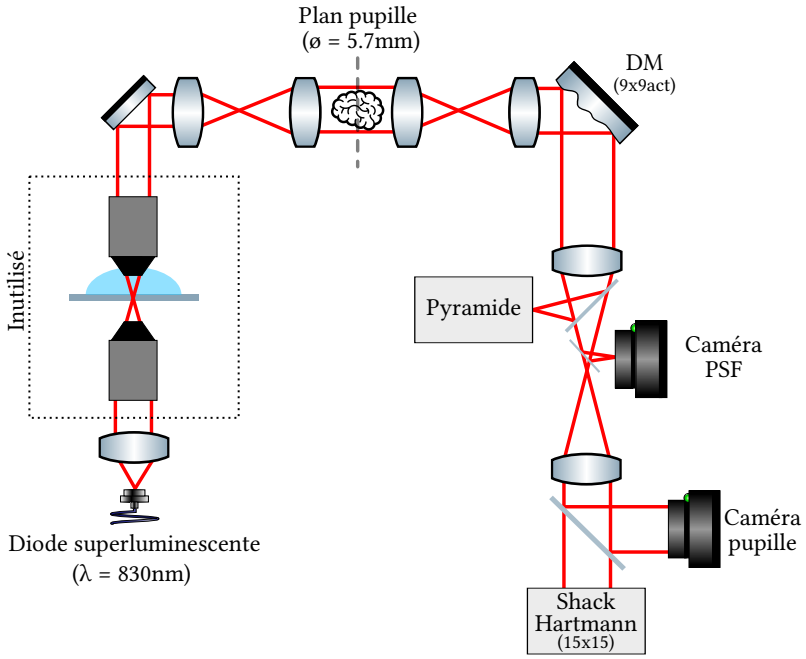


Figure 6.4 – Schéma de l'ancien montage optique.

Comme pour la tentative de mesure sur le Zygo, la disposition du cerveau dans un faisceau collimaté n'est pas représentative de la géométrie réelle du faisceau sur un microscope confocal et le spectre des aberrations générées est donc différent.

La figure 6.5 montre les quatres images prises avec les caméra pupille, PSF, pyramide et

SH avec le cerveau dans le faisceau. La PSF présente des aberrations importantes et on observe des scintillations importantes dans la pupille ainsi qu'une transmission non homogène qui se retrouve sur les images de l'analyseur pyramide. Une partie des spots sur le SH a complètement disparu à cause d'aberrations de hautes fréquences spatiales rendant toute mesure impossible. La figure 6.6 montre le résultat d'une fermeture de boucle avec la pyramide à une autre position dans le même cerveau. Même si la correction obtenue est loin d'être optimale on constate tout de même une concentration notable de l'énergie indiquant que la mesure effectuée par la pyramide est au moins partiellement correcte.

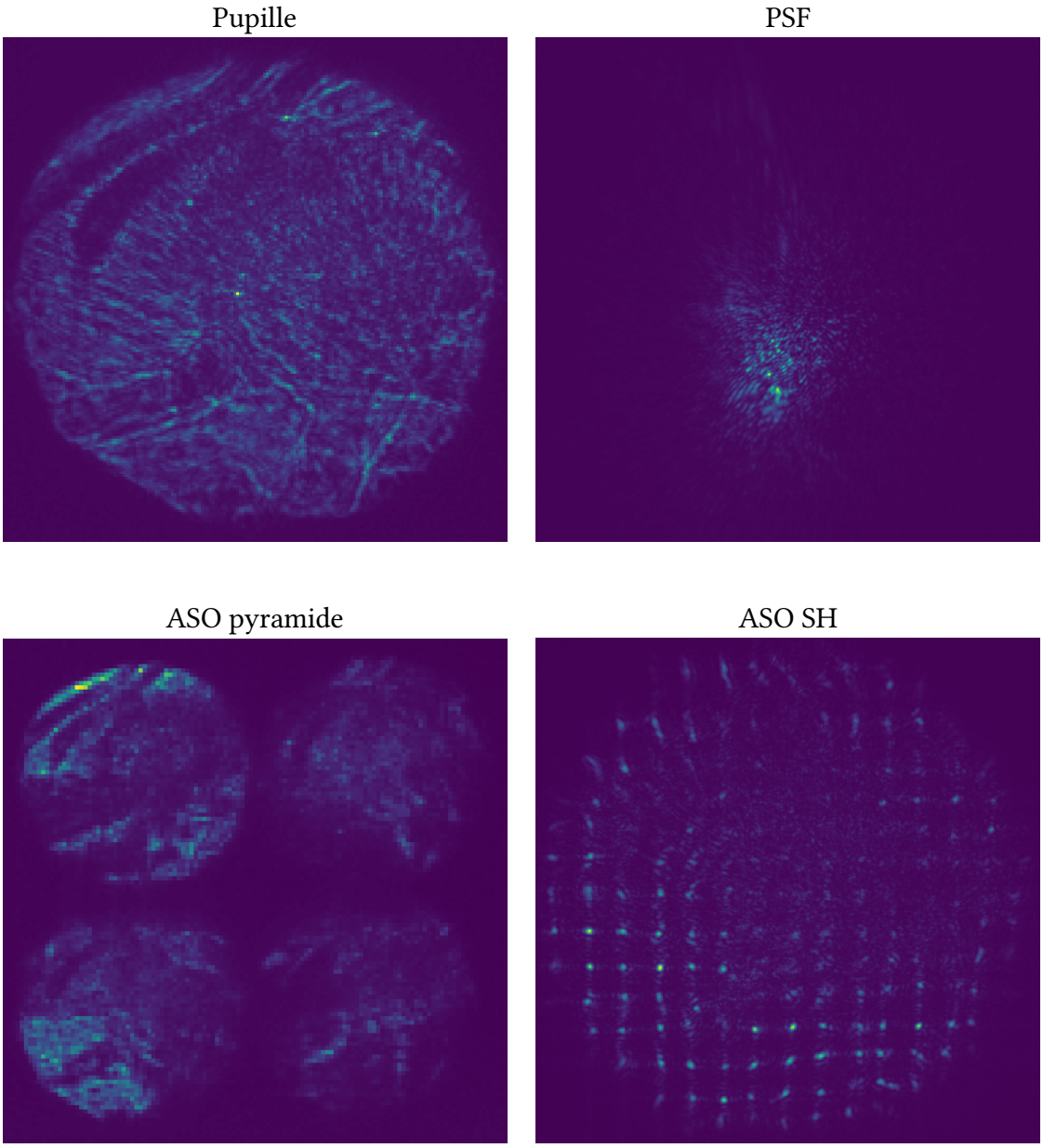


Figure 6.5 – Cerveau entier (1cm d'épaisseur) clarifé par le protocole CUBIC placé en plan pupille dans un faisceau de 5.7mm de diamètre à 830nm. Image de la pupille (en haut à gauche), de la PSF (en haut à droite), de la pyramide (en bas à gauche) et du Shack-Hartmann (en bas à droite).

Si ces tentatives n'ont pas permis d'arriver à des mesures quantitatives elles ont tout de même permis de montrer qualitativement que les aberrations induites par le cerveau clarifié

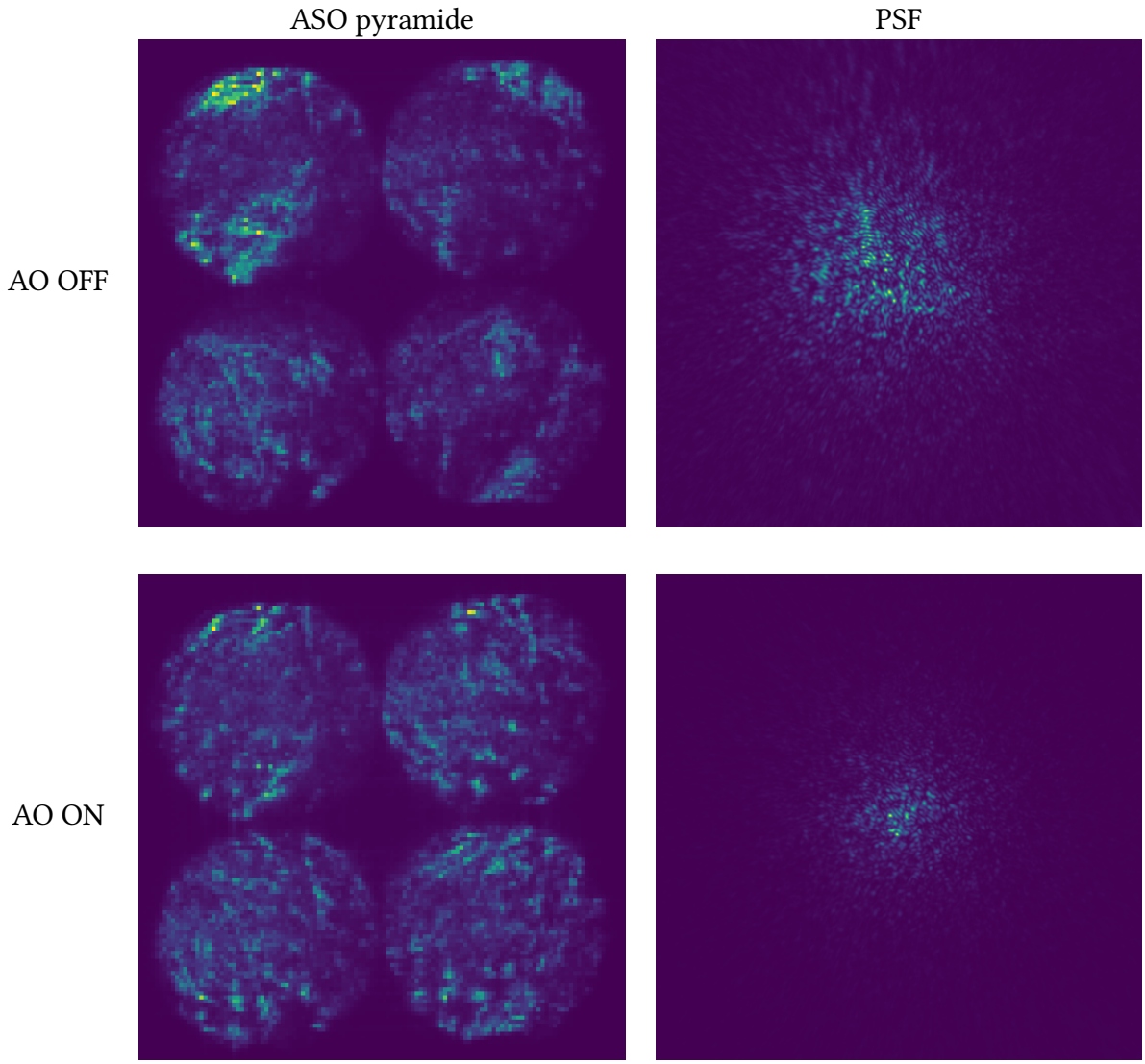


Figure 6.6 – Cerveau entier (1cm d'épaisseur) clarifié par le protocole CUBIC placé en plan pupille dans un faisceau de 5.7mm de diamètre à 830nm. Image de l'analyseur pyramide (gauche) et de la psf (droite) en boucle ouverte (haut) et fermée (bas).

n'étaient pas négligeables et que concevoir une optique adaptative pour les corriger permettrait d'améliorer la qualité d'image.

6.2 Mesures sur le microscope confocal

Je passe dans cette partie aux mesures effectuées sur le microscope confocal. Celui-ci étant opérationnel et les tentatives de mesures d'aberrations en fluorescence étant compliquées (voir chapitre précédent) je suis revenu à l'idée d'effectuer des mesures en transmission. Le microscope confocal permet deux choses que les expériences présentées dans la section précédente ne permettaient pas : une mesure avec la bonne longueur d'onde (488nm) et surtout avec la bonne géométrie de faisceau (faisceau divergeant plutôt que sur un faisceau collimaté).

Pour pouvoir illuminer l'échantillon en transmission un nouvel objectif (Zeiss 40x 1NA) est placé sous l'objectif Special Optics (voir figure 6.7). La distance de travail cumulée de 14.125mm de ces deux objectifs permet d'insérer des tranches de cerveau épaisses entre les deux. Une platine motorisée avec contrôle du positionnement en boucle fermée (Picomotor 8302 + encodeur optique 9067-COM-E de Newport) est installée pour déplacer les échantillons latéralement avec une résolution de 80nm. Le SH est utilisé pour la mesure des aberrations en transmission à travers des tranches de cerveau. Les PSF sont enregistrées sur la caméra PSF. Les miroirs galvanométriques sont maintenus immobiles en position centrale et le trou confocal est maintenu grand ouvert (Ø2mm). La pyramide est décalée hors du faisceau et la caméra pyramide est utilisée pour enregistrer les images de la pupille. Le MPPC n'est pas utilisé. L'utilisation de l'objectif Special Optics dans l'air réduit son ouverture numérique à NA=0.483 (voir tableau 3.6). Les mesures d'aberrations effectuées ci-dessous représentent donc des valeurs inférieures aux aberrations qu'on obtiendrait à pleine ouverture (NA=0.734).

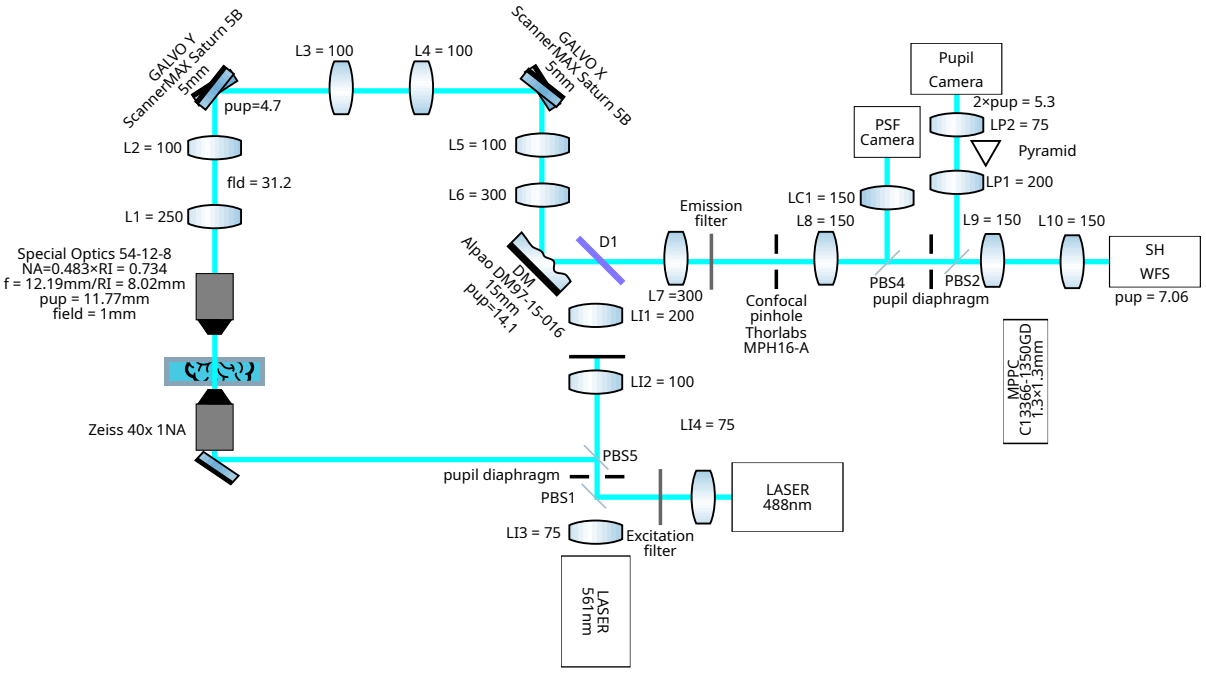


Figure 6.7 – Schéma optique avec adjonction d'un objectif d'illumination en transmission.

La figure 6.8 présente les paramètres de contrôle. Les échantillons sont des tranches coronales de cerveau d'épaisseur T placées dans des boites remplies d'une huile d'immersion de

même indice que le cerveau. Les boites sont scellées par des lamelles de microscope d'épaisseur 170µm. Les mesures de phase sont effectuées en différentes positions latérales avec un pas de d entre chaque position. Les deux objectifs sont confocalisés avec leurs points de focus situés à une distance z sous la face inférieure de l'échantillon. Il est ainsi possible d'étudier l'influence de la position dans le cône sur les aberrations générées. Je n'ai toutefois pas eu le temps de faire varier ce paramètre et les mesures que je vais présenter ici sont toutes faites avec $z = 170\mu m$.

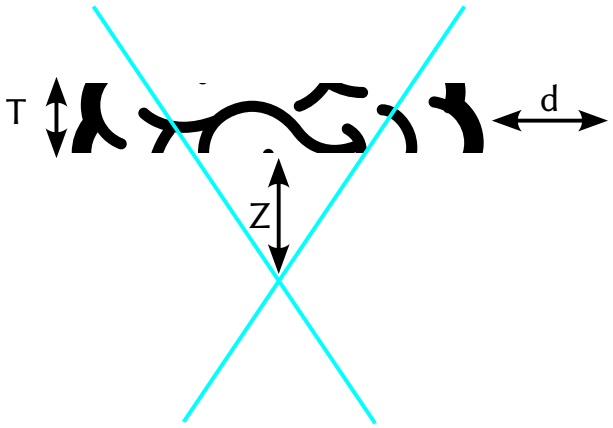


Figure 6.8 – Paramètres de contrôle des mesures d'aberrations avec T l'épaisseur de la tranche de cerveau, Z la distance au plan de focalisation du faisceau, d la taille du pas de déplacement latéral.

La procédure de mise en place de l'échantillon consiste à illuminer avec l'objectif Special Optics une couche de marqueur fluorescent préalablement placé sur la face inférieure du porte échantillon dans une zone située en dehors du cerveau (voir figure 6.9). La mesure du focus sur la fluorescence par l'analyseur SH permet de placer l'échantillon par rapport à l'objectif du haut. L'échantillon est ensuite décalé latéralement pour sortir de la zone de marqueur fluorescent et le filtre d'émission fluorescent est retiré du bras de détection.

On éclaire alors par transmission avec L'objectif Zeiss. Celui-ci est déplacé longitudinalement pour être confocalisé avec celui du haut. Pour optimiser ce positionnement, on minimise la mesure du focus faite par l'analyseur SH. Une fois cette opération effectuée on ferme la boucle d'OA puis, après convergence de la boucle, la correction du DM est enregistrée dans le vecteur $\mathbf{c_b}$ du RTC (voir equation 2.7). Cet étalonnage des aberrations du système optique permet de ne mesurer que les aberrations provenant du cerveau et non celles induites par le passage à travers le porte échantillon ou celles liées au reste du montage. Il permet notamment de corriger l'importante aberration sphérique induite par le choc d'indice entre l'air et l'huile.

On décale alors le porte échantillon latéralement pour que le faisceau se retrouve dans la tranche de cerveau et l'acquisition du profil de mesure peut commencer. La procédure d'acquisition consiste en la répétition sur N points des étapes suivantes :

- Enregistrement de la PSF non corrigée (estimation de la qualitée d'image sans OA).
- Fermeture de la boucle d'OA sur 50 itérations.
- Enregistrement de la PSF corrigée par OA et de la commande du DM associée.
- Applications successives des commandes de correction des K pas précédents (s'ils existent) et enregistrement des PSF correspondantes (estimation de l'anisoplanétisme).
- Réapplication de la commande de référence prise dans l'huile.
- Déplacement de l'échantillon latéralement d'une distance d.

La fermeture de boucle sur 50 pas avec un gain de 0.1 permet d'atteindre un résidu théorique de $(1-0.1)^{50} = 0.52\%$ des aberrations de phase initiales (voir annexe A.9).

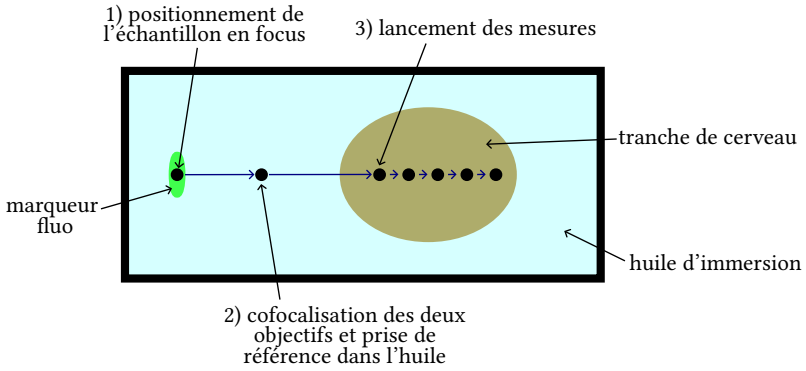


Figure 6.9 – Schéma de la procédure de mise en place d'un profil de mesures. Échantillon vu du dessus.

J'ai réalisé quatre profils de mesures, deux dans un échantillon d'épaisseur $T = 5$mm et deux dans un échantillon d'épaisseur $T = 3$mm. Je choisis un pas de déplacement de $d = 10$µm et un nombre de points de mesures de $N = 150$ soit un déplacement total de 1.5mm. À chaque position, j'enregistre K=31 PSF avec les commandes du DM enregistrées aux K pas précédents, ce qui permet une étude de l'anisoplanétisme sur une distance de $(K-1)\times d = 300$µm sur les $N - K = 120$ points pour lesquels j'ai un profil d'anisoplanétisme complet.

Un exemple des données obtenues sur une portion de profil est donné en figure 6.10. Les trois premières lignes correspondent aux images de pupilles, de PSF boucle ouverte et de PSF boucle fermée à la position indiquée en haut de chaque colonne. La dernière ligne correspond aux PSF obtenues à la position de la dernière colonne avec application de la correction d'OA mesurée à la position correspondante à la colonne dans laquelle elles sont placées. Je n'affiche qu'une position sur six pour pouvoir montrer l'évolution des PSF obtenues sur 300µm avec plus de lisibilité. On observe une amélioration notable des PSF en boucle fermée. On observe également un anisoplanétisme qui dégrade la correction. La PSF à la position 118 avec la correction de la position 94 (soit un déplacement de 240µm) est quasiment aussi étalée que la PSF boucle ouverte.

La comparaison de la PSF boucle ouverte de la figure 6.6 avec les PSF boucles ouvertes de la figure 6.10 donne une idée de l'importance de l'impact de la géométrie du faisceau sur la DSP des aberrations. Dans le premier cas, le faisceau est collimaté avec un diamètre de 5.7mm et passe à travers 10mm de cerveau. Dans le second, le faisceau est focalisé à l'entrée d'une tranche de 5mm et fait environ 3.4mm en sortie de cette tranche. On voit que la PSF dans le cas du faisceau collimaté est considérablement plus aberrée par rapport à ce qu'on pourrait attendre du fait du passage de 5mm à 10mm d'épaisseur et ce par des fréquences bien plus élevées que la PSF dans le cas du faisceau focalisé.

Je procède maintenant à une mesure quantitative de la qualité des PSF. Je note $P_{BF}^{n,k}(\mathbf{r})$ la valeur du pixel à la position $\mathbf{r}$ dans le champ de la PSF boucle fermée (BF) à la position n dans le profil en appliquant la correction mesurée à la position $n-k$. On a donc $n \in [0, N]$ et $k \in [0, K]$. Je note de même $P_{BO}^{n}(\mathbf{r})$ la valeur des pixels des PSF boucle ouverte à la position n dans le profil. Je note $\mathbf{r}_{max}^{n}$ la position du pixel le plus brillant de $P_{BF}^{n,0}$. Pour la boucle ouverte à la position n l'intensité $I_{BO}^{X}(n)$ intégrée à l'intérieur du disque de rayon $\frac{X}{2}$AU et centré sur

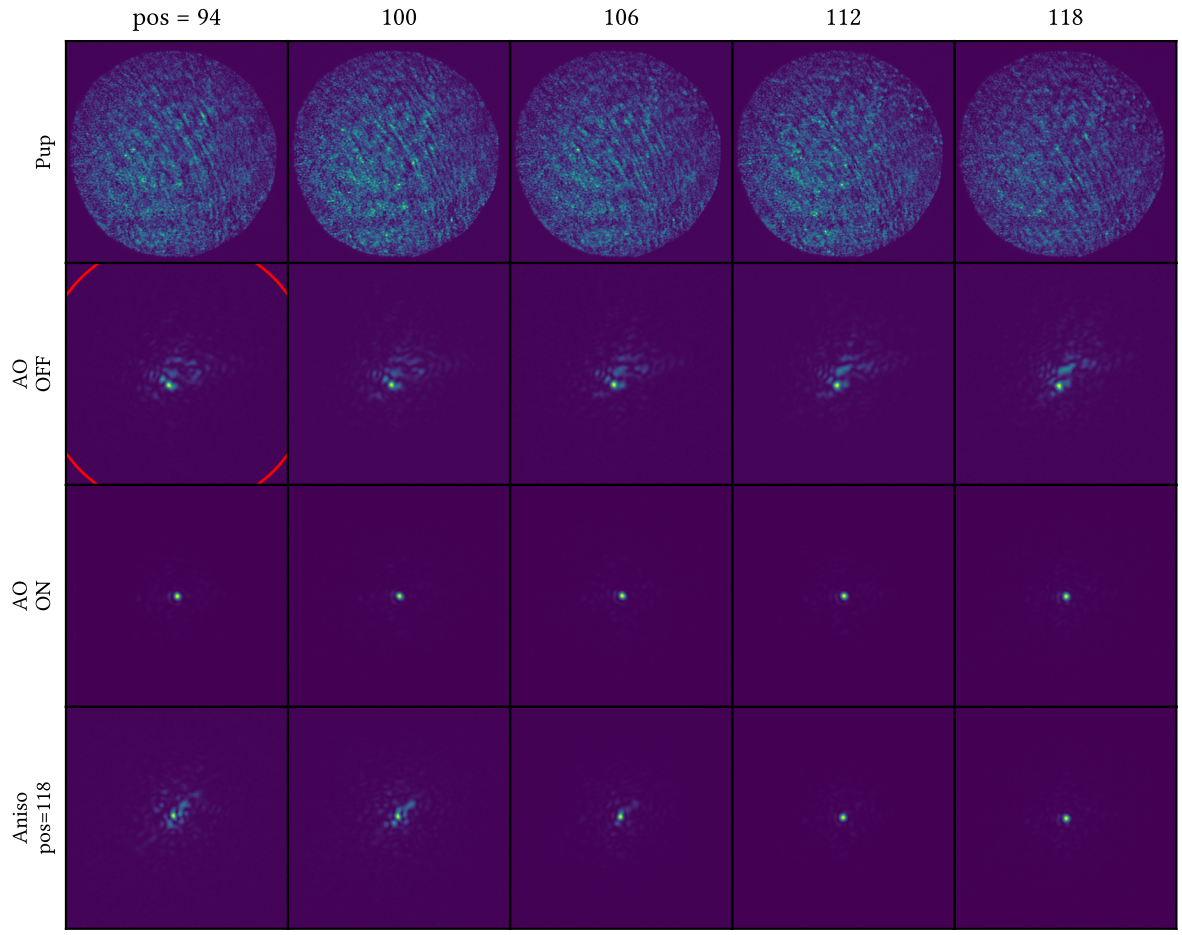


Figure 6.10 – Images issues d'une partie (n=94 à n=118) d'un profil dans une tranche de 5mm d'épaisseur de cerveau clarifié par le protocole CUBIC illuminé en faisceau divergent à 488nm avec une focalisation 170µm sous la face inférieur de la tranche. Je n'affiche qu'un point sur six pour plus de lisibilité, le déplacement entre deux colonnes est de 60µm. Images de Pupille (première ligne), de PSF boucle ouverte (deuxième ligne), de PSF boucle fermée (troisième ligne) et des PSF à la position 118 en appliquant la correction mesurée à la position de chaque colonne. Le cercle rouge correspond à un diamètre de 25.6AU.

$\mathbf{r}_{max}$ est

$$I_{BO}^{X}(n) = \int_{\|\mathbf{r}\| \leqslant \frac{X}{2}} P_{BO}^{n}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{max})\,\mathrm{d}\mathbf{r} \tag{6.1}$$

De même pour la boucle fermée à la position n avec la correction de la position $n-k$

$$I_{BF}^{X}(n,k) = \int_{\|\mathbf{r}\| \leqslant \frac{X}{2}} P_{BF}^{n,k}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_{max})\,\mathrm{d}\mathbf{r} \tag{6.2}$$

Je note $\hat{I}$ l'intensité normalisée par rapport à l'intensité contenue dans un disque de diamètre 25.6AU (le diamètre du cercle rouge sur la figure 6.10) sur la PSF boucle fermée à la position de la mesure ($k = 0$)

$$\hat{I}_{BO}^{X}(n) = \frac{I_{BO}^{X}(n)}{I_{BF}^{25.6}(n,0)} \tag{6.3}$$

pour la PSF boucle ouverte et de même

$$\hat{I}^X_{BF}(n,k) = \frac{I^X_{Bk}(n,k)}{I^{25.6}_{BF}(n,0)} \tag{6.4}$$

pour la PSF boucle fermée. Cette normalisation permet de s'affranchir d'une éventuelle variabilité de la transmission d'une position à une autre. Le choix de 25.6 (un multiple de 1.6) a été fait car il permet d'encercler l'intégralité de l'énergie.

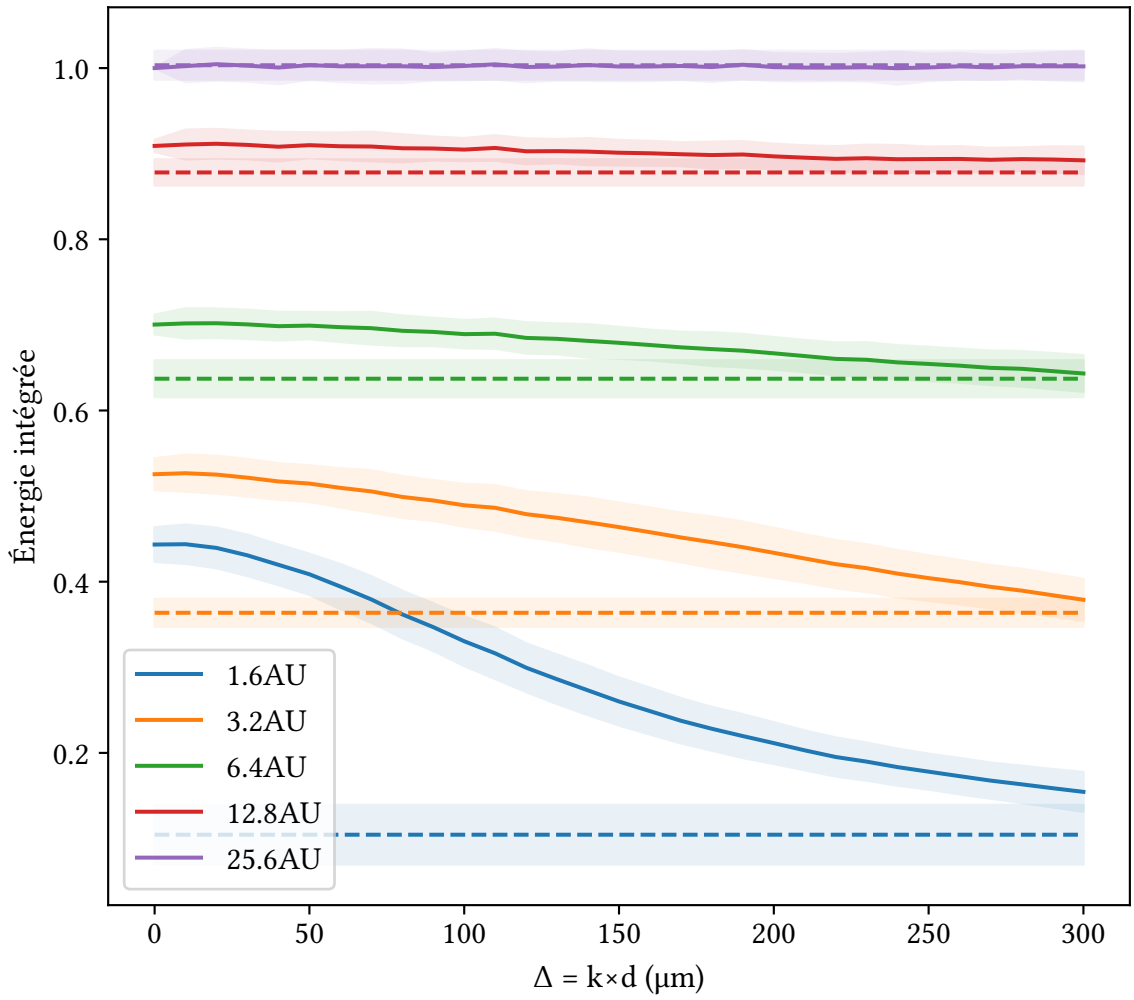


Figure 6.11 – Intensité intégrée normalisée moyenne sur un disque de diamètre X variant de 1.6AU à 25.6AU pour les PSF enregistrées en boucle ouverte ($\left\langle \hat{I}^X_{BO}(n) \right\rangle_n$, droites discontinues) et en boucle fermée ($\left\langle \hat{I}^X_{BF}(n,k) \right\rangle_n$, courbes continues) en fonction de la distance latérale à laquelle la correction de l'OA a été mesurée. Tranche de 5mm d'épaisseur de cerveau clarifié par le protocole CUBIC et illuminé à 488nm avec un faisceau convergent (NA=0.483) focalisé à 170µm sous la face inférieure de la tranche.

La figure 6.11 présente la dégradation moyenne sur l'ensemble des points du profil de $\hat{I}$ dû à l'anisoplanétisme ($\left\langle \hat{I}^X_{BF}(n,k) \right\rangle_n$, courbes continues) en comparaison des valeurs moyennes de $\hat{I}$ en boucle ouverte ($\left\langle \hat{I}^X_{BO}(n) \right\rangle_n$, droites discontinues) pour des valeurs X de 1.6AU, 6.4AU, 12.8AU et 25.6AU d'un profil effectué dans une tranche de 5mm.

La différence entre les courbes d'anisoplanétisme et les droites boucle ouverte représente le gain en signal apporté par l'optique adaptative pour différentes taille de trou confocal X et en fonction de la distance $\Delta = k \times d$ à la position de correction. Quand on augmente le diamètre X du disque, I_{BF}^{X} tend vers I_{BO}^{X} car la zone d'intégration devient supérieur à la zone d'influence du DM. Pour un trou confocal de 25.6AU le gain est nul car l'énergie est entièrement contenue dans le trou en boucle ouverte comme en boucle fermée. Pour des trous plus petits le gain est d'autant plus important que le trou est petit (puisque l'OA corrige principalement les basses fréquences spatiales dans la pupille). On voit également qu'une correction n'est effective que pour les positions situées à une distance inférieure à environ 300µm du point de correction. Pour la valeur typique de 1.6AU on mesure un gain en signal d'un facteur 4.3 au point de correction pour une observation au centre d'un cerveau entier (environ 1cm d'épaisseur).

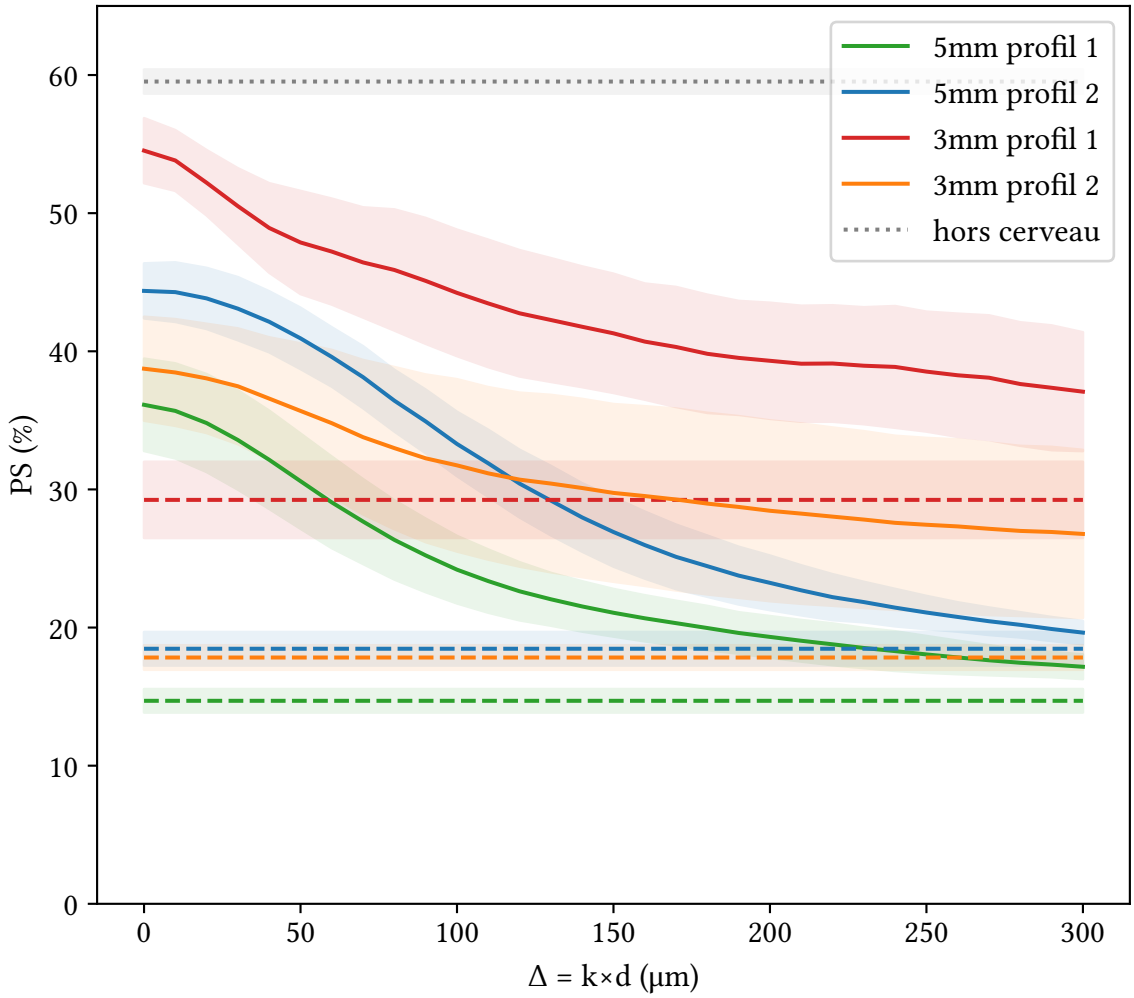


Figure 6.12 – Pseudo-Strehl pour les quatre profils réalisés dans deux tranches d'épaisseurs 3mm et 5mm. Cerveau clarifé avec le protocole CUBIC, illumination à 488nm avec un faisceau convergent (NA=0.483) focalisé à 170µm sous la face inférieur des tranches.

Un autre critère de performance est le Pseudo-Strehl introduit en section 1.5.4. Je l'utilise pour comparer sur la figure 6.12 les performances obtenues avec les 4 échantillons (2 de 3mm et 2 de 5mm). Les courbes continues représentent les Pseudo-Strehl moyens des PSF corrigées et les droites discontinues les Pseudo-Strehl moyens des PSF non corrigées. La droite grise représente le Pseudo-Strehl atteint par une fermeture de boucle dans l'huile en dehors du cer-

veau. La décroissance du Pseudo-Strehl est plus rapide pour les tranches de 5mm que pour les tranches de 3mm ce qui implique, comme on pouvait s'y attendre, que la zone d'isoplanétisme est plus grande dans des échantillons plus fin. Si je définis la taille de la zone d'isoplanétisme comme la largeur à mi hauteur de la différence entre les courbes de Pseudo-Strehl boucle fermée et les droites de Pseudo-Strehl boucle ouverte je mesure des zones d'isoplanétisme de 138µm et 202µm pour les tranches de 3mm et de 88µm et 113µm pour les tranches de 5mm. Davantage de mesures seraient nécessaires pour pouvoir donner des valeurs fiables des tailles de zones d'isoplanétisme.

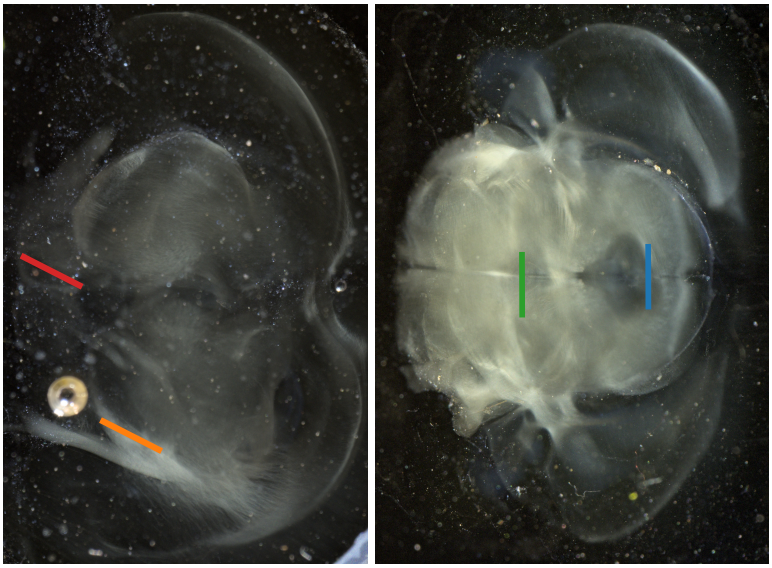


Figure 6.13 – Photographie des tranches coronales de 3mm (gauche) et 5mm (droite) dans lequelles ont été réalisé les profils. La position d'enregistrement de chaque profil est reporté sur les images avec le même code couleur que celui de la figure 6.12.

On note également que le Pseudo-Strehl n'est pas nécessairement plus grand sur les tranches de 3mm (3mm profil 2) que sur les tranches de 5mm (5mm profil 2) et ceci aussi bien pour les valeurs en boucle ouverte que pour les valeurs atteintes en boucle fermée. Ceci s'explique par la variabilité des structures du cerveau au sein des tranches, certaines zones sont plus aberrantes que d'autres et la clarification est également non homogène. Les positions d'enregistrement de chaque profil sont visibles sur la figure 6.13. On voit que les profils pris dans des zones plus myélinisées (blanche) et donc à priori plus diffusantes/aberrantes sont effectivement ceux qui ont des valeurs de Pseudo-Strehl plus faibles sur la figure 6.12. Ainsi, en fonction de la localisation du profil dans la tranche, les valeurs de Pseudo-Strehl atteintes peuvent être différentes. Il est toutefois intéressant de noter que la décroissance liée à l'anisoplanétisme semble davantage liée à l'épaisseur. Par ailleurs le fait que tous les Pseudo-Strehl en boucle fermée pour Δ=0 ne soit pas au même niveau nous indique que notre système n'est pas capable de corriger l'intégralité des aberrations induites par l'échantillon. On peut voir sur la figure 6.14 une PSF boucle ouverte et boucle fermée avec la zone d'influence du DM (cercle vert) et la zone de mesure du SH (cercle orange). On voit que la zone d'influence du DM n'est pas entièrement corrigée (anneaux d'Airy non apparents). Cette correction imparfaite est, au moins en partie, imputable à une mauvaise mesure, induite par les aberrations hautes fréquences (au-delà du cercle orange sur la figure 6.14) qui conduisent à une dégradation de la forme des spots sur le SH (voir figure 6.15).

La réalisation de plus de profils serait nécessaire pour s'assurer de la solidité des résultats

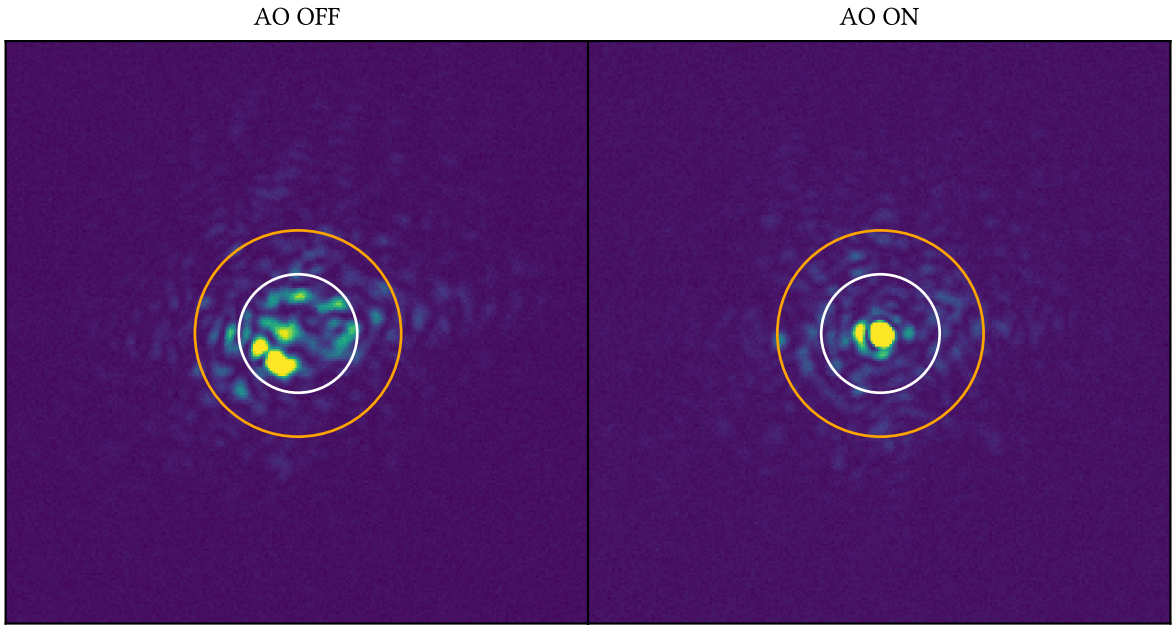


Figure 6.14 – PSF (position 94 de la figure 6.10) : boucle fermée au point de mesure (gauche) et boucle ouverte (droite) affichées à la même échelle (saturée pour une meilleure visibilité des hautes fréquences spatiales). Le cercle blanc représente la zone d'influence du DM et le cercle orange la zone de mesure du SH.

présentés ci-dessus. La présence de bulles d'air dans l'huile qui contient les échantillons rend toutefois difficile la réalisation de ces profils et je n'ai pas eu le temps d'en obtenir plus. Je peux tout de même conclure que la correction des aberrations par optique adaptative dans les échantillons de cerveau clarifié permet une amélioration du signal et ce sur un champ d'environ 600µm de diamètre pour une observation au centre du cerveau (5mm de profondeur) et davantage à des profondeurs moindres. Ces conclusions sont valables pour l'ouverture utilisée (NA=0.483). Une ouverture plus importante conduira à des zones d'isoplanétisme plus petites.

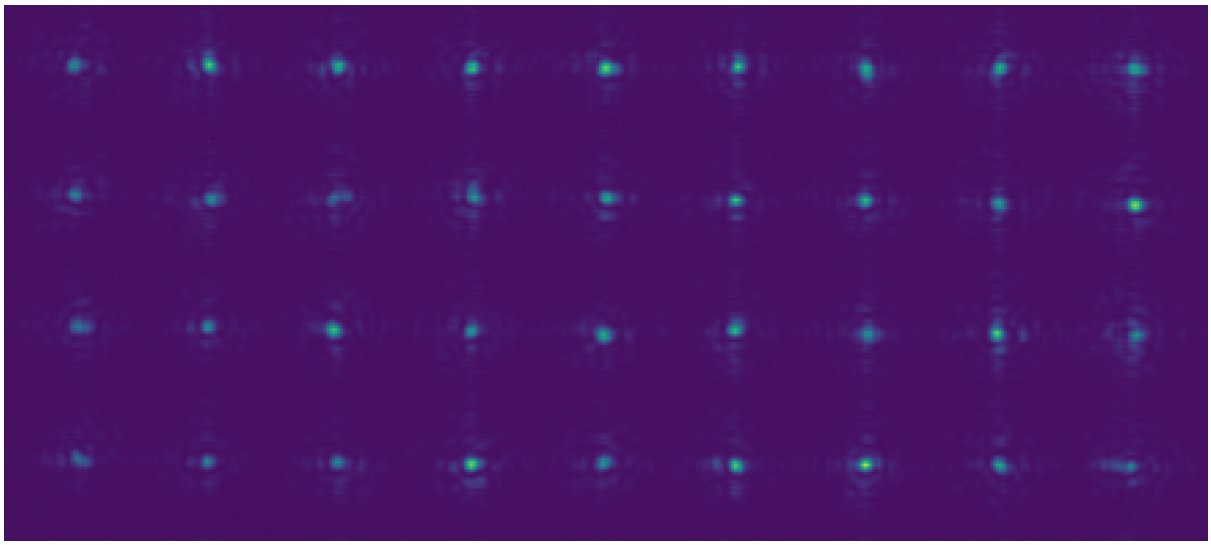


Figure 6.15 – Zoom sur une partie des spots du SH pour une tranche de 5mm. Les aberrations de haute fréquence spatiale dégradent les spots et biaise la mesure.

Conclusion

> The cats were leagues away. They breathed the sharp air into their lungs. They roamed to the four quarters. They powdered the horizons.
>
> Mervyn Peake, Gormenghast

Cette thèse a pris place dans le contexte du développement instrumental pour la microscopie. En particulier pour les neurosciences qui, pour réaliser des connectomes des circuits neuronaux, ont besoin d'imager des échantillons de cerveaux entiers. Si les méthodes chimiques de clarification couplées à des méthodes de marquage par viral tracing ont rendu possible l'imagerie de tels échantillons, la présence d'aberrations optiques résiduelles dégrade la qualité des images obtenues, en particulier en profondeur. L'optique adaptative est une technique qui, en corrigeant les aberrations optiques induites par l'échantillon, peut permettre d'améliorer la qualité des images en termes de résolution et de signal.

Après une présentation du logiciel développé pour le contrôle du banc d'optique adaptative dans le chapitre 2, j'ai présenté dans le chapitre 3 le processus de conception ainsi que de caractérisation d'un microscope confocal avec optique adaptative adapté à l'imagerie de cerveau de rongeur clarifié et entier. L'utilisation de microcontrôleurs monocartes «Teensy» a permis le développement d'une électronique d'acquisition des images et de contrôle du balayage à bas coût. La principale limitation du microscope obtenu est liée à la photométrie. En effet, l'implémentation d'une optique adaptative implique l'utilisation d'un bien plus grand nombre de relais optiques que sur un microscope classique ce qui conduit à des pertes de flux. Ceci, couplé au détournement d'une partie du flux pour la mesure de l'optique adaptative, conduit à une perte de signal importante pour le dispositif d'imagerie scientifique.

Le processus de conception d'un logiciel de ray tracing adapté à l'ingénierie optique a été présenté dans le chapitre 4. J'ai développé et utilisé ce logiciel pour caractériser les distorsions du champ. J'ai montré que la distorsion générée par les lentilles utilisées entre les galvanomètres et l'objectif était faible malgré la non-utilisation de lentilles de scan. Plus important, l'utilisation du logiciel de ray tracing m'a permis de confirmer quel était l'impact de l'angle d'incidence du faisceau sur les galvanomètres sur la distorsion du champ. L'utilisation conjointe d'un modèle analytique du balayage m'a permis d'établir quelles étaient les corrections à apporter à la commande des galvanomètres pour restaurer un champ sans distorsion. Le logiciel m'a également permis de déterminer la valeur du sectionnement du microscope en fonction de la taille du diaphragme utilisé.

Le microscope proposé inclut deux analyseurs de surface d'onde, un analyseur Shack-Hartmann et un analyseur pyramide. Ceci m'a permis d'effectuer une comparaison entre les deux méthodes. En effet, si l'analyseur pyramide est maintenant couramment utilisé en astronomie, il est peu utilisé en microscopie. J'ai montré dans le chapitre 5 que l'analyseur pyramide n'était pas utilisable en l'état pour effectuer des mesures d'aberration sur un microscope confocal de fluorescence utilisé sur échantillon épais. Concernant l'analyseur de type Shack-Hartmann, j'ai montré comment le cône de fluorescence dans les échantillons épais conduisait

à une extension spatiale de l'étoile guide similaire à ce que produisent les étoiles laser en astronomie. Pour de grandes ouvertures du faisceau d'illumination, des algorithmes classiques de centre de gravité pourraient permettre à l'analyseur Shack-Hartmann de fonctionner correctement. Il reste à investiguer à quel point les performances de ce type d'algorithme sont dégradées par l'extension spatiale des spots. J'ai proposé une méthode de mesure, inspirée des méthodes utilisées sur les étoiles laser, qui exploite cette extension spatiale dans le processus de mesure. Le gain ou l'absence de gain par rapport à la méthode du centre de gravité reste à déterminer.

Dans le dernier chapitre enfin, j'ai mesuré qu'une partie des aberrations introduites par des tranches de cerveau clarifiées sont de basse fréquence spatiale. Le développement d'une optique adaptative capable de les mesurer et de les corriger permettrait un gain en résolution et surtout en signal sur les images obtenues. La mesure de la taille de la zone d'isoplanétisme a montré que ces gains seront limités à une zone d'environ 600µm de diamètre autour de la zone où la correction de l'optique adaptative aura été optimisée. Les mesures ayant été effectuées avec une ouverture numérique plus faible que les ouvertures généralement utilisées en imagerie réelle on peut s'attendre à ce que les aberrations rencontrées en conditions réelles soient plus importantes que celles mesurées sur les profils pendant ma thèse. Le gain apporté par l'optique adaptative sera en conséquence d'autant plus grand. La taille de la zone d'isoplanétisme sera en revanche certainement plus petite.

Dans le futur, le remplacement de la caméra du Shack-Hartmann par une caméra plus sensible devrait permettre d'effectuer des tests plus poussés de fermeture de boucle en fluorescence. Ces tests devront permettre de mesurer, sur des images réalisées dans les échantillons de cerveau, quel est le gain apporté par l'optique adaptative en fonction de l'algorithme de mesure utilisé. Dans ce cadre, l'implémentation d'une correction des aberrations par une approche sans analyseur de surface d'onde offrira une comparaison intéressante. Enfin, l'ajout prochain d'une voie d'imagerie par feuille de lumière sur le microscope devrait permettre une accélération de la vitesse d'acquisition des images.

Annexe A

Optique adaptative

A.1 Étalonnage des polynômes de Zernike de tip-tilt

On cherche la valeur des coefficients des polynômes de Zernike de tilt pour un décalage des spots d'une distance d sur la caméra de l'ASO SH (voir figure A.1).

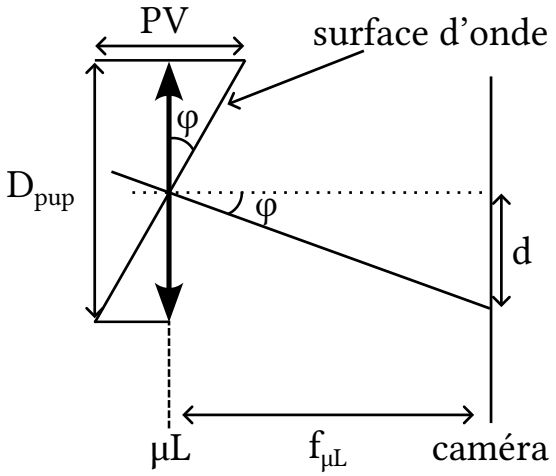


FIGURE A.1 – Une microlentille (μL) de diamètre D_{pup} est éclairée par un faisceau incliné d'un angle φ par rapport à une surface non aberrée. L'image se forme dans le plan focal de la microlentille à la distance $f_{\mu L}$.

La définition des Zernike de tip-tilt dans la convention de Noll[65] est $Z_2 = 2\rho\cos\theta$ et $Z_3 = 2\rho\sin\theta$ avec ρ la distance à l'axe en rayon de la pupille et variant donc de 0 à 1 et θ l'angle polaire variant de 0 à 2π. En présence d'une valeur de tilt a_2 on a l'amplitude crête à crête $PV = a_2(Z_2(1,0) - Z_2(1,\pi)) = 4a_2$ (ou de même $PV = 4a_3$). On voit à partir du schéma ci-dessus que

$$\tan\varphi = \frac{d}{f_{\mu L}} = \frac{PV}{D_{pup}} = \frac{4a_2}{D_{pup}} \tag{A.1}$$

et donc

$$a_2 = D_{pup}\frac{d}{4f_{\mu L}} \tag{A.2}$$

A.2 Étalonnage du tirage du Shack-Hartmann

Les focale des microlentilles est $f_{\mu L}$ et je note f_t le tirage du SH (la distance entre le capteur de la caméra de l'ASO SH et les microlentilles) qui peut, si la caméra est mal positionnée, être différent de $f_{\mu L}$. Pour mesurer expérimentalement f_t, on place une source ponctuelle à une distance r de la matrice de microlentilles et on mesure le déplacement Δz sur le capteur pour un déplacement latéral de la source $d << r$ (voir figure A.2).

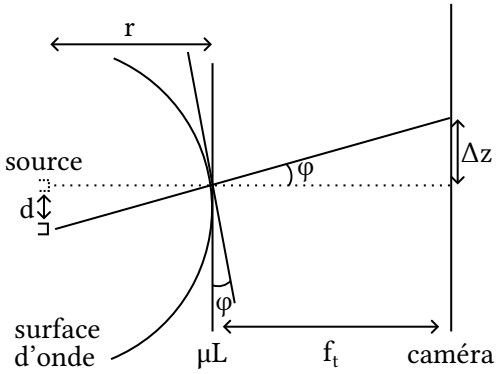


Figure A.2 – Principe de la mesure du tirage du SH.

On peut utiliser la mesure du coefficient de tilt $a_2^m(f_{t0})$ effectuée par le RTC à partir de la valeur (possiblement fausse) du tirage f_{t0} utilisé par le RTC au moment de la mesure (voir annexe A.1) pour calculer Δz

$$\Delta z = f_{t0} \frac{4a_2^m(f_{t0})}{D_{pup}} \tag{A.3}$$

On calcule ensuite le tirage réel f_t à partir de Δz

$$f_t = \frac{\Delta z}{\tan \varphi} = \frac{r\Delta z}{d} \tag{A.4}$$

et on peut alors remplacer f_{t0} par f_t dans le RTC.

A.3 Lien entre défocalisation physique et Zernike de défocus

On cherche la relation entre une défocalisation physique Δz et la valeur a_4 du Zernike de défocus correspondant dans la pupille.

La définition du Zernike de défocus dans la convention de Noll[65] est

$$Z_4(\rho, \theta) = \sqrt{3}(2\rho^2 - 1) \tag{A.5}$$

soit $Z_4(0, \theta) = -\sqrt{3}$ sur l'axe optique et $Z_4(1, \theta) = \sqrt{3}$ sur le bord de la pupille. On considère le point A et on exprime la courbure de l'onde au niveau du plan focal objet (voir figure A.3). On a

$$(R - e)^2 + \frac{D^2}{4} = R^2 \tag{A.6}$$

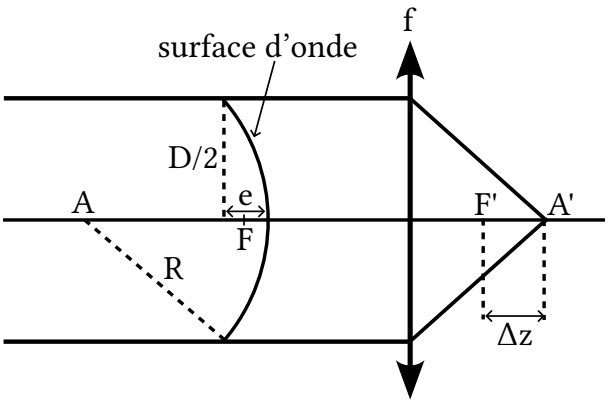


Figure A.3 – Schéma représentant le rayon de courbure R de la surface d'onde dans le plan pupille pour une défocalisiton Δz dans le plan champ.

$$R^2 - 2eR + e^2 + \frac{D^2}{4} = R^2 \tag{A.7}$$

on suppose e^2 négligeable

$$e = \frac{D^2}{8R} = 2\sqrt{3}a_4 \tag{A.8}$$

on a donc

$$R = \frac{D^2}{16\sqrt{3}a_4} \tag{A.9}$$

On utilise ensuite la relation de conjugaison de Newton pour exprimer R en fonction de la défocalisation physique Δz

$$\overline{FA} \times \overline{F'A'} = -f^2 \tag{A.10}$$

soit

$$-R\Delta z = -f^2 \tag{A.11}$$

on trouve donc

$$\Delta z = 16\sqrt{3}\frac{f^2}{D^2}a_4 = 16\sqrt{3}N^2a_4 \tag{A.12}$$

Dans le cas où on a un milieu d'indice n à droite de la lentille, la relation de conjugaison de Newton s'écrit

$$\overline{FA} \times \overline{F'A'} = -nf^2 \tag{A.13}$$

et donc

$$\Delta z = 16\sqrt{3}n\frac{f^2}{D^2}a_4 = 16\sqrt{3}nN^2a_4 \tag{A.14}$$

A.4 Matrice commandes-pentes

On veut mesurer la matrice d'interaction **D** entre l'analyseur de surface d'onde et le miroir déformable. Cette matrice donne la mesure de l'analyseur de surface d'onde en fonction du mode excité sur le correcteur de surface d'onde. Plutôt que de mesurer l'influence des modes du miroir déformable un par un j'utilise la méthode suivante, développée par Éric Gendron, qui permet une mesure simultanée de l'ensemble des modes[110].

Soit N_a le nombre de modes du miroir déformable. On associe au mode i une fréquence temporelle unique

$$f_i = f_{min} + i - 1 \tag{A.15}$$

et on choisit un nombre de trames $T > 2f_{N_a}$. La fréquence f_{min} doit être choisie de façon à ce que les mesure des modes auxquels on a attribué les fréquences les plus basses ne soit pas influencée par une éventuelle dérive du système au cours du processus de mesure. On construit ensuite une matrice **V** de dimension $N_a \times T$ avec

$$\mathbf{V}_{i,j} = a_i \sin\left(\frac{2\pi(j-1)f_i}{T}\right) \tag{A.16}$$

où a_i est l'amplitude maximale de la commande du mode i. On applique alors successivement les T différentes colonnes de la matrice **V** comme vecteur de commande au miroir déformable et on mesure les pentes correspondantes sur l'analyseur de surface d'onde. Ce faisant on construit une matrice de mesures **S** de dimension $N_m \times T$ où N_m est le nombre de pentes mesurées par l'analyseur (deux fois le nombre de sous-pupilles pour un Shack-Hartmann). La matrice d'interaction est la matrice qui transforme les vecteurs de commandes en vecteurs de mesures, on a donc par définition

$$\mathbf{S} = \mathbf{DV} \tag{A.17}$$

et la matrice d'interaction peut être obtenue en calculant

$$\mathbf{D} = \mathbf{S}\mathbf{V}^{+} \tag{A.18}$$

où $\mathbf{V}^{+}$ est le pseudo-inverse (ou inverse de Moore-Penrose) de **D**.

Alternativement, on peut utiliser la propriété d'orthogonalité des sinus de fréquences temporelles différentes, on a

$$\begin{aligned}(\mathbf{V}\mathbf{V}^t)_{i,j} &= \sum_{k=1}^{T} \mathbf{V}_{i,k}\mathbf{V}^t_{k,j} = \sum_{k=1}^{T} \mathbf{V}_{i,k}\mathbf{V}_{j,k} \\ &= \sum_{k=1}^{T} a_i a_j \sin\left(\frac{2\pi f_i(k-1)}{T}\right)\sin\left(\frac{2\pi f_j(k-1)}{T}\right) = \begin{cases} 0 & (i \neq j) \\ \frac{a_i^2 T}{2} & (i = j) \end{cases}\end{aligned} \tag{A.19}$$

et la matrice d'interaction **D** peut donc s'exprimer comme

$$\begin{aligned}\mathbf{D} &= \mathbf{D}\mathbf{V}\mathbf{V}^t(\mathbf{V}\mathbf{V}^t)^{-1} \\ &= \frac{2}{T}\mathbf{S}\mathbf{V}^t \mathrm{diag}\left(a_1, ..., a_{N_a}\right)^{-1}\end{aligned} \tag{A.20}$$

Pour une même amplitude a appliquée sur tout les modes on a

$$\mathbf{D} = \frac{2}{a^2 T}\mathbf{S}\mathbf{V}^t \tag{A.21}$$

La matrice de commande est le pseudo-inverse $\mathbf{D}^{+}$ de **D**. On peut la calculer par une SVD pour filtrer les valeurs singulières les plus faibles (typiquement inférieures à 10% de la valeur max).

A.5 Matrice Zernike-pentes pour un Shack-Hartmann

On veut construire la matrice Zernike-pentes **M** qui donne la mesure de l'analyseur en fonction de la valeur du coefficient de Zernike. Pour un Shack-Hartmann et sur une pupille circulaire celle-ci est calculable synthétiquement.

Soit N_{sp} le nombre de sous-pupilles du masque. On choisit un nombre de Zernike [1] N_z (en prenant garde de bien inclure tout les degrés azimutaux du degré radial maximum). On calcule alors le gradient moyen sur chaque sous-pupille en x et en y de chaque Zernike et on remplit la matrice **M** de dimension $2N_{sp} \times N_z$ de la façon suivante : les éléments de $\mathbf{M}_{1,i}$ à $\mathbf{M}_{N_{sp},i}$ contiennent les gradients selon x du mode de Zernike i et les éléments de $\mathbf{M}_{N_{sp}+1,i}$ à $\mathbf{M}_{2N_{sp},i}$ contiennent les gradients selon y du mode de Zernike i.

Pour calculer les gradients moyens selon x et y dans les sous-pupilles on utilise le théorème de Green

$$\iint_D \frac{\partial Q}{\partial x} - \frac{\partial P}{\partial y} \mathrm{d}x\mathrm{d}y = \int_C P\mathrm{d}x + Q\mathrm{d}y \tag{A.22}$$

avec D la surface d'une sous-pupille et C le contour de cette surface. Les sous-pupilles étant carrées leur contour C est composé de quatres segments quand la sous-pupille est entièrement contenue dans la pupille et de segments et d'un arc de cercle quand la sous-pupille est à cheval sur le bord de la pupille (voir figure A.4).

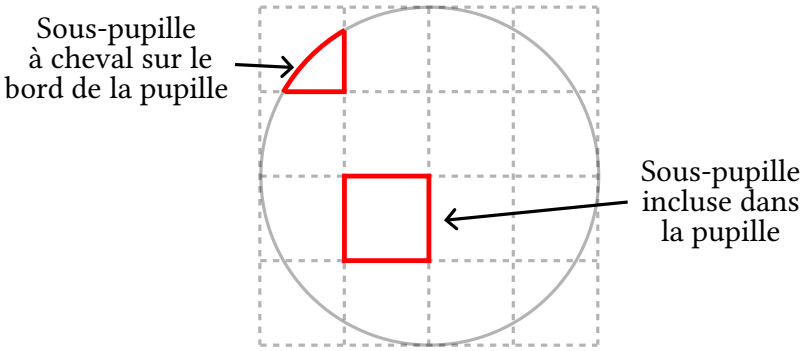


Figure A.4 – Contours des sous-pupille en fonction de leurs positions.

En coordonnées polaires on a

$$\begin{cases} x = r\cos\theta \\ y = r\sin\theta \end{cases} \tag{A.23}$$

et

$$\begin{cases} \mathrm{d}x = -r\sin\theta\mathrm{d}\theta \\ \mathrm{d}y = r\cos\theta\mathrm{d}\theta \end{cases} \tag{A.24}$$

Soit la fonction $Z_i(r,\theta)$ qui donne la valeur du mode de Zernike i en coordonées polaires, on

1. Pour un nombre n de sous-pupilles dans le diamètre on peut typiquement prendre $\frac{(n+1)(n+2)}{2}$ modes de Zernike.

pose $Q = Z_i(r,\theta)$ et $P = 0$, on a alors

$$\begin{aligned}\iint_D \frac{\partial Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)}{\partial x}\mathrm{d}x\mathrm{d}y &= \int_C Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)\mathrm{d}y \\ &= \sum_{segments\in C}\int_{y_1}^{y_2} Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)\mathrm{d}y \\ &+ \sum_{arcs\in C}\int_{\theta_1}^{\theta_2} Z_i(r,\theta) r\cos\theta \mathrm{d}\theta\end{aligned} \tag{A.25}$$

pour le grandient en x. On pose $P = Zer(r,\theta)$ et $Q = 0$ et on a alors

$$\begin{aligned}\iint_D \frac{\partial Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)}{\partial y}\mathrm{d}x\mathrm{d}y &= \int_C -Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)\mathrm{d}x \\ &= \sum_{segments\in C}\int_{x_1}^{x_2} -Zer\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)\mathrm{d}x \\ &+ \sum_{arcs\in C}\int_{\theta_1}^{\theta_2} Zer(r,\theta) r\sin\theta \mathrm{d}\theta\end{aligned} \tag{A.26}$$

pour le gradient en y.

On peut calculer l'aire A de la sous-pupille si on a $\frac{\partial Q}{\partial x} - \frac{\partial P}{\partial y} = 1$, par exemple on peut prendre $Q = x$ et $P = 0$, on a alors

$$A = \iint_D \mathrm{d}x\mathrm{d}y = \int_C x\mathrm{d}y = \sum_{segments\in C}\int_{y_1}^{y_2} x\mathrm{d}y + \sum_{arcs\in C}\int_{\theta_1}^{\theta_2} (r\cos\theta)^2\mathrm{d}\theta \tag{A.27}$$

On a alors les gradients moyens en x et en y dans notre sous-pupille

$$s_i^x = \frac{\iint \frac{\partial Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)}{\partial x}\mathrm{d}x\mathrm{d}y}{A} \tag{A.28}$$

et

$$s_i^y = \frac{\iint \frac{\partial Z_i\left(\sqrt{x^2+y^2}, \arctan\frac{y}{x}\right)}{\partial y}\mathrm{d}x\mathrm{d}y}{A} \tag{A.29}$$

Ces intégrales sont calculées numériquement par quadrature de Gauss-Legendre.

A.6 Moindre carrés pondérés

On construit la matrice diagonale $\mathbf{W}$ qui contient les poids attribués à chaque sous-pupille (par exemple l'inverse de la variance de la mesure du centroïde). Soit $\mathbf{D}$ la matrice dont on veut faire l'inversion (par exemple la matrice de pentes-commandes), son pseudo-inverse est

$$\mathbf{D}^+ = (\mathbf{D}^t\mathbf{D})^{-1}\mathbf{D}^t \tag{A.30}$$

où $^{-1}$ est l'inverse classique (qu'il est possible de calculer via la SVD si l'on souhaite faire un filtrage sur les valeurs singulières). Son pseudo-inverse pondéré par $\mathbf{W}$ est

$$\mathbf{D}_p^+ = (\mathbf{D}^t\mathbf{W}\mathbf{D})^{-1}\mathbf{D}^t\mathbf{W} \tag{A.31}$$

A.7 Diversité de phase

On rappel que dans le cadre d'une mesure d'aberrations par diversité de phase on cherche a minimiser la somme des carrées des résidus r

$$(a_2, a_3, ..., a_N) = \underset{a_2,a_3,...,a_N}{\operatorname{argmin}} \sum_k \sum_x \sum_y r^2(k, x, y) \tag{A.32}$$

$$r(k, x, y) = I_k(x, y) - \left|\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi(k)}\right](x, y)\right|^2 \tag{A.33}$$

avec

$$\varphi(k) = \frac{2\pi}{\lambda}\left(v_k Z_d + \sum_n a_n Z_n\right) \tag{A.34}$$

où λ est la longueur d'onde, P la fonction pupille, $I_k(x, y)$ et v_k sont respectivement l'image de la PSF et l'amplitude de l'aberration appliquée pour la diversité k, Z_d le polynôme de Zernike sur lequel est appliqué la diversité (typiquement la défocalisation) et les a_n les amplitudes des aberrations recherchées.

La méthode de minimisation utilisée, Levenberg-Marquardt, a besoin du jacobien de r, c'est-à-dire des dérivées de r par rapport à chacun des paramètres que l'on cherche a retrouver (les a_n). Ces dérivées peuvent s'exprimer analytiquement

$$\begin{aligned}
\frac{\partial r}{\partial a_n} &= -\frac{\partial\left(\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]\overline{\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]}\right)}{\partial a_n} \\
&= -\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]\frac{\partial\overline{\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]}}{\partial a_n} - \frac{\partial\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]}{\partial a_n}\overline{\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]} \\
&= -\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]\overline{\mathscr{F}\left[i\frac{2\pi}{\lambda}Z_n Pe^{i\varphi}\right]} - \mathscr{F}\left[i\frac{2\pi}{\lambda}Z_n Pe^{i\varphi}\right]\overline{\mathscr{F}\left[Pe^{i\varphi}\right]}
\end{aligned} \tag{A.35}$$

ce qui permet de se passer d'une estimation numérique du jacobien, coûteuse en temps de calcul et peu stable numériquement.

A.8 Reconstruction de la phase à partir de ses gradients

Étant donné une mesure de pentes, c'est-à-dire du gradient de la phase dans les deux directions x et y

$$\begin{aligned}
s^x(x, y) &= \frac{\partial\varphi}{\partial x}(x, y) \\
s^y(x, y) &= \frac{\partial\varphi}{\partial y}(x, y)
\end{aligned} \tag{A.36}$$

je présente ci-dessous deux méthodes pour reconstruire φ.

A.8.1 Reconstructeur de Southwell

Le reconstructeur de Southwell[79] permet de reconstruire φ sur une grille alignée sur la grille de mesure des gradients. On considère les relations de type différences finies suivantes

$$\begin{aligned} \frac{s^x(x+h,y)+s^x(x,y)}{2} &= \frac{\varphi(x+h,y)-\varphi(x,y)}{h} \\ \frac{s^y(x,y+h)+s^y(x,y)}{2} &= \frac{\varphi(x,y+h)-\varphi(x,y)}{h} \end{aligned} \tag{A.37}$$

où h est l'espace entre les points de mesures (e.g. la taille des pixels de la caméra pyramide). On construit le système matriciel qui représente les équations ci-dessus et on le résout pour retrouver φ.

Pour passer d'une représentation des données dans la pupille à une représentation vectorielle on définit une fonction $f(x,y)$ qui associe à la position (x,y) dans la pupille son indice i dans un vecteur. On construit le vecteur $\mathbf{s}$ qui contient les valeurs des gradients dans les deux directions

$$\begin{aligned} \mathbf{s}_{f(x,y)} &= s^x(x,y) \\ \mathbf{s}_{N+f(x,y)} &= s^y(x,y) \end{aligned} \tag{A.38}$$

où N est le nombre de points de mesures dans la pupille. On construit ensuite deux matrices, $\mathbf{A}$ de dimensions $2N \times N$, et $\mathbf{D}$ de dimensions $2N \times 2N$ telles que

$$\begin{aligned} \mathbf{A}_{f(x,y),f(x,y)} &= \mathbf{A}_{N+f(x,y),f(x,y)} = -\frac{1}{h} \\ \mathbf{A}_{f(x,y),f(x+h,y)} &= \mathbf{A}_{N+f(x,y),f(x,y+h)} = \frac{1}{h} \end{aligned} \tag{A.39}$$

et

$$\mathbf{D}_{f(x,y),f(x,y)} = \mathbf{D}_{f(x,y),f(x+h,y)} = \mathbf{D}_{N+f(x,y),N+f(x,y)} = \mathbf{D}_{N+f(x,y),N+f(x,y+h)} = \frac{1}{2} \tag{A.40}$$

qui contiennent le système d'équation A.37 de sorte que

$$\mathbf{A\Phi} = \mathbf{Ds} \tag{A.41}$$

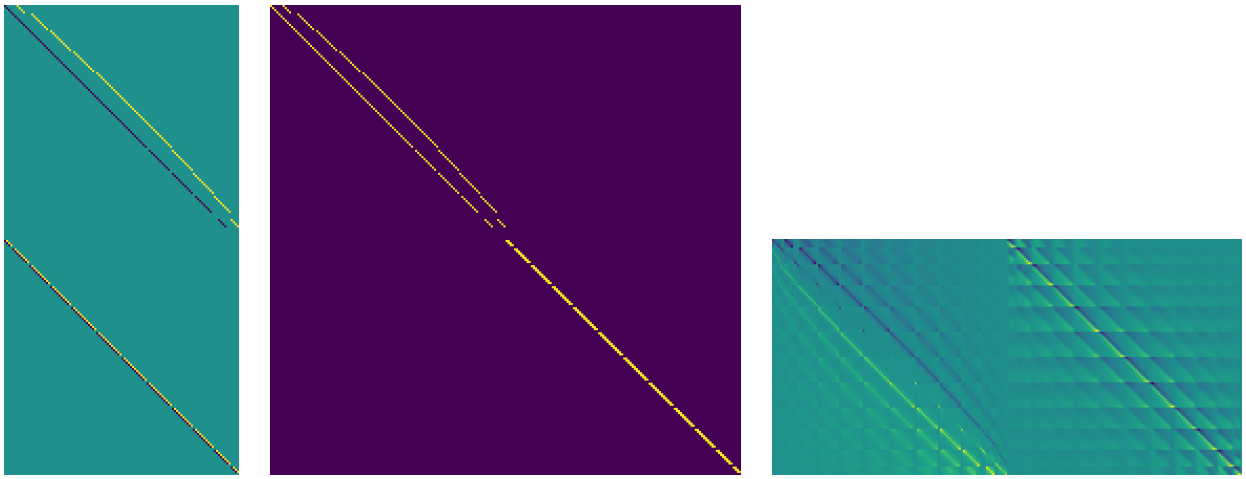
où $\mathbf{\Phi}$ est le vecteur qui contient les valeurs de la phase qu'on peut extraire avec le pseudo-inverse car $\mathbf{A}^t\mathbf{A}$ est singulière

$$\mathbf{\Phi} = (\mathbf{A}^t\mathbf{A})^+\mathbf{A}^t\mathbf{DS} \tag{A.42}$$

pour finalement reconstruire la carte de phase

$$\varphi(x,y) = \mathbf{\Phi}_{f(x,y)} \tag{A.43}$$

La figure A.5 donne une représentation de ces matrices pour une pupille définie sur un support de 12×12 pixels. Cette méthode de reconstruction est problématique dès lors que la taille de la pupille devient grande car N croit quadratiquement avec son diamètre et l'inversion de $\mathbf{A}^t\mathbf{A}$ peut alors prendre un temps considérable. La méthode par transformée de Fourier présentée dans la section suivante ne souffre pas de ce problème.



A **D** $(\mathbf{A}^t\mathbf{A})^+\mathbf{A}^t\mathbf{D}$

Figure A.5 – Matrices utilisées pour reconstruire la phase à partir des pentes avec la méthode de Southwell. La fonction f utilisée ici parcourt la pupille ligne par ligne.

A.8.2 Reconstruction par transformée de Fourier

On va utiliser les propriétés suivantes de la transformée de Fourier

$$\begin{aligned}\mathscr{F}\left[\frac{\partial\varphi(x,y)}{\partial x}\right] &= 2\pi i f_x \mathscr{F}[\varphi(x,y)] \\ \mathscr{F}\left[\frac{\partial\varphi(x,y)}{\partial y}\right] &= 2\pi i f_y \mathscr{F}[\varphi(x,y)]\end{aligned} \tag{A.44}$$

pour retrouver la phase dont on connait les pentes s^x et s^y. En partant de la transformée de Fourier du laplacien de φ

$$\begin{aligned}\mathscr{F}[\Delta\varphi] &= \mathscr{F}\left[\frac{\partial^2\varphi}{\partial x^2} + \frac{\partial^2\varphi}{\partial y^2}\right] \\ &= 2\pi i\left(f_x\mathscr{F}[s^x] + f_y\mathscr{F}[s^y]\right) \\ &= -4\pi^2(f_x^2 + f_y^2)\mathscr{F}[\varphi]\end{aligned} \tag{A.45}$$

On a donc

$$\mathscr{F}[\varphi] = \frac{2\pi i(f_x\mathscr{F}[s^x] + f_y\mathscr{F}[s^y])}{-4\pi^2(f_x^2 + f_y^2)} \tag{A.46}$$

qui n'est pas définit en $f_x = f_y = 0$. Cette fréquence spatiale nulle correspond à un piston qui n'est pas reconstructible à partir de ses gardients. La valeur de $\mathscr{F}[\varphi]$ peut être numériquement fixé à 0 en $f_x = f_y = 0$. Finalement, on a

$$\varphi = \mathscr{F}^{-1}\left[\frac{f_x\mathscr{F}[s^x] + f_y\mathscr{F}[s^y]}{2\pi i(f_x^2 + f_y^2)}\right] \tag{A.47}$$

A.9 Résidu après fermeture de la boucle d'optique adaptative

On note $r(n)$ le résidu d'aberration de phase après n pas en boucle fermée de l'OA. On a une amplitude $r(0)$ d'aberration initiale. Après un pas on a $r(1) = r(0) - gr(0)$ où g est le gain de la boucle (eq 2.8). De manière générale on a

$$\begin{aligned} r(n) &= r(n-1) - gr(n-1) \\ &= (1-g)r(n-1) \\ &= (1-g)^2 r(n-2) \\ &= (1-g)^3 r(n-3) \\ &= \dots \\ &= (1-g)^n r(0) \end{aligned} \tag{A.48}$$

Annexe B

Photométrie

B.1 Nombre de photons émis

On a la puissance du laser P et on cherche à calculer un ordre de grandeur du nombre de photons émis par un fluorophore illuminé au foyer de l'objectif. La puissance des laser en fonction de leur commande a été mesurée (figure B.1) dans le plan champ situé entre LI1 et LI2 (voir figure 3.5). Je note T_e la transmission du système depuis ce plan jusqu'à l'échantillon, avec le laser à 488nm on a $T_e = 47\%$ (voir section 3.6.2). Au foyer de l'objectif la puissance est répartie sur un disque de rayon $\frac{\lambda}{2\text{NA}}$ et de surface

$$S = 10^4 \pi \left(\frac{\lambda}{2\text{NA}} \right)^2 [\text{cm}^2] \tag{B.1}$$

avec λ la longueur d'onde du laser. On a donc une intensité de

$$I = \frac{PT_e}{S} [\text{W/cm}^2] \tag{B.2}$$

et la densité de flux de photon du faisceau d'illumination est

$$F = \frac{I\lambda}{hc} [\text{photons/cm}^2\text{/s}] \tag{B.3}$$

où h est la constante de Planck et c la vitesse de la lumière.

La base de donnée FPbase[111] fournit le rendement quantique Q, la durée de vie τ_f de l'état excité et le coefficient d'extinction ε de la plupart des fluorophores. Avec la EGFP on a [1] $Q = 60\%$, $\tau_f = 2.6\text{ns}$ et $\varepsilon = 55900\text{/M/cm}$. On peut convertir le coefficient d'extinction en une section efficace d'absorption σ par la relation suivante[112]

$$\sigma = 3.82 \times 10^{-21} \varepsilon [\text{cm}^2] \tag{B.4}$$

L'émission d'un fluorophore en fonction de l'intensité d'excitation en prenant en compte la saturation[113] est

$$P_e = \frac{I\sigma Q}{1 + F\sigma\tau_f} [\text{W}] \tag{B.5}$$

1. https://www.fpbase.org/protein/egfp/

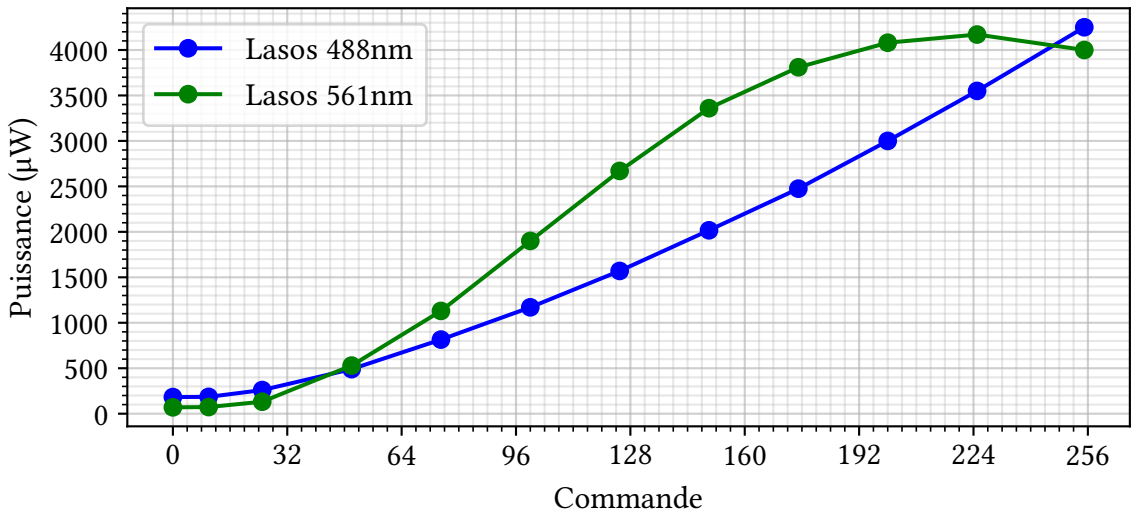


Figure B.1 – Puissance mesurée des lasers au niveau du plan champ entre LI1 et LI2 en fonction de la commande numérique.

Le nombre de fluorophores dans le volume d'excitation de l'objectif est (en réalité la PSF n'est pas sphérique)

$$N \approx c_f \times N_a \times \frac{4}{3}\pi\left(\frac{\lambda}{2\mathrm{NA}}\right)^3 \tag{B.6}$$

où N_a est la constante d'Avogadro et c_f la concentration molaire en fluorophore.

La puissance émise par l'ensemble des fluorophores est donc

$$P_e^{tot} = NP_e[\mathrm{W}] \tag{B.7}$$

B.2 Nombre de photons détectés

La proportion C des photons émis collectés par l'objectif dépend de l'angle solide Ω intercepté par celui-ci, on a

$$\Omega = 2\pi\left(1 - \cos\arcsin\left(\frac{\mathrm{NA}}{n}\right)\right)[\mathrm{sr}] \tag{B.8}$$

et donc

$$C = \frac{\Omega}{4\pi} = 6.2\% \tag{B.9}$$

pour NA=0.734 et n=1.52.

Le spectre de transmission $T_f(\lambda)$ du filtre d'émission MF525-39 ne laisse passer qu'une partie K du spectre d'émission $E_{EGFP}(\lambda)$ de la EGFP (voir figure B.2), on a

$$K = \frac{\int T_f \times E_{EGFP}\,\mathrm{d}\lambda}{\int E_{EGFP}\,\mathrm{d}\lambda} = 60\% \tag{B.10}$$

et la longueur d'onde moyenne λ_e du spectre transmis est

$$\lambda_e = \frac{\int \lambda \times T_f \times E_{EGFP}\,\mathrm{d}\lambda}{\int T_f \times E_{EGFP}\,\mathrm{d}\lambda} = 520\mathrm{nm} \tag{B.11}$$

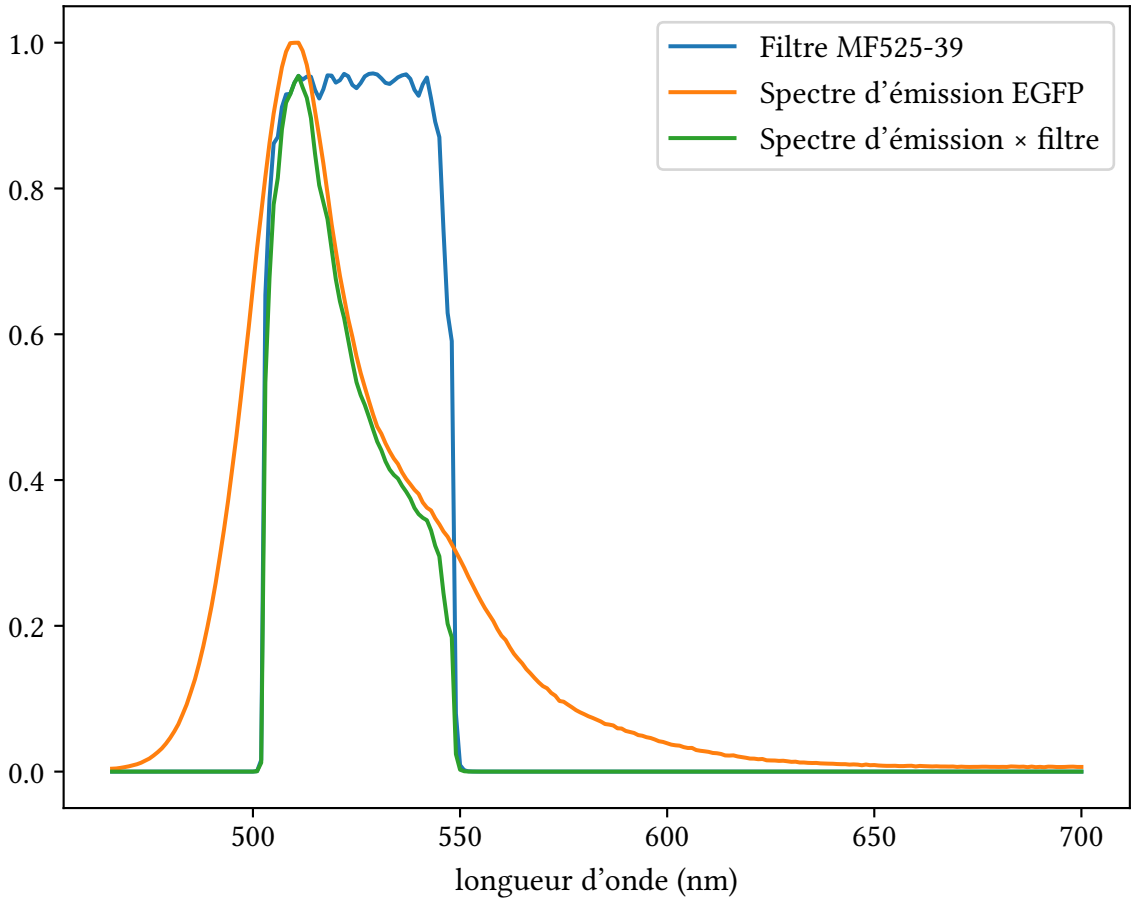


Figure B.2 – Portion du spectre d'émission de la GFP acceptée par le filtre d'émission.

Je note $T_o = 85\%$ (voir tableau 3.6) la transmission de l'objectif et $T_d = 37\%$ la transmission entre le plan champ situé entre L1 et L2 et le détecteur (MPPC) à 520nm (une séparatrice 50/50 était placée devant le détecteur au moment de la mesure). Le rendement quantique du MPPC à 520nm est $Q_d = 35\%$. Le nombre de photons n détectés est donc

$$n = CT_oKT_dQ_d\frac{P_e^{tot}\lambda_e}{hc} \tag{B.12}$$

Le nombre d'impulsions m comptées pendant un temps de pose Δt et pour un nombre de photons détectés n est (voir section 3.5.2)

$$m = \Delta t n e^{-n\tau} \tag{B.13}$$

où $\tau = 20$ns est la durée des impulsions TTL générées par le comparateur du MPPC.

B.3 Application

Il me manque la concentration molaire c_f pour faire le lien entre la puissance du laser et le nombre d'impulsions m comptées par le système de détection. Je vais donc procéder autrement et calculer cette concentration à partir du nombre d'impulsions mesurées par le système de détection et de la puissance laser utilisée. Je prends l'image de droite de la figure 3.23 comme donnée[1]. L'image a été enregistrée avec une puissance de $P \approx 1\text{mW}$ et un temps de pose de $\Delta t = 12.8\mu\text{s}$ par pixel. Je mesure environ $m = 100$ sur l'image dans une zone présentant une structure fluorescente. La figure B.3 montre la courbe de $m(c_f)$ calculée à partir de tout ce qui précède. On voit que la concentration molaire pour $m = 100$ peut prendre deux valeurs différentes en fonction du niveau de saturation du détecteur. Je sais que je me trouve dans la partie gauche de la courbe car une saturation du détecteur conduirait à une inversion de contraste entre les structures fluorescentes et l'arrière plan. Je conclus donc que la concentration molaire en fluorophore doit être d'environ 1µmol/l ce qui est un ordre de grandeur raisonable.

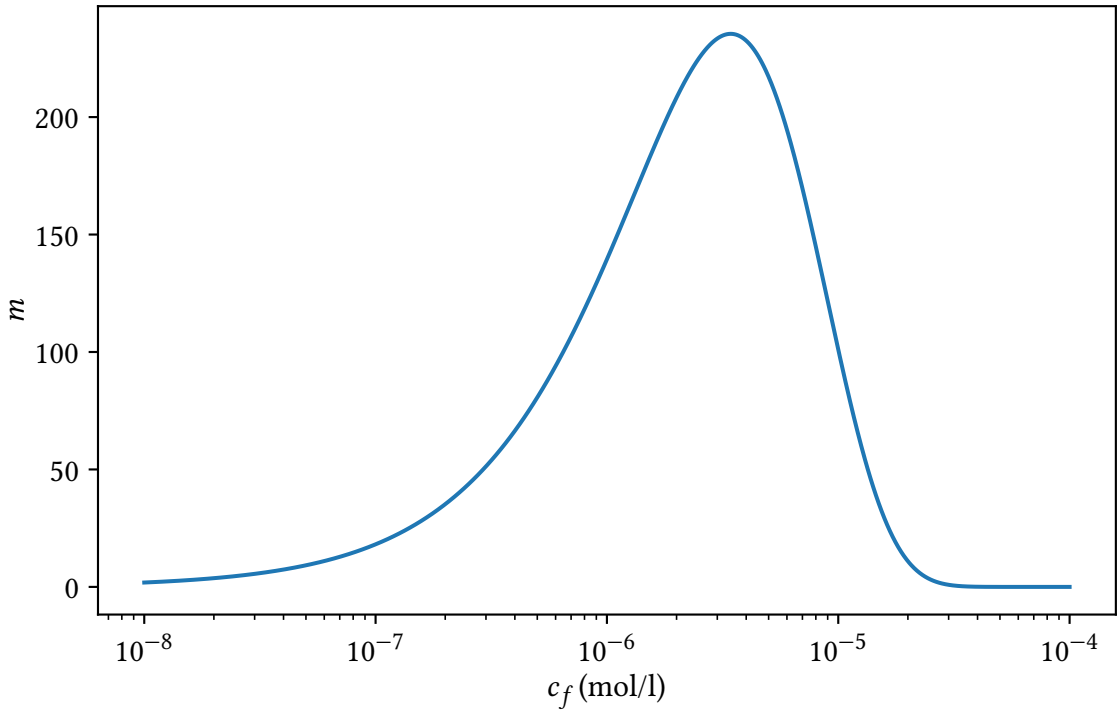


Figure B.3 – Nombre d'impulsions m comptées par le système de détection en fonction de la concentration molaire en fluorophore c_f pour une puissance d'illumination de $P = 1\text{mW}$ et un temps de pose de $\Delta t = 12.8\mu\text{s}$.

1. Cette image a été réalisée avec un trou confocal de 300µm soit environ 11AU, idéalement il faudrait une image enregistrée avec un trou confocal fermé à 1AU pour ne mesurer que les fluorophores présents dans le volume focal.

Annexe C

Schémas électroniques

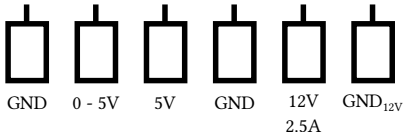


FIGURE C.1 – Connectiques des laser.

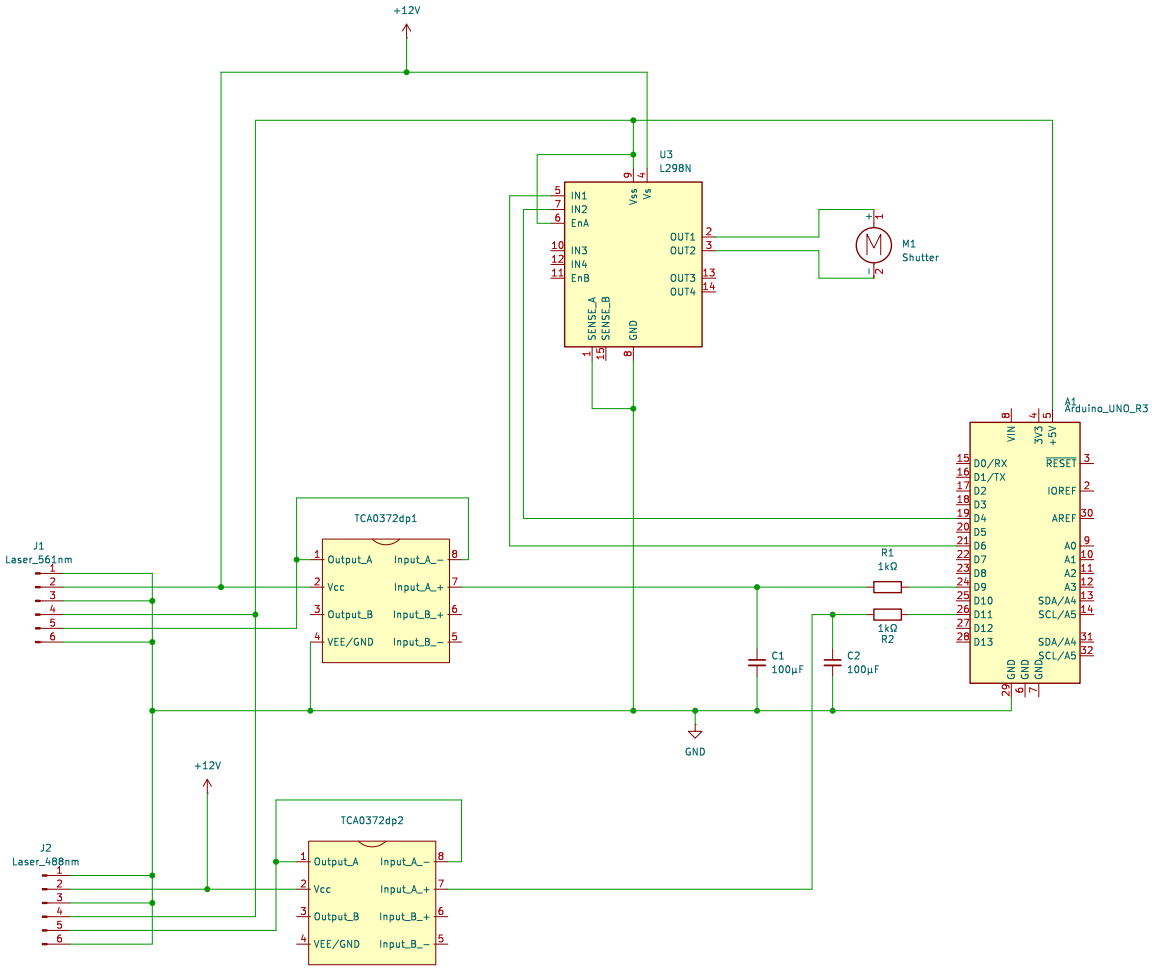


FIGURE C.2 – Schéma du système de contrôle des lasers.

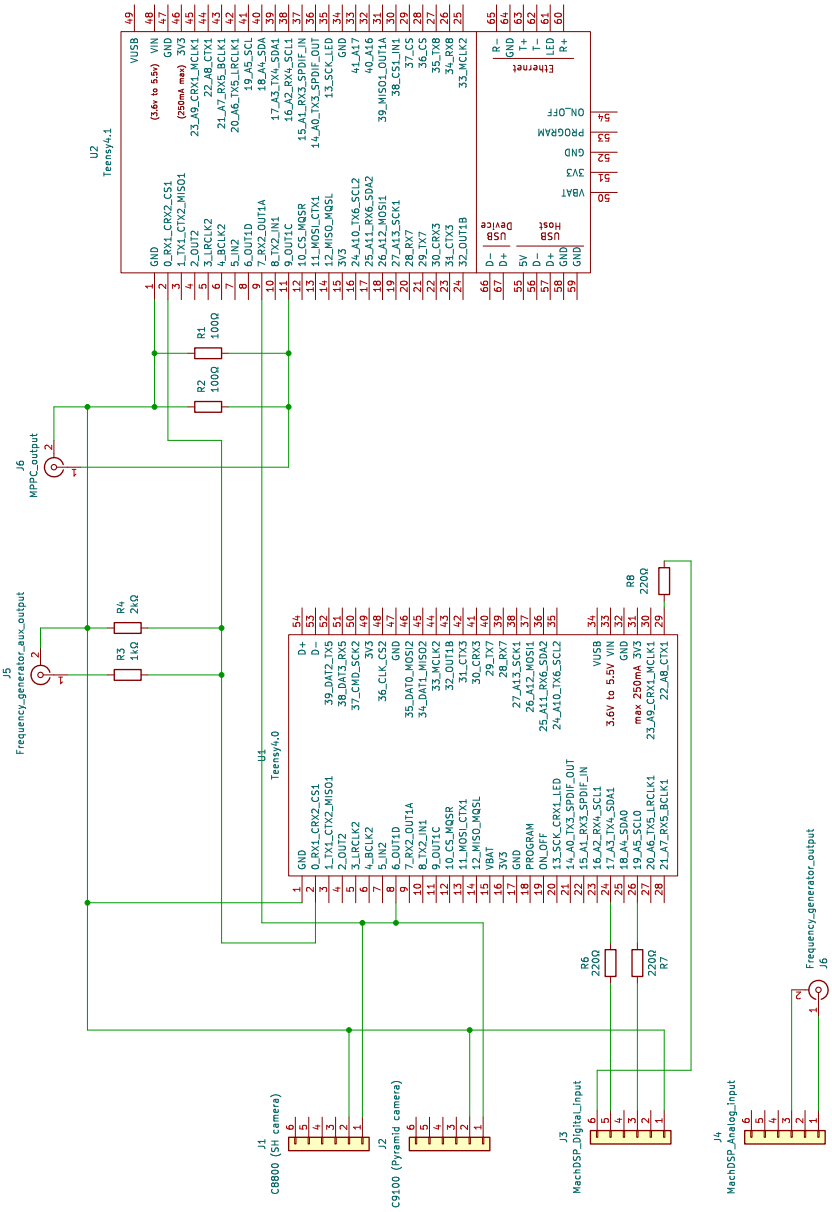


Figure C.3 – Schéma du système de balayage et d'acquisition d'image.

Annexe D

Étalonnage des paramètres du balayage

On veut un champ de $D_x \times D_y$ et on a une PSF d'excitation de 1µm^2 (obtenue en fermant légèrement la pupille de la voie d'injection laser car une ouverture de NA=0.734 conduit à une plus petite largeur de tache d'Airy). Pour être échantillonné à Nyquist-Shannon on a besoin de N = D/1µm × 2 échantillons dans chaque direction.

Mesure de la réponse des galvos

Le programme de MachDSP permet de rentrer une amplitude C de commande en degrée. Cette amplitude correspond au déplacement maximal (par rapport à 0°) effectué lorsque la commande est maximale : -10 ou 10V en analogique (axe X), 0 ou 65535 en numérique (axe Y).

Pour vérifier l'étalonnage de cette commande C, on place une camera (Alvium) successivement derrière les lentilles qui suivent chaque galvo, L4 et L2 respectivement (on a $f_4 = f_2 =$ 100mm). On mesure l'amplitude du déplacement sur le capteur et on compare à ce qu'on doit théoriquement obtenir : $D_a = \tan(C \times 2\pi/360 \times 2) \times 100\text{mm}$ où le facteur 2 prend en compte le fait que l'angle optique est égal à deux fois l'angle mécanique.

On applique un offset de 1° sur galvo X (valeur assez faible pour ne pas avoir de problème avec les aberrations de champ de la lentille et pour ne pas sortir du capteur de la caméra) et on mesure un déplacement de 1601 pixels de 2.2µm soit D_m = 3.52mm. Or, on attendait un déplacement $D_a = \tan(1 \times 2\pi/360 \times 2) \times 100\text{mm} = 3.49\text{mm}$. On determine le facteur de correction entre la valeur de commande logiciel et le déplacement réalisé : $R_x \approx \frac{D_m}{D_a} = \frac{3.52}{3.49} =$ 1.01.

De même sur galvo Y, on applique un offset de 1° et on mesure un déplacement $D_m =$ $1389 \times 2.2\text{µm} = 3.06\text{mm}$. On a $R_y \approx \frac{3.06}{3.49} = 0.88$.

Vérification du grandissement du montage objectif à L3

La focal de l'objectif est dépendante de l'indice de réfraction du milieu d'immersion.

$$f_o = \frac{12.19\text{mm}}{n} \tag{D.1}$$

Le grandissement attendu dans le plan champ entre L3 et L4 est $G = G_1 G_2$ avec $G_1 = f_1/f_o =$ $n \times 250/12.19$ et $G_2 = f_3/f_2 = 1$. On a donc des grandissement de $G_{huile} = 31$ dans l'huile (n=1.51), $G_{eau} = 27.3$ dans l'eau (n=1.33) et $G_{air} = 20.5$ dans l'air (n=1).

On place une grille d'étalonnage sous l'objectif dans l'air, on l'illumine en lumière blanche et on enregistre son image avec la camera alvium derrière L5 (sans rien balayer). On mesure

environ 27.2 pas de grille sur la camera, sachant que le capteur fait 2590 pixels de 2.2µm dans la direction mesurée et que le pas de grille est de 10µm, le rapport entre la taille attendue 10µm × 27.2 × 20.5 = 5.58mm et la taille mesurée 2590 × 2.2µm = 5.70mm est de 0.98.

On place maintenant la grille dans l'eau et on l'observe de la même façon. On mesure environ 21 pas de grille. Par la même méthode, on trouve que le rapport entre la taille attendue et la taille mesurée est de 10e-6×21×15.4 /(2590 × 2.2e-6) = 1.01.

Les grandissements du montage sont donc conformes à ce que nous avions prévu.

Commande analogique (Galvo X)

On utilise le GBF pour générer une rampe de tension (un triangle avec 90% d'asymétrie et 2.5V de valeur max (5Vpp)). Si l'on balaye à une fréquence f_{GBF}, le temps de mesure totale pour une ligne est de $\frac{1}{f_{GBF}} \times (1 - K_s - K_w)$ (on perd K_s = 10% de la période pour le retour du galvo (avec 90% d'asymétrie) et K_w = 10% de la période à cause du décalage du signal de synchronisation avec le début de la rampe). Ces paramètres sont indépendants de la fréquence (voir section 3.5.2).

L'amplitude utile de la rampe de tension se situe entre le signal de synchronisation généré par le GBF et le haut de la rampe. Quelque soit la fréquence de balayage on n'utilise que 80% de la rampe pour le balayage d'une ligne.

La largeur du champ attendue D_x(m) dans l'échantillon pour une commande C_x(°) est :

$$D_x = \frac{f_4}{G} \times 2[\text{peak} - \text{to} - \text{peak}] \times \tan\left(C_x[^\circ] \times R_x \times (1 - K_s - K_w) \times \frac{2\pi}{360}[\text{rad}/^\circ] \times \frac{2.5[\text{V}]}{10[\text{V}]} \times 2\right) \tag{D.2}$$

avec le facteur 2 de conversion entre angle mécanique et angle optique. Le facteur 2.5/10 vient de l'amplitude maximale générée par le GBF (2.5V) par rapport à l'amplitude maximale attendue par la carte MachDSP (10V).

Si l'on veut 125µm de champ dans l'huile, l'amplitude de commande de galvo X configurée dans MachDSP doit être de $\arctan\left(\frac{125e-6\times31}{2\times100e-3}\right) \times \frac{360\times10}{2\times0.8\times1.01\times2\pi\times2.5}$ = 2.75°. On a besoin de 125µm/1µm × 2 = 250 échantillons. Le teensy utilise une hologe interne dont la fréquence est f_{teensy}=150MHz. Le nombre de cycles pour chaque échantillon doit être de

$$\text{gate} = \frac{1}{f_{GBF}} \times (1 - K_s - K_w) \times \frac{1}{250} \times f_{teensy} \tag{D.3}$$

Pour ne pas dépasser 1s pour balayer l'ensemble du champ (limite imposée par le temps d'intégration de la caméra SH) on choisit f_{GBF} = 250Hz. On a alors gate = 1920.

Commande numérique (Galvo Y)

On utilise un teensy pour générer des trames de commandes numériques au format XY2-100.

La largeur du champ attendue en Y dans l'échantillon D_y(m) pour une commande C_y(°) est :

$$D_y = \frac{f_2}{G} \times 2[\text{peak} - \text{to} - \text{peak}] \times \tan\left(C_y[^\circ] \times R_y \times \frac{2\pi}{360}[\text{rad}/^\circ] \times \frac{\text{step}}{65536} \times 2\right) \tag{D.4}$$

où comme précédemment le facteur 2 vient de la conversion entre angle mécanique et angle optique. On peut choisir l'amplitude de commande C_y sur MachDSP de façon arbitraire et

ensuite calculer le nombre step de pas nécessaires pour faire les déplacements voulus. Pour avoir une bonne résolution, il est tout de même préférable de choisir une amplitude assez petite.

On a besoin d'un pas élémentaire de D_y=1µm / 2 = 0.5µm et on peut choisir n'importe quel couple (C_y, step) qui vérifie l'équation D.4. Par exemple si l'on choisit C_y=0.95° pour l'amplitude de commande sur MachDSP, on doit prendre (dans l'huile)

$$\text{step} = \arctan\left(\frac{0.5e-6\times 31}{2\times 100e-3}\right)\times\frac{360\times 65536}{C_y\times 2\pi\times 2\times 0.88} = 174 \tag{D.5}$$

En pratique on ajuste C_y de façon à ce que step soit le plus proche possible d'un entier (ici step = 174.05). On peut aussi choisir arbitrairement step et déterminer C_y, sachant que dans MachDSP C_y n'accepte que deux décimales. Dans les deux cas on doit avoir step × N < 65536 où N est le nombre de pas nécessaires pour balayer la colonne.

Le galvo est à 0° pour une commande de 32768, la position de départ doit donc être

$$\text{pos_start} = 32768 - 250/2\times\text{step} = 11018 \tag{D.6}$$

Le déplacement de galvo Y doit avoir lieu pendant le retour de galvo X au début de la ligne, on note K_d la fraction de la période du GBF qui correspond au temps d'attente entre le début du retour de galvo X et l'envoi de la commande de déplacement de galvo Y. Le temps d'attente entre la réception du signal de synchronisation du GBF et l'envoi de la commande de changement de ligne à galvo Y doit être

$$\text{wait} = \frac{1}{f_{GBF}}\times(1-K_s-K_w+K_d) \tag{D.7}$$

pour 250Hz on a wait = 3400µs avec K_d=0.05.

Cet étalonnage suppose une réponse instantanée des galvanomètres à leur commande. La figure D.1 montre le déphasage de la réponse des galvanomètres par rapport à la commande quand f_{GBF} = 250Hz. On voit que pour cette fréquence le décalage K_w entre les commandes de «retour à la ligne» et le retour effectif permet de masquer le temps de réponse des galvanomètres.

Récapitulatif

Si l'on souhaite enregistrer un champ de D×D avec une PSF dont le rayon d'Airy est A on a besoin de N×N pixels avec N = D/A pour avoir un échantillonnage à Shanon. On choisit une fréquence de balayage f_{GBF} et on doit configurer les paramètres logiciels suivants dans *mppcgui*, *galvo_params* et *machDSP*

wait (µs)	$\frac{1}{f_{GBF}}\times(1-K_s-K_w+K_d)\times 1e6$
gate	$\frac{1}{f_{GBF}}\times(1-K_s-K_w)\times\frac{1}{N}\times f_{teensy}$
step	$\arctan\left(\frac{A\times G_1}{2\times f_2}\right)\times\frac{360\times 65536}{C_y\times 2\pi\times 2\times R_y}$
pos_start	$32768 - N/2\times\text{step}$
C_x (°)	$\arctan\left(\frac{D\times G}{2\times f_4}\right)\times\frac{360\times 10}{2\times(1-K_s-K_w)\times R_x\times 2\pi\times 2.5}$

C_y étant choisi de façon à avoir step le plus proche possible d'un nombre entier.

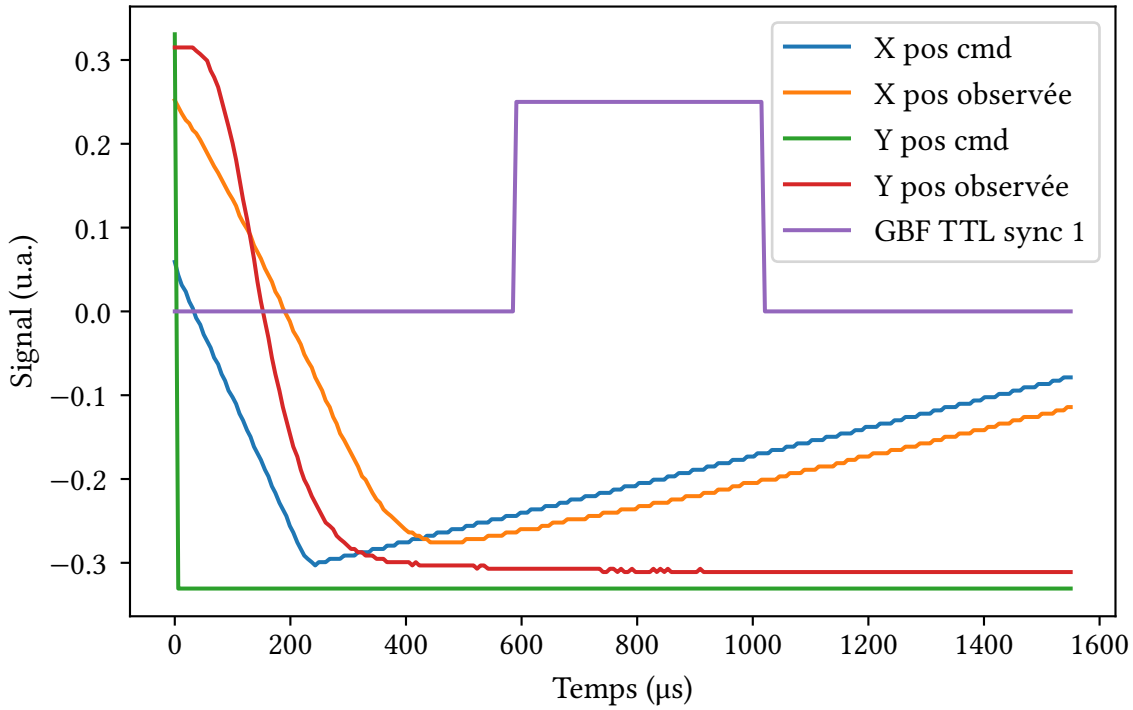


Figure D.1 – Réponse des galvanomètres à la commande enregistrée au moment du retour de la dernière à la première ligne pour $f_{GPF} = 250\text{Hz}$.

Annexe E

Ray tracing

Cette partie donne les formules utilisées dans le logiciel de ray tracing que j'ai développé.

E.1 Rayon

L'ensemble **P** des points par lesquels passe un rayon dans un milieu homogène est caractérisé par

$$\mathbf{P}(t) = \mathbf{a}t + \mathbf{b} = (x, y, z) \tag{E.1}$$

où $\mathbf{a} = (a_x, a_y, a_z)$ est le vecteur directeur du rayon, $\mathbf{b} = (b_x, b_y, b_z)$ est son origine et $t \in [-\infty, \infty]$ est le paramètre qui permet de décrire l'ensemble.

E.2 Plan

Un plan est entièrement caractérisé par le vecteur position $\mathbf{p_0}$ d'un point de ce plan et la normale $\mathbf{n}$ au plan. Tout les vecteurs positions $\mathbf{p}$ des points du plan vérifient

$$(\mathbf{p} - \mathbf{p_0}) \cdot \mathbf{n} = 0 \tag{E.2}$$

On cherche à calculer l'intersection d'un rayon avec ce plan, si $\mathbf{P}(t)$ est un point du rayon qui appartient au plan alors on a

$$(\mathbf{P}(t) - \mathbf{p_0}) \cdot \mathbf{n} = (\mathbf{a}t + \mathbf{b} - \mathbf{p_0}) \cdot \mathbf{n} = 0 \tag{E.3}$$

soit

$$t = \frac{(\mathbf{p_0} - \mathbf{b}) \cdot \mathbf{n}}{\mathbf{a} \cdot \mathbf{n}} \tag{E.4}$$

Il n'y a pas d'intersection si $\mathbf{a} \cdot \mathbf{n} = 0$, c'est-à-dire si le rayon est parallèle au plan (on ignore le cas où le rayon est dans le plan).

E.3 Surfaces quadratiques

E.3.1 Dioptre sphérique

Une sphère de rayon r centrée en $\mathbf{c} = (c_x, c_y, c_z)$ est caractérisée par l'équation

$$(x - c_x)^2 + (y - c_y)^2 + (z - c_z)^2 = r^2 \tag{E.5}$$

Pour calculer l'intersection d'un rayon avec la sphère on cherche les points situés à une distance r du centre $\mathbf{c}$ de la sphère, il faut donc résoudre

$$(\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}) \cdot (\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}) - r^2 = 0 \tag{E.6}$$

soit une fois développé

$$\mathbf{a} \cdot \mathbf{a}t^2 + 2\mathbf{a} \cdot \mathbf{b}t - 2\mathbf{a} \cdot \mathbf{c}t + \mathbf{b} \cdot \mathbf{b} - 2\mathbf{b} \cdot \mathbf{c} + \mathbf{c} \cdot \mathbf{c} - r^2 = 0 \tag{E.7}$$

On pose $A = \mathbf{a} \cdot \mathbf{a}$, $B = 2\mathbf{a} \cdot (\mathbf{b} - \mathbf{c})$ et $C = (\mathbf{b} - \mathbf{c}) \cdot (\mathbf{b} - \mathbf{c}) - r^2$ et on a deux solutions

$$t_1 = \frac{-B - \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \tag{E.8}$$

et

$$t_2 = \frac{-B + \sqrt{B^2 - 4AC}}{2A} \tag{E.9}$$

En pratique pour simuler des lentilles on a surtout besoin de l'intersection avec un hémisphère, pour ce faire on associe une direction $\mathbf{d}$ à la sphère. On calcule ensuite les deux positions $\mathbf{P}(t_1)$ et $\mathbf{P}(t_2)$ et on choisit par convention de ne garder que le point pour lequel $(\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}) \cdot \mathbf{d} > 0$.

Pour calculer les rayons réfléchi et réfracté sur la surface sphérique on a besoin de la normale à cette surface, qui est directement donnée par

$$\mathbf{n} = \frac{\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}}{\sqrt{(\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}) \cdot (\mathbf{P}(t) - \mathbf{c})}} \tag{E.10}$$

Selon le rayon ($\mathbf{P}(t) = \mathbf{a}t + \mathbf{b}$) d'intérêt, on inverse ensuite éventuellement le signe de $\mathbf{n}$ pour avoir $\mathbf{n} \cdot \mathbf{a} < 0$.

E.3.2 Cylindre

Soit un cylindre de rayon r orienté le long du vecteur $\mathbf{n}$ et centré en $\mathbf{c}$, on choisit une base perpendiculaire à $\mathbf{n}$ qu'on note $(\mathbf{n_a}, \mathbf{n_b})$.

Les points d'intersections $\mathbf{P}(t)$ d'un rayon avec la surface du cylindre vérifient

$$((\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}) \cdot \mathbf{n_a})^2 + ((\mathbf{P}(t) - \mathbf{c}) \cdot \mathbf{n_b})^2 = r^2 \tag{E.11}$$

soit une fois développé

$$\begin{aligned} 0 = At^2 + Bt + C = &\left((\mathbf{a} \cdot \mathbf{n_a})^2 + (\mathbf{a} \cdot \mathbf{n_b})^2\right) t^2 \\ &+ 2\left((\mathbf{a} \cdot \mathbf{n_a})(\mathbf{b} \cdot \mathbf{n_a}) - (\mathbf{a} \cdot \mathbf{n_a})(\mathbf{c} \cdot \mathbf{n_a}) + (\mathbf{a} \cdot \mathbf{n_b})(\mathbf{b} \cdot \mathbf{n_b}) - (\mathbf{a} \cdot \mathbf{n_b})(\mathbf{c} \cdot \mathbf{n_b})\right) t \\ &+ (\mathbf{b} \cdot \mathbf{n_a})^2 + (\mathbf{c} \cdot \mathbf{n_a})^2 - 2(\mathbf{b} \cdot \mathbf{n_a})(\mathbf{c} \cdot \mathbf{n_a}) + (\mathbf{b} \cdot \mathbf{n_b})^2 + (\mathbf{c} \cdot \mathbf{n_b})^2 - 2(\mathbf{b} \cdot \mathbf{n_b})(\mathbf{c} \cdot \mathbf{n_b}) - r^2 \end{aligned} \tag{E.12}$$

et on a les deux solutions $\mathbf{P}(t_1)$ et $\mathbf{P}(t_2)$ par les equations E.8 et E.9.

E.3.3 Cône

Soit un cône de demi-ouverture θ orienté par le vecteur $\mathbf{n}$ et centré en $\mathbf{c}$, on choisit une base perpendiculaire à $\mathbf{n}$ qu'on note $(\mathbf{n_a}, \mathbf{n_b})$.

Les points d'intersections $\mathbf{P}(t)$ d'un rayon avec la surface du cône vérifient

$$((\mathbf{P}(t)-\mathbf{c})\cdot\mathbf{n_a})^2 + ((\mathbf{P}(t)-\mathbf{c})\cdot\mathbf{n_b})^2 = ((\mathbf{P}(t)-\mathbf{c})\cdot\mathbf{n})^2 \tan^2\theta \tag{E.13}$$

soit une fois développé

$$\begin{aligned} 0 = At^2 + Bt + C = &\left((\mathbf{a}\cdot\mathbf{n})^2\tan^2\theta - (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n_a})^2 - (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n_b})^2\right)t^2 \\ + 2(&((\mathbf{a}\cdot\mathbf{n})(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n}) - (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n})(\mathbf{c}\cdot\mathbf{n}))\tan^2\theta - (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n_a})(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n_a}) + (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n_a})(\mathbf{c}\cdot\mathbf{n_a}) - (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n_b})(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n_b}) \\ &+ (\mathbf{a}\cdot\mathbf{n_b})(\mathbf{c}\cdot\mathbf{n_b}))t \\ +(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n})^2 - 2(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n})(\mathbf{c}\cdot\mathbf{n}) + (\mathbf{c}\cdot\mathbf{n})^2)\tan^2\theta + 2(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n_a})(\mathbf{c}\cdot\mathbf{n_a}) + 2(\mathbf{b}\cdot\mathbf{n_b})(\mathbf{c}\cdot\mathbf{n_b}) - (\mathbf{b}\cdot\mathbf{n_a})^2 - (\mathbf{b}\cdot\mathbf{n_b})^2 \\ &- (\mathbf{c}\cdot\mathbf{n_a})^2 - (\mathbf{c}\cdot\mathbf{n_b})^2 \end{aligned} \tag{E.14}$$

et on a les deux solutions $\mathbf{P}(t_1)$ et $\mathbf{P}(t_2)$ par les equations E.8 et E.9.

E.4 Lois de Snell-Descartes [1]

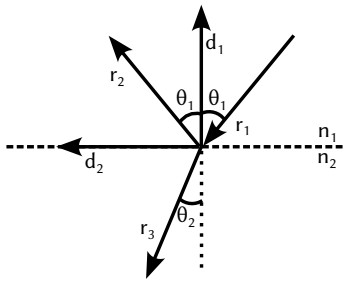


Figure E.1 – Réfraction et réflexion d'un rayon incident r_1 par un dioptre plan.

Soit un dioptre plan [2] séparant deux milieux d'indices optiques n_1 et n_2 (voir figure E.1). On note $\mathbf{d_1}$ la normale au dioptre dirigée vers le milieu d'incidence. Soit $\mathbf{r_1}$ le vecteur directeur normé d'un rayon tel que $\mathbf{r_1}\cdot\mathbf{d_1} < 0$. On note $\mathbf{d_2}$ le vecteur normé perpendiculaire à $\mathbf{d_1}$ et situé dans le plan du rayon incident. Soit θ_1 l'angle entre $-\mathbf{r_1}$ et $\mathbf{d_1}$, le rayon incident s'écrit $\mathbf{r_1} = \sin\theta_1\mathbf{d_2} - \cos\theta_1\mathbf{d_1}$ et le rayon réfléchi est $\mathbf{r_2} = \sin\theta_1\mathbf{d_2} + \cos\theta_1\mathbf{d_1}$.

On a $\cos\theta_1 = -\mathbf{d_1}\cdot\mathbf{r_1}$ (qui doit être positif si $\mathbf{d_1}$ est bien dirigé vers le rayon). Le rayon réfléchi s'écrit alors

$$\mathbf{r_2} = \mathbf{r_1} + 2\cos\theta_1\mathbf{d_1} = \mathbf{r_1} - 2(\mathbf{d_1}\cdot\mathbf{r_1})\mathbf{d_1} \tag{E.15}$$

Le rayon réfracté est $\mathbf{r_3} = \sin\theta_2\mathbf{d_2} - \cos\theta_2\mathbf{d_1}$ et d'après la loi de Snell-Descartes

$$n_1\sin\theta_1 = n_2\sin\theta_2 \tag{E.16}$$

1. Cette section est tirée du chapitre 5 de [95].

2. La même méthode peut être utilisée pour un dioptre non plan en considérant le plan tangent au point d'impact du rayon.

et donc $\mathbf{r_3} = \frac{n_1}{n_2}\mathbf{r_1} + \left(\frac{n_1}{n_2}\cos\theta_1 - \cos\theta_2\right)\mathbf{d_1}$ et en utilisant $\sin^2\theta + \cos^2\theta = 1$

$$\cos\theta_2 = \sqrt{1-\sin^2\theta_2} = \sqrt{1-\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2\sin^2\theta_1} = \sqrt{1-\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2\left(1-\cos^2\theta_1\right)} \tag{E.17}$$

soit

$$\mathbf{r_3} = \frac{n_1}{n_2}\mathbf{r_1} - \left(\frac{n_1}{n_2}\mathbf{d_1}\cdot\mathbf{r_1} + \sqrt{1-\left(\frac{n_1}{n_2}\right)^2\left(1-(\mathbf{d_1}\cdot\mathbf{r_1})^2\right)}\right) \tag{E.18}$$

On a donc deux formules, indépendantes de $\mathbf{d_2}$, qui permettent de calculer les rayons réfléchi et réfracté sans aucun calcul de cosinus et de sinus (qui sont particulièrement lents à calculer).

E.5 Procédé de Gram-Schmidt

Étant donné un vecteur unitaire $\mathbf{n}$ on cherche à construire une base $(\mathbf{n_a}, \mathbf{n_b})$ orthonormale à $\mathbf{n}$. La procédure d'orthogonalisation de Gram-Schmidt permet de calculer n_a et n_b à partir de n. On commence par construire un vecteur $\mathbf{r}$ dont les trois composantes sont tirées aléatoirement avec une distribution uniforme entre 0 et 1. On obtient le premier vecteur de base en soustrayant à $\mathbf{r}$ sa composante orientée le long de $\mathbf{n}$ et en normalisant le résultat

$$\mathbf{n_a} = \frac{\mathbf{r} - (\mathbf{r}\cdot\mathbf{n})\mathbf{n}}{\sqrt{(\mathbf{r} - (\mathbf{r}\cdot\mathbf{n})\mathbf{n})\cdot(\mathbf{r} - (\mathbf{r}\cdot\mathbf{n})\mathbf{n})}} \tag{E.19}$$

enfin le second vecteur de base est

$$\mathbf{n_b} = \mathbf{n}\times\mathbf{n_a} \tag{E.20}$$

E.6 Rayon aléatoire dans un cône de révolution [1]

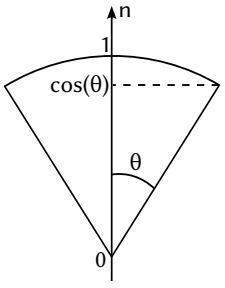


Figure E.2 – Schéma du cône.

Pour générer un vecteur unitaire aléatoire dans un cône (voir figure E.2) de demi-ouverture θ dirigé selon un vecteur $\mathbf{n}$, on choisit un nombre aléatoire k uniformément distribué dans

1. Voir https://math.stackexchange.com/q/205589

$[\cos\theta, 1]$. On choisit ensuite un angle aléatoire φ uniformément distribué entre 0 et 2π. On obtient un vecteur unitaire aléatoire situé dans le cône

$$\mathbf{v} = \left(\sqrt{1-k^2}\cos\varphi, \sqrt{1-k^2}\sin\varphi, k\right) \tag{E.21}$$

Le vecteur est uniformément distribué angulairement dans le cône, car la surface d'une zone sphérique est proportionnelle à sa hauteur et indépendante de sa distance au centre de la sphère. [1]

E.7 Formule de rotation de Rodrigues

Si l'on veut faire tourner le vecteur $\mathbf{v}$ d'un angle θ autour du vecteur $\mathbf{n}$ la formule de rotation de Rodrigues donne[114]

$$\mathbf{v_{rot}} = \mathbf{v}\cos\theta + \mathbf{n}\times\mathbf{v}\sin\theta + \mathbf{n}(\mathbf{n}\cdot\mathbf{v})(1-\cos\theta) \tag{E.22}$$

E.8 Diffusion et absorption

Les paramètres de diffusion sont μ_s le libre parcours moyen de diffusion, μ_a le libre parcours moyen d'absorption et $g = \langle\cos\theta\rangle$ le coefficient d'anisotropie calculé sur la distribution des angles de diffusion θ (angle de déviation d'un rayon par rapport à sa direction initiale). La fonction de phase d'Henyey-Greenstein[115] donne la densité de probabilité $p(\theta)$ d'avoir un certain angle de diffusion θ à partir de g

$$p(\theta) = \frac{1-g^2}{4\pi(1+g^2-2g\cos\theta)^{3/2}} \tag{E.23}$$

et [2]

$$\cos\theta = \begin{cases} \frac{1}{2g}\left(1+g^2-\frac{1-g^2}{1-g+2gR}\right) & \text{si } g \neq 0 \\ 1-2R & \text{si g=0} \end{cases} \tag{E.24}$$

avec R un nombre aléatoire distribué uniformément dans $[0, 1]$.

Pour chaque rayon, on génère une distance aléatoire de libre déplacement

$$d = -\mu_s \times \ln R \tag{E.25}$$

avec $R \in]0, 1]$ puis on calcule la nouvelle direction du rayon. On réitère l'opération jusqu'à ce que le rayon sorte du milieu diffusant ou jusqu'à un nombre limite d'évènements de diffusion.

Il n'est pas possible de faire du raytracing inverse quand on simule de la diffusion, la simulation doit se faire en raytracing direct.

Si l'on souhaite en plus simuler l'effet de l'absorption, la contribution de chaque rayon à l'illumination de la caméra est pondérée par

$$e^{-\frac{\ell}{\mu_a}} \tag{E.26}$$

où ℓ est le chemin total parcouru dans le milieu absorbant.

1. https://mathworld.wolfram.com/Zone.html
2. https://miepython.readthedocs.io/en/stable/06_random_deviates.html

Annexe F

Poster Mifobio 2025

Adaptive Optics for Confocal Microscopy in Cleared mouse brain

Jean Commère[1], Yan Feng[1], Marie Glanc[1], Raphaël Galicher[1], Laurent Bourdieu[2], Jonathan Bradley[2]

[1]LIRA, Observatoire de Paris [2]IBENS

Abstract

Fluorescence imaging and brain clearing on rodent are two techniques widely used in neurosciences. Whole brain imaging at depth can be challenging, even for cleared samples because of sample induced optical aberrations. The development of adaptive optics corrected fluorescent microscopes for whole cleared brain samples should help increase the signal to noise ratio. For the development of such a system, we need to characterize the optical aberrations induced by the cleared rodent brain. To do so, we combine a confocal microscope and two wavefront sensors that are commonly used in astronomy (Shack-Hartmann and pyramid). In this poster, we present the experimental setup that combines adaptive optics and confocal microscopy.

Introduction

This project is a collaboration between IBENS and LIRA. The team at IBENS is studying the cerebellum, a part of the brain mainly dedicated to movement regulation. Using confocal microscopy in CUBIC clarified mouse brain marked with viral tracing they are sometimes unable to follow axons paths due to bad signal to noise ratio. Relying on previous experience in measuring optical aberrations in mouse brain slices[1] the team at LIRA is building an adaptive optics corrected confocal microscope to increase signal to noise ratio.

Sample

Neurosciences are increasingly making use of clarification techniques to image the brain[2]. Those techniques are necessary because the brain is full of very scattering lipids, the clarification allows to remove those lipids without damage to the structural integrity of the brain. Multiple methods have been developped in the past twenty years. The CLARITY technique gives good clarification, but is toxic to humans[3]. The CUBIC[4, 5] method gives a less efficient clarification but is not toxic making it more practical. The sample size is about 1cm³ and the CUBIC clarified tissue refractive index is 1.52 and is index matched with oil.

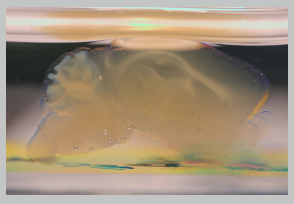


Figure 1: Mouse brain clarified with CUBIC

Setup

The confocal microscope has two laser sources at 488nm and 561nm to image both GFP and tdTomato. The excitation beam is shaped by a 97 actuators pupil-conjugated deformable mirror (Alpao DM97) and then scanned over the field of view by two pupil-conjugated galvanometers (ScannerMax Saturn 5). The dipping objective lens is a Special Optics 54-12-8 designed for use with cleared tissue samples. It's curved first surface makes it work with any refractive index without aberrations. Fluorescent light emited by the sample goes back through the same objective lens, is unscanned by the galvanometers, is shape by the deformable mirror and then goes to the detection arm through the dichroic D2. In the detection arm light is filtered by the confocal pinhole (Thorlabs MPH16) and then split between the detector (Hamamatsu MPPC C13366-1350GD) and two home-made wavefront sensors : pyramid and Shack-Hartmann. All the software used to control the adaptive optics was developped internaly in Rust.

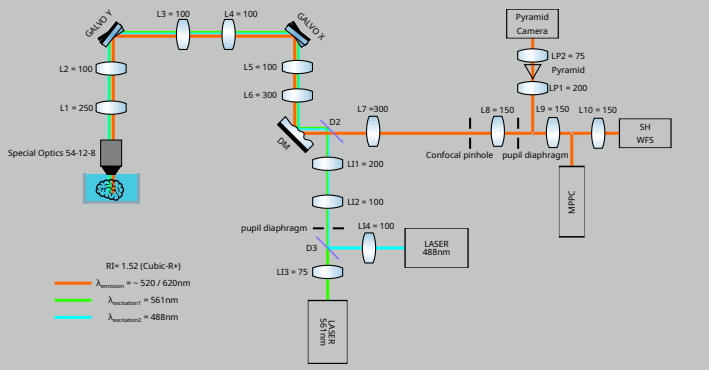


Figure 2: Optical design of the setup

Acknowledgements

This work was funded by the CNRS 80—PRIME initiative, CNRS MITI, UFR de physique of Université Paris Cité, and the iXcore-iXlife-iXblue foundation.

Setup



Figure 3: Photography of the bench

Adaptive Optics

The adaptive optics allows the correction of sample induced aberrations. In a confocal setup, the resolution is given by the size of the pinhole. Thus the adaptive optics is not here to increase resolution but to increase the signal to noise ratio by reducing the size of the psf, allowing more signal to get through the pinhole. We are using Shack-Hartmann and pyramid wavefront sensor, allowing us to compare their merit for our type of sample. The Shack-Hartmann has lower resolution (18×18 sub-pupils in our case) but is simple to use. The pyramid allows for a much higher resolution but is more difficult to use due to its non-linearity[6].

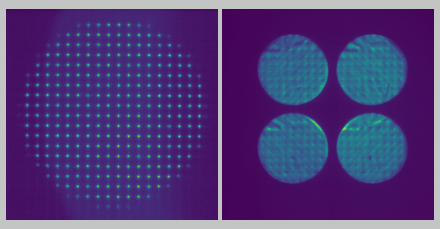


Figure 4: Aberrations measurement images with, left: Shack-Hartmann WFS, right: Pyramid WFS

Scanning and photon counting with Teensy

The Teensy 4.0 are an inexpensive (≈30€) Arduino-like board that contain a ARM Cortex-M7 at 600 MHz. A first teensy is used to control the position of the slow axis galvanometer by sending positions in the XY2-100 protocol to the galvo controler. The fast axis galvanometers is controled using a frequency generator. A second teensy uses a modified version of the FreqCount Library to count the TTL pulses output of the MPPC in sync with the frequency generator, sum them in bin as short as 300ns and send the data to the computer for display.

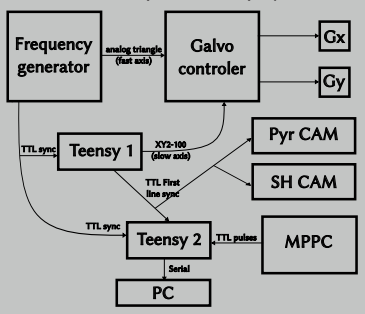


Figure 5: Diagram of the laser scanning and image acquisition setup

References

[1] J. Commère et al., Experimental characterization of an isoplanatic patch in mouse cortex using adaptive optics, *Biomedical Optics Express*, 15(10):5645–5659, October 2024.

[2] R. J. Vigouroux et al., Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing, *Molecular Brain*, 10(1):33, July 2017.

[3] K. Chung et al., Structural and molecular interrogation of intact biological systems, *Nature*, 497(7449):332–337, May 2013.

[4] E. A. Susaki et al., Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis, *Cell*, 157(3):726–739, April 2014.

[5] K. Matsumoto et al., Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling, *Nature Protocols*, 14(12):3506–3537, December 2019.

[6] A. Burvall et al., Linearity of the pyramid wavefront sensor, *Optics Express*, 14(25):11925–11934, December 2006.

Annexe G

Proceeding SPIE Medical Imaging 2026

Adaptive optics for confocal microscopy in thick samples

Jean Commère[a,*], Marie Glanc[a], Yan Feng[a], Raphaël Galicher[a], Laurent Bourdieu[b], and Jonathan Bradley[b]

[a]LIRA, Observatoire de Paris, Université Paris Cité, Sorbonne Université, Université PSL, CY Cergy Paris Université, CNRS, 92190 Meudon, France
[b]IBENS, École Normale Supérieure, 75005 Paris, France

ABSTRACT

Fluorescence imaging and clearing on mouse brains are two techniques widely used in neurosciences. Whole brain imaging at depth remains challenging though, even for cleared samples because of sample induced optical aberrations. The development of adaptive optics corrected fluorescent microscopes for thick samples will help image the neural network in whole rodent clarified brains. To optimize such a system, we need to characterize the optical aberrations induced by the cleared rodent brain. In our project, we combine a confocal microscope and two wavefront sensors (Shack-Hartmann and pyramid) to have independent sensing and probe the performance of each sensor. In this paper, we describe the experimental setup of the microscope and we present challenges induced by thick samples on aberration measurements in confocal microscopy.

Keywords: adaptive optics, wavefront sensor, Shack-Hartmann, pyramid, sample clarification, fluorescence imaging

1. INTRODUCTION

1.1 Adaptive optics and microscopy

Adaptive optics (AO) was initially developed in astronomy to correct atmospheric turbulence effects on ground-based telescopes.[1] AO usually uses a wavefront sensor (WFS) that estimates the wavefront aberrations and an active optic to correct for them.[1] The Shack-Hartmann (SH) WFS was historically the most used. Since a decade, the pyramid WFS tends to replace it in most astronomical AO systems as it allows for a better spatial sampling.

AO systems are now widely used in microscopy to correct aberrations induced by the sample.[1,2] Some systems use a sensorless correction with an optimization approach on the image. Most of the systems with wavefront sensors use a SH WFS, although the pyramid WFS starts being used.[3] In our project, we study an AO microscope for imaging thick samples ($\sim 1\,\mathrm{cm}$) such as clarified rodent brains. We built a confocal microscope that includes both a SH and pyramid WFS to enable comparison of their performance.

1.2 Clarified mouse brain

Neurosciences are increasingly making use of clarification techniques to image the brain as it enables probing the samples in depth minimizing the scattered light.[4] However, the imaging performance is then limited by phase aberrations induced by the sample itself. For example, using confocal microscopy, our team observed that the axon paths are sometimes lost due to bad signal to noise ratio (SNR) in CUBIC[5] clarified mouse brains marked with viral tracing. To overcome this limitation, we propose to compensate the aberrations by adding an AO system to a confocal microscope. This will increase the lateral resolution and the SNR in the images.

In section 2, we describe the AO microscope setup designed to image whole clarified mouse brain. In section 3, we describe the principle of OA in confocal microscopy with a demonstration on our setup. In section 4, we investigate the consequences of having thick samples on the WFS measurements and compare experimental measurement with homemade ray-tracing numerical simulations.

*corresponding author, E-mail: jean.commere@obspm.fr

Medical Imaging 2026: Clinical and Biomedical Imaging, edited by Barjor S. Gimi, Andrzej Krol, Proc. of SPIE Vol. 13929, 1392905 · 2026 Published by SPIE
1605-7422 · doi: 10.1117/12.3085547

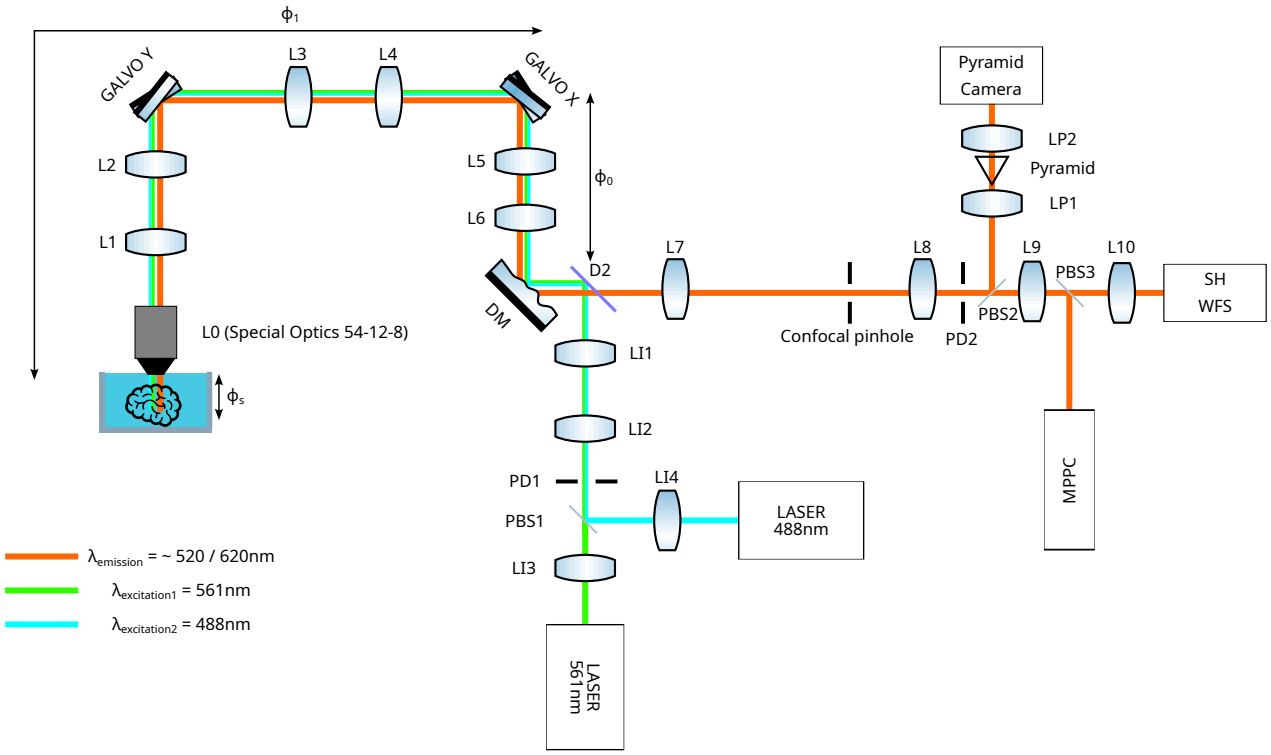


Figure 1. Optical setup of the confocal microscope combined with an adaptive optics system. The focal lengths of the lenses are (in mm): $f_{L0} = 8$, $f_{L1} = 250$, $f_{L2} = 100$, $f_{L3} = 100$, $f_{L4} = 100$, $f_{L5} = 100$, $f_{L6} = 300$, $f_{L7} = 300$, $f_{L8} = 150$, $f_{L9} = 150$, $f_{L10} = 150$, $f_{LP1} = 200$, $f_{LP2} = 75$, $f_{LI1} = 200$, $f_{LI2} = 100$, $f_{LI3} = 75$, $f_{LI4} = 75$

2. OPTICAL SETUP

The setup of our AO confocal microscope is shown in Fig. 1. The illumination sources are two laser from Lasos at 561 nm (green path) and 488 nm (blue path). The laser beams are collimated (by LI3 and LI4) onto a diaphragm that defines the optical pupil. This pupil is re-imaged using a two lens relay (LI2/LI1) on the deformable mirror (DM, Alpao D97-15-016 with 97 actuators). The DM reflective surface can be shaped to compensate for phase aberrations of the beam. Other lens relays (L6/L5, L4/L3, L2/L1) re-image the optical pupil on two galvanometers (ScannerMax Saturn 5B) used to scan over the field of view and on the back focal plane of the objective lens (Special Optics 54-12-8).

The fluorescence generated in the sample (orange path) goes back through the objective lens. The beam is un-scanned by the two galvanometers and it is phase-shaped by the DM before going through the dichroic mirror D2 (Semrock Di01-R488/561-25x36) towards the detection arm. The detection arm consists of a motorized confocal pinhole (Thorlabs MPH16-A) for axial sectioning. The light is split between a Multi-Pixel Photon Counter (MPPC, Hamamatsu C13366-1350GD) for imaging and two WFS for aberration measurement: SH WFS and pyramid WFS. The MPPC is slightly out of focus in the imaging plane so that most of its array is illuminated. The Pyramid optical component, located in the imaging plane between LP1 and LP2, is made up of two perpendicularly oriented facing roof prisms (the roof angle is 175°). The Pyramid WFS camera is a Hamamatsu C9100 EM-CCD camera. The SH WFS is a homemade 18×18 micro-lenses array of 24.7 mm focal length and a Hamamatsu C8800 CCD camera. The pellicle beam splitter PBS2 send 45% of the flux toward the pyramid WFS and 55% of the flux toward the SH WFS and MPPC. The pellicle beam splitter PBS3 send half the flux toward the SH WFS and half the flux toward the MPPC.

In the current setup, all lenses but the objective are achromatic optics designed for small field of view imaging. We are aware of the limitation of such an economic choice, especially for the L1, L2, L3 and L4 lenses. These lenses

induce field aberrations, which limits the field of view we can scan with the galvanometers to $200\,\mu$m$\times 200\,\mu$m. A foreseen upgrade is the use of scan lenses instead.

3. AO IN CONFOCAL MICROSCOPY

3.1 Principle

An AO system using a wavefront sensor needs a guide star (GS) from which the phase aberrations are measured. Then, the DM is shaped to compensate the measured aberrations in a close loop. In confocal microscopy, the scanning/de-scanning of the beam is well suited for WFS. The fluorescent beam (orange in Figure 1) is stabilized after Galvo X. This means that it always follows the same optical path from Galvo X to the WFS. Especially, the focal spot in the confocal pinhole plane is always located at the same position creating a stable guide star (GS) for the AO system. Assuming the WFS measures the phase aberrations over a complete scan of the field of view, the measured phase is composed of the phase aberration induced by the instrument between Galvo X and the DM (ϕ_0) and the average over the field of view of the aberration induced by the instrument ($\phi_1(x,y)$) and through the sample ($\phi_s(x,y)$). The aberrations generated in the laser injection arm before D2 and after L7 in the detection arm are different and cannot be corrected by the DM without deteriorating one path or the other. Special care should be taken during alignment to minimize them. In our setup, we minimized them so that they are negligible with respect to the other aberrations. As the correction must be done in the plane of the pinhole the aberrations generated by the optics between the pinhole and each WFS are calibrated and removed from the measurement. Therefore, the final measurement is composed of a fix aberration (ϕ_0, from Galvo X to the DM) and an averaged phase over the field of view ($<\phi_1+\phi_s>_{\mathrm{FOV}}$).

Once the AO loop is closed (the WFS measurement is used to shape the DM), both the excitation and emission beams are phase-corrected, allowing for a twofold improvements. The correction of the excitation beam allows for an increase in resolution by reducing the spread of the excitation spot inside the sample. The correction of the emission beam allows for an increase in SNR by reducing the spread of the focal spot in the confocal pinhole plane, preventing useful light from being blocked by the pinhole (see section 3.4).

3.2 Size of the pinhole

The best DM-shape (ϕ_{DM}) is the one that minimizes the residual phase of the beam ($\phi_0+<\phi_1+\phi_s>_{\mathrm{FOV}}-\phi_{\mathrm{DM}}$). The level of the residual phase is directly linked to the number of DM actuators (97 in our setup). This number sets the spatial frequencies in the pupil plane that the WFS should probe. For example, in a setup with $N\times N$ DM actuators, one cannot correct spatial frequencies higher than $N/(2\,D)$ with D the pupil diameter. This means that the pinhole diameter must be at least $N\,G\,\lambda\,f_{L0}/D$ for the aberrations measurement with f_{L0} the objective focal length and G the magnification (f_{L1}/f_{L0}). As one also wants to minimize the out of focus fluorescence one needs to minimize the pinhole diameter. Therefore, for a $N\times N$ DM, one will choose a $N\,G\,\lambda\,f_{L0}/D$ pinhole diameter. In our setup (11×11 actuators), the optimized pinhole diameter is $\sim 11\,G\,\lambda\,f_{L0}/D$. Once the aberrations measurement is done and the correction is applied the pinhole can be closed further for imaging.

3.3 Average over the field of view

In the best case, the DM fully compensates for the $\phi_0+<\phi_1+\phi_s>_{\mathrm{FOV}}$ aberration, meaning the correction (i.e. the image quality) may vary as a function of the position in the field of view if $\phi_1+\phi_s$ varies over the field of view. Designing the instrument, one can minimize the variation of ϕ_1 using scanning lenses for example. The variation of ϕ_s however cannot be controlled as it is induced by the sample. In our project, we aim at measuring the phase ϕ_s induced by a clarified whole rodent brain and its variation in the field of view. Then, we will optimize the WFS and the AO correction as a function of the field of view.

3.4 Demonstration on a phantom sample

To demonstrate the interest of the AO correction, we use a phantom sample which consists of a 1.7 mm-thick uniform fluorescent slide (Thorlabs FSK2) with a $170\,\mu$m transparent slide placed above and marked on its superior surface with a yellow marker pen. We then add a Kolmogorov phase screen above to simulate sample induced aberrations. We first record images focusing on the upper layer of the top plate (marker pen fluorescence)

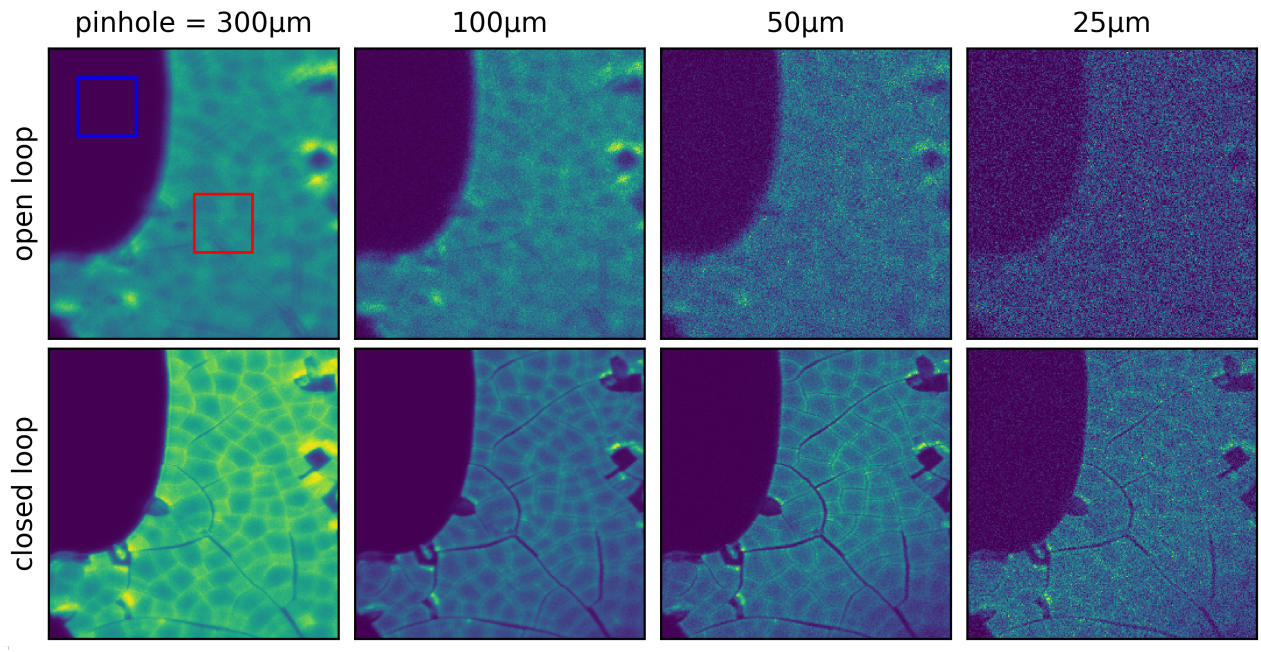


Figure 2. Images of a phantom sample in open and closed loop configuration with four different pinhole sizes : 300µm, 100µm, 50µm and 25µm. The field size is 125×125µm. The black and red square are 50×50 pixels area used to compute the signal (red) and background (blue) numbers shown in Table 1.

and with no AO correction (i.e. open loop) for four pinhole diameters: 300 µm, 100 µm, 50 µm and 25 µm, respectively 9.2 Airy unit (AU), 3 AU, 1.5 AU and 0.75 AU. Images are showed on the top row of Fig. 2.

We then close the AO loop to compensate for the optical aberrations induced by the phase screen using the SH WFS with a large pinhole (2 mm diameter, i.e. 64 AU). We freeze the DM shape and we record images with the four previous pinhole sizes. The resulting images are showed in the bottom row. The AO correction obviously improves the SNR and lateral resolution in all cases. To quantify the improvement, we compute the ratio between the summed intensity over an area where there is signal (red box on the figure) to an area without signal (blue box). The measurements are summarized in Table 1.

Pinhole size		300µm	100µm	50µm	25µm
Signal (counts)	AO OFF	96862	5961	1168	264
	AO ON	235176	39883	9188	1005
Background (counts)	AO OFF	760	160	96	76
	AO ON	669	156	121	79
Signal/Background	AO OFF	127.5	37.3	12.2	3.5
	AO ON	351.5	255.7	75.9	12.7
Signal(AO ON) / Signal(AO OFF)		2.4	6.7	7.9	3.8

Table 1. Summed intensity in an area with signal (red square on Fig. 2), summed intensity in an area of background (blue square on Fig. 2) and their ratio.

The smaller the pinhole, the more the out of focus light coming form the fluorescent slide is filtered and the smaller the background signal. From Table 1, the best improvement in signal happen for the 50µm (1.5AU) pinhole. Bigger pinholes let in more of the aberrated PSF and of the background signal. Smaller pinholes (here the 25µm, 0.75AU, pinhole) are so small that they stop a large amount of light of the corrected PSF. As always

in confocal microscopy, there is a trade-off for the size of the pinhole: too small stop part of the signal of interest, too large increase the background due to out-of-focus fluorescence. One interest of AO is to decrease the size of the beam at the pinhole position so that one can use a smaller pinhole than with no AO for a given amount of signal of interest.

We have demonstrated that our setup allows the correction of aberrations on a phantom sample. For such sample, the AO system behaves mostly as it does in astronomy: a point-like GS enable the sensing of the phase aberrations.

4. ABERRATIONS MEASUREMENTS IN THICK SAMPLES

Imaging thick samples of $\sim 1\,\text{cm}$ like the clarified mouse brain requires changes in the AO system. First, the sample can induce huge aberrations, especially when imaging at depth. Moreover, the GS is not point-like anymore and the WFS data processing have to be adapted.

4.1 Cone-effect in thick samples: principle and measurement

The necessity of working with an large diameter pinhole for the AO measurement (as described in section 3.2) has huge consequences when working on thick samples. Since there is little sectioning left with a large diameter pinhole, the WFS sees the light emitted from the focal plane plus the one coming from all the volume above and below it inside the sectioning. The WFS thus sees a 3D cone-shaped object as a GS.

A similar effect, called the cone effect, can be seen on laser GS in astronomy. The laser beam launched from the telescope excites the molecules (e.g. sodium) in the atmosphere. The molecules then emit light back to the telescope, creating GS used to measure the aberrations induced by the Earth atmosphere on the beam coming from the astrophysical source. Because of the depth of the molecule layer (e.g. sodium layer) in the atmosphere, the GS are not point-like source but 3D extended objects.

To understand the impact of such a 3D GS, we quickly remind how the SH WFS works. A $N_{\text{SH}} \times N_{\text{SH}}$ microlens array is set in a pupil plane. Each microlens selects one part of the pupil and focuses the beam on the SH WFS detector. This results in $N_{\text{SH}} \times N_{\text{SH}}$ spots on the SH WFS detector. The lateral displacement of the spots onto the detector with respect to a reference position can be linked to the local first derivative of the phase aberrations in the pupil plane. It is thus important to be able to measure the spot center with accuracy. In the case of a point-like GS, the spots are point spread function and a center of gravity provides a very good estimate of the spot position onto the WFS detector. In the case of laser GS, the SH WFS spots have an elongated shape. The SH spots can no longer be fitted with a simple center of gravity and more sophisticated method have been developed to deal with the problem.[6] A similar study has been recently conducted for the pyramid WFS for astronomical uses.[7] The conclusion is that the pyramid is ill suited for those kind of measurements. Whether the same results hold for microscopy applications remain to be investigated.

We used our microscope to illuminate a whole clarified mouse brain with the 488 nm laser. We then recorded the spot images on the SH WFS for two illumination aperture (PD1 on Fig. 1). On the left the illumination aperture is the same as the detection aperture (NA= 0.7) whereas on the right the illumination aperture has been closed (NA= 0.3). We can see that at the center of the pupil, the spots could be fitted with a center of gravity in both cases. On the contrary, on the edge of the pupil, the spot shape is strongly modified and they cannot be fitted with such a simple procedure.

The images recorded by the Pyramid Camera of the pyramid WFS are showed in Fig. 4. The size of the illumination aperture strongly modify the pyramid WFS images and the usual processing, develop for astronomy, cannot be used. We will study new algorithms and their robustness against the illumination aperture, sample aberrations, and so on.

4.2 Cone-effect in thick samples: ray-tracing

To get a better understanding of the cone-effect in thick biological samples, we developed a ray-tracing software to simulate the SH WFS images. We assume a simplified model of the illumination cone in the sample without aberrations: the gaussian illumination beam is replaced by a geometrical double cone where the central part (over half the Rayleigh range) is replaced by a cylinder. Within the illumination beam the total flux at each depth is

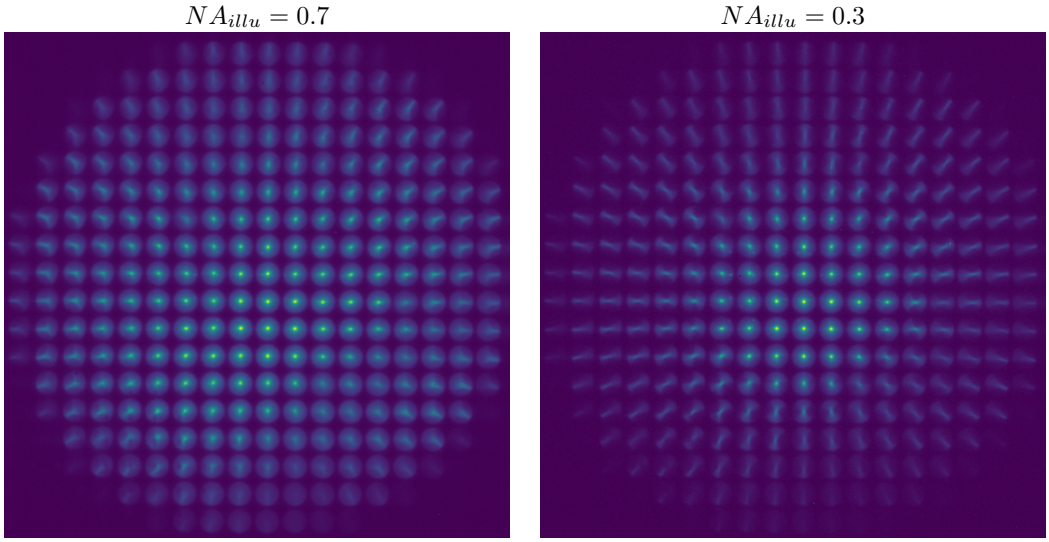


Figure 3. Images of SH WFS in a mouse brain sample clarified with CUBIC and marked with GFP.

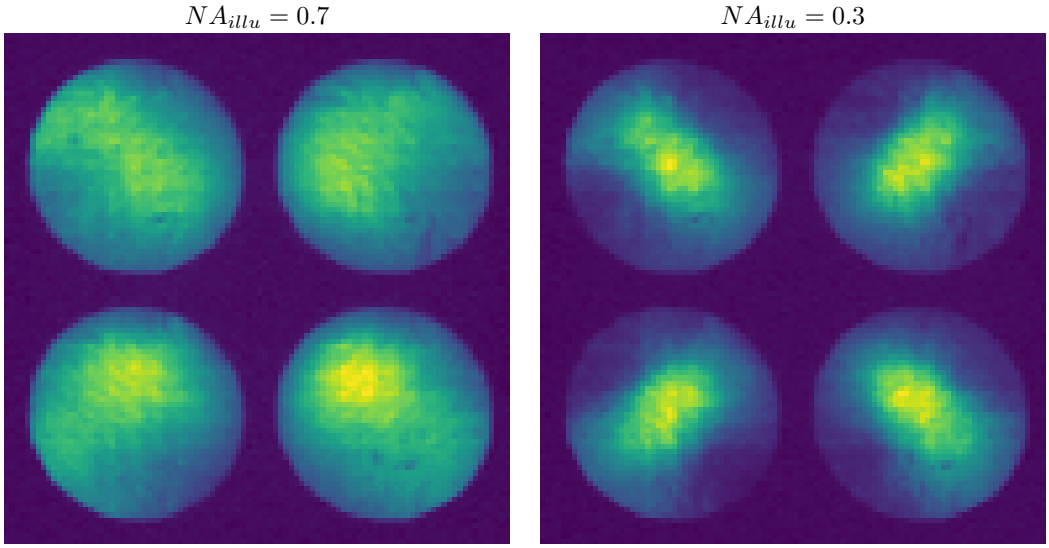


Figure 4. Images of pyramid WFS in a mouse brain sample clarified with CUBIC and marked with GFP.

constant. The fluorescence is assumed uniform in the whole sample. The numerically simulated SH images are showed in Fig. 5 for the same illumination apertures as for the experimental images of Fig. 3. From the simulated image, a simple center of gravity algorithm should be enough to measure the position of the spots all over the pupil in the full illumination pupil case (except maybe on the very edge where the cone effect increases). In the reduced illumination pupil case, we confirm that the center of gravity can be used only on the central part of the pupil. To be able to measure the phase all over the pupil, it may be possible to use a fit of the experimental data with the numerical model as done astronomy.

On the experimental results of Fig. 3 though, the spots are distorted, especially on the edge of the pupil were the light has to go through a longer part of the sample. The challenge of SH WFS in confocal microscopy is then double: the spots are structured because of the 3D shape of the GS and their shape is distorted because of aberrations induced by the sample. One could restrict the phase measurement to the central part of the pupil but this would limit the AO gain (SNR improvement and background minimization as in Fig. 2). We are currently

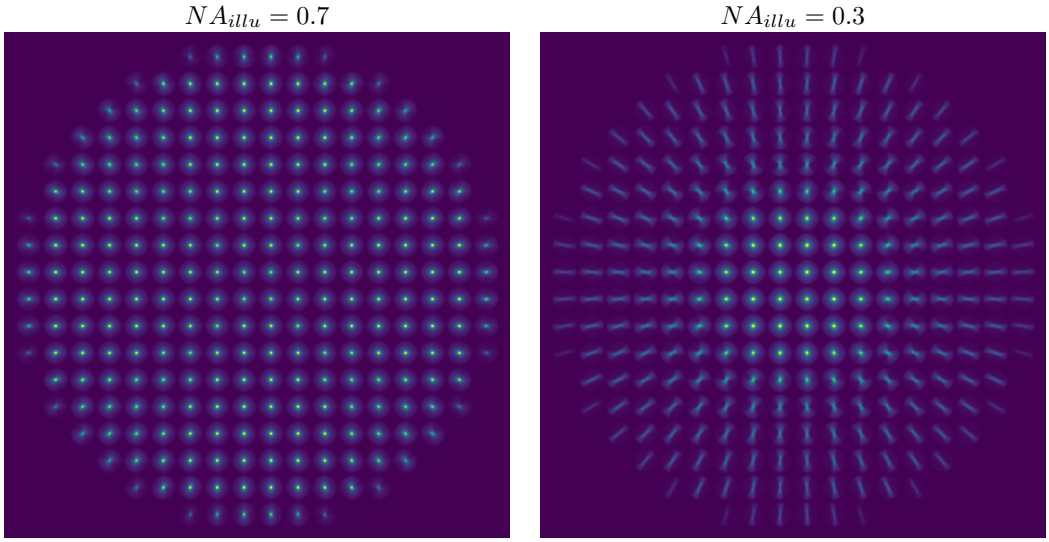


Figure 5. Ray-tracing images of SH WFS looking at a 3D cone+cylinder model of fluorescence.

investigating several ways of improvement (number of spots per pupil, fitting a numerical model, an so on).

5. CONCLUSION

In the context of imaging whole clarified mouse brain, we developed a confocal microscope combined with adaptive optics. In this paper, we fully describe the optical setup that includes two wavefront sensors: a Shack-Hartmann and a pyramid. We reviewed the working principle of adaptive optics on a confocal system. We explained how to choose the pinhole size and which aberrations can be measured and corrected. Then, we showed experimental and numerical images to highlight the challenges of adaptive optics in thick fluorescent samples such as clarified mouse brains. In the future, we will adapt the wavefront sensors and the adaptive optic correction to study whole clarified mouse brains. For example, we will probe the SH and the Pyramid wavefront sensor limitation, we will propose new processing algorithms for both sensors and we will measure the aberrations induced by thick samples.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by the CNRS 80|PRIME initiative, CNRS MITI, UFR de physique of Université Paris Cité, and the iXcore-iXlife-iXblue foundation.

REFERENCES

[1] Tyson, R. K., [*Principles of adaptive optics*], Taylor & Francis, Boca Raton (2011). OCLC: 741261071.

[2] Booth, M. J., "Adaptive optical microscopy: the ongoing quest for a perfect image," *Light: Science & Applications* **3**, e165–e165 (Apr. 2014).

[3] Brunner, E., Shatokhina, J., Shirazi, M. F., Drexler, W., Leitgeb, R., Pollreisz, A., Hitzenberger, C. K., Ramlau, R., and Pircher, M., "Retinal adaptive optics imaging with a pyramid wavefront sensor," *Biomedical Optics Express* **12**, 5969–5990 (Oct. 2021).

[4] Vigouroux, R. J., Belle, M., and Chédotal, A., "Neuroscience in the third dimension: shedding new light on the brain with tissue clearing," *Molecular Brain* **10**, 33 (July 2017).

[5] Matsumoto, K., Mitani, T. T., Horiguchi, S. A., Kaneshiro, J., Murakami, T. C., Mano, T., Fujishima, H., Konno, A., Watanabe, T. M., Hirai, H., and Ueda, H. R., "Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling," *Nature Protocols* **14**, 3506–3537 (Dec. 2019).

[6] Tallon, M., Tallon-Bosc, I., Béchet, C., and Thiébaut, E., "Shack-Hartmann wavefront reconstruction with elongated sodium laser guide stars: improvements with priors and noise correlations," 70151N (July 2008).
[7] Oyarzún, F., Chambouleyron, V., Neichel, B., Fusco, T., and Guesalaga, A., "Expected performance of the Pyramid wavefront sensor with a laser guide star for 40 m class telescopes," *Astronomy & Astrophysics* **686**, A1 (June 2024).

Bibliographie

> Je savais aussi que les hommes ne pensent pas. Non, non, ne ris pas, ils ne pensent pas. De temps à autre il y en a un qui pense, c'est vrai, et il le dit et il l'écrit, et cela est si extraordinaire que personne ne l'oublie. Les gens assemblent ces fragments que d'autres ont pensés, comme ils peuvent, parfois sous une forme très opportune, parfois sous une forme très absurde, ils répètent une série de pensées d'autrui sans rapport précis avec une situation donnée et une autre série de pensées d'autrui dont le rapport n'est pas plus précis avec une autre situation donnée, et ils croient que ce sont eux qui pensent. Celui qui peut se rappeler et déformer le plus de pensées d'autrui afin de les adapter à autant de situations donne le sentiment d'être plus intelligent et les autres l'admirent. Apparaît un autre qui pense, il le dit ou l'écrit, les gens affirment qu'il est fou et peuvent même aller jusqu'à le lapider, mais ce qu'il a pensé demeure et ceux qui ne pensent pas finissent par se l'approprier, et ainsi les pensées d'autrui dont les gens font usage comme s'il s'agissait de mouchoirs ou de dessous-de-bras sont de plus en plus nombreuses et on appelle ça le progrès.
>
> Angélica Gorodischer, Kalpa Impérial

[1] Shreyas M. Suryanarayana, Brita Robertson, and Sten Grillner. The neural bases of vertebrate motor behaviour through the lens of evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences*, 377(1844):20200521.

[2] Dale Purves, editor. *Neuroscience*. Oxford University Press, New York, sixth edition edition, 2018.

[3] Elizabeth Lackey, Detlef Heck, and Roy Sillitoe. Shaping Diversity Into the Brain's Form and Function. *Frontiers in Neural Circuits*, 12, October 2018.

[4] E. Abbe. VII.—On the Estimation of Aperture in the Microscope. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 1(3):388–423, 1881.

[5] E. Abbe. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie*, 9(1):413–468, December 1873.

[6] E. Abbe. The Relation of Aperture and Power in the Microscope (continued)*. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 2(4):460–473, 1882. _eprint : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x.

[7] G. B. Airy. On the Diffraction of an Object-glass with Circular Aperture. *Transactions of the Cambridge Philosophical Society*, 5:283, January 1835. ADS Bibcode : 1835TCaPS...5..283A.

[8] Joseph W. Goodman. *Introduction to Fourier optics*. Roberts & Co, Englewood, Colo, 3rd ed edition, 2005. OCLC : ocm56632414.

[9] Jun Zeng, Pierre Mahou, Marie-Claire Schanne-Klein, Emmanuel Beaurepaire, and Delphine Débarre. 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues. *Biomedical Optics Express*, 3(8):1898–1913, August 2012.

[10] Adam K. Glaser, Ye Chen, and Jonathan T.C. Liu. Fractal propagation method enables realistic optical microscopy simulations in biological tissues. *Optica*, 3(8):861–869, 2016.

[11] A. Kolmogorov. The Local Structure of Turbulence in Incompressible Viscous Fluid for Very Large Reynolds' Numbers. *Akademiia Nauk SSSR Doklady*, 30:301–305, January 1941. ADS Bibcode : 1941DoSSR..30..301K.

[12] Theodore von Kármán. Progress in the Statistical Theory of Turbulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 34(11):530–539, November 1948.

[13] J. M. Schmitt and G. Kumar. Turbulent nature of refractive-index variations in biological tissue. *Optics Letters*, 21(16):1310–1312, August 1996.

[14] Yue Zhu, Yuan Zhou, and Zhenyan Guo. Fractal-based aberration-corrected full-field OCT. *Biomedical Optics Express*, 14(7):3775–3797, June 2023.

[15] Francis A. Duck. Optical Properties of Tissue including Ultraviolet and Infrared Radiation. In *Physical Properties of Tissues*, pages 43–71. Academic Press, London, January 1990.

[16] Steven L. Jacques. Origins of Tissue Optical Properties in the UVA, Visible, and NIR Regions. In *Advances in Optical Imaging and Photon Migration (1996), paper OPC364*, page OPC364. Optica Publishing Group, March 1996.

[17] Sylvain Gigan, Ori Katz, Hilton B. de Aguiar, Esben Ravn Andresen, Alexandre Aubry, Jacopo Bertolotti, Emmanuel Bossy, Dorian Bouchet, Joshua Brake, Sophie Brasselet, Yaron Bromberg, Hui Cao, Thomas Chaigne, Zhongtao Cheng, Wonshik Choi, Tomáš Čižmár, Meng Cui, Vincent R. Curtis, Hugo Defienne, Matthias Hofer, Ryoichi Horisaki, Roarke Horstmeyer, Na Ji, Aaron K. LaViolette, Jerome Mertz, Christophe Moser, Allard P. Mosk, Nicolas C. Pégard, Rafael Piestun, Sebastien Popoff, David B. Phillips, Demetri Psaltis, Babak Rahmani, Hervé Rigneault, Stefan Rotter, Lei Tian, Ivo M. Vellekoop, Laura Waller, Lihong Wang, Timothy Weber, Sheng Xiao, Chris Xu, Alexey Yamilov, Changhuei Yang, and Hasan Yılmaz. Roadmap on wavefront shaping and deep imaging in complex media. *Journal of Physics : Photonics*, 4(4):042501, August 2022.

[18] Isaac Freund, Michael Rosenbluh, and Shechao Feng. Memory Effects in Propagation of Optical Waves through Disordered Media. *Physical Review Letters*, 61(20):2328–2331, November 1988.

[19] Shechao Feng, Charles Kane, Patrick A. Lee, and A. Douglas Stone. Correlations and Fluctuations of Coherent Wave Transmission through Disordered Media. *Physical Review Letters*, 61(7):834–837, August 1988.

[20] Benjamin Judkewitz, Roarke Horstmeyer, Ivo M. Vellekoop, Ioannis N. Papadopoulos, and Changhuei Yang. Translation correlations in anisotropically scattering media. *Nature Physics*, 11(8):684–689, August 2015. Number : 8.

[21] Gerwin Osnabrugge, Roarke Horstmeyer, Ioannis N. Papadopoulos, Benjamin Judkewitz, and Ivo M. Vellekoop. Generalized optical memory effect. *Optica*, 4(8):886–892, August 2017.

[22] Douglas S. Richardson, Webster Guan, Katsuhiko Matsumoto, Chenchen Pan, Kwanghun Chung, Ali Ertürk, Hiroki R. Ueda, and Jeff W. Lichtman. Tissue Clearing. *Nature reviews. Methods primers*, 1(1):84, 2021.

[23] John S. O'Brien and E. Lois Sampson. Lipid composition of the normal human brain : gray matter, white matter, and myelin*. *Journal of Lipid Research*, 6(4):537–544, October 1965.

[24] Alba Vieites-Prado and Nicolas Renier. Tissue clearing and 3D imaging in developmental biology. *Development*, 148(18):dev199369, October 2021.

[25] Spalteholz. Über das Durchsichtigmachen von menschlichen und tierischen Präparaten und seine theoretischen Bedingungen, nebst Anhang : Über Knochenfärbung., by Werner Spalteholz | The Online Books Page, 1911.

[26] Youngjae Ryu, Yoonju Kim, Sang-Joon Park, Sung Rae Kim, Hyung-Jun Kim, and Chang Man Ha. Comparison of Light-Sheet Fluorescence Microscopy and Fast-Confocal Microscopy for Three-Dimensional Imaging of Cleared Mouse Brain. *Methods and Protocols*, 6(6):108, December 2023.

[27] Etsuo A. Susaki, Kazuki Tainaka, Dimitri Perrin, Fumiaki Kishino, Takehiro Tawara, Tomonobu M. Watanabe, Chihiro Yokoyama, Hirotaka Onoe, Megumi Eguchi, Shun Yamaguchi, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Yoshihiro Shimizu, Atsushi Miyawaki, Hideo Yokota, and Hiroki R. Ueda. Whole-Brain Imaging with Single-Cell Resolution Using Chemical Cocktails and Computational Analysis. *Cell*, 157(3):726–739, April 2014.

[28] Katsuhiko Matsumoto, Tomoki T. Mitani, Shuhei A. Horiguchi, Junichi Kaneshiro, Tatsuya C. Murakami, Tomoyuki Mano, Hiroshi Fujishima, Ayumu Konno, Tomonobu M. Watanabe, Hirokazu Hirai, and Hiroki R. Ueda. Advanced CUBIC tissue clearing for whole-organ cell profiling. *Nature Protocols*, 14(12):3506–3537, December 2019.

[29] Mohammad A. Omary and Howard H. Patterson. Luminescence Theory. In John C. Lindon, editor, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, pages 1186–1207. Elsevier, Oxford, January 1999.

[30] John Frederick William Herschel. 'Αμόρφωτα No. I. On a Case of Superficial Colour Presented by a Homogeneous Liquid Internally Colourless. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 135:143–145, 1845.

[31] Malte Renz. Fluorescence microscopy—A historical and technical perspective. *Cytometry Part A*, 83(9):767–779, 2013.

[32] Brendan P. Cormack, Raphael H. Valdivia, and Stanley Falkow. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1):33–38, January 1996.

[33] Osamu Shimomura, Frank H. Johnson, and Yo Saiga. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59(3):223–239, 1962.

[34] Douglas C. Prasher, Virginia K. Eckenrode, William W. Ward, Frank G. Prendergast, and Milton J. Cormier. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2):229–233, February 1992.

[35] Nathan C. Shaner, Robert E. Campbell, Paul A. Steinbach, Ben N. G. Giepmans, Amy E. Palmer, and Roger Y. Tsien. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology*, 22(12):1567–1572, December 2004.

[36] Martin Byrdin and Svetlana Byrdina. Impact of triplet state population on GFP-type fluorescence and photobleaching. *Biology of the Cell*, 117(2):e2400076, February 2025.

[37] Dmitriy M. Chudakov, Mikhail V. Matz, Sergey Lukyanov, and Konstantin A. Lukyanov. Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*, 90(3):1103–1163, July 2010.

[38] Liyao Qiu, Bin Zhang, and Zhihua Gao. Lighting Up Neural Circuits by Viral Tracing. *Neuroscience Bulletin*, 38(11):1383–1396, May 2022.

[39] Jerome Mertz. *Introduction to optical microscopy*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom ; New York, NY, second edition edition, 2019.

[40] J. M. Girkin and M. T. Carvalho. The light-sheet microscopy revolution. *Journal of Optics*, 20(5):053002, April 2018.

[41] Omar E. Olarte, Jordi Andilla, Emilio J. Gualda, and Pablo Loza-Alvarez. Light-sheet microscopy : a tutorial. *Advances in Optics and Photonics*, 10(1):111–179, March 2018.

[42] M. Minsky. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10(4):128–138, 1988.

[43] Minsky Marvin. Microscopy apparatus, December 1961. US patent US3013467A.

[44] T. Wilson. Resolution and optical sectioning in the confocal microscope. *Journal of Microscopy*, 244(2):113–121, 2011.

[45] C. J. R Sheppard. Super-resolution in confocal imaging. *Super-resolution in confocal imaging*, 80(2):53–54, 1988. Place : Jena.

[46] Ingo Gregor and Jörg Enderlein. Image scanning microscopy. *Current Opinion in Chemical Biology*, 51:74–83, August 2019.

[47] Winfried Denk, James H. Strickler, and Watt W. Webb. Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy. *Science*, 248(4951):73–76, April 1990.

[48] Peter Luu, Scott E. Fraser, and Falk Schneider. More than double the fun with two-photon excitation microscopy. *Communications Biology*, 7(1):364, March 2024.

[49] H. W. Babcock. The Possibility of Compensating Astronomical Seeing. *Publications of the Astronomical Society of the Pacific*, 65(386):229, October 1953.

[50] J. W. Hardy, J. E. Lefebvre, and C. L. Koliopoulos. Real-time atmospheric compensation. *JOSA*, 67(3):360–369, March 1977.

[51] G. Rousset, J. C. Fontanella, P. Kern, P. Gigan, and F. Rigaut. First diffraction-limited astronomical images with adaptive optics. *Astronomy and Astrophysics*, 230:L29–L32, April 1990. ADS Bibcode : 1990A&A...230L..29R.

[52] F. Rigaut, G. Rousset, P. Kern, J. C. Fontanella, J. P. Gaffard, F. Merkle, and P. Léna. Adaptive optics on a 3.6-m telescope - Results and performance. *Astronomy and Astrophysics*, 250:280–290, October 1991. ADS Bibcode : 1991A&A...250..280R.

[53] Andreas W. Dreher, Josef F. Bille, and Robert N. Weinreb. Active optical depth resolution improvement of the laser tomographic scanner. *Applied Optics*, 28(4):804–808, February 1989.

[54] Junzhong Liang, Bernhard Grimm, Stefan Goelz, and Josef F. Bille. Objective measurement of wave aberrations of the human eye with the use of a Hartmann–Shack wave-front sensor. *JOSA A*, 11(7):1949–1957, July 1994.

[55] Junzhong Liang, David R. Williams, and Donald T. Miller. Supernormal vision and high-resolution retinal imaging through adaptive optics. *JOSA A*, 14(11):2884–2892, November 1997.

[56] M Glanc, E Gendron, F Lacombe, D Lafaille, J. F Le Gargasson, and P Léna. Towards wide-field retinal imaging with adaptive optics. *Optics Communications*, 230(4):225–238, February 2004.

[57] Martin J Booth. Adaptive optics in microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A : Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 365(1861):2829–2843, September 2007.

[58] Pierre Baudoz. Acheter un miroir déformable. *Photoniques*, (82), 2016.

[59] Sebastien M. Popoff, Louis Malosse, Rodrigo Gutiérrez Cuevas, Jean Commère, Marie Glanc, Raphaël Galicher, Yaron Bromberg, and Maxime W. Matthès. A practical guide to digital micro-mirror devices (DMDs) for wavefront shaping. *Journal of Physics : Photonics*, 2026.

[60] Hong-Je Liu, Shu-Sheng Lee, Hsiang-Chieh Lee, Jiun-Woei Huang, and Chih-Kung Lee. Adopt digital micromirror devise (DMD) for wavefront correction and wavefront sensing in adaptive optical system. In Maria Pina Limongelli, Ching Tai Ng, and Branko Glisic, editors, *Sensors and Smart Structures Technologies for Civil, Mechanical, and Aerospace Systems 2024*, page 48, Long Beach, United States, May 2024. SPIE.

[61] R. Shack. Production and use of a lenticular Hartmann screen. *Spring Meeting of Optical Society of America, 1971*, 656, 1971.

[62] Roberto Ragazzoni. Pupil plane wavefront sensing with an oscillating prism. *Journal of Modern Optics*, 43(2):289–293, February 1996. _eprint : https://doi.org/10.1080/09500349608232742.

[63] Jean Bernard Léon Foucault. Mémoire sur la construction des télescopes en verre argenté. January 1859. Medium : 41 p., 1 pl. dépliante.

[64] F. Zernike. Beugungstheorie des schneidenver-fahrens und seiner verbesserten form, der phasenkontrastmethode. *Physica*, 1(7):689–704, May 1934.

[65] Robert J. Noll. Zernike polynomials and atmospheric turbulence*. *JOSA*, 66(3):207–211, March 1976.

[66] Barmak Honarvar Shakibaei and Raveendran Paramesran. Recursive formula to compute Zernike radial polynomials. *Optics Letters*, 38(14):2487–2489, July 2013.

[67] Karl Strehl. Aplanatische und fehlerhafte Abbildung im Fernrohr. *Zeitschrift für Instrumentenkunde*, 15(7):362–370, 1895.

[68] Virendra N. Mahajan. Strehl ratio for primary aberrations in terms of their aberration variance. *JOSA*, 73(6):860–861, June 1983.

[69] Lewis C. Roberts Jr, Marshall D. Perrin, Franck Marchis, Anand Sivaramakrishnan, Russell B. Makidon, Julian C. Christou, Bruce A. Macintosh, Lisa A. Poyneer, Marcos A. van Dam, and Mitchell Troy. Is that really your Strehl ratio ? In *Advancements in Adaptive Optics*, volume 5490, pages 504–515. SPIE, October 2004.

[70] Jean Commère, Marie Glanc, Laurent Bourdieu, Raphaël Galicher, Éric Gendron, and Gérard Rousset. Experimental characterization of an isoplanatic patch in mouse cortex using adaptive optics. *Biomedical Optics Express*, 15(10):5645–5659, October 2024.

[71] E. Dusch, T. Dorval, N. Vincent, M. Wachsmuth, and A. Genovesio. Three-dimensional point spread function model for line-scanning confocal microscope with high-aperture objective. *Journal of Microscopy*, 228(2):132–138, 2007.

[72] Kelsey R. Fulton, Anna Chan, Daniel Votipka, Michael Hicks, and Michelle L. Mazurek. Benefits and Drawbacks of Adopting a Secure Programming Language : Rust as a Case Study. pages 597–616, 2021.

[73] Chensheng Wu, Jonathan Ko, and Christopher C. Davis. Plenoptic mapping for imaging and retrieval of the complex field amplitude of a laser beam. *Optics Express*, 24(26):29852–29871, December 2016.

[74] Jonathan Ko and Christopher C. Davis. Comparison of the plenoptic sensor and the Shack-Hartmann sensor. *Applied Optics*, 56(13):3689–3698, May 2017.

[75] Jintian Hu, Tao Chen, Xudong Lin, Liang Wang, Qichang An, and Zhichong Wang. Improved Wavefront Reconstruction and Correction Strategy for Adaptive Optics System With a Plenoptic Sensor. *IEEE Photonics Journal*, 13(4):1–8, August 2021. Conference Name : IEEE Photonics Journal.

[76] E. Gendron, M. Brangier, G. Chenegros, F. Vidal, Z. Hubert, G. Rousset, and F. Pouplard. A new sensor for laser tomography on ELTs. In *1st AO4ELT conference - Adaptive Optics for Extremely Large Telescopes*, page 05003. EDP Sciences, 2010.

[77] Bruce A. Horwitz. New pupil-plane wavefront gradient sensor. pages 496–501, Kailua, Kona, HI, May 1994.

[78] Koen J. A. Martens, Arjen N. Bader, Sander Baas, Bernd Rieger, and Johannes Hohlbein. Phasor based single-molecule localization microscopy in 3D (pSMLM-3D) : An algorithm for MHz localization rates using standard CPUs. *The Journal of Chemical Physics*, 148(12):123311, March 2018.

[79] W. H. Southwell. Wave-front estimation from wave-front slope measurements. *JOSA*, 70(8):998–1006, August 1980.

[80] A. Bertrou-Cantou, E. Gendron, G. Rousset, V. Deo, F. Ferreira, A. Sevin, and F. Vidal. Confusion in differential piston measurement with the pyramid wavefront sensor. *Astronomy & Astrophysics*, 658:A49, February 2022.

[81] Robert A. Gonsalves. Phase Retrieval And Diversity In Adaptive Optics. *Optical Engineering*, 21(5), October 1982.

[82] Thomas A. Underwood and David G. Voelz. Wave optics approach for incoherent imaging simulation through distributed turbulence. In *Unconventional Imaging and Wavefront Sensing 2013*, volume 8877, pages 112–119. SPIE, September 2013.

[83] John Oreopoulos, Richard Berman, and Mark Browne. Spinning-disk confocal microscopy : present technology and future trends. In Jennifer C. Waters and Torsten Wittman, editors, *Methods in Cell Biology*, volume 123 of *Quantitative Imaging in Cell Biology*, pages 153–175. Academic Press, January 2014.

[84] Antoine Hubert, Fabrice Harms, Rémy Juvénal, Pauline Treimany, Xavier Levecq, Vincent Loriette, Georges Farkouh, François Rouyer, and Alexandra Fragola. Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star. *Optics Letters*, 44(10):2514–2517, May 2019.

[85] Ji Ma. Advanced MEMS-based technologies and displays. *Displays*, 37:2–10, April 2015.

[86] Jerome Mertz, Hari Paudel, and Thomas G. Bifano. Field of view advantage of conjugate adaptive optics in microscopy applications. *Applied Optics*, 54(11):3498–3506, April 2015.

[87] Jacques M. Beckers. Detailed Compensation Of Atmospheric Seeing Using Multiconjugate Adaptive Optics. page 215, Orlando, FL, United States, September 1989.

[88] Raju Tomer, Li Ye, Brian Hsueh, and Karl Deisseroth. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols*, 9(7):1682–1697, July 2014.

[89] Fabian F. Voigt, Anna Maria Reuss, Thomas Naert, Sven Hildebrand, Martina Schaettin, Adriana L. Hotz, Lachlan Whitehead, Armin Bahl, Stephan C. F. Neuhauss, Alard Roebroeck, Esther T. Stoeckli, Soeren S. Lienkamp, Adriano Aguzzi, and Fritjof Helmchen. Reflective multi-immersion microscope objectives inspired by the Schmidt telescope. *Nature Biotechnology*, pages 1–7, March 2023.

[90] Lintong Du, Rui Xu, Shuxin Liu, Rongjun Shao, Lin Li, Yuhang Zhang, Ziqiang Li, Yuan Qu, Dapeng Tian, and Jiamiao Yang. Large dynamic range Shack-Hartmann wavefront sensing based on a graph-theoretic computational model. *Light : Science & Applications*, 15(1):199, April 2026.

[91] M. Yousaf, T. Akyurek, and S. Usman. A comparison of traditional and hybrid radiation detector dead-time models and detector behavior. *Progress in Nuclear Energy*, 83:177–185, August 2015.

[92] Heidemarie Halbritter, Silvia Ulrich, Friðgeir Grímsson, Martina Weber, Reinhard Zetter, Michael Hesse, Ralf Buchner, Matthias Svojtka, and Andrea Frosch-Radivo. *Illustrated Pollen Terminology*. Springer International Publishing, 2 edition, 2018.

[93] M. Weber, H. Halbritter, and W. Auer. Geranium robertianum. In : PalDat - A palynological database. /pub/Geranium_robertianum/306235, 2021.

[94] H. Halbritter and W. Auer. Stellaria holostea. In : PalDat - A palynological database. /pub/Stellaria_holostea/306417, 2021.

[95] Andrew S. Glassner. *An Introduction to Ray Tracing*. Morgan Kaufmann, January 1989.

[96] Ibón Guillén, Carlos Ureña, Alan King, Marcos Fajardo, Iliyan Georgiev, Jorge López-Moreno, and Adrian Jarabo. Area-preserving parameterizations for spherical ellipses. *Computer Graphics Forum*, 36(4):179–187, July 2017. arXiv:1805.09048 [cs].

[97] Klaus Halbach. Matrix Representation of Gaussian Optics. *American Journal of Physics*, 32(2):90–108, February 1964.

[98] Frank L. Pedrotti, Leno M. Pedrotti, and Leno S. Pedrotti. *Introduction to Optics*. Pearson Prentice Hall, 2007.

[99] Christophe Vérinaud. On the nature of the measurements provided by a pyramid wavefront sensor. *Optics Communications*, 233(1):27–38, March 2004.

[100] Jeffrey P. Wilde. Ray-tracing model of a perfect lens compliant with Fermat's principle : the Cardinal Lens. *Applied Optics*, 63(4):1110–1124, February 2024.

[101] Richard G. Schell and George Tyras. Irradiance from an Aperture with a Truncated-Gaussian Field Distribution. *JOSA*, 61(1):31–35, January 1971.

[102] Orazio Svelto. *Principles of lasers*. Springer, New York, NY, 5. edition edition, 2010.

[103] Alice Guillaume-Manca. *Adaptive optics in two-photon fluorescence microscopy for functional imaging in neuroscience in mice*. Theses, Sorbonne Université, June 2026. Issue : 2026SORUS099.

[104] N. Ageorges and J. C. Dainty, editors. *Laser guide star adaptive optics for astronomy*. Number Volume 551 in NATO ASI Series. Series C, Mathematical and Physical Sciences. Springer-Science+Business Media, B.V, Dordrecht, [Netherlands], 2000.

[105] Alastair G. Basden, Fanny Chemla, Nigel Dipper, Eric Gendron, David Henry, Tim Morris, Gerrard Rousset, and Fabrice Vidal. Real-time correlation reference update for astronomical adaptive optics. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 439(1):968–976, March 2014.

[106] Michel Tallon, Isabelle Tallon-Bosc, Clémentine Béchet, and Eric Thiébaut. Shack-Hartmann wavefront reconstruction with elongated sodium laser guide stars : improvements with priors and noise correlations. page 70151N, Marseille, France, July 2008.

[107] Robert K Tyson. *Principles of adaptive optics*. Taylor & Francis, Boca Raton, 2011. OCLC : 741261071.

[108] Antoine Hubert, Fabrice Harms, Rémy Juvénal, Pauline Treimany, Xavier Levecq, Vincent Loriette, Georges Farkouh, François Rouyer, and Alexandra Fragola. Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star. *Optics Letters*, 44(10):2514–2517, May 2019.

[109] Jun Zeng, Pierre Mahou, Marie-Claire Schanne-Klein, Emmanuel Beaurepaire, and Delphine Débarre. 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues. *Biomedical Optics Express*, 3(8):1898–1913, August 2012.

[110] Aglaë Kellerer, Fabrice Vidal, Éric Gendron, Zoltan Hubert, Denis Perret, and Gérard Rousset. Deformable mirrors for open-loop adaptive optics. In *Proceedings of the SPIE*, volume 8447, pages 844765 1–12, Amsterdam, Netherlands, July 2012.

[111] Talley J. Lambert. FPbase : a community-editable fluorescent protein database. *Nature Methods*, 16(4):277–278, April 2019.

[112] Joseph R. Lakowicz, editor. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Springer US, Boston, MA, 2006.

[113] Boris Yakimov, Natalia Rovnyagina, Afraa Hasan, Juntao Zhang, Haibo Wang, Victor Fadeev, Liliya Urusova, Evgeny Khoroshilov, Andrey Sharkov, Nataliya Mokrysheva, and Evgeny Shirshin. Fluorescence saturation imaging microscopy : molecular fingerprinting with a standard confocal microscope. *Biomedical Optics Express*, 15(6):3755–3769, May 2024.

[114] Hui Cheng and K. C. Gupta. An historical note on finite rotations. *Journal of Applied Mechanics*, 56:139–145, March 1989. ADS Bibcode : 1989JAM....56..139C.

[115] L. G. Henyey and J. L. Greenstein. Diffuse radiation in the Galaxy. *The Astrophysical Journal*, 93:70–83, January 1941. ADS Bibcode : 1941ApJ....93...70H.

RÉSUMÉ

La visualisation des circuits neuronaux dans des cerveaux de rongeurs clarifiés, entiers, et marqués en fluorescence est une méthode couramment utilisée en neurosciences, par exemple, pour l'étude des maladies neurodégénératives. La microscopie confocale est une des méthodes phares pour en effectuer l'imagerie. Si la clarification des cerveaux permet d'en retirer la majorité des structures diffusantes, le cerveau clarifié conserve néanmoins des inhomogénéités d'indice de réfraction qui induisent des aberrations optiques. Ces aberrations dégradent la qualité d'imagerie, en particulier en profondeur.
L'optique adaptative est une technique de correction des aberrations optiques qui peut a priori permettre de retrouver une meilleure qualité d'image en profondeur. Dans ce manuscrit je présente la conception, la réalisation et la caractérisation d'un microscope confocal avec optique adaptative adapté à l'imagerie de cerveaux clarifiés de rongeurs. L'optique adaptative implémentée est basée sur l'utilisation d'un analyseur de surface d'onde. Deux types d'analyseur sont utilisés : l'analyseur Shack-Hartmann et l'analyseur Pyramide. J'étudie les conséquences de l'illumination confocale sur les performances de ces deux types d'analyseurs. Je donne également une présentation du logiciel de contrôle de l'optique adaptative dont le développement, initié avant ma thèse, s'est poursuivi pendant celle-ci. J'ai également développé un logiciel de ray tracing dont je fais la présentation et dont je me sers pour caractériser l'instrument. Je présente, pour finir, les premières mesures d'aberrations en transmission effectuées pour établir l'amplitude des aberrations introduites par des échantillons de cerveaux clarifiés.
Le microscope que j'ai développé (optique, mécanique, logiciel de contrôle) sera utilisé pour obtenir des images de cerveaux de rongeurs avec une haute résolution spatiale. Les résultats présentés dans ce manuscrit (simulations numériques, et résultats expérimentaux) pourront aussi être utilisés pour améliorer le montage optique.

MOTS CLÉS

imagerie biologique, instrumentation, optique adaptative

ABSTRACT

Visualizing neural circuits in whole, clarified, and fluorescently labeled rodent brains is a commonly used method in neuroscience, for example, in the study of neurodegenerative diseases. Confocal microscopy is one of the leading methods for imaging these circuits. While brain clarification removes most scattering structures, the clarified brain nevertheless retains inhomogeneities in refractive index that cause optical aberrations. These aberrations degrade image quality, particularly in depth.
Adaptive optics is a technique for correcting optical aberrations that, in theory, can improve image quality in depth. In this manuscript, I present the design, construction, and characterization of a confocal microscope with adaptive optics suited for imaging clarified rodent brains. The implemented adaptive optics system is based on the use of a wavefront analyzer. Two types of analyzers are used : the Shack-Hartmann analyzer and the Pyramid analyzer. I investigate the consequences of confocal illumination on the performance of these two types of analyzers. I also present the adaptive optics control software, the development of which began before my thesis and continued throughout it. I have also developed a ray-tracing software, which I present and use to characterize the instrument. Finally, I present the first aberration measurements performed in transmission to determine the magnitude of the aberrations introduced by clarified brain samples.
The microscope I developed (optics, mechanics, control software) will be used to obtain high-spatial-resolution images of rodent brains. The results presented in this manuscript (numerical simulations and experimental results) can also be used to improve the optical setup.

KEYWORDS

imaging for biology, instrumentation, adaptive optics