

Utilisation et impact des analyseurs de Front d'onde

Shack-Hartmann sur les techniques d'imagerie du vivant

*Nicolas GOUZE, Jérôme BALLESTA, Guillaume DOVILLAIRE, Xavier LEVECQ,
Imagine Optic – 18, rue Charles de Gaulle – 91400 Orsay*

1. L'analyse de front d'onde Shack–Hartmann

1.1. Historique de la méthode

Principe séculaire, développé par **Hartmann**, pour étudier les aberrations de miroirs de télescopes, il ne considère plus le front d'onde dans sa globalité, mais comme étant la formation de plusieurs fronts d'onde élémentaires plans. Hartmann utilisa donc un masque percé d'une matrice de trous pour échantillonner une surface d'onde et étudier ce qu'il appelait les "aberrated rays". Le montage était le suivant : il plaçait devant un miroir le masque percé de petits trous régulièrement répartis sur un quadrillage cartésien et plaçait un écran de visualisation à proximité du lieu de formation de l'image.

Un siècle plus tard, le principe fut repris et amélioré par **Shack**, qui remplaça les trous par des lentilles. Ainsi les spots sur l'écran étaient plus lumineux et plus fins.

L'**ONERA** a ensuite largement utilisé le principe de ces analyseurs, dans le cadre de travaux en optique active et adaptative.

Depuis, **Imagine Optic** a repris le principe du senseur Shack-Hartmann et en a optimisé le dimensionnement afin d'en faire un outil de métrologie souple et performant. Depuis 1996, l'entreprise a déposé de nombreux brevets concernant aussi bien les aspects software et hardware, aspects critiques de la méthode de mesure. Elle propose maintenant une large gamme de ces analyseurs, compatible avec un large champ d'applications de métrologie optique. Elle a commercialisé plus de 100 de ses H-LINE et HASO dans l'industrie et la recherche (CEA, ESPCI, ESO, LOA, SAGEM, US Air Force.....), et continue d'en améliorer les fonctionnalités et les performances.

En parallèle, l'entreprise propose des solutions d'optique active et adaptative intégrant HASO, élément déphaseur et logiciels. Ainsi Imagine Optic est capable d'intégrer tous les miroirs déformables du marché dans ses boucles, et a déjà réalisé des essais de Correction de Surface d'Onde avec un masque de cristaux liquides adressables optiquement. Cette dernière génération de composants est au cœur de la problématique actuelle de la R&D de la société Orcéne : **Le Beam Shaping ou la mise en forme de faisceaux.....**

1.2. Principe de mesure

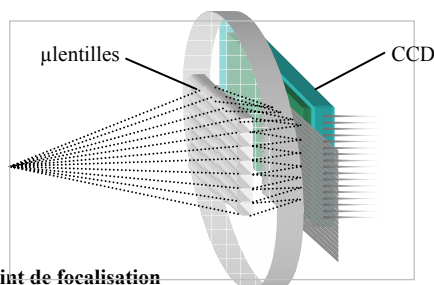
La phase est le critère physique le plus en amont dans la connaissance et la maîtrise d'un faisceau lumineux ou d'un instrument optique. A partir de la mesure de la phase, de nombreux paramètres sont accessibles mathématiquement.

Les analyseurs Shack Hartmann mesurent la phase et l'intensité de manière décorrélée. Le champ électromagnétique est ainsi défini dans le plan des μ lentilles. Il est donc possible, par calcul, de se propager dans l'espace libre et d'aller ainsi calculer la PSF¹, la FTM² d'un instrument ou le M² d'un faisceau Gaussien.

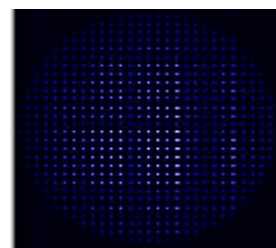
La méthode de mesure et d'analyse Shack-Hartmann de mesure de la phase peut se résumer comme suit :

I. Echantillonnage du front d'onde

Un faisceau se propage et est échantillonné par la matrice de μ lentilles (fig 1) de l'analyseur. Les μ lentilles focalisent donc chacune en un spot (fig2) qui est à la base du traitement réalisé par le logiciel d'Imagine Optic.



II. Signal caméra

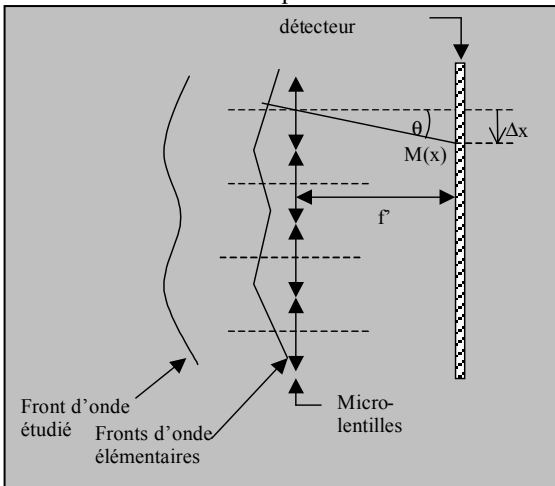


¹ Point Spread Function : Répartition de l'énergie en un point de focalisation

² Fréquence de Transfert de Modulation : Critère de caractérisation classique de systèmes optiques. Utilisé pour juger de la qualité d'un système en terme de réponse en fréquences spatiales, notamment pour les systèmes d'imagerie



III. Calcul des pentes locales



La pente locale d'un front d'onde s'exprime de la manière suivante :

$$\tan \theta = \frac{d(\theta)}{d(X)} \text{ et } \tan \theta = \frac{M(X)}{f'}$$

M(X) étant le barycentre d'un spot

On a donc :

$$M(X) = \frac{f' \times d(\phi)}{d(X)}$$

Les analyseurs de front d'onde Shack Hartmann mesurent en fait la dérivée du front d'onde. Il est donc ensuite possible de passer de la dérivée à la surface d'onde par des algorithmes mathématiques d'intégration ou de projection polynomiale.

1.3. Avantages et performances des HASO développés par Imagine Optic

Les travaux réalisés par Imagine Optic et ce, aussi bien au niveau Hard, pour le dimensionnement des microlentilles, qu'au niveau soft, pour les algorithmes de calculs ont permis au HASO d'accéder à de réelles performances métrologiques.

Aujourd'hui les HASO mesurent la phase en absolu avec une précision de $\lambda/100$ rms et une répétabilité inférieure à $\lambda/200$ rms. Les sensibilités de mesure sont de l'ordre du μrad sur le tilt et de $5 \cdot 10^{-4} \text{m}^{-1}$ sur la courbure.

Mais le principal avantage du mode de mesure des Shack Hartmann par rapport à l'interférométrie, par exemple, est la dynamique de mesure qu'offre le système. En effet les HASO sont capables de mesurer un front d'onde présentant un tilt de 1200λ et une courbure de 800λ . Ces grandes dynamiques lui permettent de caractériser, en temps réel, des instruments ou des composants très ouverts et fortement aberrants. Imagine Optic a mis au point un système de calibration et breveté un logiciel de tracking automatique des tâches focales.

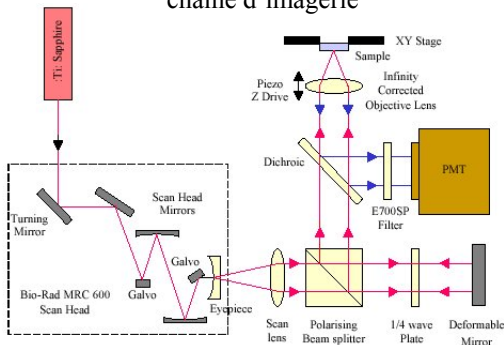
A ces avantages dus aux innovations apportées par Imagine Optic, se rajoutent ceux dus au principe même de la mesure. Ainsi les HASO sont insensibles aux vibrations, aux perturbations atmosphériques, et enfin sont achromatiques.

2. Applications aux domaines de la Biophotonique

Avec la donnée élémentaire qu'est le front d'onde, Imagine Optic propose un instrument polyvalent et adaptable à de nombreuses situations et qui a déjà fait ses preuves dans d'autres domaines.

2.1. Etat de l'art

IV. Implantation de l'optique adaptative dans une chaîne d'imagerie

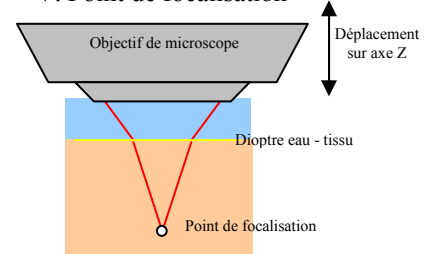


A court terme une des problématiques en imagerie multiphotonique est l'optimisation de la PSF (Point Spread Function) en sortie des objectifs de microscopes. L'objectif est double puisque un meilleur gain en résolution ainsi qu'une augmentation de la profondeur de pénétration des tissus sont visés. Ces 2 points sont d'ailleurs physiquement liés.

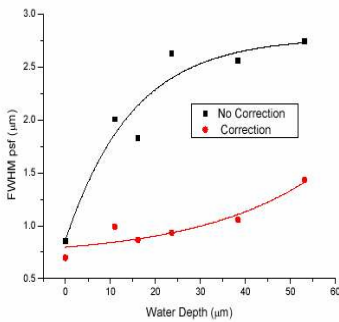
Plusieurs équipes ont déjà travaillé sur le sujet et certaines ont déjà implantés des systèmes de **Correction de Surface d'Onde** dans leurs microscopes. La dernière en date (Mai 2003), conduite par P.N. Marsh a abouti à une publication :

« *Practical implementation of adaptive optics in multiphoton microscopy* ».

V. Point de focalisation



VI. Graphe de gain sur la taille de PSF



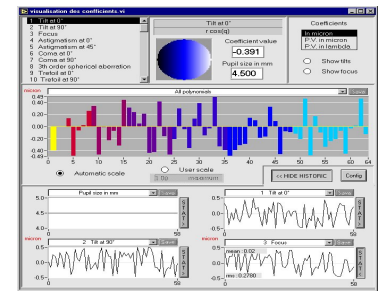
Dans cet article Marsh présente les résultats de l'utilisation d'un **Miroir Déformable** pour optimiser la **PSF** en compensant l'aberration sphérique induite par le liquide d'immersion de la cellule à imager. En fait le réel problème réside dans le fait que les objectifs à immersion utilisés sont optimisés pour travailler dans un indice bien défini, si l'indice est différent ou si il n'est pas constant dans le tissu, de l'aberration sphérique est générée. Cela se traduit directement par un point de focalisation qui s'éloigne de la limite de diffraction. Les conséquences directes de ce phénomène sont : perte sur le contraste de l'image et des limites rapides en terme de pénétration dans les tissus. Marsh a donc développé un système de **CSO**, avec un **MD OKO** et **Algorithme Génétique**. En bouclant sur l'allure de la PSF obtenu sur son **PMT** il a obtenu des résultats très encourageants (voir courbes ci-contre) mais nettement améliorables à court ou moyen terme. En effet les temps de calibration et de

correction peuvent être diminués et les performances de correction améliorées. De plus les fonctionnalités de son système **d'Optique Adaptative** sont limitées puisqu'il ne fait que de la correction

Néanmoins les résultats de l'expérience de P.N. Marsh mettent en évidence la réduction du diamètre de la PSF de 2,5 µm à 1 µm pour un gain sur la profondeur de pénétration d'environ 100%. Cette technique permet donc d'envisager une exploration de tissus plus en profondeur, rendue possible par la concentration de l'énergie lumineuse plus importante au point de focalisation.

2.2. Réglages et alignements

Les aberrations présentes sur la phase en sortie d'objectif sont directement en relation avec la qualité des optiques qui le précèdent. Grâce à la mesure temps réel du FO, toutes les optimisations sont possibles. De plus une reconstruction temps réel sur les Zernike est possible, ce qui permet de réduire les aberrations de la chaîne optique post-Laser rapidement et de manière objective. D'ores et déjà le HASO permet donc de quantifier et d'optimiser la qualité globale de la voie d'excitation du microscope.



Décomposition sur les Zernike

2.3. Optique adaptative pour l'imagerie

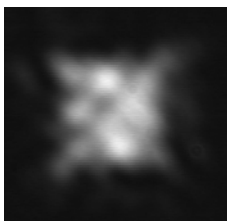
Les aberrations principalement rencontrées sont générées durant la pénétration de l'échantillon. Les indices des échantillons par le faisceau d'excitation diffèrent bien souvent de l'indice pour lequel est conçu l'objectif de microscope ce qui introduit de l'aberration sphérique.

2.3.1. Correction de surface d'onde avec boucle d'optique adaptative

L'élément déphaseur (**MD**, **SLM**³...) permet de modifier le front d'onde incident afin de converger vers une consigne fournie par l'utilisateur. A chaque mesure de **FO** faite par le HASO sera calculée une carte de tension à appliquer au miroir pour que celui-ci compense les aberrations. Le HASO commandera directement l'élément déphaseur à partir d'un logiciel et de drivers développés par Imagine Optic. La boucle de **CSO** corrigera donc toutes les aberrations mesurées par le HASO et ce dès la première itération. De plus il sera possible de se passer des platines de translation de l'objectif de microscope en jouant sur la capacité que possède un MD à faire de la courbure.

2.3.2. Mise en forme de PSF

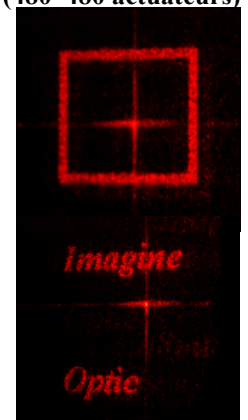
L'autre application de l'optique adaptative en imagerie du vivant est la mise forme des faisceaux d'excitation. Imagine Optic travaille actuellement sur la question et a obtenu des résultats prometteurs. Ainsi comme le montre les photos ci contre il sera possible en fonction de l'élément déphaseur de réaliser des PSF carrées, linéaires et de toutes autres formes.



Ci dessus PSF obtenue avec MD (17 actuateurs)

A court terme l'optimisation de la surface d'onde permet d'entrevoir de nettes améliorations des contrastes en imagerie confocale, à 1 photon ou en multiphotons. A moyen terme l'optique adaptative pourra faire bénéficier de ses avantages, dans les applications d'imagerie classique mais aussi dans les applications de Frap, de Fret, de pinces optiques.....

Ci dessous PSF obtenues avec matrice SLM (480*480 actuateurs)



³ SLM (Spatial Light Modulator) : Matrice de cristaux liquides VGA.