



Microscopie non linéaire de tissus biologiques : excitation multicolore, faisceaux de Bessel, et excitation en nappe de lumière

Pierre Mahou

► To cite this version:

Pierre Mahou. Microscopie non linéaire de tissus biologiques : excitation multicolore, faisceaux de Bessel, et excitation en nappe de lumière. Optique [physics.optics]. Ecole Polytechnique X, 2012. Français. NNT : 2597046289B . pastel-00840186

HAL Id: pastel-00840186

<https://pastel.hal.science/pastel-00840186>

Submitted on 1 Jul 2013

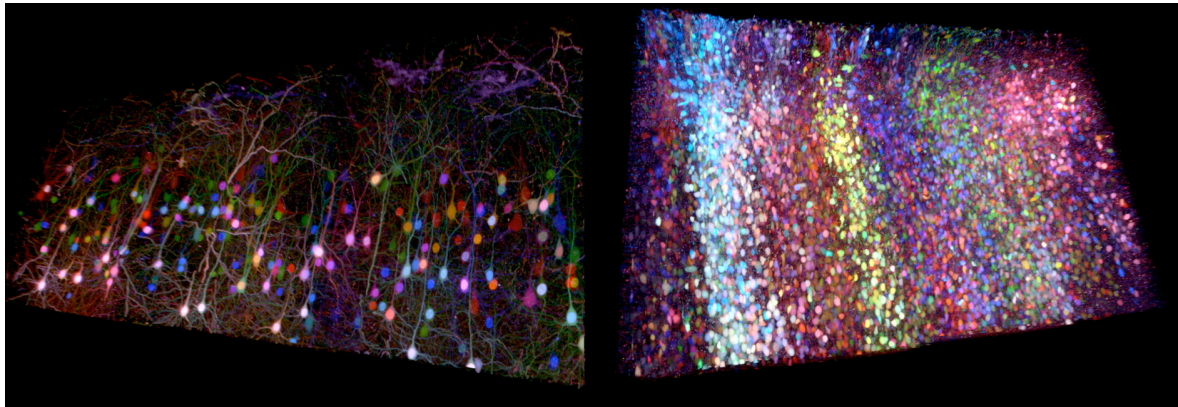
HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

Spécialité : Physique

MICROSCOPIE NON LINÉAIRE DE TISSUS BIOLOGIQUES : EXCITATION MULTICOULEUR, FAISCEAUX DE BESSEL, ET ILLUMINATION EN NAPPE DE LUMIÈRE



présentée par

Pierre Mahou

effectuée au Laboratoire d'Optique et Biosciences
et soutenue le 19 décembre 2012 devant le jury composé de :

Dr. Antonello DE MARTINO	Président
Dr. Laurent BOURDIEU	Rapporteur
Dr. Sylvain GIGAN	Rapporteur
Dr. Sandrine LÉVÈQUE-FORT	Examinatrice
Pr. Jérôme MERTZ	Examineur
Dr. Delphine DÉBARRE	Co-directrice de thèse
Dr. Emmanuel BEAUREPAIRE	Directeur de thèse



Thèse de doctorat de l'École Polytechnique

Spécialité : Physique

MICROSCOPIE NON LINÉAIRE DE TISSUS BIOLOGIQUES : EXCITATION MULTICOULEUR, FAISCEAUX DE BESSEL, ET ILLUMINATION EN NAPPE DE LUMIÈRE

présentée par

Pierre Mahou

effectuée au Laboratoire d'Optique et Biosciences
et soutenue le 19 décembre 2012 devant le jury composé de :

Dr. Antonello DE MARTINO	Président
Dr. Laurent BOURDIEU	Rapporteur
Dr. Sylvain GIGAN	Rapporteur
Dr. Sandrine LÉVÈQUE-FORT	Examinatrice
Pr. Jérôme MERTZ	Examineur
Dr. Delphine DÉBARRE	Co-directrice de thèse
Dr. Emmanuel BEAUREPAIRE	Directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier les membres du jury : Laurent Bourdieu, Sylvain Gigan, Sandrine Lévêque-Fort, Antonello De Martino et Jerome Mertz. Merci d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse, merci pour votre intérêt pour mon travail, merci d'avoir minutieusement lu mon manuscrit et encore merci pour m'avoir inondé de questions et de commentaires constructifs lors de ma soutenance. Pour respecter le protocole, j'adresse ensuite un grand merci mais non moins sincère à Jean-Louis Martin pour m'avoir accueilli au sein du Laboratoire d'Optique et Biosciences, ainsi qu'à Delphine Débarre et Emmanuel Beaurepaire pour m'avoir chaleureusement intégré à l'équipe de microscopie non linéaire et pour avoir encadré mon travail tout au long de ces trois années de thèse.

Je souhaiterais ensuite témoigner ma reconnaissance à Willy Supatto et Jean Livet pour avoir encadré une partie de mon travail de façon officieuse mais déterminante que ce soit sur le projet d'imagerie multi-couleurs et sur le projet d'imagerie à nappe de lumière.

Je tiens également à remercier les autres membres de l'équipe de microscopie non linéaire avec lesquels j'ai activement travaillé et collaboré : Marie-Claire Schanne-Klein, Manuel Joffre, Nicolas Olivier, Max Zimmerley, Guillaume Labroille, Nelly Vuillemin et Sylvain De Léséleuc. Pour n'oublier personne, je remercie aussi tous nos collaborateurs de l'Institut de la Vision (Paris) et de l'Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure (Paris) : Karine Loulier, Xavier Morin, Raphaëlle Barry, et Katherine Matho pour avoir préparé les échantillons Brainbow, ainsi que nos collaborateurs de l'Institut de Neurobiologie Alfred Fessard (Gif) pour les embryons de poisson zèbre et nos collaborateurs du Centre de Génétique Moléculaire (Gif) pour les nématodes.

Je tiens également à remercier Laure Lachapelle, Christelle Francais, Xavier Solinas et Jean-Marc Sintès pour leur aide concernant les aspects administratifs,

l'interface électronique ou encore mécanique. Je vous en remercie doublement car ce travail est essentiel mais pas toujours mis en valeur. Je pense qu'à ce moment des remerciements il faut que je mentionne mes voisins de bureau qui m'en voudront dans le cas contraire. Je remercie donc Yvan Gusachenko, Antoine Wojdyla, Guillaume Labroille, Stéphan Bancelin, Thibault Vieille, Lucille Mendonca, Nelly Vuillemin, Alexander Podzorov, John Ulmer et Alessio Ligabue, pour toutes les discussions et échanges d'idées que l'on a pu avoir. Je remercie ensuite : Paul abbyad, Silvan Türkcan, Max Richly, Mouna Abdesselem, Sergey Laptenok et Stéphane Skouloubris qui ont bien voulu braver le froid pour faire un peu de sport et se changer les idées.

Plus généralement, je remercie les personnes du laboratoire que je n'ai pas encore citées mais qui ont contribué à maintenir une bonne ambiance de travail que ce soit les membres permanents : Antigoni Alexandrou, Hubert Becker, Adeline Bonvallet, Latifa Bouzahir-Sima, Cédric Bouzigues, Guilhem Gallot, François Hache, Joëlle Kühn, Isabelle Lamarre, Jean-Christophe Lambry, Roxane Lestini, Ursula Liebl, et les personnes de passages tout comme moi : Gaël Latour, Laura Lobato Bailon, Laura Antonucci, Rachid Rezgui, Louis Daniault, Kamel Djaout, Floriane Delpech. Pour terminer les remerciements concernant le personnel du laboratoire, j'adresse un merci spécial à Marie-Claire Schanne-Klein pour m'avoir acheté ma chaise de bureau qui m'aura servi tout au long de mon séjour au LOB!

Enfin, mes derniers remerciements vont naturellement à ma famille et à Elsa qui m'aura soutenu et permis de m'épanouir.

Et sur ce bon vent!

Table des matières

1	Introduction	1
1.1	Imagerie pour la biologie	2
1.1.1	Les techniques d'imagerie biomédicale	2
1.1.1.1	Techniques les plus répandues	2
1.1.1.2	Développement des microscopies optiques	3
1.1.2	Microscopie non linéaire : principes et propriétés	4
1.1.2.1	Principes et domaines d'étude	4
1.1.2.2	Volume d'excitation	7
1.1.2.3	Ordre de grandeur des signaux détectés	8
1.1.2.4	Pénétration dans les tissus	9
1.1.2.5	Paramètres limitant la profondeur de pénétration	11
1.1.2.6	Photo-toxicité et photo-blanchiment	14
1.1.2.7	Stratégies d'acquisition	16
1.2	Signaux non linéaires et sources de contraste	17
1.2.1	Origine des contrastes	17
1.2.2	Microscopie de fluorescence multi-photonique	19
1.2.2.1	Origine physique des signaux de fluorescence	19
1.2.2.2	Fonction d'étalement de point (PSF)	20
1.2.2.3	Microscopie de fluorescence excitée à deux photons	21
1.2.3	Microscopies non linéaires cohérentes	23
1.2.3.1	Construction des signaux	23
1.2.3.2	Polarisations non linéaires	24
1.2.3.3	Génération de seconde harmonique (SHG)	25
1.2.3.4	Génération de troisième harmonique (THG)	25
1.2.3.5	Mélange à quatre onde (FWM)	27
1.3	Problématiques	28

1.4	Dispositif expérimental	29
1.4.1	Sources utilisées	30
1.4.2	Mise en forme des sources	31
1.4.3	Microscopes	34
1.4.3.1	Microscope à balayage	34
1.4.3.2	Microscope à nappe de lumière	35
2	Microscopie à deux photons par mélange de fréquences	37
2.1	Introduction	38
2.2	Microscopie à deux photons multicolore : état de l'art	39
2.2.1	Les approches multicolore en microscopie	39
2.2.2	Stratégies d'imagerie non linéaire multicolore	40
2.3	Combinaison de faisceaux synchronisés	42
2.3.1	Principe	43
2.3.2	Travaux antérieurs	44
2.3.3	Spectres d'excitation à deux photons	45
2.3.4	Validation du concept	47
2.3.5	Recouvrement spatial et aberrations chromatiques	49
2.3.6	Comparaison entre une excitation à 1 et 2 couleurs	53
2.3.7	Imagerie de grands volumes	54
2.4	Applications à l'imagerie de tissus Brainbow	60
2.4.1	Le marquage Brainbow	60
2.4.2	Connectivité dans le cerveau	62
2.4.3	Lignage et étude clonale	68
2.4.4	Étude du photo-blanchiment en multicolore	74
2.4.5	Conclusion et perspectives	77
3	Microscopie non linéaire multimodale	87
3.1	Introduction	87
3.2	Microscopie THG-FWM	88
3.2.1	Mise en contexte	88
3.2.2	Système expérimental	89
3.2.3	Conditions d'accord de phase	90
3.2.4	Susceptibilité non linéaire	92
3.2.5	Estimation de susceptibilité non linéaire	94

3.2.6	Sources de contrastes au cours des divisions cellulaires	98
3.2.7	Effets de structures dans les échantillons	100
3.2.8	Effets des résonances électroniques	102
3.3	Microscopie multimodale cohérente et incohérente	105
3.3.1	Imagerie THG combinée à la fluorescence	105
3.3.1.1	Imagerie THG combinée à la fluorescence	105
3.3.1.2	Résultats avec un fluorophore	106
3.3.1.3	Résultats avec trois fluorophores	107
3.3.2	Imagerie multimodale de contrastes endogènes	108
3.3.2.1	Imagerie de quatre signaux endogènes	109
3.3.2.2	Imagerie THG-CARS	111
3.4	Conclusions et perspectives	112
4	Faisceau de Bessel et microscopie à profondeur de champ étendue	127
5	Microscopie non linéaire à nappe de lumière	129
	Conclusion	131
	Bibliographie	135

Chapitre 1

Introduction

Sommaire

1.1 Imagerie pour la biologie	2
1.1.1 Les techniques d'imagerie biomédicale	2
1.1.2 Microscopie non linéaire : principes et propriétés	4
1.2 Signaux non linéaires et sources de contraste	17
1.2.1 Origine des contrastes	17
1.2.2 Microscopie de fluorescence multi-photonique	19
1.2.3 Microscopies non linéaires cohérentes	23
1.3 Problématiques	28
1.4 Dispositif expérimental	29
1.4.1 Sources utilisées	30
1.4.2 Mise en forme des sources	31
1.4.3 Microscopes	34

Au cours de ce chapitre introductif nous allons tout d'abord recontextualiser les microscopies optiques non linéaires parmi les méthodes d'imagerie actuellement utilisées en biologie (**Section 1.1**). Puis après avoir résumé les principales caractéristiques des techniques de microscopie non linéaire (**Section 1.1**) nous discuterons des spécificités des différents processus d'excitation non linéaires ainsi que des applications qui en découlent (**Section 1.2**). Enfin après avoir défini les problématiques et enjeux de cette thèse (**Section 1.3**), nous présenterons le dispositif expérimental utilisé pour les expériences de microscopie multimodale, et de parallélisation de l'excitation (**Section 1.4**).

1.1 Imagerie pour la biologie

1.1.1 Les techniques d'imagerie biomédicale

1.1.1.1 Techniques les plus répandues

Il existe actuellement de nombreuses techniques d'imagerie biomédicale. On distingue notamment les techniques d'imagerie clinique (la radiologie conventionnelle, le scanner à rayons X, l'échographie, et l'imagerie par résonance magnétique), les microscopies optiques (confocale, non linéaire, par cohérence optique, etc.), ou encore la microscopie électronique. D'une façon générale, suivant l'application considérée un compromis est à trouver entre invasivité et résolution (**Figure 1.1**).

Par exemple les techniques d'imagerie clinique possèdent une résolution modérée (typiquement 1 mm pour l'IRM) mais permettent de visualiser toutes les parties du corps humain. Les microscopies optiques dont les résolutions sont trois à quatre ordres de grandeur plus élevées ($1-0,1\mu\text{m}$) et la profondeur d'imagerie limitée à quelques dixièmes de millimètres sont en revanche adaptées à l'étude de petits organismes, de tissus, ou de cellules isolées. Enfin, la microscopie électronique, possédant des résolutions supérieures à 0,1 nm (soit dix fois la taille d'un atome de carbone) [1, 2] ne permet d'observer que des échantillons minces, en général fixés chimiquement et déshydratés.

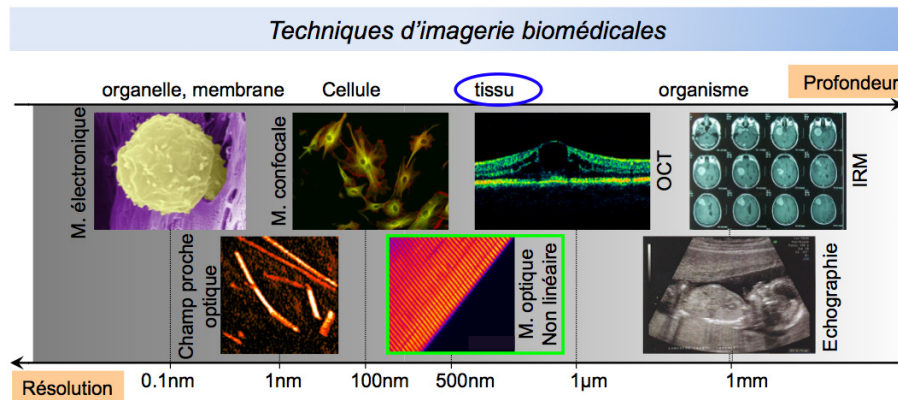


Figure 1.1: Comparaison des techniques d'imagerie couramment utilisées en biologie et en médecine. Les résolutions accessibles s'échelonnent de quelques nanomètres à plusieurs millimètres suivant la technique considérée. Globalement les techniques offrant les meilleures résolutions sont souvent les plus invasives et inversement. Adapté de [3].

1.1.1.2 Développement des microscopies optiques

Les techniques de microscopie optique actuelles sont issues de nombreuses inventions apparues au cours des siècles, la finalité ayant souvent été de mieux distinguer et comprendre les tissus vivants. Les avancées technologiques et scientifiques sont donc étroitement impliquées dans l'évolution des microscopies optiques. Les premiers développements ont tout d'abord été technologiques car ils ont contribué à améliorer le grandissement et la résolution des premiers microscopes plein champ qui furent inventés par Hans Janssen et Zacharias Janssen en 1590, et par Antoni van Leeuwenhoek (1632–1723). Ainsi, les premières contributions ont porté sur la correction des aberrations chromatiques et sphériques grâce aux premiers travaux de Joseph Jackson Lister (1786–1869), et sur l'utilisation d'objectifs à immersion proposés par Giaovanni Battista Amici (1786–1863), qui décrivit également l'influence des lamelles sur la qualité optique des images. Cependant ce n'est qu'après les travaux d'Ernst Abbe (1840–1905) qu'un formalisme sur la résolution et les aberrations en microscopie fut défini, ce qui permit une nette amélioration des résolutions des microscopes [4, 5, 6].

Les développements suivants se sont en revanche orientés vers le problème du contraste des microscopes plein champ dans les cellules et les tissus, conduisant notamment à la microscopie à contraste de phase en 1934 [7, 8] (ce qui valut le prix Nobel à Frederik Zernike en 1953), et à la microscopie à contraste interférenciel par Nomarski en 1956. Cependant, les contrastes fournis par ces méthodes ne sont pas spécifiques car ils reposent uniquement sur les variations d'indice de réfraction dans l'échantillon et il a fallu attendre l'apparition de la microscopie de fluorescence pour gagner à la fois en contraste et en spécificité.

On peut tout de même noter que les méthodes de marquage sont apparues bien avant la microscopie à contraste de phase, notamment suite aux travaux de Camillo Golgi (1843–1926) permettant d'imprégner des neurones entiers du système nerveux (1873), ou encore suite aux travaux du bactériologiste Paul Ehrlich (1854–1915) qui utilisa la fluorescéine pour visualiser l'humeur aqueuse dans l'œil ainsi que d'autres marqueurs organiques pour augmenter le contraste de bactéries au microscope (1881). Cependant, il fallut plusieurs années pour que les microscopes de fluorescence et les méthodes de marquage soient développées. Le marquage par immuno-fluorescence (méthode pour laquelle une protéine fluorescente attachée à un anticorps va spécifiquement s'attacher à un antigène cible), puis l'apparition des

marqueurs encodés génétiquement (protéines fluorescentes type GFP) représentent deux contributions majeures au développement de la microscopie de fluorescence.

Enfin, malgré la spécificité de marquage permise par ces méthodes, les premiers microscopes pourvus d'une détection plein champ ne possédaient pas de sectionnement optique ce qui ne permettait pas de distinguer le plan de mise au point des autres plans de l'échantillon. Ces problèmes ont été solutionnés notamment par l'invention du microscope confocal par Marvin Minsky en 1957, et par l'apparition des microscopies non linéaires [9, 10, 11]. Si l'invention du microscope confocal a permis par la suite de cartographier le développement d'échantillons minces ou de cellules en culture avec un contraste et un sectionnement optique jamais obtenus auparavant [12], la microscopie non linéaire a quant à elle permis de développer considérablement l'imagerie *in vivo* sur des tissus épais [13, 14, 15, 16, 17, 18] notamment grâce à la préservation du sectionnement optique dans les tissus et à son invasivité réduite.

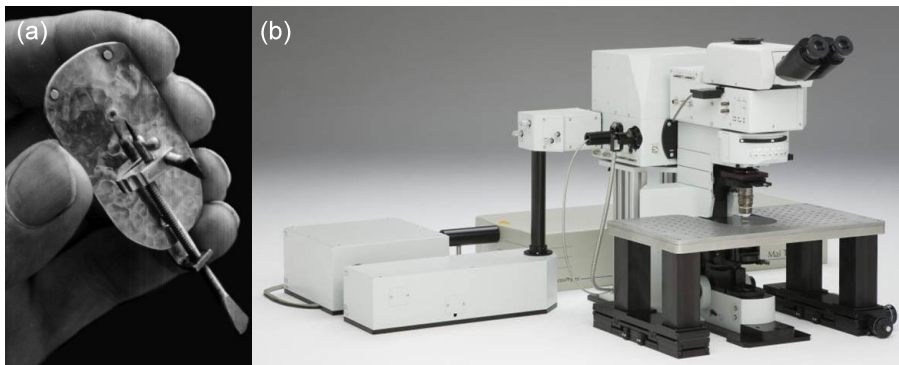


Figure 1.2: (a) Microscope construit par Antoni van Leeuwenhoek. Ses microscopes étaient constitués d'une seule lentille et ont d'abord été utilisés pour vérifier la régularité d'étoffes, puis pour observer des organismes vivants. (b) En comparaison, exemple de microscope non linéaire vendu actuellement.

1.1.2 Microscopie non linéaire : principes et propriétés

1.1.2.1 Principes et domaines d'étude

La microscopie optique non linéaire est une application des lasers impulsionnels et est apparue à partir des années 1980 [10, 19, 11, 20, 21]. Contrairement à la microscopie confocale, la microscopie non linéaire possède un sectionnement optique intrinsèque à l'excitation car le signal créé dépend non linéairement du profil

d'excitation. Ce confinement de l'excitation et le fait qu'il soit préservé en profondeur dans un milieu diffusant font de la microscopie non linéaire une méthode de choix pour l'imagerie de tissus épais *in vivo*.

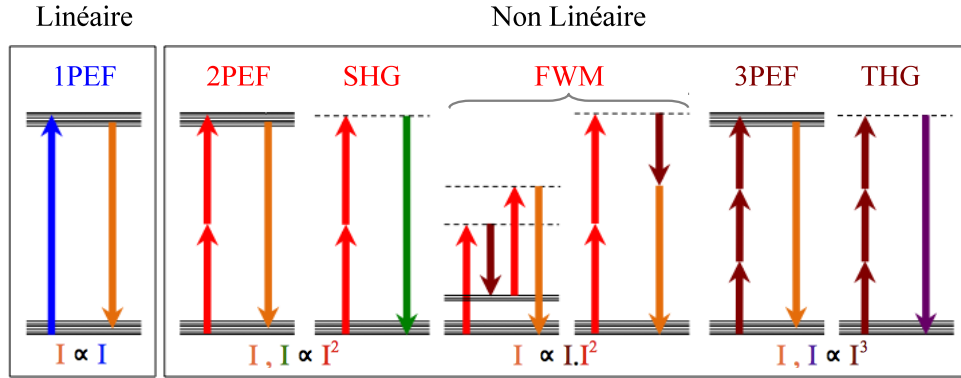


Figure 1.3: Mécanismes de contraste utilisables en microscopie linéaire et non linéaire. 1PEF, fluorescence excitée à un photon (linéaire); 2PEF, fluorescence excitée à deux photons; SHG, génération de seconde harmonique; FWM, mélange à quatre ondes résonant et non résonant; 3PEF, fluorescence excitée à trois photons; THG, génération de troisième harmonique.

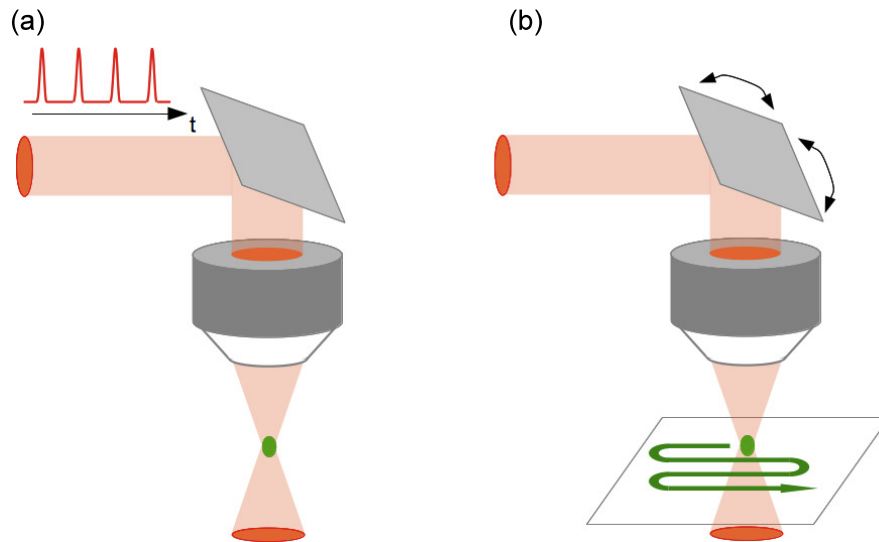


Figure 1.4: Mise en œuvre de la microscopie non linéaire. (a) Le faisceau d'un laser impulsionnel est focalisé à l'aide d'un objectif de microscope ce qui permet de produire efficacement des effets non linéaires dans les tissus. (b) Les images sont reconstruites point après point en balayant le volume de focalisation suivant un plan et en détectant les signaux non linéaires.

Typiquement les profondeurs d'imagerie sont de l'ordre de 0,5 mm dans du tissu cérébral de rat, pour des résolutions de l'ordre de $0,40 \times 0,40 \times 1,6 \mu\text{m}^3$ en surface du tissu pour une longueur d'onde $\lambda = 950 \text{ nm}$ et une ouverture numérique $\text{NA} = 1,0$. Cependant, en contrepartie les images se forment relativement lentement (temps par image typique de l'ordre de la seconde) car les tissus sont cartographiés selon un processus de balayage séquentiel c'est-à-dire point après point.

En plus de la profondeur d'imagerie, l'une des caractéristiques de la microscopie non linéaire réside dans la variété des modes de contraste disponibles : fluorescence excitée à deux photons (2PEF), génération de deuxième ou troisième harmonique (SHG-THG) et mélange à quatre ondes, etc. (**Figure 1.3**). La fluorescence excitée à deux photons de marqueurs endogènes ou exogènes est le mode de contraste le plus utilisé en raison de sa grande spécificité et sensibilité. La génération d'harmoniques (SHG ou THG) suscite depuis quelques années un net intérêt comme mode de contraste complémentaire, voire alternatif quand un marquage fluorescent n'est pas envisageable. Les applications de la microscopie non linéaire en biologie sont aujourd'hui nombreuses et concernent notamment les neurosciences [22, 13, 23], la cancérologie [24, 25], l'immunologie [26, 27, 17], et la biologie du développement [14, 15, 28, 18].

Les phénomènes optiques non linéaires sont produits de façon peu efficace avec une source de lumière continue. Par exemple un chromophore naturel exposé à la lumière du soleil subira un événement d'absorption à deux photons environ tous les 10 millions d'années. Pour produire ces effets efficacement avec un microscope dans les tissus, on a donc besoin de profils d'excitation confinés spatialement et temporellement, afin d'augmenter la probabilité d'interaction de plusieurs photons avec une même molécule à un instant donné. Le confinement spatial repose généralement sur l'utilisation d'objectifs de microscope permettant de focaliser la lumière sur une surface dont la dimension est limitée par la diffraction et le confinement temporel est obtenu par l'utilisation de lasers impulsionnels produisant typiquement des trains d'impulsions de durée $\tau \sim 100 \text{ fs}$ et de taux de répétition $R = 1/T = 80 \text{ MHz}$ (**Figure 1.4**). Enfin, parce que le signal est généré uniquement dans un volume restreint de l'échantillon, tous les photons produits peuvent être utilisés. Ils sont donc détectés par un collecteur de flux sensible à grande surface placé en transmission ou en réflexion, les images étant enregistrées point après point en balayant le volume focal suivant un plan à l'aide de déflecteurs synchronisés avec l'acquisition.

1.1.2.2 Volume d'excitation

En microscopie non linéaire, le signal est produit dans un volume restreint centré sur le point de focalisation, ce qui confère un sectionnement optique à l'excitation. Dans le cas des microscopies incohérentes (1PEF, 2PEF, 3PEF, etc.), cela peut être illustré en calculant le confinement de l'excitation : $S^n(z) = 2\pi \int_0^{+\infty} r I^n(r, z) dr$. Pour un faisceau focalisé de forme gaussienne-lorentzienne l'intensité du profil d'excitation peut se mettre sous la forme :

$$I(r, z) = \frac{2P_0}{\pi\omega(z)^2} \exp\left(-2\frac{r^2}{\omega(z)^2}\right), \quad (1.1)$$

où $\pi\omega(z)^2$ est la surface occupée par le faisceau dans le plan de cote z et P_0 la puissance moyenne. Pour un faisceau gaussien $\omega(z) = \omega_0 \sqrt{1 + 4z^2/(n^2 k_0^2 \omega_0^4)}$ et ω_0 est la largeur à $1/e^2$ du profil d'intensité au foyer de l'objectif de microscope. Dans le cas d'un processus non linéaire d'ordre n le confinement de l'excitation est donc donné par la relation suivante :

$$\frac{S^n(z)}{P_0} = \frac{1}{n} \left(\frac{2P_0}{\pi\omega^2(z)} \right)^{n-1} \quad (1.2)$$

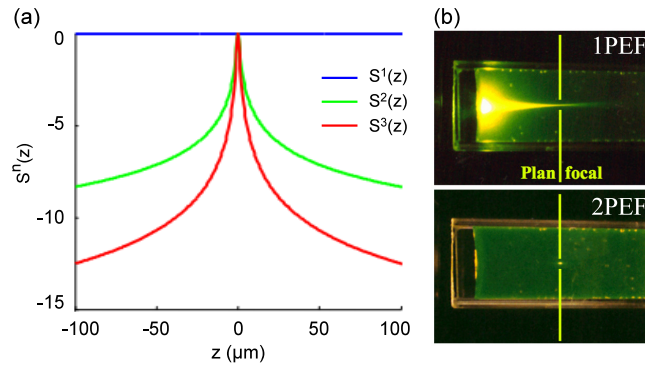


Figure 1.5: Confinement optique en microscopie non linéaire. (a) Courbes du confinement tracées en échelle logarithmique pour une excitation à un, deux ou trois photons. Les courbes ont toutes été normalisées à l'unité pour la comparaison. (b) Signal de fluorescence excité à un (haut) et deux photons (bas) pour des faisceaux focalisés dans une cuve de fluorescéine. L'excitation non linéaire possède un confinement intrinsèque. Images adaptées de [29].

Comme cela est illustré sur la **Figure 1.5** dans le cas d'un échantillon homogène, pour un processus d'excitation linéaire le signal total créé dans chaque plan transverse est invariant le long de l'axe de propagation, alors que pour une excitation non linéaire l'efficacité d'excitation est maximale dans le plan de focalisation. Usuellement, le volume d'excitation V est défini à partir du carré ou du cube de la distribution d'intensité excitatrice. On peut ainsi approximer le volume d'excitation non linéaire par une fonction de forme gaussienne-gaussienne dont les largeurs à $1/e^2$ notées ω_{xy} et ω_z peuvent se mettre sous la forme [29] :

$$\begin{aligned}\omega_{xy} &= \frac{0,320\lambda}{\sqrt{n}\text{NA}} \text{ pour } \text{NA} \leq 0,7 \text{ et } \omega_{xy} = \frac{0,325\lambda}{\sqrt{n}\text{NA}^{0,91}} \text{ pour } \text{NA} > 0,7 \\ \omega_z &= \frac{0,532\lambda}{\sqrt{n}} \left[\frac{1}{(n_{liq} - \sqrt{n_{liq}^2 - \text{NA}^2})} \right] \\ V &= (\pi/n)^{3/2} \omega_{xy}^2 \times \omega_z\end{aligned}\tag{1.3}$$

où λ est la longueur d'onde dans le vide, NA l'ouverture numérique et n_{liq} l'indice de réfraction du milieu. Par exemple pour la fluorescence excitée à deux photons ($n = 2$), si l'on utilise une ouverture numérique $\text{NA} = 1,0$ et une longueur d'onde d'excitation $\lambda = 950 \text{ nm}$, les extensions axiales et radiales à mi-hauteur valent $\delta_{xy} = 2\sqrt{\ln 2} \times \omega_{xy} = 0,40 \mu\text{m}$ et $\delta_z = 2\sqrt{\ln 2} \times \omega_z = 1,60 \mu\text{m}$. Ces résolutions sont moins bonnes que dans le cas de la microscopie confocale car les longueurs d'onde sont généralement 2 à 3 fois plus élevées. Cependant la comparaison absolue de ces techniques en termes de résolution est complexe, car celle-ci dépend de plusieurs paramètres tels que l'ouverture du diaphragme confocal et la diffusion [30, 31, 29].

1.1.2.3 Ordre de grandeur des signaux détectés

Nous allons maintenant estimer l'ordre de grandeur des signaux attendus en microscopie de fluorescence excitée à deux photons. Dans le cas où une molécule se trouve au foyer d'un objectif de microscope, on peut s'attendre à ce que le nombre de photons produits par unité de temps (flux de photons) de fluorescence dépende : (i) de la section efficace de la molécule notée σ_{2PEF} , (ii) du carré de l'intensité du faisceau focalisé noté I_0^2 et (iii) du gain apporté suite à l'utilisation d'un train d'impulsions de rapport cyclique T/τ . Ainsi :

$$F = \frac{1}{2} \sigma_{2PEF} I_0^2 \frac{T}{\tau} \quad (1.4)$$

Typiquement, pour un oscillateur titane-saphir émettant des impulsions de durée $\tau = 100$ fs à un taux de répétition $1/T = 80$ MHz, pour une puissance moyenne d'excitation $P_0 = 1,0$ mW $= 5 \times 10^{15}$ photons $\cdot$ s $^{-1}$ à $\lambda = 950$ nm, focalisées sur une surface $S = 10^{-9}$ cm 2 et pour un fluorophore de section efficace $\sigma_{2PEF} = 10$ GM $= 10^{-49}$ cm $^4 \cdot$ s $\cdot$ photon $^{-1}$, le flux de photons de fluorescence vaut approximativement $F \approx 2 \times 10^5$ photons $\cdot$ s $^{-1}$. D'autre part, dans le cas où N molécules sont présentes dans le volume focal le signal produit dépend alors (i) du signal produit par une molécule, (ii) d'un facteur de correction prenant en compte la forme du faisceau noté γ et (iii) du nombre de molécules $N = C V$, soit :

$$F = \frac{1}{2} \sigma_{2PEF} I_0^2 \frac{T}{\tau} \times \gamma \times C V \quad (1.5)$$

Pour un faisceau de forme gaussienne-gaussienne $\gamma = 1/\sqrt{8}$ [32]. Ainsi, pour des concentrations en molécules de l'ordre de $C = 10$ μ M et les mêmes conditions utilisées précédemment, le nombre de molécules excitées dans le volume focal vaut $N = 600$ ce qui donne un flux de photons de fluorescence de l'ordre de $F \approx 5 \times 10^7$ photons $\cdot$ s $^{-1}$. Pour des temps d'acquisition par pixel compris entre 1 et 10 μ s on peut alors détecter de l'ordre de 50–500 photons par pixel sur un angle solide de 4π sr. Pour collecter ce type de flux, on peut par exemple utiliser des photomultiplicateurs (PMT) en régime de comptage de photons. Dans le cas d'un marquage plus efficace, on utilise usuellement des PMT analogiques.

1.1.2.4 Pénétration dans les tissus

Le principal avantage de la microscopie non linéaire par rapport à la microscopie confocale est sa capacité de pénétration dans les tissus biologiques qui sont généralement fortement diffusants pour la lumière visible. Cette capacité est liée à la conservation du sectionnement optique dans les tissus, à l'efficacité du schéma de détection et aux longueurs d'onde impliquées.

Conservation du sectionnement optique : contrairement à la microscopie confocale, la microscopie non linéaire possède un sectionnement optique lié à la dépendance non linéaire entre le signal créé et l'intensité excitatrice. Grâce à cette

propriété, le sectionnement optique se conserve de façon robuste dans les tissus malgré la diffusion [33]. Cependant, on distingue plusieurs régimes de création des signaux. Jusqu'à des profondeurs comprises entre deux et trois fois le libre parcours moyen (l_s) de la lumière dans le tissu [34, 35, 36], (soit pour des profondeurs de l'ordre de 300-500 μm dans le cerveau de rat), seuls les photons balistiques contribuent au signal, l'effet de la diffusion étant principalement d'atténuer le profil d'excitation. En revanche pour des profondeurs plus élevées la diffusion conduit peu à peu à une redistribution des photons d'excitation et limite la qualité des images (**Figure 1.6(a)**). D'une part, cela se traduit par une réduction de l'ouverture numérique effective car les photons se propageant suivant les angles les plus inclinés parcourent des distances plus grandes et donc subissent plus d'événements de diffusion. D'autre part la forte intensité excitatrice en surface et au-dessus du plan focal (lumière partiellement diffusée) finit par produire un bruit de fond de fluorescence, conduisant à une dégradation de la résolution et du contraste, ce qui est plus critique. Quelques études ont estimé que la limite fondamentale pour la profondeur d'imagerie en fluorescence excitée à deux photons se situe entre 5 et $8l_s$ [37, 36].

Efficacité de détection : grâce à la préservation du sectionnement optique dans les tissus, le schéma de détection peut être très efficace en microscopie non linéaire car aucune stratégie de filtrage des photons n'est à adopter contrairement à une détection confocale (**Figure 1.6(b)**). La sensibilité de détection est donc en grande partie limitée par l'étendue géométrique de détection car tous les photons émis contribuent au signal utile.

Dans le cas de l'épidétection d'un signal de fluorescence à deux photons créé dans un milieu transparent, l'angle solide d'un objectif d'ouverture numérique $\text{NA} = 0,8\text{-}1,0$ permet seulement de collecter 10–17% de la fluorescence. Pour un milieu fortement diffusant, cette fraction est environ doublée en surface (car le tissu en-dessous du plan focal se comporte comme un miroir diffusant [38]) mais elle décroît progressivement avec la profondeur car la fluorescence diffusée semble provenir d'une source étendue dont la dimension finit par dépasser celle du champ de vue [39, 38]. Ainsi, la fraction collectée lors de l'imagerie en profondeur peut être améliorée en augmentant à la fois l'ouverture numérique et l'acceptance angulaire de détection ; plusieurs stratégies ont été explorées pour cela : (i) l'utilisation d'un objectif de détection de faible grandissement et de forte ouverture numérique [39, 38, 40], (ii) la collection à l'aide d'un objectif supplémentaire [41, 42], (iii) la mise au point de

systèmes hybrides réfléchissants [43, 44], (iv) le recours à plusieurs fibres optiques entourant l'objectif [45], ou encore (v) la conception de détecteurs annulaires placés contre l'échantillon [46].

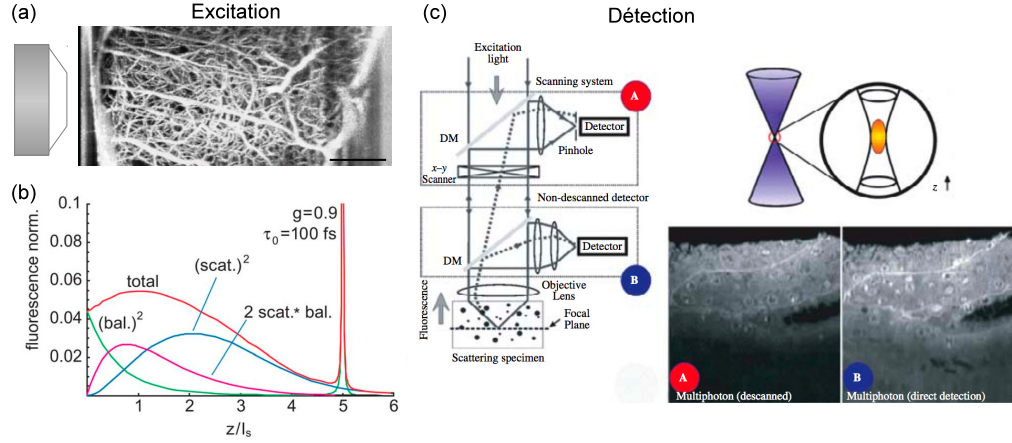


Figure 1.6: Profondeur de pénétration dans les tissus. (a,b) Conservation du sectionnement optique dans un tissu diffusant : (a) Vaisseaux sanguins du cortex de souris marqués par un fluorophore qui est excité à $\lambda = 1280$ nm par un processus d'absorption à deux photons. (b) Simulation modélisant le signal de fluorescence excitée à deux photons produit le long d'un faisceau focalisé dans un milieu diffusant en $z = 5 \times l_s$. On peut remarquer que du signal est créé par les photons balistiques en surface de l'échantillon, ainsi que par les photons diffusés se trouvant au dessus du volume focal. (c) Influence du schéma de détection : comparaison entre une détection confocale et proximale en microscopie non linéaire en profondeur. (a) Barre d'échelle $200 \mu\text{m}$. Adapté de [37, 47, 48]

Variation des coefficients de diffusion avec la longueur d'onde : les longueurs d'onde impliquées en microscopie non linéaire (700–1300 nm) sont plus élevées que celles utilisées en microscopie confocale (400–700 nm), ce qui permet de réduire l'influence de la diffusion sur le profil d'excitation car les coefficients de diffusion des tissus diminuent lorsque la longueur d'onde augmente. Par exemple, le coefficient de diffusion d'une émulsion constituée de gouttelettes d'huile en suspension (taille allant de 20 à 700 nm) dans un milieu aqueux varie comme $1/\lambda^{2,4}$ [49].

1.1.2.5 Paramètres limitant la profondeur de pénétration

Absorption dans les tissus : à l'échelle macroscopique, l'absorption dans un tissu peut être quantifiée par le libre parcours moyen d'absorption noté l_{abs} ou par le

coefficient d'absorption $\mu_{abs} = 1/l_{abs}$. Cette grandeur représente la distance moyenne parcourue par un photon dans un tissu avant d'être absorbé. L'absorption dans un tissu se manifeste donc par une atténuation du profil d'intensité suivant la loi :

$$I^n(z) = I_0^n \exp \left[-n \frac{z}{l_{abs}} \right] \quad (1.6)$$

Les coefficients d'absorption de quelques constituants des tissus (eau, graisse, HbO₂, Hb, mélanine et tryptophane) sont visibles sur la **Figure 1.7**. On peut remarquer que c'est dans la région du proche infra-rouge (700–1 300 nm) que les tissus absorbent le moins. Cette région est appelée fenêtre de transparence des tissus et rend l'utilisation de la microscopie non linéaire particulièrement adaptée pour l'étude de tissus biologiques.

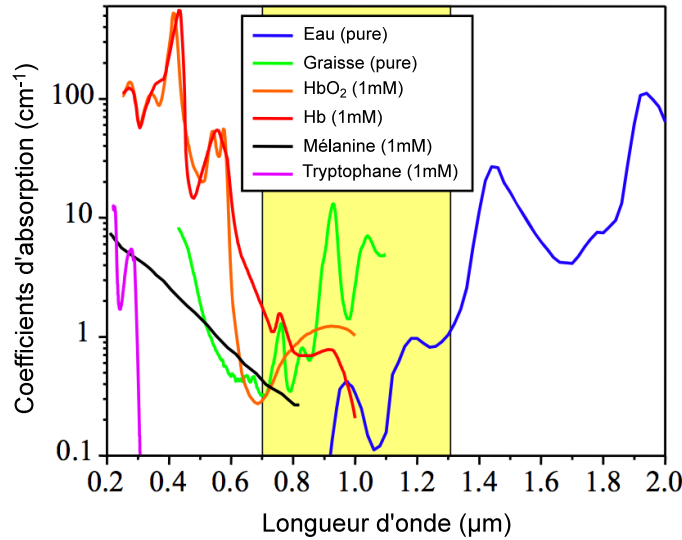


Figure 1.7: Coefficients d'absorption linéaires de divers constituants que l'on retrouve dans les tissus. L'absorption globale est réduite entre 700 et 1 300 nm, on appelle cette zone fenêtre de transparence des tissus. Le graphique utilise les données disponibles sur le site <http://omlc.orgi.edu/> et est adapté de [3].

Diffusion dans les tissus : à l'échelle macroscopique, la diffusion est souvent caractérisée par deux paramètres : le libre parcours moyen de diffusion de la lumière noté $l_s(\omega)$ qui représente la distance moyenne parcourue par un photon d'énergie $\hbar\omega$ entre deux événements de diffusion, et le coefficient d'anisotropie $g = \langle \cos \theta \rangle$ qui représente la direction moyenne dans laquelle les photons sont diffusés. Pour

$g = 0$ la diffusion est isotrope, il n'existe pas de direction particulière, et pour $g = 1$ la diffusion se fait complètement vers l'avant. Dans les tissus biologiques le libre parcours moyen de diffusion vaut de l'ordre de 30–100 μm pour la lumière visible et 100–200 μm pour la lumière infra-rouge, la diffusion s'effectuant préférentiellement vers l'avant avec des facteurs d'anisotropie compris entre 0,8 et 0,98 (**Figure 1.8**). En première approximation l'effet de la diffusion, est d'atténuer l'intensité du profil d'excitation suivant la loi :

$$I^n(\omega, z) = I_0^n \exp\left[-n \frac{z}{l_s}\right], \quad (1.7)$$

cela est valable tant que les photons diffusés participent peu à la création du signal, ce qui correspond à des profondeurs d'imagerie inférieures au libre parcours moyen de transport soit $z \leq l_s / (1 - g)$. Dans la fenêtre de transparence on a $l_{abs} \gg l_s$, si bien que seule la diffusion contribue à diminuer l'intensité du profil d'excitation [39]. Ainsi pour conserver l'intensité au foyer il est nécessaire d'utiliser une puissance en surface $P \propto \exp\left(\frac{z}{l_s}\right)$. D'autre part comme nous avons pu le voir **Section 1.1.2.4**, la diffusion a également pour effet de dégrader le sectionnement optique en excitation à deux photons pour des profondeurs supérieures à 2-3 l_s [35, 36].

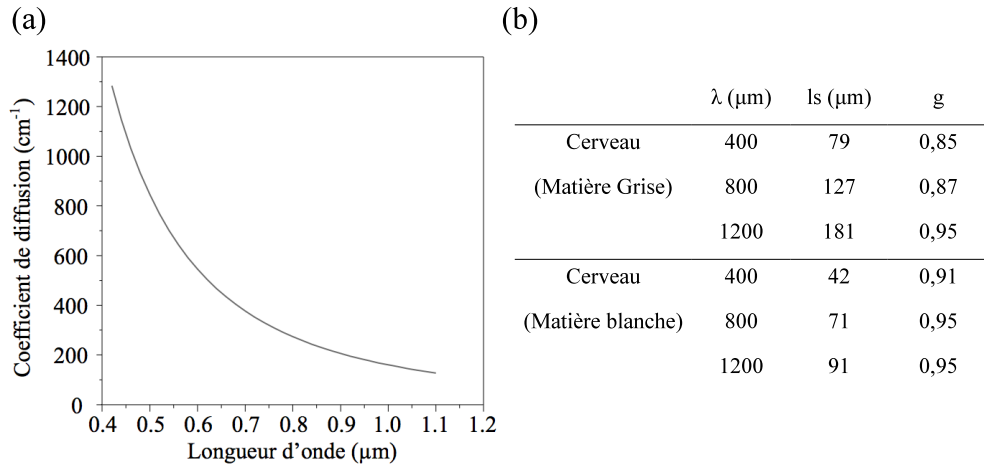


Figure 1.8: Diffusion de Mie dans les tissus. (a) Coefficients de diffusion $\mu_s = 1/l_s$ pour des gouttelettes lipidiques en solution aqueuse. Les données proviennent de la référence [49] et la courbe correspond à une loi en $1/\lambda^{2,4}$. (b) Paramètres de diffusion dans les tissus cérébraux. Le libre parcours moyen et l'anisotropie pour la matière grise et la matière blanche dépendent de la longueur d'onde et les effets de la diffusion sont moins visibles pour les plus grandes longueurs d'onde. Les valeurs sont extraites des références [39, 50].

Pour limiter ces effets, il est tout d’abord possible de décaler la longueur d’onde d’excitation dans l’infra-rouge par exemple vers 1 000–1 300 nm [39, 51, 48, 52] car les coefficients de diffusion varient généralement comme λ^α avec $\alpha \geq 1$ [49]. D’autres stratégies cherchent en revanche à rejeter la contribution provenant d’en dehors du volume focal. Contrairement à une idée courante, la détection confocale ne permet pas d’augmenter la profondeur d’imagerie [37] car au fur et à mesure que l’on s’enfonce dans les tissus ce type de détection rejette également de plus en plus de photons créés au point focal car ceux-ci semblent provenir d’une tache dont la taille augmente. Certaines stratégies explorées actuellement reposent plutôt sur des méthodes permettant de moduler sélectivement le signal au point focal en laissant la contribution générée hors plan d’imagerie inchangée puis de la soustraire [53, 54, 55], ou encore à photo-activer préférentiellement les molécules présentes dans le plan d’imagerie pour ensuite les exciter ce qui revient à augmenter l’ordre de la non linéarité du processus d’imagerie [56].

Aberrations dans les tissus : un autre effet limitant la profondeur de pénétration dans les tissus est la déformation de la phase spatiale du profil d’excitation. Tout comme la diffusion, les aberrations sont dues aux inhomogénéités de l’indice de réfraction. Cependant, contrairement à la diffusion les aberrations proviennent des modulations basses fréquences de l’indice de réfraction. Elles se traduisent par une perte de la qualité de focalisation et donc globalement par une baisse du niveau de signal et de la résolution [57], même si leur influence peut être plus complexe pour les microscopies cohérentes [58, 59].

1.1.2.6 Photo-toxicité et photo-blanchiment

Un autre avantage des microscopies non linéaires par rapport à la microscopie de fluorescence confocale est de diminuer la photo-toxicité et le photo-blanchiment liés à l’imagerie. Cette réduction provient d’une part des longueurs d’onde utilisées se trouvant dans la fenêtre de transparence des tissus (700–1 300 nm) et d’autre part du confinement spatial de l’excitation non linéaire

Pour les longueurs d’onde d’excitation en microscopie non linéaire l’absorption linéaire des molécules est faible, si bien que seules les absorptions à plusieurs photons contribuent à la photo-toxicité. Ainsi, étant donné que les excitations à plusieurs photons sont nécessairement confinées, les effets photo-toxiques pouvant perturber

les échantillons sont limités au plan d'imagerie. Par exemple, plusieurs études ont montré que la fluorescence à deux photons ou la génération de troisième harmonique étaient compatibles avec l'imagerie tridimensionnelle du développement embryonnaire de vertébrés et d'hexapodes [14, 60, 61, 28, 18].

D'autre part, les microscopies non linéaires permettent également la réduction des effets de photo-blanchiment en dehors du plan focal par rapport à la microscopie confocale. Cet avantage découle également du confinement optique qui limite l'excitation des molécules fluorescentes à un volume restreint autour du point focal (**Figure 1.9**). Ainsi, seul le plan imagé est affecté par le photo-blanchiment des protéines fluorescentes. Nous verrons par la suite que cet avantage est également présent en microscopie à feuille de lumière, qui possède un confinement optique à l'excitation.

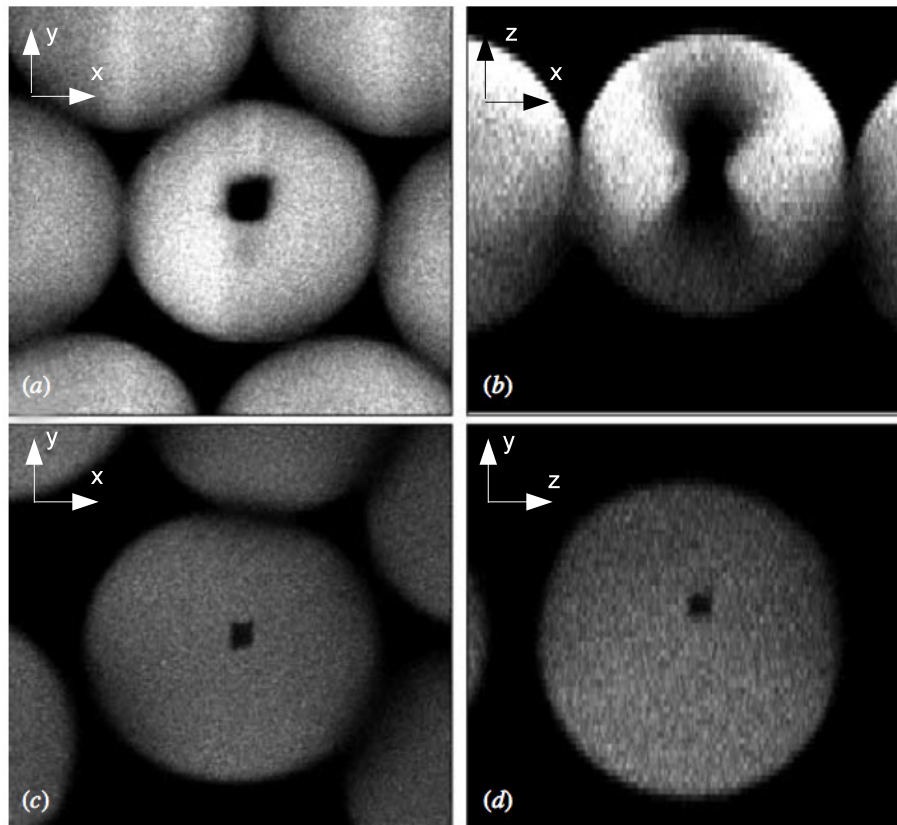


Figure 1.9: Comparaison du photo-blanchiment induit sur des billes fluorescentes pour une excitation à un (a,b) et deux photons (c,d). Le photo-blanchiment a lieu uniquement dans le plan de focalisation pour une excitation à deux photons contrairement à une excitation linéaire (b,d). Adapté de [47]

1.1.2.7 Stratégies d'acquisition

Comme nous avons pu le voir, en microscopie non linéaire le signal provient d'un volume restreint autour du point focal correspondant à la zone de plus forte intensité. La microscopie non linéaire est donc intrinsèquement une méthode pour laquelle il est nécessaire de balayer le volume d'excitation afin de réaliser une image de l'échantillon. Plusieurs géométries d'excitation et de détection sont possibles.

La méthode la plus répandue consiste à exciter un volume de l'échantillon limité par la diffraction à l'aide d'un objectif de forte ouverture numérique et à balayer ce volume pour reconstruire une image point par point (**Figure 1.10(a)**) [11]. Pour chaque position du volume d'excitation, un signal est enregistré à l'aide d'un collecteur de flux, si bien que la vitesse d'acquisition est limitée à la fois par le niveau de signal et par la vitesse de balayage. De nombreux développements technologiques ont permis d'augmenter les vitesses d'échantillonnage grâce à l'utilisation (i) de miroirs galvanométriques (quelques $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ en quelques dizaines de ms), ou (ii) de défecteurs acousto-optiques qui présente un grand intérêt quand on limite le balayage à un nombre de points discrets et éloigné (quelques μs pour quelques centaines de points répartis sur $100 \times 100 \mu\text{m}^2$) [62, 63], de sorte que le facteur limitant est usuellement le temps nécessaire pour collecter un niveau de signal donné par pixel. Pour augmenter encore la vitesse d'acquisition, des méthodes de parallélisation de

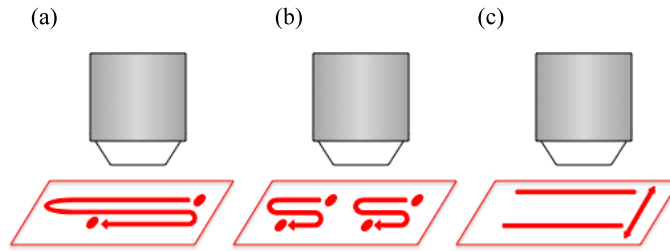


Figure 1.10: Stratégies de balayage pour former des images. (a) Un faisceau focalisé est balayé dans le plan focal. (b) Plusieurs faisceaux sont balayés simultanément. (c) Un profil d'illumination en ligne est balayé suivant une direction.

l'excitation et de la détection sont explorées. Ces méthodes reposent sur l'utilisation de plusieurs faisceaux que l'on balaye simultanément (**Figure 1.10(b)**) [64, 65, 66, 67] ou sur l'utilisation d'un profil d'illumination en ligne que l'on balaye suivant une dimension (**Figure 1.10(c)**). Nous verrons qu'il existe plusieurs méthodes pour produire une illumination suivant une ligne. Pour certaines méthodes (*temporal focusing*) il est nécessaire de faire un compromis sur la résolution axiale de l'image qui se

trouve dégradée [68, 69, 70], alors que pour d'autres (*light sheet*) la résolution axiale et latérale peuvent être contrôlées indépendamment [71, 72, 73, 74]. Dans toutes ces méthodes, le collecteur de flux est remplacé par un détecteur pixellisé (caméra) afin d'acquérir en parallèle les différents points excités simultanément dans l'échantillon. Ainsi, le gain sur la vitesse d'excitation est contrebalancé par une perte de sélectivité de la détection par rapport à une stratégie d'excitation point à point. En effet, en présence de diffusion et d'aberrations, le signal provenant d'un volume élémentaire dans l'échantillon devient une tache couvrant plusieurs pixels du détecteur ce qui conduit à une dégradation du contraste et de la résolution.

1.2 Signaux non linéaires et sources de contraste

1.2.1 Origine des contrastes

En microscopie optique le milieu est excité par un champ électromagnétique que l'on focalise à l'aide d'un objectif de microscope et la réponse produite est analysée pour obtenir des informations sur l'échantillon (**Figure 1.11**). Celle-ci est souvent complexe car elle dépend des propriétés du milieu et du champ exciteur. Le couplage entre la réponse et l'excitation provient d'une interaction lumière-matière et peut être décrit comme suit.

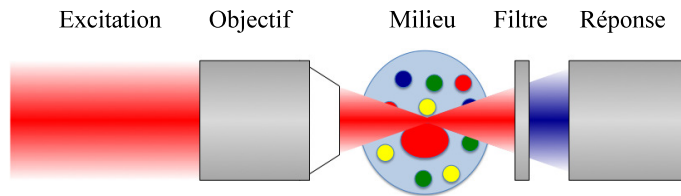


Figure 1.11: Approche utilisée en microscopie non linéaire. Le milieu est excité par une onde électromagnétique que l'on focalise à l'aide d'un objectif de microscope. Sous l'action de l'onde le milieu va produire une réponse non linéaire caractéristique du milieu.

On considère une molécule soumise à un champ électromagnétique $\mathbf{E}$ dont les variations spatiales sont négligeables à l'échelle de la molécule. Dans ce cas, l'interaction lumière-matière se traduit par la création d'un moment dipolaire $\boldsymbol{\mu}(\mathbf{E})$ se rajoutant au moment dipolaire permanent de la molécule $\boldsymbol{\mu}_0$ soit :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_0 + \boldsymbol{\mu}(\mathbf{E}) \quad (1.8)$$

En développant la réponse de la molécule comme une série de puissances du champ électromagnétique $\mathbf{E}$ on peut alors écrire :

$$\boldsymbol{\mu} = \boldsymbol{\mu}_0 + \boldsymbol{\alpha}\mathbf{E} + \frac{1}{2}\boldsymbol{\beta}\mathbf{E}\mathbf{E} + \frac{1}{6}\boldsymbol{\gamma}\mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots \quad (1.9)$$

Cette équation décrit la déformation du nuage d'électrons de la molécule sous l'action du champ électromagnétique $\mathbf{E}$. Le terme $\boldsymbol{\alpha}\mathbf{E}$ est la réponse linéaire de la molécule et correspond à un mouvement des électrons proportionnel à la force appliquée. $\boldsymbol{\alpha}$ est appelé polarisabilité linéaire de la molécule. Les termes non linéaires $\boldsymbol{\beta}\mathbf{E}\mathbf{E}$ et $\boldsymbol{\gamma}\mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E}$ correspondent en revanche à la déformation du nuage d'électrons apparaissant pour de forts déplacements. Cette déformation est quantifiée par les hyperpolarisabilités du second et du troisième ordre notées $\boldsymbol{\beta}$ et $\boldsymbol{\gamma}$, ainsi que par les termes d'ordres supérieurs qui ne seront pas étudiés dans ce manuscrit.

Si l'on s'intéresse maintenant la réponse induite pour un milieu composé d'un grand nombre de molécules considéré comme continu à l'échelle du volume d'excitation, on peut écrire [75] :

$$\begin{aligned} \mathbf{P}(t) &= \mathbf{P}^{(0)}(t) + \mathbf{P}^{(1)}(t) + \mathbf{P}^{(2)}(t) + \mathbf{P}^{(3)}(t) + \dots \\ \mathbf{P}(t) &= \mathbf{P}^{(0)} + \epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(1)}\mathbf{E}(t) + \epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(2)}\mathbf{E}(t)\mathbf{E}(t) + \epsilon_0\boldsymbol{\chi}^{(3)}\mathbf{E}(t)\mathbf{E}(t)\mathbf{E}(t) + \dots \end{aligned} \quad (1.10)$$

où $\mathbf{P}^{(0)}$ est la polarisation du milieu en l'absence de champ, et $\mathbf{P}^{(n)}$ la polarisation induite par le champ pour un effet d'ordre n . Les tenseurs $\boldsymbol{\chi}^{(n)}$ sont les susceptibilités d'ordre n et reflètent la sommation dans l'espace des polarisabilités des molécules présentes dans un volume élémentaire.

$\boldsymbol{\chi}^{(1)}$ est complexe et est à l'origine de plusieurs mécanismes de contraste linéaire. Sa partie réelle est reliée aux indices de réfraction du milieu pour les différentes composantes du champ et peut être utilisée pour obtenir un contraste à partir soit de la phase accumulée par l'onde, soit de la lumière diffusée, soit des changements de polarisation induits sur le faisceau d'excitation. La partie imaginaire renseigne en revanche sur les absorbeurs présents dans les tissus. Elle permet d'obtenir des informations spectroscopiques et contribue au contraste pour l'imagerie de fluorescence à un photon.

Les tenseurs non linéaires $\boldsymbol{\chi}^{(2)}$ et $\boldsymbol{\chi}^{(3)}$ peuvent également être complexes et sont à l'origine de plusieurs effets non linéaires couramment utilisés en microscopie, tels que la fluorescence excitée à deux photons (2PEF), la génération d'harmoniques

(SHG, THG), et le mélanges à quatre ondes (FWM). Au cours de ces effets plusieurs photons sont mis en jeu à l'excitation pour produire un photon de fréquence plus élevée (**Figure 1.3**). Les interactions peuvent être quasi-instantanées comme dans le cas de la génération d'harmoniques ($\sim 10^{-15}$ s), ou incohérentes à l'émission dans le cas de la fluorescence. Les expressions des polarisations supposent que la réponse du milieu est instantanée ce qui n'est pas toujours le cas pour les phénomènes liés aux absorptions ou pour des spectres très larges. La polarisation induite d'ordre n , $\mathbf{P}^{(n)}$, s'écrit alors de façon plus générale comme [75] :

$$P_i^{(n)}(t) = \epsilon_0 \int \frac{d\omega_1}{2\pi} \dots \int \frac{d\omega_n}{2\pi} \chi_{ii_1 \dots i_n}^{(n)}(\omega_1, \dots, \omega_n) E_{i_1}(\omega_1) \dots E_{i_n}(\omega_n) \exp(-i(\omega_1 + \dots + \omega_n)t) \quad (1.11)$$

Dans le cas particulier où $\chi_{ii_1 \dots i_n}^{(n)}(\omega_1, \dots, \omega_n)$ varie lentement devant $E(\omega_1) \dots E(\omega_n)$ on retrouve alors les relations écrites précédemment. Ainsi, la réponse du milieu à un champ électromagnétique peut être décomposée en plusieurs termes. Nous verrons par la suite que les termes non linéaires (SHG, 2PEF, THG, FWM) donnent lieu à la création de signaux caractéristiques des propriétés du milieu.

1.2.2 Microscopie de fluorescence multi-photonique

1.2.2.1 Origine physique des signaux de fluorescence

Un phénomène de fluorescence excitée à plusieurs photons peut être décrit en différentes étapes : un atome ou une molécule du milieu est tout d'abord excité(e) depuis son état fondamental vers un état de plus haute énergie suite à l'absorption simultanée de plusieurs photons (**Figure 1.12(a)**), pour finalement retourner spontanément vers son état fondamental suivant une loi de probabilité exponentielle en émettant un photon de fluorescence (**Figure 1.12(b)**). Les temps caractéristiques de désexcitation pour la fluorescence sont de l'ordre de quelques nanosecondes. Notons que des relaxations non radiatives dont les temps caractéristiques sont de l'ordre de quelques picosecondes peuvent également avoir lieu entre ces deux étapes lorsque la molécule ou l'atome est excité(e) vers un état de plus haute énergie.

L'absorption à n photons est nécessairement un effet non linéaire proportionnel à I^n car la probabilité d'absorber simultanément n photons dépend de la probabilité

de rencontrer n photons au même moment. Cependant, si l'absorption à plusieurs photons se fait de façon cohérente, l'émission des photons de fluorescence se produit de façon incohérente car le processus d'émission est spontané. Ainsi chaque molécule ou atome du milieu se comporte comme un point source incohérent et le signal total est donné par la somme des intensités produites par chacune des molécules. Il existe donc une relation linéaire entre le signal mesuré et le nombre d'émetteurs, ce qui permet de décrire le processus de formation des images par une fonction d'étalement de point incohérente.

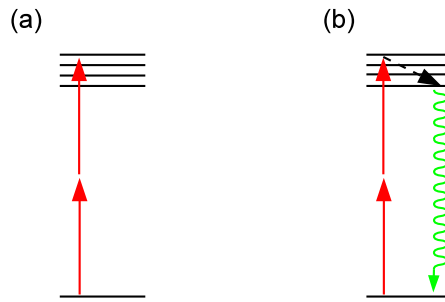


Figure 1.12: Fluorescence excitée à deux photons. (a) Une molécule est excitée depuis son état fondamental vers un état de plus haute énergie suite à une absorption simultané de deux photons. (b) La molécule retourne spontanément vers son état fondamental en émettant un photon.

1.2.2.2 Fonction d'étalement de point (PSF)

La notion de fonction d'étalement de point est une notion que l'on retrouve dans de nombreux domaines en physique et peut traduire l'inertie temporelle (détecteurs) ou le pouvoir de résolution (système d'imagerie). Étant donné que le processus d'imagerie de fluorescence est incohérent, il peut être décrit simplement au moyen d'une fonction d'étalement de point notée PSF_n – pour *Point Spread Function*. En utilisant un tel modèle l'image d'un objet notée O est alors donnée par la relation suivante :

$$I(x, y, z) = \iiint O(x', y', z') \times PSF_n(x - x', y - y', z - z') dx' dy' dz' \quad (1.12)$$

$$I(x, y, z) = (O * PSF_n)(x, y, z)$$

où $*$ est l'opération de convolution. Ce modèle suppose que la fonction d'étalement

de point du système est la même sur tout le champ de vue, ce qui revient à considérer que les aberrations et la diffusion sont invariantes ou absentes. La fonction PSF_n est donnée par la distribution d'intensité du profil d'excitation au foyer notée I^n . Pour des champs scalaires à symétrie radiale vérifiant l'approximation paraxiale, les PSF non linéaires peuvent se calculer à l'aide de l'expression suivante [76] :

$$PSF_n(u, v) = \left| 2 \int_0^1 P(\rho) J_0(v\rho) \times \exp(iu\rho^2/2) \rho d\rho \right|^{2n} \quad (1.13)$$

où $v = k_0 NA r$, $u = k_0 NA^2 z/n$, $\rho = n/NA \times \sin \theta$ et $P(\rho)$ est le champ diaphragmé sur la pupille arrière de l'objectif. Par exemple pour un faisceau gaussien $P(\rho) = \exp(-\rho^2/f_0)$ où f_0 est le facteur de remplissage de la pupille arrière défini comme $f_0 = D_{\text{Beam}}/D_{\text{BA}}$ avec D_{Beam} est le diamètre du faisceau à $1/e^2$ et D_{BA} le diamètre de la pupille arrière.

1.2.2.3 Microscopie de fluorescence excitée à deux photons

Le phénomène d'absorption à deux photons a tout d'abord été prédit par Maria Goeppert-Mayer en 1931 [77] puis observé pour la première fois en 1961 dans un cristal dopé en ions europium ($\text{CaF}_2:\text{Eu}^{3+}$). C'est en 1989 qu'apparaît la première utilisation de ce phénomène en microscopie ouvrant la voie à la microscopie de fluorescence excitée à deux photons [11]. En l'absence de résonance à un photon l'absorption à deux photons est décrite par la partie imaginaire de $\chi^{(3)}$ (contrairement à l'absorption à un photon qui est décrite par $\chi^{(1)}$). Les règles de sélection des transitions sont différentes pour ces deux mécanismes si bien que les spectres d'absorption à deux photons sont généralement différents des spectres d'absorption à un photon. Par exemple, certaines protéines fluorescentes rouges comme par exemple mKamina, TagRFP ou encore mOrange possèdent des bandes d'absorption proches du visible que l'on ne retrouve pas sur les spectres à un photon pour des longueurs d'onde deux fois plus petites [78, 79, 80].

Les sources de contraste en microscopie de fluorescence excitée à deux photons peuvent provenir soit de fluorophores naturellement présents dans les cellules et tissus (fluorophores dits endogènes), soit de marqueurs externes incorporés physiquement ou génétiquement (fluorophores dits exogènes ou extrinsèques). Les fluorophores endogènes sont par exemple utilisés dans certaines problématiques médicales [81, 82] et en dermatologie [83] où l'utilisation d'agents de contraste n'est pas souhaitée, ou encore pour l'identification des contrefaçons [84]. Les sections efficaces des

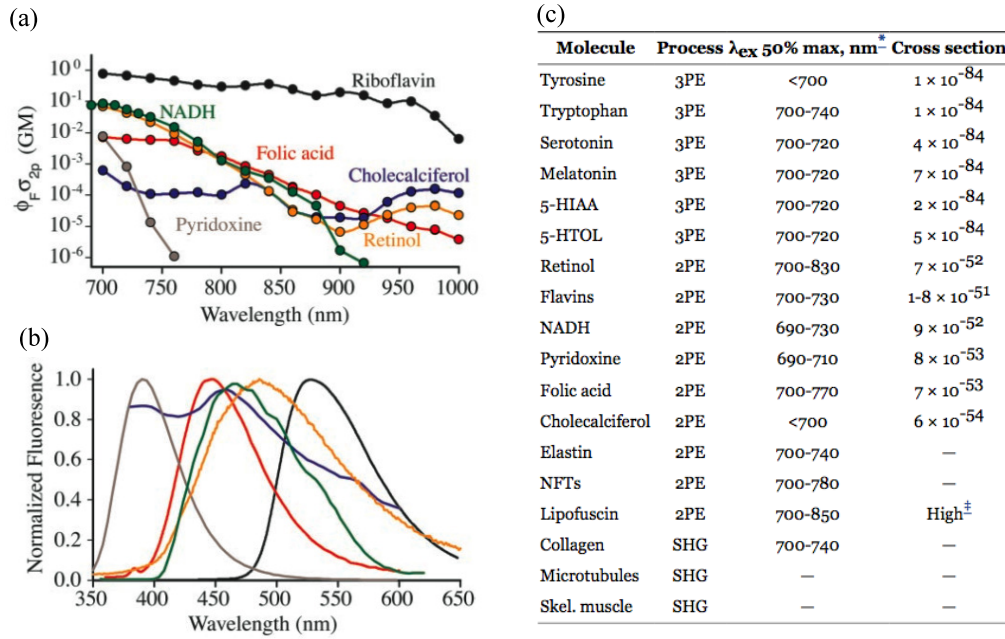


Figure 1.13: Quelques sources de contraste endogènes en microscopie multiphotonique. (a) Sections efficaces à deux photons. (b) Spectres d'émission correspondants. (c) Section efficace et longueurs d'onde d'excitation pour plusieurs espèces endogènes. Unité : $1GM = 10^{-50} \text{ cm}^4 \cdot \text{s}$. Adaptée de [81].

fluorophores endogènes sont généralement plusieurs ordres de grandeur plus faibles que celles des marqueurs extrinsèques (quelques dixièmes de GM contre quelques dizaines de GM pour les protéines fluorescentes) cependant leur concentration peut être plus élevée (de l'ordre de quelques mmol/L contre quelques $\mu\text{mol/L}$) ce qui permet de disposer de signaux d'amplitudes parfois comparables. L'identification a posteriori des fluorophores endogènes est souvent difficile car les caractéristiques spectrales des différentes espèces sont souvent proches.

Bien que les signaux de fluorescence endogènes soient parfois une alternative intéressante, la plupart des études en biologie utilisent des marqueurs exogènes, notamment en neurosciences [85, 86] ou en biologie du développement [14, 28]. Pour ces applications la fluorescence endogène est alors une source de bruit limitant la sensibilité et la spécificité, si bien qu'il est préférable de décaler les longueurs d'onde d'excitation dans l'infra-rouge ($\lambda > 900 \text{ nm}$). De plus cela permet également de réduire la photo-toxicité liée à l'imagerie car l'absorption à deux photons des tissus est alors plus faible. Il existe de nombreux marqueurs exogènes, ceux-ci peuvent être des colorants que l'on injecte ou des protéines fluorescentes insérées génétiquement

dans les tissus. La multiplication du nombre de protéines exprimables génétiquement et le développement de méthodes efficaces de transfection ont rendu cette stratégie particulièrement attractive en biologie. De plus il est également possible de multiplier ou combiner des protéines de couleurs différentes pour réaliser un marquage de structures différentes [87, 88, 89, 90, 91].

Enfin, on peut également mentionner l'absorption à trois photons qui jusqu'ici été peu utilisée en raison des sections efficaces plus faibles que celles des absorptions à deux photons. L'imagerie de fluorescence du tryptophane, de sondes de calcium ou encore de chromosomes marqués au DAPI ont notamment été rapportées [92, 93, 94].

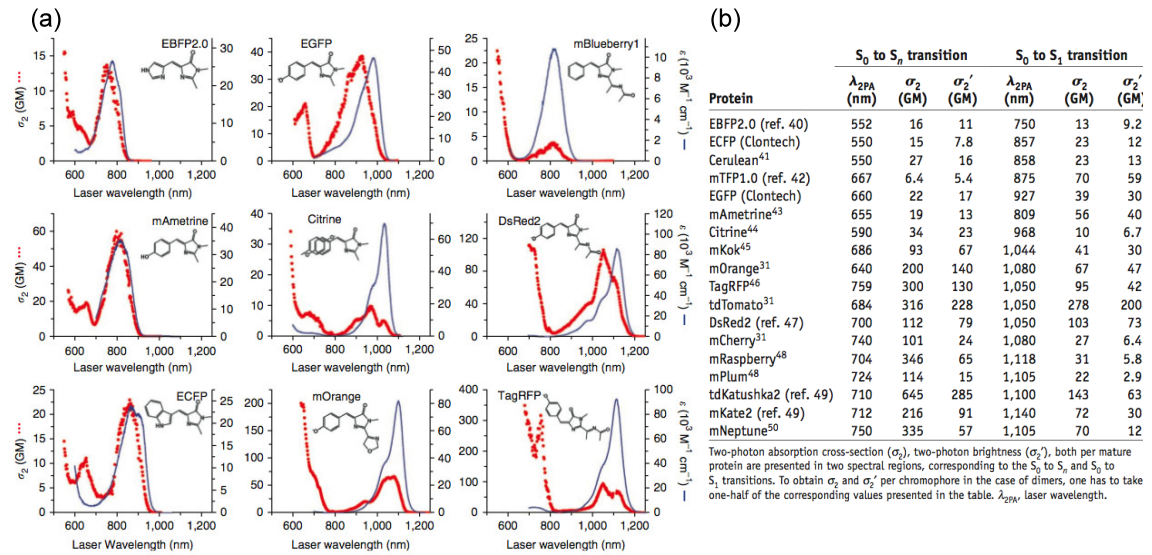


Figure 1.14: Quelques sources de contraste exogènes en microscopie. (a) Sections efficaces à deux photons superposées aux sections efficaces à un photon de plusieurs fluorophores. (b) Sections efficaces et longueurs d'onde d'excitation pour quelques fluorophores exogènes. Unité : $1\text{GM} = 10^{-50} \text{cm}^4 \cdot \text{s}$. Adapté de [78, 80].

1.2.3 Microscopies non linéaires cohérentes

1.2.3.1 Construction des signaux

Sous l'appellation microscopies non linéaires cohérentes nous regroupons les techniques utilisant la génération d'harmoniques (SHG et THG) et le mélange à quatre ondes (FWM). Pour ces processus, les interactions entre le milieu et les champs sont instantanées si bien que les champs émis ont la même phase que les champs excitateurs. Ainsi il existe une relation de phase bien définie entre les différents points

sources du volume focal et le signal mesuré dans une direction résulte d'interférences qui peuvent être constructives ou destructives. Selon la phase relative des différentes contributions, cela peut conduire à une amplification cohérente du signal, ou à un signal nul alors que des photons sont malgré tout produits par le milieu. Le modèle de formation des images basé sur une convolution par une fonction d'étalement de point utilisé pour la fluorescence n'est alors plus valable car la réponse mesurée dépend de la phase des profils d'excitation et des structures observées.

1.2.3.2 Polarisation non linéaires

Le lien entre les réponses non linéaires du milieu ($\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$) et les signaux non linéaires créés est donné par la notion de polarisation non linéaire. Cela peut être illustré en écrivant les équations gouvernant les différents processus non linéaires cohérents (SHG, THG, FWM) :

$$\nabla^2 \mathbf{E}_m(\mathbf{r}, m\omega) - k^2 \mathbf{E}_m(\mathbf{r}, m\omega) = \frac{(m\omega)^2}{\epsilon_0 c^2} \mathbf{P}^{(m)}(\mathbf{r}, m\omega) \quad (1.14)$$

Au travers de ces équations on peut voir que les polarisations non linéaires sont des termes sources pour les processus considérés dans ce manuscrit (SHG, THG et FWM). Usuellement les polarisations non linéaires se mettent sous la forme :

$$\begin{aligned} P_i^{(2)}(2\omega) &= \frac{1}{2} \epsilon_0 \sum_{j,k} \chi_{ijk}^{(2)}(-2\omega, \omega, \omega) \cdot E_j(\omega) E_k(\omega) \\ P_i^{(3)}(3\omega) &= \frac{1}{4} \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)}(-3\omega, \omega, \omega, \omega) \cdot E_j(\omega) E_k(\omega) E_l(\omega) \\ P_i^{(3)}(2\omega_1 - \omega_2) &= \frac{3}{4} \epsilon_0 \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)}(-2\omega_1 + \omega_2, \omega_1, \omega_2, \omega_1) \cdot E_j(\omega_1) E_k(\omega_2)^* E_l(\omega_1) \end{aligned} \quad (1.15)$$

Les paramètres modélisant la réponse du milieu $\chi^{(2)}$ et $\chi^{(3)}$ sont des tenseurs d'ordre trois et quatre. Ils traduisent l'influence des différents états de polarisation de l'excitation sur le signal créé. Ces tenseurs répondent à des symétries, c'est-à-dire qu'ils possèdent de nombreux éléments nuls et des éléments égaux entre eux. Par exemple, pour la génération de seconde harmonique les éléments de $\chi^{(2)}$ sont non nuls uniquement dans des milieux non centro-symétriques alors que pour la THG et le FWM, $\chi^{(3)}$ est généralement non nul.

1.2.3.3 Génération de seconde harmonique (SHG)

La SHG a été l'une des premières techniques utilisées en microscopie non linéaire [9, 19] avant même la fluorescence excitée à deux photons. Cependant, il fallu attendre l'essor de la fluorescence à deux photons [95, 96] et l'identification des sources de contrastes endogènes [97, 98, 99] pour que cette technique se répande plus largement.

Étant donné que la SHG nécessite des structures électroniques non centro-symétriques, les sources de contraste SHG endogènes dans les tissus proviennent de milieux fortement organisés tels que les filaments de myosine dans les sarcomères musculaires, le collagène fibrillaire, les faisceaux polarisés de microtubules, et les granules d'amidon. Le signal SHG du collagène fibrillaire [9] est détectable dans de très nombreux tissus, notamment la peau [81, 83], les artères [97, 100], les tendons [101, 102, 103] ou encore la cornée [104, 105, 106, 107].

D'autre part, comme dans le cas de l'imagerie de fluorescence il est également possible d'utiliser des sources de contraste exogènes tels que des colorants membranaires à structure *push-pull* [95, 96] ou des nanocristaux non linéaires [108]. L'utilisation de nano-sondes semble prometteuse car leur susceptibilité non linéaire peut être plus élevée que celle des tissus et car elles rayonnent de façon dipolaire, ce qui permet d'effectuer une collection efficace des signaux par l'objectif de focalisation (épidétection).

1.2.3.4 Génération de troisième harmonique (THG)

Pour la THG, contrairement à la SHG, il n'existe pas de règle de symétrie annulant la susceptibilité non linéaire $\chi^{(3)}$ dans des milieux centro-symétriques. Le signal peut donc être produit par n'importe quelle molécule ou structure. Cependant pour qu'un signal soit détecté, il est également nécessaire que les champs rayonnés par les différents points du volume focal interfèrent constructivement dans la direction du détecteur. À cause de la phase de Gouy accumulée par un faisceau focalisé à la traversée du plan focal les interférences sont destructives dans le cas d'un échantillon homogène. Ainsi, les milieux homogènes ne produisent pas de signal en microscopie THG. En revanche les interférences dans la direction du détecteur sont partiellement non destructives quand le faisceau excitateur est focalisé au voisinage d'hétérogénéités ou d'interfaces [109]. Le signal de génération de troisième harmonique n'est donc pas décrit par la susceptibilité non linéaire $\chi^{(3)}$ mais plutôt par ses

variations $|\Delta\chi^{(3)}|^2$ à l'échelle du volume focal [110].

La première démonstration de microscopie par génération de troisième harmonique a été faite par deux groupes indépendants à la fin des années 1990 [20, 21]. Dans leurs travaux les auteurs montrent que la THG peut être utilisée comme mécanisme de contraste dans les tissus et que les signaux proviennent effectivement des interfaces ou des structures plus petites que le volume focal. Ces propriétés sont remarquables pour l'imagerie de tissus biologiques, tout d'abord car n'importe quel échantillon non homogène peut produire naturellement un signal endogène, mais également car les images se forment sur un fond noir ce qui permet de détecter de petites hétérogénéités avec une sensibilité limitée par le bruit de photon du signal utile.

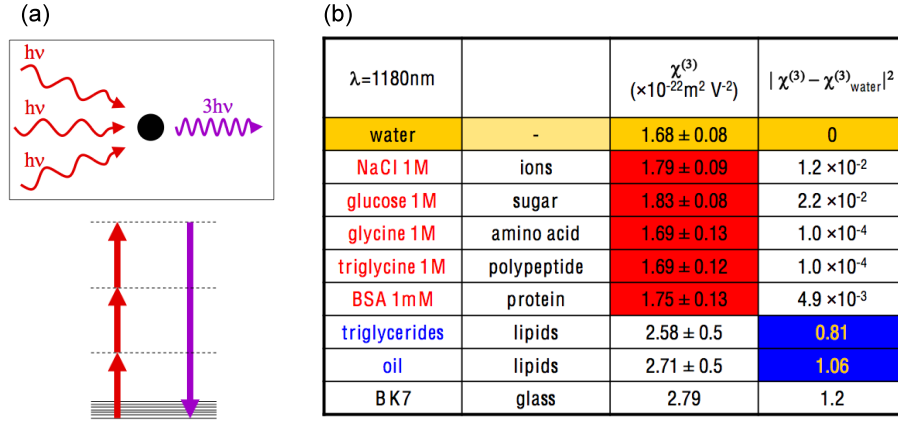


Figure 1.15: Susceptibilité non linéaire du troisième ordre des principaux constituants rencontrés dans des échantillons biologiques. Adapté de [3, 58].

Cependant, la condition sur l'inhomogénéité de la susceptibilité non linéaire peut être limitante, car des milieux présentant de faibles variations de susceptibilité non linéaire donneront des signaux peu intenses. Plusieurs études ont porté sur l'identification des sources de contraste dans les tissus. Certaines ont émis l'hypothèse que la THG pouvait être utilisée pour mesurer des variations de concentrations en ions calcium [111, 112]. Si la susceptibilité non linéaire dépend effectivement des concentrations ioniques [113] les variations nécessaires pour produire un signal détectables ne sont pas physiologiques [114]. Des travaux réalisés au LOB ont permis de déterminer les ordres de grandeur des contrastes attendus par rapport à l'eau pour plusieurs constituants cellulaires et tissulaires (**Figure 1.16**) [114]. Ces études ont notamment révélé que les accumulations de lipides étaient parti-

culièrement visibles dans les tissus biologiques [115]. Par ailleurs, il a également été montré que le signal de THG pouvait être modulé par des absorptions à un, deux, ou trois photons, comme par exemple dans l'hémoglobine [116].

Plusieurs applications ont tiré parti des images morphologiques sans marquage fournies par la microscopie THG notamment en biologie du développement [60, 115, 18] ou en neurosciences [117, 118].

1.2.3.5 Mélange à quatre onde (FWM)

La microscopie CARS a été démontrée pour la première fois en 1982 par Duncan [10] et s'est répandue plus largement à la fin des années 1990 suite au développement de géométries d'excitation colinéaires simple à mettre en œuvre [119, 120]. La microscopie CARS est par nature une méthode spectroscopique permettant d'obtenir avec une résolution tri-dimensionnelle une signature vibrationnelle des molécules présentes dans l'échantillon sans marquage.

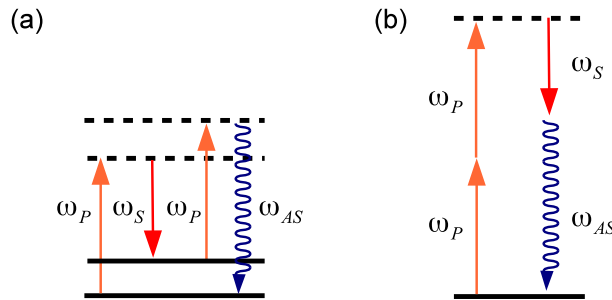


Figure 1.16: Processus intervenant dans le signal CARS. (a) Partie résonnante, (b) partie non résonnante.

Plus précisément, le processus non linéaire intervenant est un mélange à quatre ondes (FWM) au cours duquel des faisceaux de pompe ω_P et de sonde ω_S interagissent avec le milieu pour générer un signal à la fréquence anti-Stokes ω_{AS} . Deux types d'interactions sont en compétition au cours de ce processus : la première est dite non résonnante car spectralement non spécifique, alors que la deuxième est dite résonnante car elle fait intervenir les niveaux vibrationnels des molécules. Pour des polarisations incidentes linéaires, ces deux signaux sont gouvernés par la susceptibilité non linéaire d'ordre trois que l'on décompose usuellement en deux contributions :

$$\chi^{(3)} = \chi_{NR}^{(3)} + \chi_R^{(3)} \quad (1.16)$$

où $\chi_{NR}^{(3)}$ et $\chi_R^{(3)}$ sont les parties résonnante et non résonnante de $\chi^{(3)}$. Usuellement $\chi_R^{(3)}$ est décomposée suivant une somme de contributions résonnantes de type lorentzien :

$$\chi_R^{(3)} = \sum_j \frac{R_j}{\Omega_j - (\omega_P - \omega_S) - i\Gamma_j} \quad (1.17)$$

où R_j , Ω_j et Γ_j sont l'amplitude, la largeur, et la fréquence des résonances du spectre Raman. Le signal CARS détecté est donc issu d'interférences entre la partie résonnante et non résonnante soit :

$$I_{CARS} = |\chi_{NR}^{(3)}|^2 + |\chi_R^{(3)}|^2 + 2\chi_{NR}^{(3)} \text{Re}(\chi_R^{(3)}) \quad (1.18)$$

La partie non résonnante est donc une limitation à la sensibilité vibrationnelle du signal CARS. Pour augmenter cette sensibilité, plusieurs études ont montré qu'il était possible d'augmenter la durée des impulsions [121], de choisir soigneusement les polarisations d'excitation et de détection [122], ou encore de sonder le milieu à l'aide d'un processus Raman stimulé [123, 124]. Dans les applications d'imagerie, les signaux résonnants les plus forts sont obtenus sur les structures lipidiques en sondant les liaisons CH_2 qui possèdent une résonance vibrationnelle à 2850 cm^{-1} .

Enfin il est intéressant de remarquer que le signal CARS est sensible tout comme la THG à la susceptibilité non linéaire d'ordre trois, et qu'en l'absence de résonance on peut s'attendre à ce que les deux processus sondent tous les deux le même paramètre $\chi_{NR}^{(3)}$.

1.3 Problématiques

La microscopie non linéaire permet d'étudier des tissus biologiques épais et vivants, et trouve des applications importantes dans des domaines tels que les neurosciences et la biologie du développement. Cependant dans le cas de tissus complexes et dynamiques les microscopes non linéaires actuels sont généralement limités en termes de nombre de signaux simultanément accessibles, de vitesse d'imagerie, et de profondeur de pénétration. Par exemple une étude récente a montré qu'il était possible de reconstruire le développement précoce du poisson zébré jusqu'au stade de 1024 cellules [18] à l'aide d'un microscope THG-SHG à balayage, avec les conditions suivantes : échantillonnage spatial de $2 \times 2 \times 4 \mu\text{m}^3$ pour un champ de vue

de $840\ \mu\text{m}$ et une résolution temporelle de l'ordre de $3\ \mu\text{s}/\text{Voxel}$ (2×20 millions de points par minute). Cependant, pour reconstruire *in toto* et étudier le développement de cet embryon au-delà du stades 1024 cellules, ces performances d'imagerie sont insuffisantes. En effet, les cellules deviennent alors plus petites et plus mobiles et le tissu devient plus complexe. Il faudrait alors d'une part pouvoir suivre plus de paramètres simultanément (marquages de différentes couleurs), d'autre part augmenter l'échantillonnage spatial et temporel (donc la vitesse d'imagerie), et dans certains cas la résolution en profondeur. Ce constat sur les limitations en termes de paramètres accessibles simultanément, de vitesse d'imagerie et de profondeur de pénétration est bien souvent le même en neurosciences pour des études concernant la reconstruction de réseaux neuronaux et du lignage cellulaire pendant la formation du système nerveux.

Ainsi, au cours de ma thèse nous avons développé et mis en œuvre des stratégies permettant d'améliorer deux aspects limitant des microscopes non linéaires actuels : le nombre de signaux simultanément observables d'une part, la vitesse d'acquisition d'autre part. Après avoir présenté brièvement les dispositifs expérimentaux utilisés au laboratoire, nous explorerons dans un premier temps la possibilité de produire des signaux multiples au moyen de deux trains d'impulsions synchronisés de longueur d'onde centrale distincte et nous présenterons des applications de cette approche (**Chapitre 2 et 3**). Dans un deuxième temps nous étudierons la possibilité d'augmenter la vitesse d'imagerie en étendant la profondeur de champ des microscopes actuels (**Chapitre 4**). Enfin, en vue d'augmenter la vitesse d'acquisition tout en préservant le sectionnement optique, nous nous intéresserons à la microscopie non linéaire à nappe de lumière (**Chapitre 5**).

1.4 Dispositif expérimental

Le principe du dispositif expérimental utilisé pour les expériences de microscopie est schématisé **Figure 1.17**. Deux chaînes laser destinées à l'imagerie multimodale sont mises en forme temporellement et spatialement avant d'être envoyées vers un microscope à balayage ou à nappe de lumière.

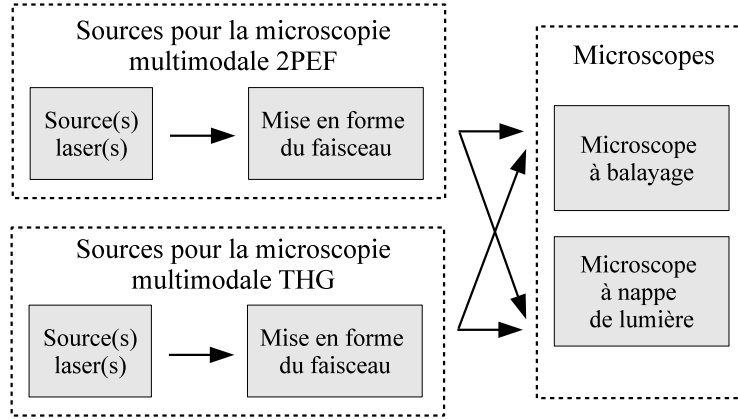


Figure 1.17: Principe du dispositif expérimental.

1.4.1 Sources utilisées

La première chaîne laser ($\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$) est constituée d'un oscillateur titane-saphir (TiS_1 , Chameleon-ultra2, Coherent) et d'un oscillateur paramétrique optique librement accordable et de durée d'impulsion relativement longue (OPO_1 , Chameleon compact OPO, APE). La deuxième chaîne laser ($\text{TiS}_2/\text{OPO}_2$) est également constituée d'un oscillateur titane-saphir (TiS_2 , Chameleon-ultra2, Coherent), mais l'OPO est en revanche faiblement accordable de durée d'impulsion relativement courte (OPO_2 , OPO-Basic, APE).

Oscillateurs titane-saphir : les oscillateurs titane-saphir des deux chaînes ($\text{TiS}_1/\text{TiS}_2$) sont accordables entre 650 et 1080 nm. Ils délivrent tous deux des impulsions dont les durées typiques limitées par transformée de Fourier sont de l'ordre de 100–180 fs pour un taux de répétition de 80 MHz. Avec une puissance de pompe de 18 W (laser Verdi V18 pompé par des diodes laser émettant à 532 nm), ils fournissent entre 3,4–4,0 W de puissance moyenne au centre de leur gamme d'accordabilité, ce qui correspond à des énergies de 43–50 nJ par impulsion. Les oscillateurs sont pompés par des lasers Verdi V18, et le milieu à gain est un cristal de saphir dopé en ions titane. À leur sortie, les faisceaux sont scindés en deux parties : une fraction est envoyée vers un module de mise en forme puis vers l'un des microscopes et une autre sert à pomper un oscillateur paramétrique optique. La répartition de la puissance entre ces deux voies peut être modulée à l'aide d'un cube polarisant et d'une lame demi-onde.

Oscillateurs paramétriques optiques : les oscillateurs paramétriques optiques des deux chaînes laser ($\text{OPO}_1/\text{OPO}_2$) sont tous deux pompés de façon synchrone par un des lasers titane-saphir ($\text{TiS}_1/\text{TiS}_2$). La cavité de l' OPO_1 est munie d'un cristal polarisé périodiquement à pas variable permettant une accordabilité indépendante des deux sources ($\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$). En contrepartie la durée des impulsions de l' OPO_1 est relativement longue (largeur spectrale à mi hauteur de 6,3 nm ce qui correspond à une largeur à mi-hauteur limitée par transformée de Fourier faisant approximativement $\tau = 280$ fs). La chaîne laser $\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$ sera donc particulièrement adaptée pour l'imagerie multimodale de fluorescence ou encore pour l'imagerie CARS. En sortie de l' OPO_1 le train d'impulsions a une puissance moyenne maximale de 750 mW pour un taux de répétition de 80 MHz, ce qui correspond à une énergie de 9,4 nJ par impulsion.

La cavité de l' OPO_2 est en revanche munie d'un cristal de KTP ne permettant pas une accordabilité indépendante des deux sources ($\text{TiS}_2/\text{OPO}_2$). Cependant, la durée des impulsions délivrées par l' OPO_2 est relativement courte (largeur à mi-hauteur limitée par transformée de Fourier faisant approximativement $\tau = 75$ fs). La chaîne laser $\text{TiS}_2/\text{OPO}_2$ sera donc adaptée pour l'imagerie multimodale de THG. Enfin, en sortie de l' OPO_2 le train d'impulsions délivré a une puissance moyenne maximale de 1,0 W pour un taux de répétition de 80 MHz ce qui correspond à une énergie de 13 nJ par impulsion.

1.4.2 Mise en forme des sources

Le dispositif expérimental de contrôle des faisceaux excitateurs est présenté **Figure 1.18**. Chaque source multimodale ($\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$ et $\text{TiS}_2/\text{OPO}_2$) est mise en forme temporellement et spatialement de façon indépendante. Les différents modules impliqués ont été mis au point au laboratoire et permettent de contrôler quelques paramètres des sources utiles en microscopie multimodale à savoir : la puissance et la polarisation des lasers, le synchronisme des trains d'impulsions, la durée des impulsions, ou encore la taille des faisceaux ainsi que leur divergence sur la pupille arrière des objectifs de focalisation.

Contrôle de la puissance et de la polarisation : la puissance des faisceaux excitateurs est modulée à l'aide d'une lame demi-onde motorisée et d'un cube séparateur de polarisation. En sortie des lasers la polarisation est linéaire, de ce fait

en tournant une lame demi-onde d'un angle θ placée juste avant un cube séparateur de polarisation la puissance transmise peut varier continûment selon une fonction du type $\cos^2 \theta$. Ainsi à condition de connaître la relation entre la commande envoyée au moteur et l'angle θ il est possible de contrôler précisément la puissance envoyée vers les microscopes. Cela permet par exemple de moduler finement la puissance envoyée sur les échantillons ou encore de changer de façon automatique la puissance lorsque l'on s'enfonce dans les tissus afin de compenser l'atténuation des profils d'excitation. De plus, en sortie des cubes, la polarisation est toujours linéaire, et peut être tournée si besoin à l'aide d'une deuxième lame demi-onde.

Synchronisation temporelle entre les trains d'impulsions : chaque chaîne laser décrite précédemment (TiS/OPO) génère deux trains d'impulsions parfaitement corrélés de par le principe de fonctionnement d'un OPO. Nous verrons par la suite, qu'il peut être intéressant de tirer parti de cette propriété pour l'imagerie multimodale en ayant recours à des trains d'impulsions synchronisés (**Chapitre 2**). Pour cela, le délai entre les trains d'impulsions est ajusté à l'aide d'une ligne à retard motorisée que l'on contrôle par ordinateur. La synchronisation se fait usuellement en deux temps : (i) de façon grossière à l'aide d'une photodiode rapide et d'un oscilloscope (précision de l'ordre de quelques ps suivant la bande passante des deux composants) et (ii) de façon plus précise en mesurant un signal issu de la somme de fréquences produit dans un cristal non linéaire (précision de l'ordre de quelques fs).

Contrôle de la dispersion : la compensation de la dispersion se fait uniquement sur les impulsions de l'OPO₂ utilisées pour la THG et est réalisée à l'aide d'une ligne de prismes. Ce dispositif corrige la dispersion du second ordre présente en sortie de l'OPO et introduite par les différents éléments dispersifs rencontrés par le faisceau. En pratique nous avons constaté que même avec un tel dispositif les impulsions ne sont pas tout à fait limitées par transformée de Fourier (80–100 fs au lieu de 75 fs). La dispersion résiduelle pourrait provenir de la dispersion du troisième ordre introduite par le cristal à chaque tour dans la cavité, ou d'une phase asymétrique introduite par un processus d'auto-modulation de phase ayant lieu dans le cristal de l'OPO₂.

Contrôle de la taille des faisceaux : la résolution d'un objectif dépend de son ouverture numérique et du facteur de remplissage du faisceau arrivant sur sa

pupille arrière. Il est donc important d'éclairer sa pupille arrière avec un profil d'illumination connu et contrôlé pour trouver le bon compromis entre résolution et puissance d'excitation disponible au foyer du microscope. D'autre part, les objectifs de microscope sont usuellement fortement chromatiques dans l'infrarouge si bien que des impulsions décalées en longueur d'onde ($\lambda_1 = 850 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 1100 \text{ nm}$) ont généralement des plans de focalisation espacés de plusieurs micromètres. Par exemple, les décalages peuvent être de l'ordre de 5 à $7 \mu\text{m}$ pour un objectif Olympus XLUMPFL ($20\times$ $\text{NA} = 0,95$). Il est donc également important de pouvoir contrôler la divergence des faisceaux sur la pupille arrière des objectifs utilisés. Pour cela,

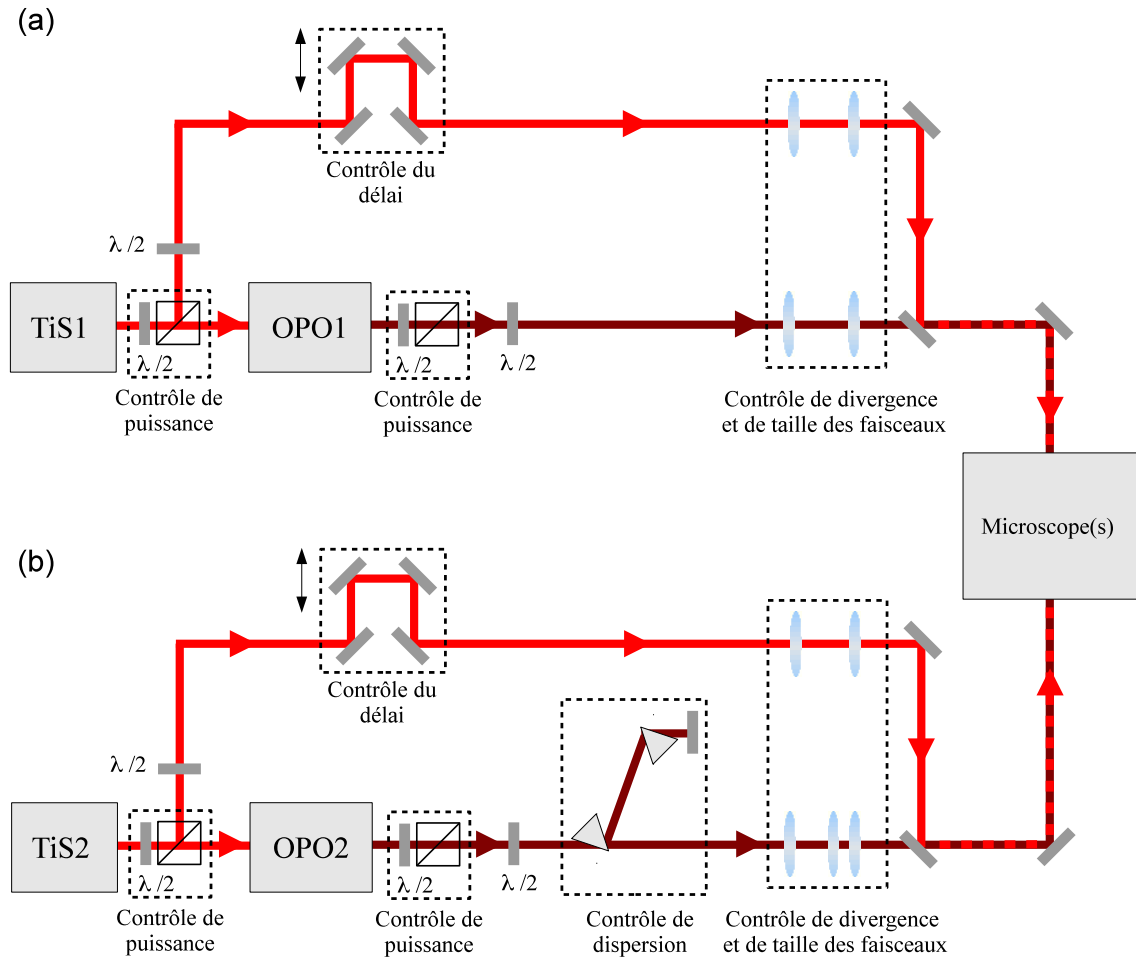


Figure 1.18: Mise en forme des faisceaux excitateurs pour la microscopie.

la divergence et la taille des faisceaux sont ajustées à l'aide de télescopes à trois ou deux lentilles conçus au laboratoire. Le télescope à trois lentilles a été conçu

sur le modèle des télescopes de Donders (1818–1889) à partir d’un logiciel de tracé de rayon. Celui-ci est constitué d’une lentille divergente de focale $f = -50$ mm placée entre deux lentilles convergentes de focale $f = 150$ mm. Ce télescope permet un contrôle indépendant de la divergence et de la taille du faisceau de l’OPO₂ en déplaçant la lentille externe et la lentille du milieu (le grandissement théorique peut varier entre 0,5 et 1,5 mais est en pratique limité aux valeurs comprises entre 0,75 et 1,5 du fait de l’encombrement des lentilles). Par souci d’encombrement nous avons en revanche opté sur la deuxième chaîne laser pour des télescopes à deux lentilles ne permettant pas d’ajuster indépendamment la taille et la divergence des faisceaux. Nous avons donc étalonné nos différents télescopes en choisissant les couples de lentilles pour lesquels les grandissements permettent de remplir correctement la pupille arrière des objectifs utilisés tout en compensant les aberrations chromatiques à l’aide des divergences.

1.4.3 Microscopes

1.4.3.1 Microscope à balayage

Les expériences de microscopie qui seront présentées dans les Chapitres 2, 3 et 4, ont été réalisées sur un microscope à balayage construit au laboratoire au cours de la thèse de Delphine Débarre et de Nicolas Olivier. Le microscope est constitué des éléments suivants : un système à balayage, un objectif, et des modules de détection en transmission et en épi-détection (**Figure 1.19**).

Le système à balayage comprend deux miroirs galvanométriques orthogonaux de diamètre 4 mm (GSI lumonics) et deux lentilles imageant les miroirs sur la pupille arrière d’un objectif de microscope avec un grandissement $G_y = 3,5$. Ainsi il est possible de remplir une pupille arrière faisant au plus 14 mm. En pratique, le balayage des faisceaux est synchronisé avec l’acquisition des signaux sur des photomultiplicateurs en régime de comptage de photons par un programme LabVIEW, l’électronique de comptage de photons ayant été développée au laboratoire par Xavier Solinas. La carte d’acquisition permet l’enregistrement d’images quatre canaux à une cadence maximale d’environ $2,5 \mu\text{s}/\text{pixel}$

Pour nos expériences, nous avons utilisé des objectifs Olympus d’ouvertures numériques comprises entre 0,95 et 1,2 et de grandissement allant de 20 à 60 fois. Les signaux cohérents (génération d’harmoniques) ont été détectés en transmission

à l'aide d'un condenseur, de miroirs dichroïques et de tubes photo-multiplicateurs (SensTech), alors que les signaux incohérents ont en revanche été détectés vers l'arrière (épi-détectés) sur trois tubes photo-multiplicateurs à l'aide de miroirs dichroïques.

Nous avons estimé la durée des impulsions des différentes sources au foyer du microscope pour un objectif XLUMPFL 20X par des mesures XFROG effectuées avec Guillaume Labroille et Manuel Joffre. Pour la chaîne destinée à l'imagerie de fluorescence multimodale ($\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$) nous avons trouvé que les impulsions du TiS_1 et de l' OPO_1 avaient une largeur à mi-hauteur $\tau = 160/390$ fs alors que les spectres théoriques permettraient des durées limitées par transformée de Fourier $\tau_{TL} = 105/275$ fs). Pour la chaîne destinée à l'imagerie multimodale THG ($\text{TiS}_2/\text{OPO}_2$) nous avons estimé que les impulsions du TiS_1 et de l' OPO_1 avaient une largeur à mi-hauteur $\tau = 280/80\text{--}100$ fs alors que les spectres théoriques permettraient des durées limitées par transformée de Fourier $\tau_{TL} = 170/75$ fs).

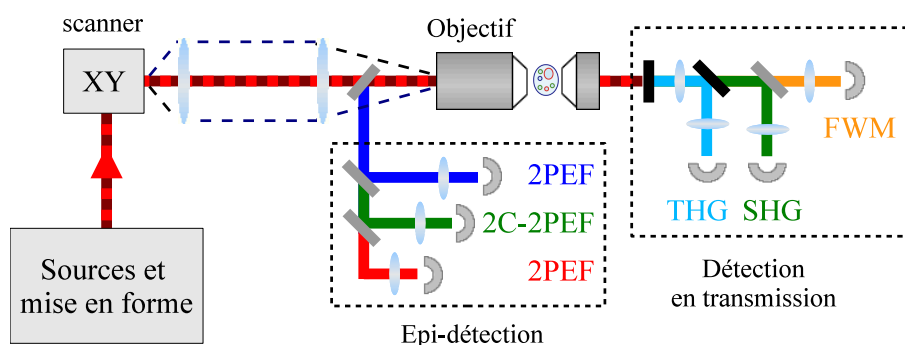


Figure 1.19: Schéma de principe du microscope à balayage.

1.4.3.2 Microscope à nappe de lumière

Les expériences de microscopie qui seront présentées dans le dernier chapitre ont en revanche été réalisées sur un microscope à nappe de lumière construit au laboratoire à la fin de ma thèse suite à l'arrivée au laboratoire de Willy Supatto. Le principal avantage de ce type de microscope est la rapidité d'imagerie en comparaison d'un système à balayage (ce point sera abordé plus en détail au **Chapitre 4**). Le microscope que nous avons construit est constitué des éléments suivants : un système à balayage, deux voies d'illumination, une cuve à échantillon dans laquelle plongent deux objectifs d'excitation et un objectif de détection, ainsi que d'un module de

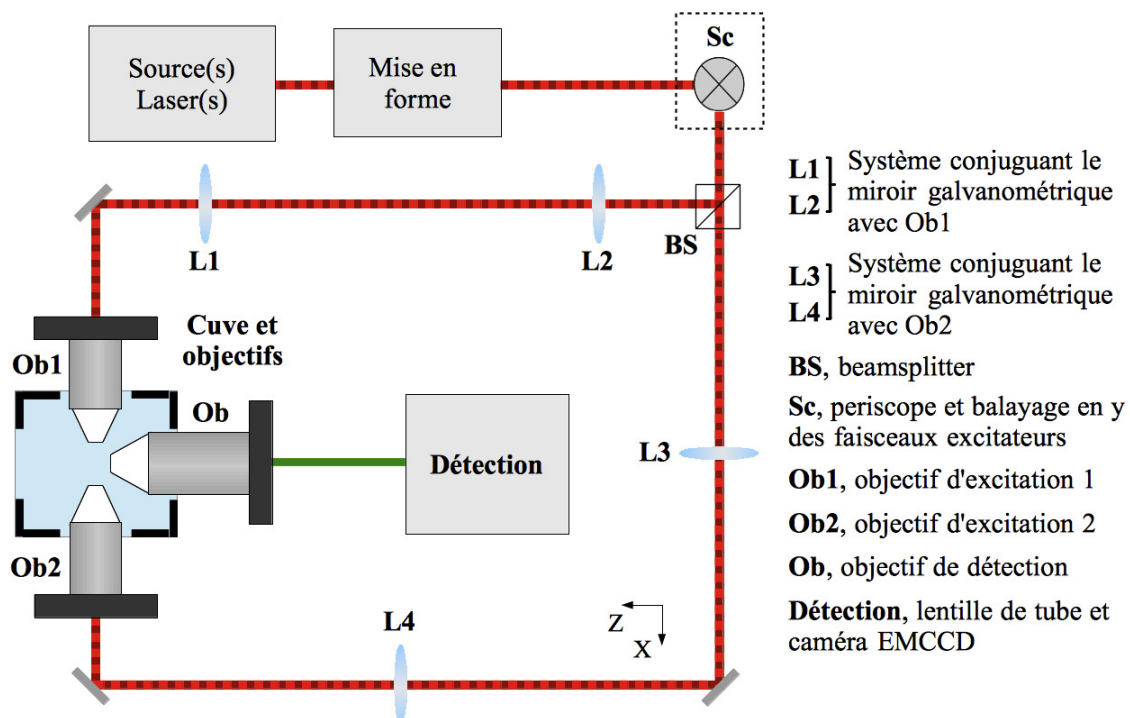


Figure 1.20: Schéma de principe du microscope à nappe de lumière.

détection (voir **Chapitre 5** pour plus de détails). (**Figure 1.20**).

Chapitre 2

Microscopie à deux photons par mélange de fréquences

Sommaire

2.1	Introduction	38
2.2	Microscopie à deux photons multicolore : état de l'art	39
2.2.1	Les approches multicolore en microscopie	39
2.2.2	Stratégies d'imagerie non linéaire multicolore	40
2.3	Combinaison de faisceaux synchronisés	42
2.3.1	Principe	43
2.3.2	Travaux antérieurs	44
2.3.3	Spectres d'excitation à deux photons	45
2.3.4	Validation du concept	47
2.3.5	Recouvrement spatial et aberrations chromatiques	49
2.3.6	Comparaison entre une excitation à 1 et 2 couleurs	53
2.3.7	Imagerie de grands volumes	54
2.4	Applications à l'imagerie de tissus Brainbow	60
2.4.1	Le marquage Brainbow	60
2.4.2	Connectivité dans le cerveau	62
2.4.3	Lignage et étude clonale	68
2.4.4	Étude du photo-blanchiment en multicolore	74
2.4.5	Conclusion et perspectives	77

2.1 Introduction

La fluorescence est la modalité d'imagerie la plus utilisée en microscopie non-linéaire, car de nombreux marqueurs sont utilisables pour obtenir une information structurale ou fonctionnelle. Cependant, chaque marqueur n'apporte qu'un nombre limité d'informations. Ainsi, il est intéressant de développer des stratégies expérimentales combinant plusieurs marqueurs (par exemple différentes protéines fluorescentes) et de mettre au point des méthodes d'imagerie adéquates. Plusieurs approches ont été explorées pour répondre aux problématiques liées à l'imagerie multi-sigaux et le point commun entre les méthodes existantes est de combiner plusieurs longueurs d'onde d'excitation que l'on peut contrôler indépendamment. Au cours de ce chapitre nous présenterons une nouvelle stratégie d'excitation non linéaire de fluorophores multiples reposant sur deux trains d'impulsions synchronisés de longueurs d'onde centrales différentes. Cette approche a pour but d'augmenter le nombre de signaux biphotoniques que l'on peut produire et détecter simultanément tout en limitant la complexité du système d'imagerie. Dans les parties qui suivent, nous allons tout d'abord présenter un bref état de l'art des approches d'imagerie multicolore en microscopie (notamment non linéaire), puis nous détaillerons la méthode d'imagerie multicolore par mélange de fréquence mise au point au laboratoire. Enfin, nous présentons l'application de cette méthode à l'observation de tissus marqués avec l'approche *Brainbow*. Le but est de développer une méthodologie permettant de reconstruire le connectome de circuits neuronaux ou d'étudier le développement et le lignage cellulaire dans le système nerveux central. Les travaux présentés dans ce chapitre ont été obtenus dans le cadre d'une collaboration avec les équipes de Jean Livet (Institut de la Vision) et de Xavier Morin (Ecole Normale Supérieure), qui ont développé les stratégies de marquage *Brainbow* et préparé les tissus de cortex de souris et de moelle épinière d'embryon de poulet imagés dans ce travail.

2.2 Microscopie à deux photons multicolore : état de l'art

2.2.1 Les approches multicolore en microscopie

En microscopie de fluorescence les approches multicolore sont de plus en plus utilisées, que ce soit pour obtenir des informations à l'échelle moléculaire (*Förster Resonance Energy Transfert*, FRET)[125], ou à l'échelle macroscopique (fluorescence classique). Le développement de nouvelles approches de marquage a notamment ouvert la voie à de nombreuses applications. Parmi les avancées significatives on distingue l'optimisation d'une grande diversité de protéines fluorescentes, l'apparition de protéines photo-convertibles que l'on peut utiliser comme interrupteurs optiques, ou encore l'adressage génétique de marqueurs ciblant des populations (neurons, astrocytes etc.) ou des structures cellulaires différentes (noyau, cytoplasme enveloppe nucléaire, microtubules, filaments d'actine etc.).

Cette dernière approche se révèle être un moyen efficace pour étudier la dynamique cellulaire ou pour comparer des groupes de cellules d'un même organe, que ce soit pour l'étude du lignage cellulaire ou de la connectivité dans le cas de neurones. En effet, en combinant des informations fournies par plusieurs marqueurs il est par exemple possible de différencier des cellules ou groupes de cellules dans des situations où la résolution temporelle et spatiale d'acquisition ne permet pas de le faire. De telles stratégies ont été démontrées dans des applications telles que le suivi de cellules du système immunitaire [126], l'étude de la migration des cellules embryonnaires dans la moelle épinière de poulet [127], le suivi de la formation des métastases dans la souris [88], l'étude fonctionnelle des reins dans la souris [87], ou encore le suivi de la formation des cryptes dans le petit intestin de la souris [90]. Comme le montrent ces études, l'utilisation de plusieurs protéines fluorescentes est un outil puissant pour l'analyse quantitative. Cependant, seul un nombre limité de marqueurs peut être utilisé sans causer de problèmes de séparation des signaux à la détection.

Pour augmenter le nombre d'états discernables, plusieurs solutions sont envisageables. Il a par exemple été proposé d'utiliser une voie de détection résolue spectralement [128], ou encore d'associer de façon combinatoire un nombre restreint de marqueurs clairement identifiables[89, 129, 91]. Cette dernière possibilité, dénommée

Brainbow est particulièrement intéressante car elle permet en principe d’obtenir une grande variété de signatures spectroscopiques différentes à partir d’un petit nombre de marqueurs. Par exemple, dans le cortex de souris treize couleurs peuvent être distinguées dans une population de neurones en utilisant trois marqueurs et trois détecteurs [89].

2.2.2 Stratégies d’imagerie non linéaire multicolore

Si les stratégies de marquage multicolore ont considérablement évolué et permettent potentiellement de traiter un grand nombre d’applications biologiques, des méthodes d’imageries adaptées à l’observation de tissus vivants ou intacts sont encore à développer. En particulier, leur transposition à la microscopie non linéaire reste délicate.

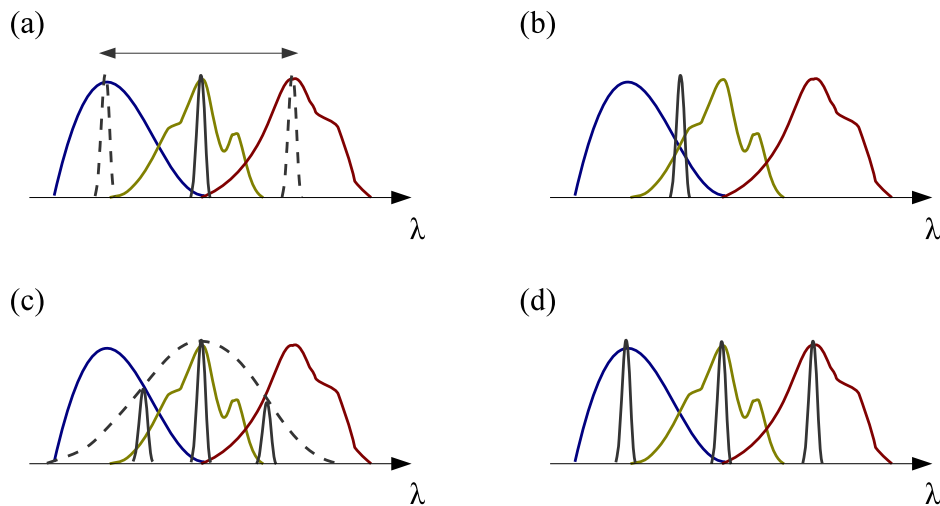


Figure 2.1: Stratégies d’excitation multicolore non linéaires. (a) Un oscillateur femtoseconde accordable est utilisé pour exciter différents fluorophores séquentiellement. (b) Des chromophores dont le spectre d’excitation se recouvrent peuvent être excités simultanément avec une seule longueur d’onde. (c) Façonnage d’un spectre large pour exciter de façon optimale plusieurs chromophores. (d) Utilisation de plusieurs faisceaux d’excitations.

Plusieurs approches ont été proposées pour l’imagerie à deux photons multicolore. La première consiste à utiliser un oscillateur femtoseconde accordable pour exciter différentes protéines fluorescentes séquentiellement. Par exemple, les dernières générations de sources femtoseconde permettent une accordabilité sur la gamme 700–1 300 nm pour une puissance moyenne au centre de la gamme d’approximativement

1,0 W avec un taux de répétition de 80 MHz et une durée d'impulsion de 100 fs. Si cette méthode permet par exemple d'exciter n'importe quelle protéine fluorescente au sein de tissus épais, elle n'est cependant pas compatible avec l'imagerie multicolore de tissus dynamiques car le temps d'acquisition croît avec le nombre de marqueurs.

Une autre stratégie consiste à utiliser le même laser pour exciter plusieurs chromophores dont les spectres d'excitation se recouvrent. Il a été montré que des longueurs d'onde décalées vers le visible pouvaient exciter simultanément deux protéines fluorescentes à condition que l'une d'elle possède de multiples bandes d'absorption (mKamala et TagRFP par exemple) [130, 131, 79]. Cependant, cette stratégie n'est applicable que pour un nombre restreint de protéines et peut conduire à des effets de photo-blanchiment plus importants suite à l'excitation de niveaux d'absorption d'ordre supérieurs pour la protéine rouge. Plus simplement, il est possible d'utiliser des longueurs d'ondes d'excitation comprises entre 880 et 920 nm pour exciter simultanément une CFP et une GFP, ou encore une CFP et une YFP [29, 132]. Cependant une telle méthode ne permet pas d'équilibrer indépendamment la puissance des différents signaux ce qui réduit la sensibilité et la spécificité [133]. De plus le nombre de chromophores simultanément accessibles est intrinsèquement limité.

Avec le développement combiné de lasers à spectre étendu et des méthodes de façonnage d'impulsions, plusieurs approches prometteuses sont également apparues. Ces stratégies consistent par exemple à façonner le spectre d'excitation à deux photons d'un laser large bande pour lui faire épouser de façon optimale le spectre d'excitation de plusieurs chromophores de façon simultanée ou séquentielle en commutant rapidement entre différentes formes de spectre [134, 135, 136]. Ainsi, le nombre de protéines fluorescentes distinctes que l'on peut exciter simultanément ou sélectivement est limité par la bande spectrale du laser. Cependant, ce type de stratégie peut être complexe à mettre en œuvre et à utiliser en routine car la phase spectrale et l'amplitude spectrale doivent être contrôlées précisément et maintenues au foyer de l'objectif pendant l'imagerie. De plus, il est nécessaire de disposer d'une densité spectrale d'énergie importante sur un spectre large.

Enfin plusieurs schémas multipliant le nombre de faisceaux excitateurs sont également envisageables. Le nombre de chromophores distincts que l'on peut adresser est alors limité par le nombre de bandes spectrales d'excitation dont on dispose. Pour produire ces faisceaux on distingue plusieurs méthodes. La moins onéreuse consiste à pomper une fibre à cristal photonique, ou à large cœur à l'aide d'un seul

laser pour générer de nouvelles fréquences [137, 138, 139]. De cette manière trois protéines fluorescentes peuvent être excitées simultanément [139]. Pour cela, les auteurs ont utilisé un faisceau de longueur centrale $\lambda_1 = 1550$ nm pour générer dans une fibre deux autres impulsions de longueurs d'onde centrales $\lambda_2 = 1728$ nm et $\lambda_3 = 1900$ nm et ont doublé les trois impulsions obtenues à partir de cristaux non linéaires pour pouvoir exciter trois chromophores aux longueurs d'onde suivantes 750, 864, et 950 nm. Cependant, ce type de méthode est peu efficace (40 % de pertes dues à la fibre et 70 % de pertes par cristal non linéaire) et complexe à mettre en œuvre. De plus pour ce type de méthode étant donné que les différents faisceaux sont produits à partir d'une même source il est généralement nécessaire de faire un compromis entre puissance disponible et nombre de couleurs accessibles. D'autres approches plus onéreuses mais néanmoins plus simples à mettre en œuvre utilisent deux lasers indépendants, ou un laser pompant un oscillateur paramétrique optique de façon synchrone [51, 52, 133, 132]. Avec cette stratégie d'excitation, l'imagerie simultanée de deux chromophores est réalisée par principe, et l'imagerie de trois chromophores a été rapportée dans le cas où l'une des deux sources excite simultanément deux marqueurs aux spectres partiellement superposés [132].

Au vu des méthodes existantes, les solutions à plusieurs sources sont actuellement les plus matures bien que la complexité de mise en œuvre augmente avec le nombre de couleurs nécessaires. Cependant, il est possible de tirer un meilleur parti des sources à plusieurs sorties en utilisant des combinaisons de fréquences comme voies d'excitation supplémentaires. C'est l'approche que j'ai développé afin d'exciter de façon optimale trois chromophores aux spectres d'excitation disjoints couvrant une partie du proche infra-rouge (750–1 200 nm) comme c'est le cas pour les constructions multicolore de type *Brainbow* [89, 91].

2.3 Combinaison de faisceaux synchronisés

Nous allons maintenant présenter une nouvelle stratégie permettant d'exciter simultanément trois molécules fluorescentes dont les spectres d'excitation sont distincts et couvrent une partie étendue du proche infra-rouge (750–1 200 nm) [140]. Cette méthode repose sur l'utilisation de trains d'impulsions synchronisés et a été développée au cours de ma thèse.

2.3.1 Principe

Comme discuté dans la section précédente, une méthode efficace et simple à mettre en œuvre pour l'imagerie de deux fluorophores consiste à utiliser deux spectres d'excitation disjoints produits par exemple par deux lasers, ou par un laser pompant un oscillateur paramétrique optique. Pour une telle configuration les protéines sont excitées par des processus d'absorption à deux photons dégénérés (à une couleur) provenant de chacun des trains d'impulsions **Figure 2.2(a)**. Dans ce cas, les couples de protéines utilisables sont limités par la superposition des spectres d'émission et les associations les plus répandues sont CFP-YFP, ou encore GFP-RFP.

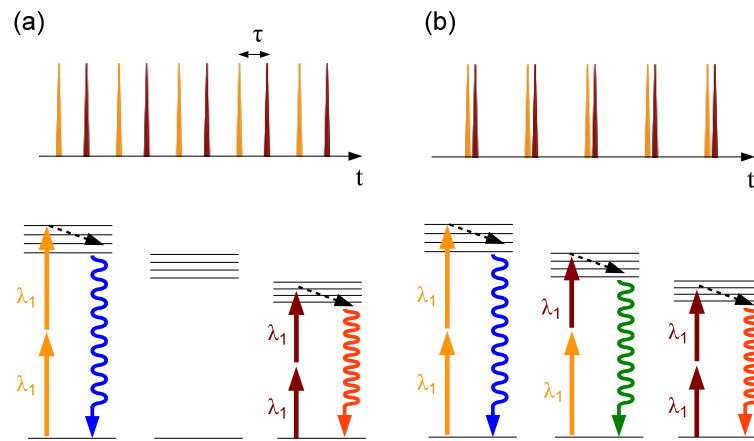


Figure 2.2: Stratégie d'excitation multicolore avec des trains d'impulsion synchronisés (a) Les trains d'impulsions sont décalés temporellement. Deux protéines fluorescentes sont excitées par des processus d'absorption à deux photons dégénérés provenant de chacun des trains d'impulsions. (b) Les trains d'impulsions sont superposés temporellement. Une troisième protéine fluorescente peut être excitée par un processus d'absorption à deux photons à deux couleurs.

D'autre part, dans le cas où les trains d'impulsions provenant des deux sources sont superposés temporellement, d'autres effets non linéaires résultant de l'interaction entre le milieu et les impulsions de couleurs différentes sont également générés simultanément (fluorescence excitée à deux photons à deux couleurs, somme de fréquences, mélange à quatre ondes). Ainsi, trois chromophores aux spectres d'absorption distincts peuvent être excités simultanément grâce à deux processus d'absorption à deux photons dégénérés et un processus à deux couleurs **Figure 2.2(b)**.

Si deux sources lasers indépendantes de même taux de répétition requièrent l'utilisation d'une synchronisation active pour corriger le bruit de gigue temporelle,

en revanche l'utilisation d'un oscillateur paramétrique optique pompé par un laser fournit naturellement deux trains d'impulsions parfaitement corrélés. C'est cette stratégie que nous avons utilisée pour l'imagerie multicolore de trois protéines fluorescentes. Le schéma de principe est visible sur la **Figure 2.3** : les faisceaux d'excitation sont recombinaés spatialement à l'aide d'un miroir dichroïque et synchronisés temporellement à l'aide d'une ligne à retard, puis envoyés vers un microscope décrit au premier chapitre. Les trois signaux étant créés simultanément, ils sont détectés dans trois bandes spectrales différentes.

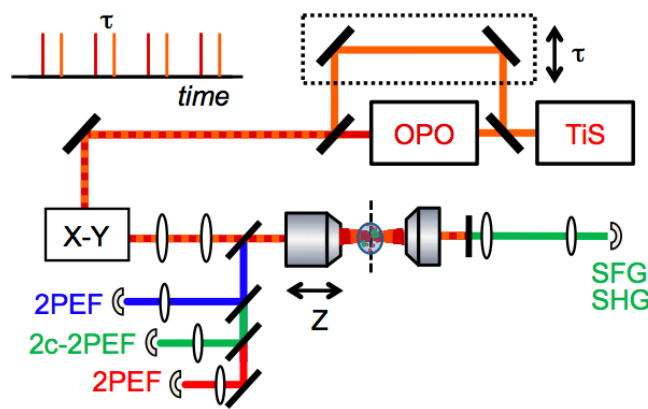


Figure 2.3: Montage expérimental. Un laser titane saphir (TiS) et un oscillateur paramétrique optique (OPO) sont recombinaés spatialement et superposés temporellement avant d'être envoyés dans un microscope à balayage.

2.3.2 Travaux antérieurs

L'excitation à base de trains d'impulsions synchronisés a été utilisé dans d'autres techniques de microscopie, notamment pour l'imagerie CARS [10, 119, 120] ou SRS [141, 123, 124] mais également pour la fluorescence. La fluorescence excitée à 2 photons à 2 couleurs a été utilisée pour la première fois par Joseph R. Lakowicz et Ignacy Gryczynski en 1996 [142, 92, 143] pour exciter des molécules fluorescentes dont le spectre d'absorption est centré à 250 nm dans le proche ultraviolet comme cela est le cas pour le tryptophane (**Figure 2.4(a)**). Ne disposant pas de sources pulsées à 500 nm permettant l'excitation à deux photons des résidus tryptophanes (**Figure 2.4(b)**), les auteurs ont utilisé un faisceau à 760 nm et sa réplique doublée en fréquence à 380 nm pour exciter le tryptophane à l'aide d'un mécanisme de fluorescence à 2 photons à 2 couleurs (**Figure 2.4(c)**). On peut noter que les fluorophores

pourraient également être excités par un processus de fluorescence à 3 photons à 760 nm mais l'efficacité d'excitation serait alors plus faible [94].

Depuis, plusieurs applications de l'excitation à deux photons deux couleurs ont été proposées pour la spectroscopie moléculaire comme la mesure des temps de fluorescence de molécules absorbant dans l'ultraviolet [144], ou la détermination du tenseur de fluorescence à 2 photons à l'aide d'études polarimétriques résolues temporellement [145, 146, 147]. D'autres applications ont également été proposées pour le suivi de réactions enzymatiques sans marquage [146] et de liaisons entre deux protéines sans marquage [144].

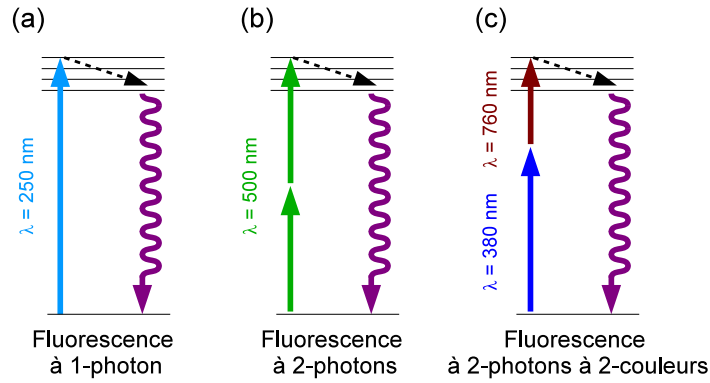


Figure 2.4: Stratégies d'excitation d'un fluorophore dans l'ultra-violet. (a) Excitation à 1 photon à l'aide d'une source continue à 250 nm. (b) Excitation à 2 photons à l'aide d'un laser impulsif émettant à 500 nm. (c) Excitation à 2 photons à 2 couleurs à l'aide d'un faisceau à 760 nm et de sa réplique doublée en fréquence à 380 nm.

2.3.3 Spectres d'excitation à deux photons

Pour vérifier la validité du concept d'imagerie à trois couleurs par mélange de fréquence, nous avons effectué une mesure du spectre d'excitation à deux photons de notre système. Le spectre d'excitation à deux photons $|E^{(2)}(\omega)|^2$ est défini comme la transformée de Fourier du champ doublé en fréquence $E^{(2)}(t) = E(t)^2$. Pour cette mesure, les deux lasers sont focalisés dans un cristal doubleur de BBO et le spectre des différents signaux non linéaires générés est mesuré. Pour deux impulsions de fréquences centrales ω_1 et ω_2 , le spectre possède bien trois composantes de fréquences respectives : $2\omega_1$, $\omega_1 + \omega_2$ et $2\omega_2$ (**Figure 2.5(a)**). Les composantes à $2\omega_1$ et $2\omega_2$ sont dues au doublage en fréquence des faisceaux utilisés et sont bien indépendantes

du délai entre les trains d'impulsions, alors que la composante à $\omega_1 + \omega_2$ provient d'une interaction de type somme de fréquences et disparaît lorsque les lasers sont décalés temporellement. Ainsi tout se passe comme si l'on disposait de trois lasers permettant d'exciter trois fluorophores dont les spectres d'absorption à deux photons possèdent des résonances à $2\omega_1$, $\omega_1 + \omega_2$ et $2\omega_2$.

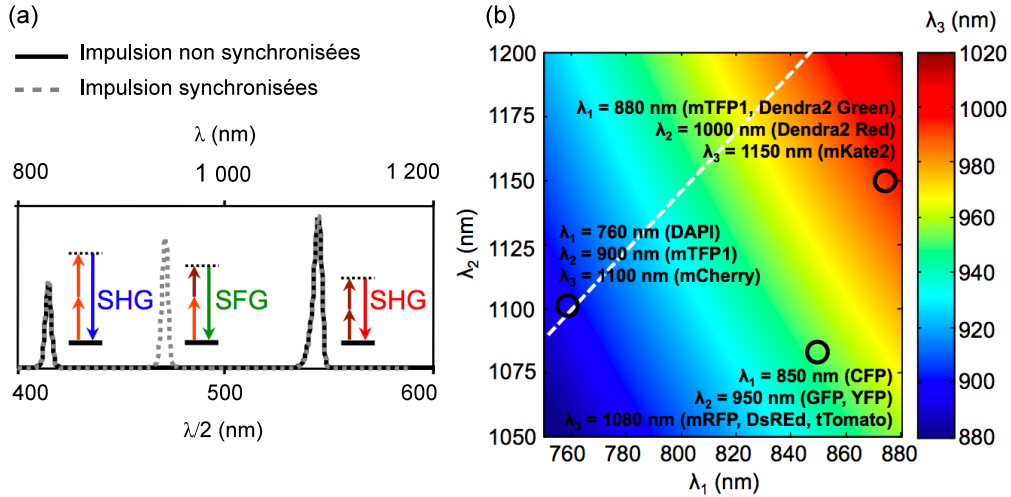


Figure 2.5: (a) Spectres d'excitation à deux photons mesurés en focalisant deux trains d'impulsion dans un cristal non linéaire de BBO. Trois signaux sont visibles : les deux premiers sont dus à un phénomène de doublage de fréquence et apparaissent aux fréquences $2\omega_1$ ($\lambda_1/2$) et $2\omega_2$ ($\lambda_2/2$), alors que le troisième est un signal de somme de fréquence à $\omega_1 + \omega_2$ ($1/(1/\lambda_1 + 1/\lambda_2)$) apparaissant uniquement lorsque les impulsions sont synchronisées. (b) Carte des combinaisons de longueurs d'ondes d'excitation à deux photons accessibles pour l'imagerie à trois couleurs. L'ensemble du plan est accessible lorsque λ_1 et λ_2 sont contrôlables indépendamment (chaîne laser TiS₁/OPO₁), alors que seule une partie du plan peut être explorée lorsque λ_1 et λ_2 ne sont pas indépendantes (ligne en pointillé blanc correspondant à la chaîne laser TiS₂/OPO₂).

Pour l'imagerie à trois couleurs on souhaiterait idéalement pouvoir contrôler indépendamment les longueurs d'ondes centrales des trois spectres d'excitation à 2 photons de façon à pouvoir travailler avec le plus grand nombre possible de combinaisons de fluorophores. Cependant, pour des impulsions synchronisées de longueurs d'ondes centrales λ_1 (TiS) et λ_2 (OPO) la longueur d'onde d'excitation à 2 couleurs est liée à celles des deux faisceaux et est donnée par la relation suivante $\lambda_3 = 2(1/\lambda_1 + 1/\lambda_2)$. La **Figure 2.5(b)** est une carte des triplets de longueurs d'ondes d'excitation que l'on peut atteindre pour l'imagerie trois couleurs

avec notre dispositif expérimental. Cette carte nous montre que des impulsions synchronisées de longueurs d'ondes centrales λ_1 et λ_2 comprises entre (750–860 nm) et (1 050–1 200 nm) donnent accès à une troisième longueur d'onde comprise entre (875–1 000 nm) (chaîne laser TiS₁/OPO₁ voir **Section 1.3.1**). Ainsi, plusieurs combinaisons de protéines fluorescentes sont accessibles et notamment celles encodées par les transgènes Brainbow [89, 129] (CFP, YFP et tdTomato ou mCherry). Cependant, dans le cas où les deux longueurs d'onde λ_1 et λ_2 ne sont pas indépendantes (chaîne laser TiS₂/OPO₂ voir **Section 1.3.1**) les combinaisons accessibles sont limitées à une ligne représentée en pointillé blanc sur la **Figure 2.5(b)**.

2.3.4 Validation du concept

Pour valider le principe d'excitation, nous avons mesuré le signal de fluorescence produit dans un tissu marqué par trois protéines fluorescentes pour différentes valeurs du délai entre deux impulsions synchronisées de longueurs d'onde centrales $\lambda_1 = 850$ nm et $\lambda_2 = 1100$ nm. Nous avons utilisé des cellules embryonnaires humaines de rein (HEK) fournies par Jean Livet comme échantillons test. Chaque cellule exprime une protéine fluorescente parmi (i)CFP, (ii)YFP, et (iii)tdTomato ou mCherry. Les images de fluorescence ont été enregistrées dans trois bandes spectrales différentes à l'aide de filtres dichroïques et de trois photo-multiplicateurs.

On peut remarquer que les signaux de fluorescence bleu (CFP) et rouge (tdTomato ou mCherry) dépendent peu du délai (**Figure 2.6(a,b)**). Une légère augmentation est cependant observée lorsque les trains d'impulsion sont synchronisés ; celle-ci est en fait due à une excitation parasite à 2 couleurs (**Figure 2.6(c)**). En revanche la protéine YFP est excitée uniquement lorsque les trains d'impulsions sont synchronisés. Ainsi on peut considérer que chaque protéine fluorescente est excitée majoritairement par une seule composante du spectre d'excitation à deux photons, ce qui valide la méthode d'excitation de trois chromophores. Notons que notre méthode est d'autant plus pertinente que les spectres d'excitation sont disjoints, car sinon une ou deux longueur(s) d'onde suffit(ent) pour produire plusieurs signaux de fluorescence.

Dans ces conditions, en supposant les profils d'intensité temporels gaussiens, les signaux de fluorescence bleu, rouge et vert s'expriment de la manière suivante :

$$S_{Blue} = P_1^2, S_{Rouge} = P_2^2, S_{Vert} = 2P_1P_2 \exp\left(-\tau^2/2\sigma^2\right), \quad (2.1)$$

où P_1 et P_2 sont les puissances d'excitation du titane-saphir et de l'OPO, τ le délai entre les trains d'impulsions et σ la largeur à $1/e^2$ de la fonction d'intercorrélacion temporelle d'ordre deux. Ce paramètre est relié aux largeurs des profils d'intensité du titane-saphir et de l'OPO par la relation $\sigma = \sqrt{\sigma_1^2 + \sigma_2^2}$. Ainsi l'efficacité des processus d'excitation à un faisceau est contrôlée par la puissance des lasers, alors que l'efficacité du signal à 2 couleurs est contrôlée en plus par le délai entre les trains d'impulsions, ce qui permet un contrôle indépendant des trois signaux. Notons qu'en pratique la dispersion induite par les tissus est trop faible pour induire une désynchronisation significative des trains d'impulsions. En utilisant les valeurs mesurées par Daiman et Masumara [148] pour l'indice de réfraction de l'eau on trouve qu'il faut parcourir une distance de propagation de 1 mm pour que des trains d'impulsions synchronisés de longueurs d'onde centrales $\lambda_1 = 850$ nm et $\lambda_2 = 1100$ nm se décalent de 13 fs, soit une faible fraction de la largeur des impulsions excitatrices utilisées (100–400 fs voir **Section 1.3.1**).

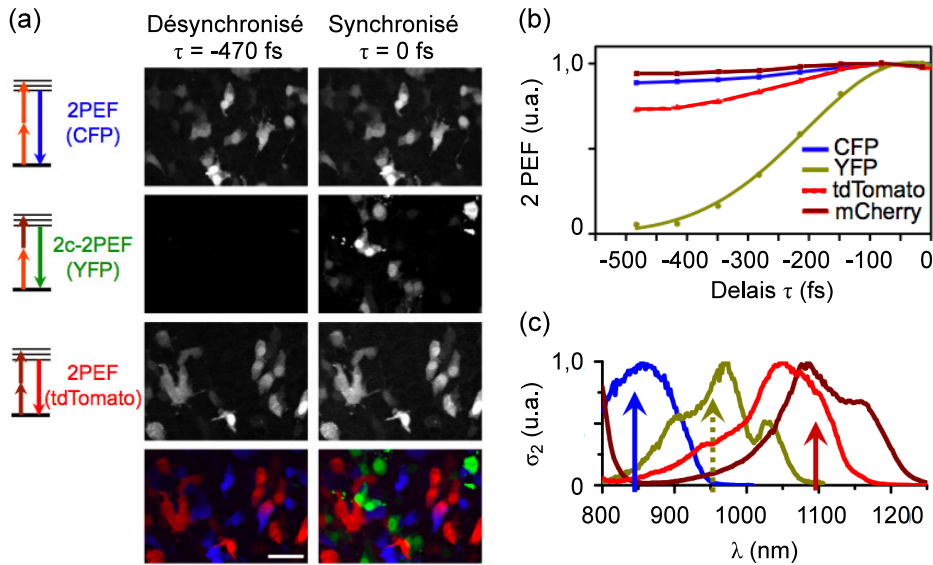


Figure 2.6: Excitation de trois protéines fluorescentes à l'aide de trains d'impulsions synchronisés. (a) Comparaison des signaux obtenus pour des trains d'impulsions désynchronisés puis synchronisés. Les images représentent des cellules HEK exprimant chacune une protéine fluorescente (CFP, YFP, ou tdTomato). Les acquisitions ont été faites sur trois canaux spectraux différents pour des trains d'impulsions désynchronisés puis synchronisés. (b) Signaux obtenus sur quelques cellules en fonction du délai. (c) Spectres d'excitation des marqueurs utilisés (CFP, YFP, tdTomato et mCherry).

2.3.5 Recouvrement spatial et aberrations chromatiques

Recouvrement spatial : Le signal de fluorescence à 2 couleurs provient d'une interaction entre deux faisceaux de longueurs d'onde centrales différentes que l'on focalise au foyer d'un objectif de microscope. Contrairement à la fluorescence à 2 photons classique où un seul faisceau d'excitation est utilisé, le signal de fluorescence produit est sensible aux décalages spatiaux entre les faisceaux d'excitation. On distingue deux types de décalage entre les profils d'excitation : les décalages qui sont dans le plan de focalisation, et ceux qui sont parallèles à l'axe optique. Ces décalages peuvent avoir plusieurs origines physiques : un mauvais alignement induira un décalage dans le plan focal, tandis que les aberrations chromatiques du microscope et des tissus peuvent provoquer les deux types de décalage.

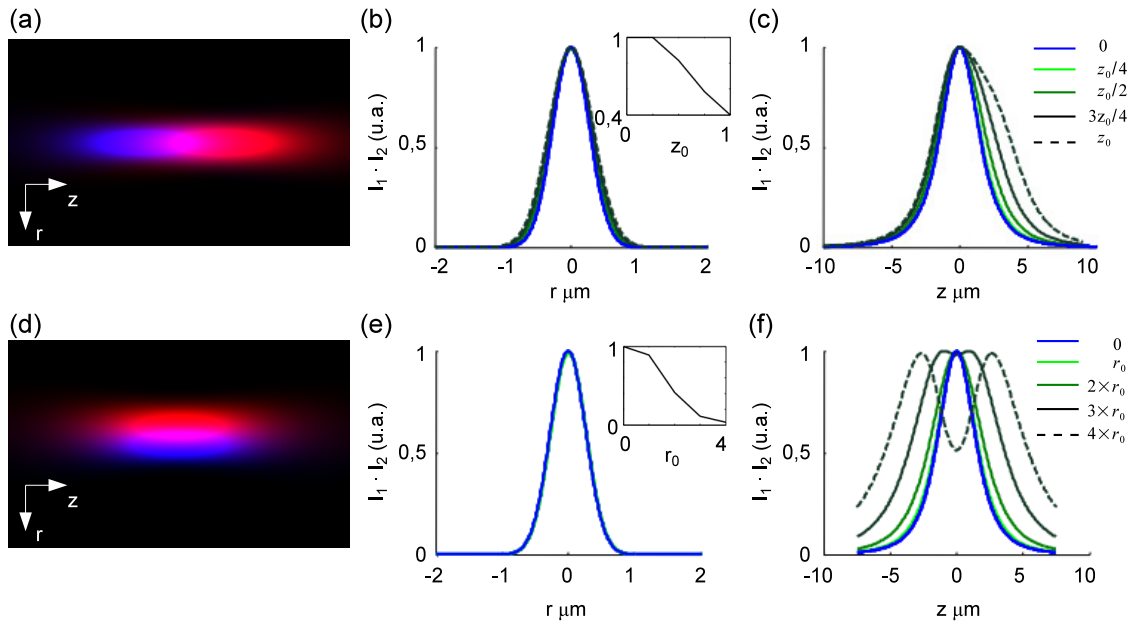


Figure 2.7: Effets des décalages entre les faisceaux d'excitation. (a-c) Les faisceaux sont décalés axialement et les profils d'intensité à deux couleurs normalisés sont calculés pour plusieurs décalages (b,c) où z_0 est la largeur à mi-hauteur axiale d'un des faisceaux. (d-f) Les faisceaux sont décalés radialement et les profils d'intensité à deux couleurs sont calculés pour plusieurs décalages (e,f) pour plusieurs valeurs où r_0 est la largeur à mi-hauteur axiale d'un des faisceaux. Les inserts visibles en (b) et (e) représentent la chute du signal à deux couleurs en fonction du décalage axial et radial.

Les effets de ces décalages sur le profil d'excitation sont présentés **Figure 2.7**. Nous avons calculé ces effets pour des ouvertures numériques modérées et dans le

cadre de l'approximation paraxiale. Dans le cas de décalages suivant l'axe de propagation, on peut remarquer que les profils d'excitation s'élargissent en fonction du décalage (**Figure 2.7(b,c)**). Les résolutions latérale et axiale peuvent donc être dégradées pour de forts décalages. Dans le cas où les deux faisceaux sont décalés axialement seule la résolution axiale est dégradée (**Figure 2.7(e,f)**). Ainsi la résolution du processus à 2 photons à 2 couleurs dépend des longueurs d'onde d'excitation mais également de la différence de focalisation entre les deux faisceaux d'excitation (résultat connu pour la microscopie CARS).

Cependant, les décalages entre les faisceaux vont surtout avoir pour effet de faire baisser l'efficacité de génération de la fluorescence à 2 photons excitée à 2 couleurs, comme l'illustre la **Figure 2.8**. Ainsi, le signal excité à 2 couleurs est un bon indicateur de la superposition des faisceaux d'excitation et sa contribution est faible dans les cas où la résolution est dégradée. Pour générer efficacement un signal de fluorescence à 2 couleurs sur une partie importante du champ de vue il est donc important de corriger les principales sources de décalage que sont les aberrations chromatiques.

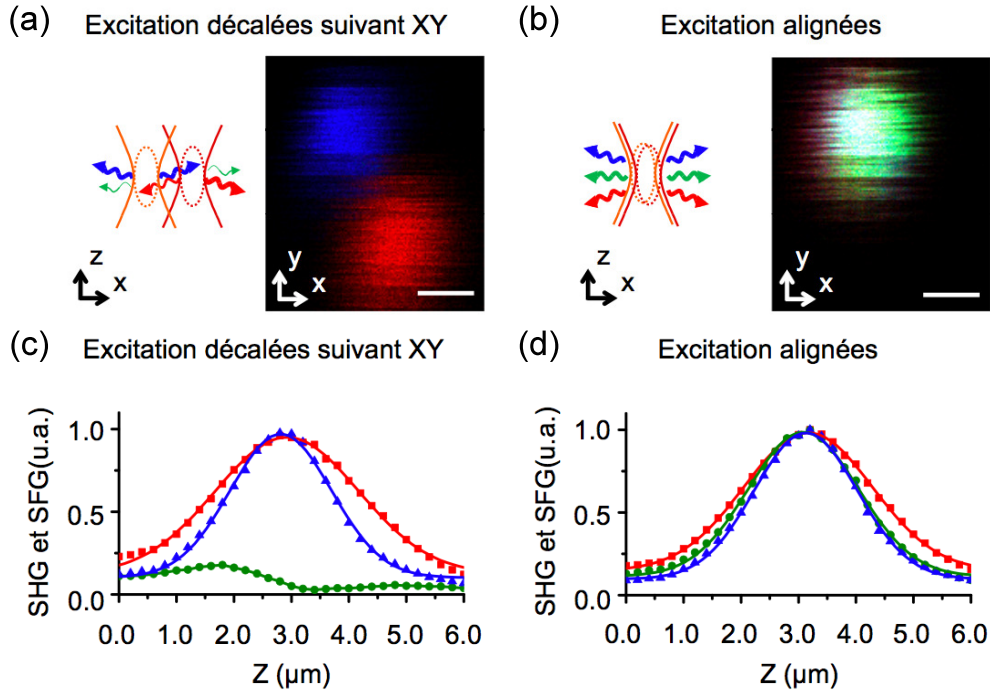


Figure 2.8: Chute du signal de fluorescence excitée à 2 couleurs pour un décalage entre les faisceaux de l'ordre de deux fois la résolution latérale. Temps par pixel $5 \mu\text{s}$, barre d'échelle $0,50 \mu\text{m}$.

Aberrations chromatiques : Les aberrations chromatiques se manifestent en présence d'éléments dispersifs tels que la silice et sont dues à une variation de l'indice de réfraction avec la longueur d'onde. Pour une optique usuelle comme une lentille ou un objectif de microscope qui est une succession de lentilles, on distingue deux types d'aberrations chromatiques : les aberrations axiales et les aberrations transverses. Les aberrations axiales sont en première approximation indépendantes de la position dans le champ de vue et se manifestent par un déplacement du point de focalisation le long de l'axe lorsque la longueur d'onde varie (**Figure 2.9(a)**). Elles peuvent donc être corrigées sur tout le champ de vue. Les aberrations chromatiques longitudinales apparaissent en revanche uniquement hors d'axe et se manifestent par un déplacement radial du point de focalisation en fonction de la longueur d'onde et de la position dans le champ de vue (**Figure 2.9(b)**). Il n'est donc pas possible d'appliquer une correction globale.

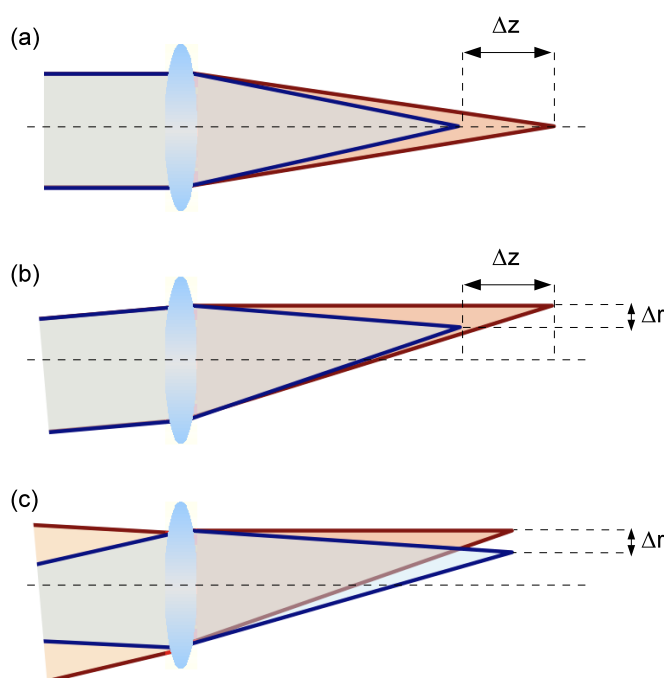


Figure 2.9: Influence des aberrations chromatiques dans un microscope à balayage. (a) Les aberrations chromatiques axiales se traduisent par un décalage longitudinale des points de focalisation pour deux faisceaux de longueurs d'onde centrales différentes. (b) Dans le cas général (aberrations chromatiques axiales et radiales) les points de focalisation des deux faisceaux sont décalés longitudinalement et radialement. (c) Malgré la correction des aberrations chromatiques axiales les points de focalisation sont toujours décalés radialement hors d'axe.

Dans un microscope à balayage deux éléments sont principalement susceptibles d'induire des aberrations chromatiques : le système imageant les miroirs galvanométriques sur la pupille arrière de l'objectif de microscope, et l'objectif lui-même. Ainsi, lorsque l'on balaye deux faisceaux de longueurs d'onde centrales différentes au foyer d'un objectif de microscope, les points de focalisation des deux faisceaux sont spatialement décalés : au centre du champ de vue les points de focalisation sont décalés principalement le long de l'axe et en bord du champ de vue ils sont en plus décalés radialement. Pour la fluorescence à 2 photons à 2 couleurs il est donc important de corriger les aberrations chromatiques ou de définir une portion du champ de vue pour laquelle les décalages sont faibles devant la taille du volume focal.

L'aberration chromatique axiale peut être corrigée en introduisant un défaut de mise au point pour chacun des faisceaux d'excitation. Cela peut se faire rigoureusement à l'aide d'un modulateur de phase spatiale conjugué sur la pupille arrière de l'objectif de microscope, ou de façon approchée en changeant la divergence des faisceaux d'excitation (**Figure 2.9(c)**). Les méthodes reposant sur un contrôle de la divergence sont plus simples à mettre en œuvre, mais introduisent néanmoins une phase résiduelle d'aberration sphérique ce qui peut dégrader la résolution pour de fortes valeurs de la divergence [62, 149, 150, 151]. Par souci de simplicité nous avons choisi de corriger l'aberration chromatique axiale en changeant la divergence des faisceaux d'excitation à l'aide de télescopes placés en amont du microscope. Le grandissement des télescopes a été choisi de façon à ce que le remplissage des faisceaux soit le même malgré la divergence induite sur les faisceaux, ce qui permet d'avoir des résolutions comparables pour les différents signaux de fluorescence. Malgré l'aberration sphérique résiduelle introduite, les résolutions axiales pour les deux faisceaux sont de l'ordre de 2,0 et de 2,5 μm pour les deux faisceaux d'excitation (**Figure 2.8(b)**) ce qui correspond à une ouverture numérique effective $\text{NA} = 0,80$ alors que l'ouverture numérique nominale de l'objectif utilisé est $\text{NA} = 1,05$ et que l'objectif est légèrement sous-couvert. Ces résolutions sont donc tout à fait convenables pour les applications visées, à savoir imager des tissus de cortex cérébral avec une résolution subcellulaire.

D'autre part, dans un système à balayage les aberrations chromatiques transverses varient dans le champ de vue et ne peuvent pas être corrigées à l'aide d'un élément statique. Nous avons donc essayé de trouver un objectif corrigeant au mieux ces aberrations. Pour comparer les différents objectifs le signal de fluorescence à 2

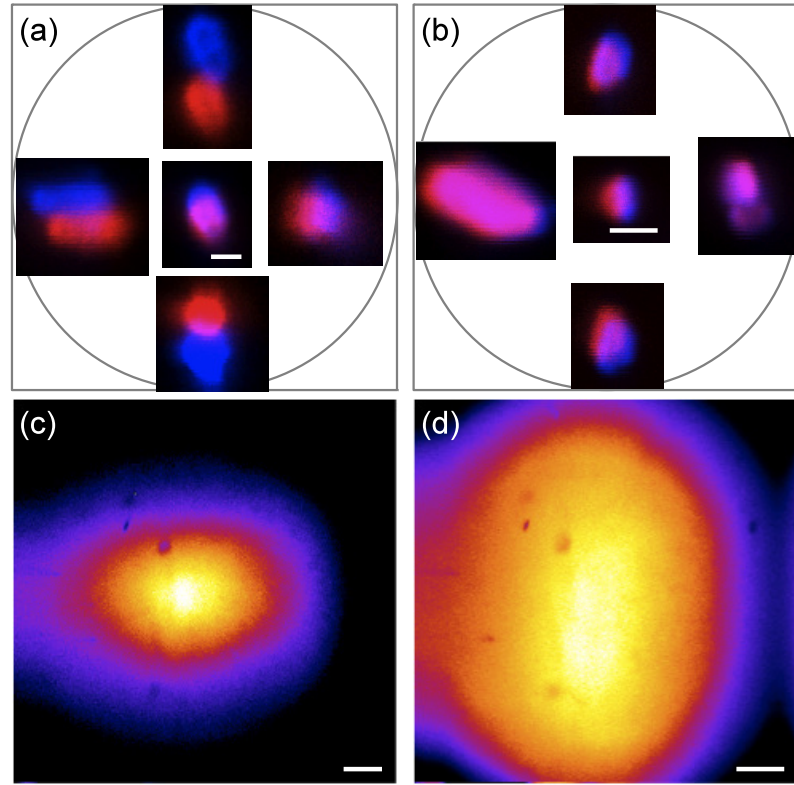


Figure 2.10: Chromatisme dans le champ de vue. (a,b) Décalages des points de focalisation pour un objectif dont le chromatisme n'est pas corrigé (a) et pour un objectif dont le chromatisme est corrigé (b). (c,d) Signaux de fluorescence excités à deux couleurs d'un échantillon homogène étendue pour les deux objectifs. Barres d'échelles (a,b) $2,0\ \mu\text{m}$, (c,d) $100,0\ \mu\text{m}$.

couleurs est un bon diagnostic pour quantifier les aberrations chromatiques dans le champ de vue car il reflète directement les décalages entre les faisceaux d'excitation. Nous avons essayé plusieurs objectifs conçus pour le proche infrarouge disponible au laboratoire, et obtenu les meilleurs résultats avec un Olympus XLPL25XWMP (25X NA 1,05). Pour cet objectif nous avons trouvé que les faisceaux d'excitation se décalent de moins de la résolution latérale sur plus de la moitié du champ de vue, ce qui correspond à un champ de vue effectif de $400\ \mu\text{m}$ de diamètre pour des résolutions axiales comprises entre $2,0$ et $2,5\ \mu\text{m}$ pour les différents signaux de fluorescence.

2.3.6 Comparaison entre une excitation à 1 et 2 couleurs

Pour l'imagerie à trois couleurs de volume il est important de vérifier que le profil d'excitation à 2 couleurs se conserve dans les tissus. Pour cela, nous avons

comparé une excitation à 2 photons standard et une excitation à 2 couleurs en imageant des tranches de cortex marquées à l'aide d'une protéine fluorescente jaune (YFP) pour des impulsions synchronisées de longueur d'onde centrale $\lambda_1 = 850$ nm et $\lambda_2 = 1100$ nm ($\lambda_3 = 2 / (1/\lambda_1 + 1/\lambda_2) = 959$ nm), puis pour un seul faisceau de longueur d'onde centrale $\lambda_0 = 960$ nm. Les résultats sont visibles **Figure 2.11**. On peut constater qu'aucune différence majeure n'est apparente entre les deux processus d'excitation sur le champ de vue utilisé : $395 \times 275 \mu\text{m}^2$ et ceci pour des profondeurs d'imagerie de $250 \mu\text{m}$ et $300 \mu\text{m}$. La fluorescence à 2 couleurs pourra donc être utilisée pour l'imagerie du cortex en profondeur avec une résolution cellulaire équivalente à celle obtenue en fluorescence à deux photons classique.

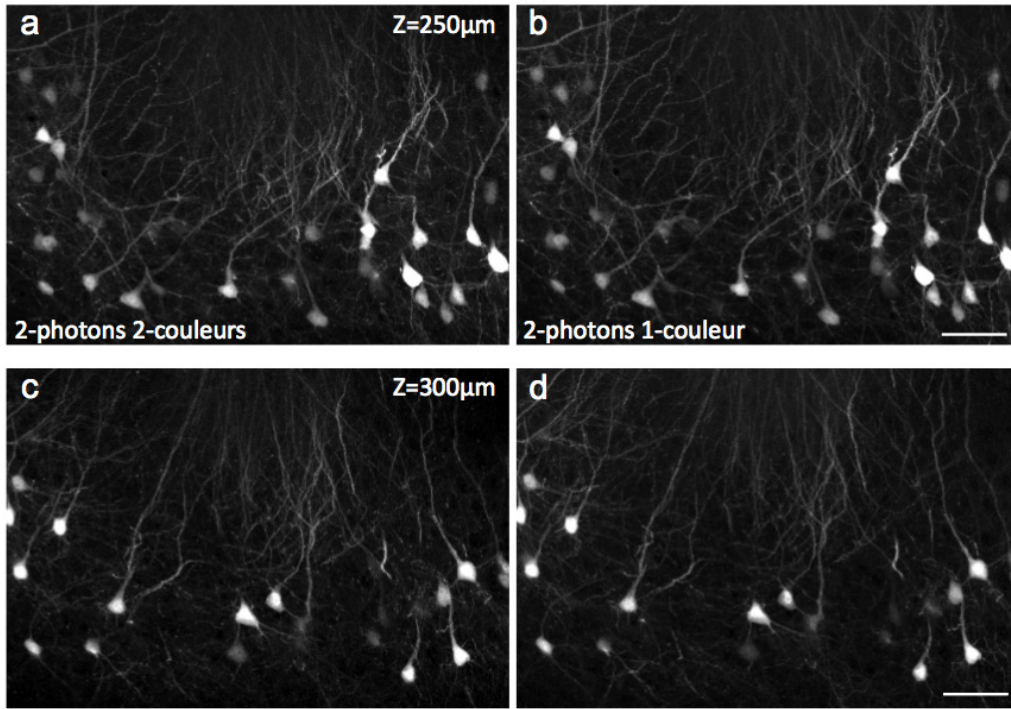


Figure 2.11: Comparaison entre une excitation à 2 photons à 2 et 1 couleurs d'un marquage YFP dans un tissu de cortex de souris, (a,c) et (b,d) respectivement. Temps par pixel $5 \mu\text{s}$, barre d'échelle $50 \mu\text{m}$.

2.3.7 Imagerie de grands volumes

Pour les applications de lignage cellulaire et d'étude de la connectivité dans le tissu nerveux avec des stratégies Brainbow, il est nécessaire de réaliser une analyse colorimétrique (c'est à dire mesurer les rapports entre les trois signaux bleu, jaune-

vert, et rouge) sur de grands volumes. Nous avons pour cela corrigé la sensibilité des différents canaux en fonction de la profondeur et du champ de vue, et implémenté un mosaïcage de zones étendues. Nous présenterons ces aspects dans les paragraphes suivants, puis validerons cette stratégie sur des échantillons épais de cortex de souris.

Contrôle des signaux en profondeur : Lorsque l'on s'enfonce dans les tissus le signal de fluorescence mesuré et le contraste des images diminue, ce qui limite la profondeur d'imagerie utile. Cette limitation est due à la diffusion des profils d'excitation et des signaux de fluorescence (**Chapitre 1**). Pour optimiser l'imagerie en profondeur, il est tout d'abord préférable de minimiser la baisse de l'efficacité de collection. Cela peut être fait en augmentant l'étendue géométrique de la voie de détection, c'est à dire en utilisant un objectif de forte ouverture numérique et de faible grandissement ainsi que des lentilles de collection adaptées [39, 38]. Cependant pour des profondeurs d'imagerie non superficielles ($> 100 \mu\text{m}$) il est également nécessaire d'augmenter la puissance incidente de façon à maintenir une intensité d'excitation constante malgré la diffusion.

Pour l'imagerie trichromatique avec des faisceaux synchronisés ($\lambda_1 = 850 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 1100 \text{ nm}$) nous avons pu remarquer que les différents signaux de fluorescence s'atténuaient différemment lorsque l'on s'enfonce dans les tissus (**Figure 2.12(a)**). Cela est dû au fait que les phénomènes de diffusion varient avec la longueur d'onde (**Chapitre 1**). Cependant, comme la superposition des deux faisceaux est peu affectée en profondeur, seul un contrôle sur la puissance des trains d'impulsions est nécessaire pour maintenir l'intensité des trois profils d'excitation dans les tissus (les signaux en surface étant ajustés à l'aide des deux puissances et du délai entre les trains d'impulsions).

En pratique, les puissances sont contrôlées en ajustant les angles des axes de rotation de deux lames demi-onde placées juste avant des cubes polarisants. Le mouvement des lames est synchronisé avec l'acquisition des images de fluorescence ce qui permet d'augmenter progressivement la puissance pour chaque nouvelle profondeur. Ainsi, il est possible de compenser les atténuations des trois signaux de fluorescence de façon automatique (**Figure 2.12(b)**) et donc de préserver le rapport des trois signaux (soit la couleur des structures) et le rapport signal-sur-bruit lorsque l'on s'enfonce dans les tissus comme l'illustre la pile d'images enregistrées sur un tissu de cortex faisant $400 \mu\text{m}$ d'épaisseur (**Figure 2.13**). On note qu'il est tout de même difficile de concevoir une méthode entièrement automatique permettant de

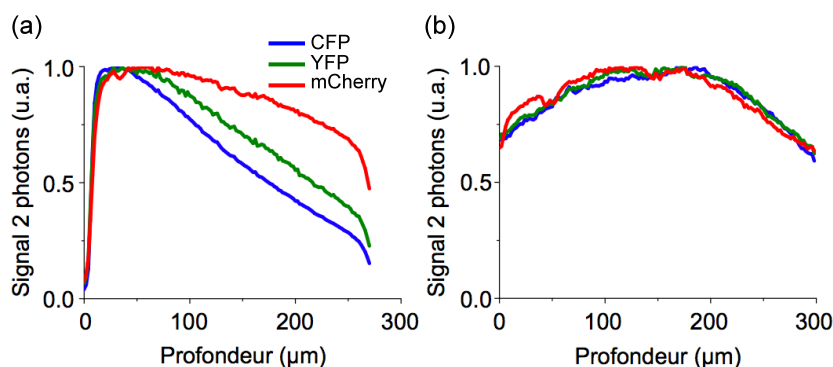


Figure 2.12: Variation des trois signaux excités à deux photons (CFP, YFP, mCherry) avec la profondeur dans un tissu de cortex de souris *Brainbow* dans les cas où les puissances d'excitation sont inchangées (a), et dans le cas où elles augmentent suivant un profil exponentiel (b). On peut noter que la brusque chute du signal en (a) aux alentours de $z = 280 \mu\text{m}$ est un effet de bord de tranche.

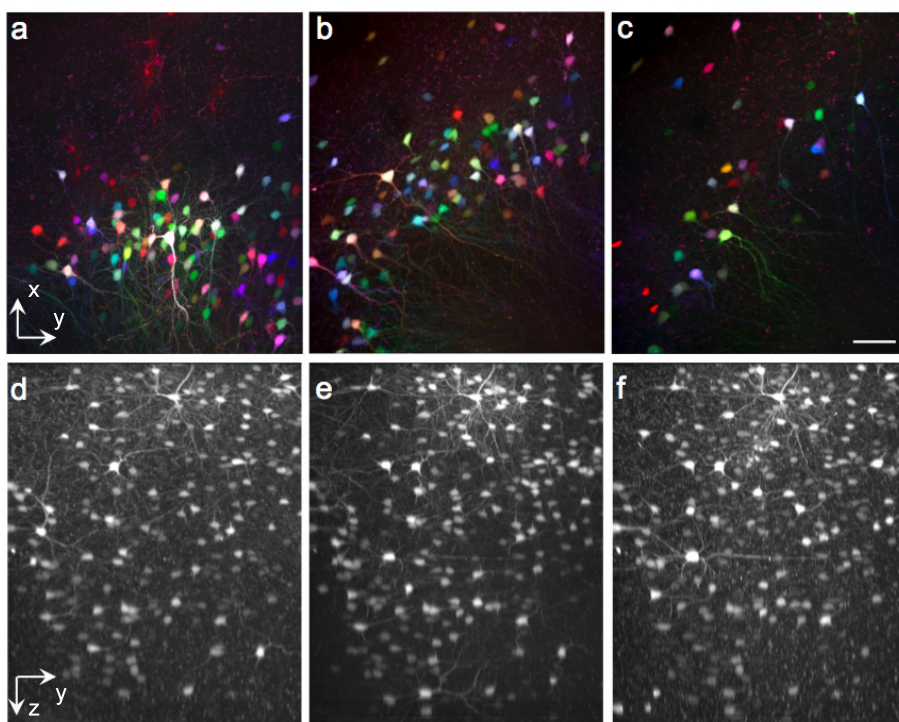


Figure 2.13: Pile d'images enregistrées sur un tissu de cortex de souris *Brainbow*. (a-c) Projections maximales calculées sur une épaisseur de $100 \mu\text{m}$ pour trois profondeurs différentes : $z = 0, 100$ et $350 \mu\text{m}$. (d-f) Projections maximales calculées à partir des reprojctions orthogonales de la pile d'images. Temps par pixel $5 \mu\text{s}$, barre d'échelle $50 \mu\text{m}$.

compenser parfaitement l'atténuation des signaux dans les tissus car nous avons pu observer des différences d'atténuation au sein d'un même tissu et entre les tissus.

Enfin, bien que le signal de fluorescence moyen soit préservé, ce type de stratégie ne compense pas la perte du confinement de l'excitation due aux aberrations et à la diffusion. De plus on peut s'attendre à ce que les résolutions des trois signaux se dégradent différemment lorsque l'on s'enfonce dans les tissus car les longueurs d'ondes d'excitation utilisées sont différentes ($\lambda_1 = 850 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 1100 \text{ nm}$). Cela peut être problématique pour des structures plus petites que la résolution optique car le rapport des signaux de fluorescence ne va alors pas être la même en surface et en profondeur (les structures semblent changer de couleur). Pour augmenter la profondeur de pénétration, une solution possible consisterait à pré-compenser les aberrations et la diffusion induite par le tissu à l'aide de modulateurs de phase spatiale (optique adaptative). Cependant une correction de ce type est nécessairement locale et plusieurs zones devraient être corrigées séquentiellement pour imager un champ de vue étendu [152, 153].

Homogénéisation du signal de fluorescence : Les efficacités d'excitation et de détection ne sont pas invariantes dans le champ de vue et peuvent également changer d'un canal de détection à l'autre. Ces variations doivent être mesurées et prises en compte pour obtenir des informations colorimétriques (rapport entre les différents canaux de fluorescence) indépendante de la position dans le champ de vue. Pour cela nous avons mesuré la réponse du système dans le cas d'un échantillon fluorescent homogène et ceci pour chacune des voies de fluorescence utilisées pour l'imagerie de tissus multicolore (**Figure 2.14(a-c)**). Ces réponses mesurées peuvent alors être utilisées pour normaliser les images en intensité de façon à pouvoir comparer les couleurs de différentes structures sur l'ensemble du champ de vue utile (**Figure 2.14(d-e)**).

Acquisition de mosaïques : Le champ de vue effectif de notre système pour la microscopie trichromatique est restreint et fait approximativement $400 \times 400 \mu\text{m}^2$. Pour étendre ce champ de vue il est possible de réaliser plusieurs acquisitions successives décalées les unes par rapport aux autres. Les images sont corrigées spectralement avant d'être recalées.

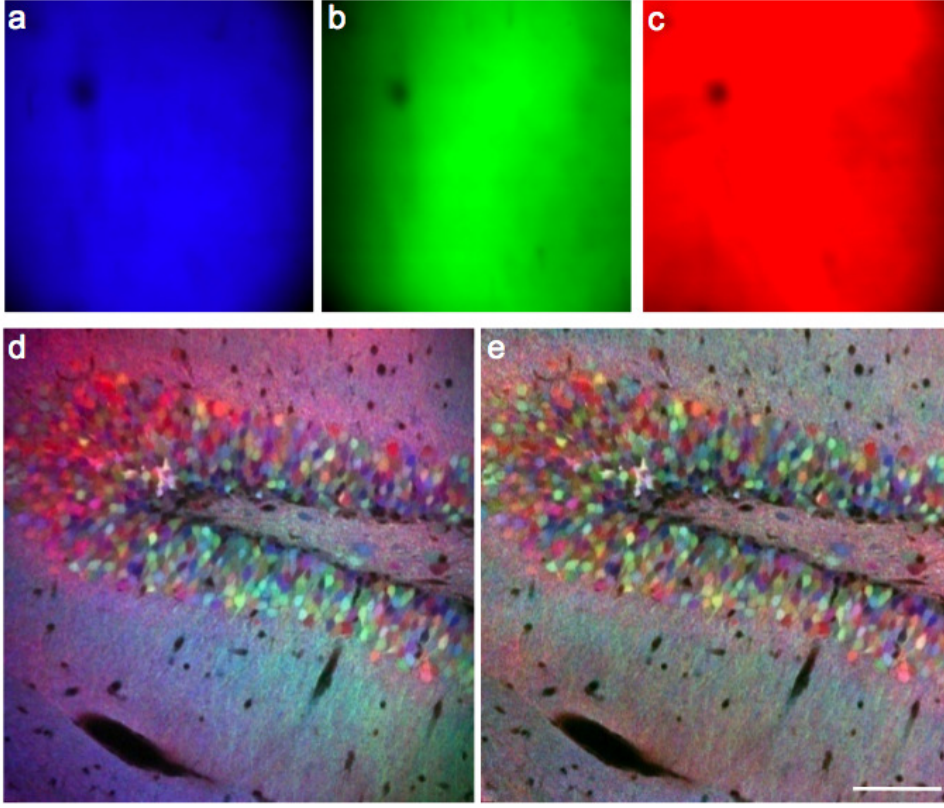


Figure 2.14: Homogénéisation du signal de fluorescence sur le champ de vue à partir des réponses mesurées pour chacun des canaux spectraux. (a-c) Réponses des différents canaux de détection pour un échantillon fluorescent homogène. (d,e) Composite des trois images de fluorescence avec (d) et sans (e) corriger par les réponses spectrales mesurées. Temps par pixel $5 \mu\text{s}$, barre d'échelle $100 \mu\text{m}$.

Validation des stratégies sur des tissus de cortex : Nous avons combiné les méthodes d'acquisition décrites dans les paragraphes précédents (augmentation de la puissance avec la profondeur, acquisition de mosaïques, et calibration du signal de fluorescence en fonction de la position dans le champ de vue) et appliqué notre méthode à l'observation de grands volumes de cortex de souris avec marquage Brainbow. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 2.15(a)**. Le volume total imagé (composé de six piles d'images) s'étend sur $900 \times 720 \times 370 \mu\text{m}^3$ et les corps cellulaires ont été détectés automatiquement dans l'ensemble du volume à l'aide du logiciel Imaris (Bitplane) (**Figure 2.15(b)**). En comparant graphiquement le poids des signaux de fluorescence relatif défini comme $C_{R,G,B} = (I_{R,G,B} - I_{\text{Min},R,G,B}) / (I_R + I_G + I_B)$ on note que la répartition des signaux est inchangée avec la profondeur **Figure 2.15(c)**, ce qui valide notre stratégie d'acquisition

et de normalisation des signaux.

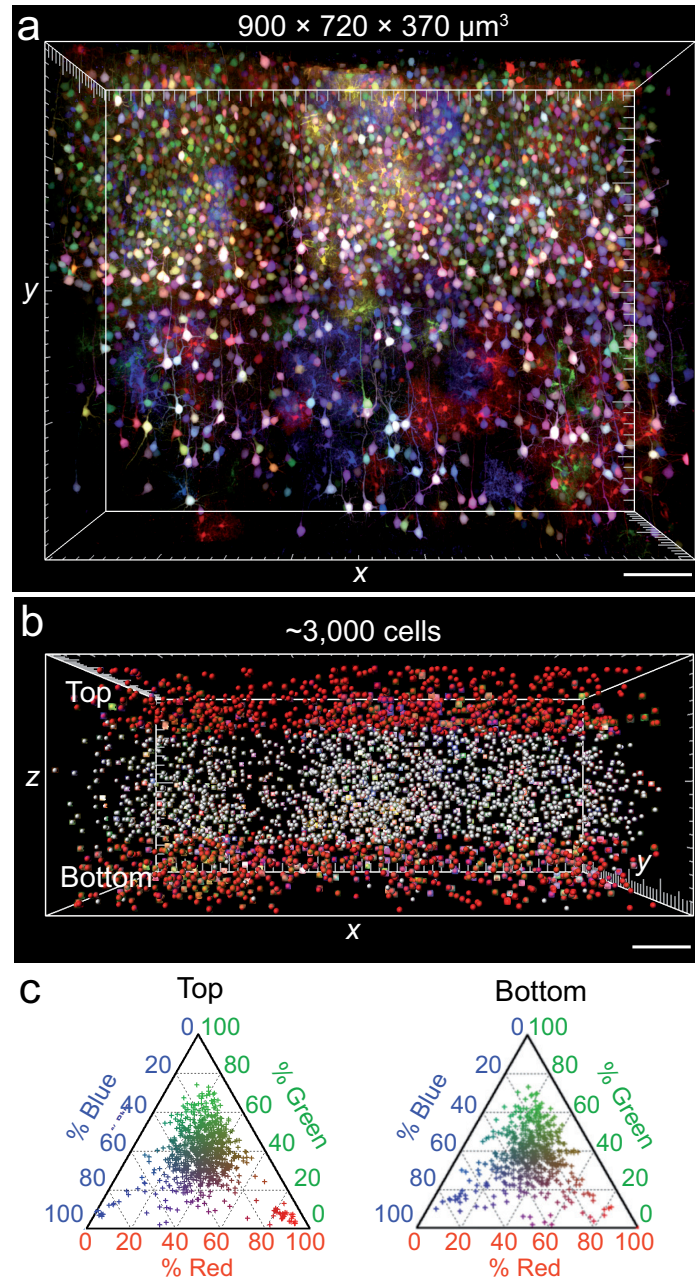


Figure 2.15: Validation de la stratégie d'acquisition sur de grands volumes. (a) Composites d'images des fluorescences reconstruites à partir de six piles différentes. Le volume total est de $900 \times 720 \times 370 \mu\text{m}^3$. (b) Corps cellulaires détectés sur l'ensemble du volume. (c) Proportions relatives des signaux de fluorescence mesurés sur les corps cellulaires des régions superficielle et profonde de l'échantillon, correspondant aux zones rouges dans (b). Temps par pixel $5 \mu\text{s}$, barre d'échelle $100 \mu\text{m}$.

2.4 Applications à l'imagerie de tissus Brainbow

2.4.1 Le marquage Brainbow

Brainbow désigne une méthode pour laquelle les neurones du cerveau sont marqués individuellement par un groupe de protéines fluorescentes permettant de les distinguer de leurs voisins à l'aide d'un critère colorimétrique. Chaque neurone exprime un même ensemble de protéines fluorescentes (par exemple une protéine bleue, une verte et une rouge), mais dans des proportions différentes, ce qui permet de lui associer une couleur distinctive dans un espace colorimétrique.

Plus spécifiquement, ces méthodes de marquage nécessitent (i) de pouvoir exprimer plusieurs protéines fluorescentes et (ii) de pouvoir exprimer chacune des protéines de façon indépendante. Pour une revue voir les références [154, 155, 156].

De nombreux schémas ont été proposés pour exprimer dans les tissus plusieurs rapporteurs de façon exclusive et stochastique. Ces schémas reposent généralement sur l'utilisation de systèmes contrôlant la recombinaison de segments de chromosomes [157]. Le processus de recombinaison est catalysé par une enzyme (*Cre recombinase* ou autre) et se fait sur un segment d'ADN situé entre deux sites de reconnaissance (séquence de 34 nucléotides appelée *lox*). Suivant la configuration des sites de reconnaissance, la réaction peut aboutir à l'excision ou à l'inversion du brin d'ADN situé entre les deux sites. Cette stratégie a tout d'abord été utilisée pour l'expression exclusive et stochastique d'un [158, 159, 160, 161, 162, 163] ou deux rapporteurs [164, 165, 166, 167, 168]. D'autre part, dans le cas où l'on souhaite exprimer plus de deux rapporteurs comme dans le cas des marquages Brainbow que nous avons utilisés, il est également possible d'utiliser plusieurs paires de sites de reconnaissance [89, 169, 90, 170, 171, 172]. Ainsi, un événement de recombinaison peut conduire de manière aléatoire à plusieurs événements se traduisant chacun par l'expression d'un rapporteur différent. Par exemple, pour un seul transgène muni de trois rapporteurs (CFP, YFP et RFP) que l'on a placé entre trois paires de sites de reconnaissance, la recombinaison peut aboutir à quatre résultats : trois excisions conduisant chacune à l'expression d'une des protéines fluorescentes (CFP, YFP et RFP), ainsi qu'aucune excision (**Figure 2.16(a)**). Si une seule copie de ce transgène est exprimée seule trois couleurs seront visibles (expression exclusives des protéines).

Pour augmenter le nombre de couleurs disponibles, il est également possible d'utiliser plusieurs copies indépendantes du même transgène ce qui permet d'exprimer

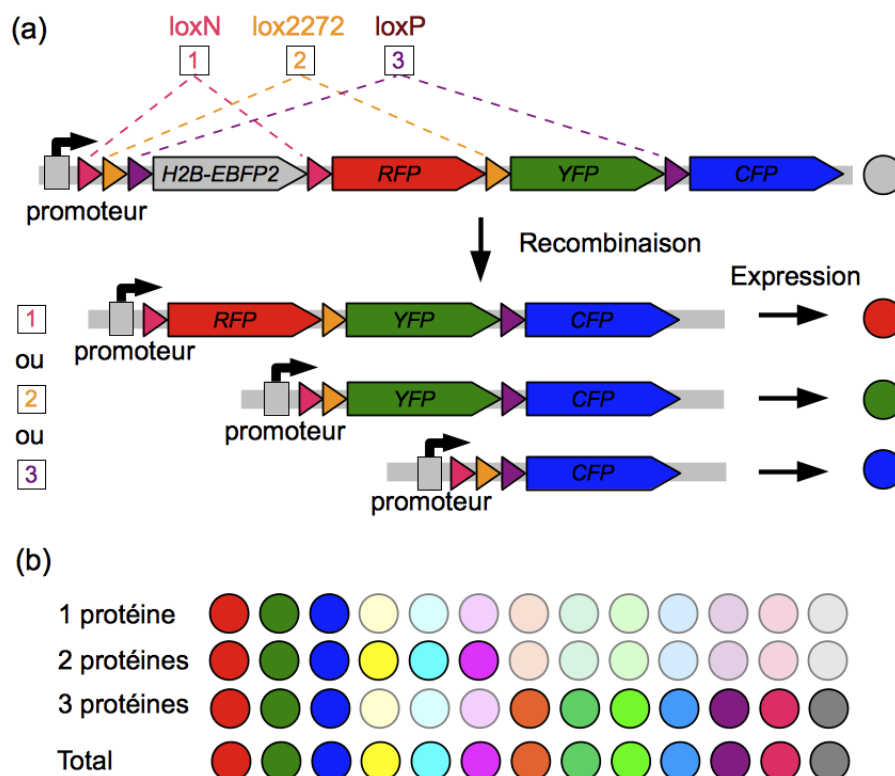


Figure 2.16: Principe du marquage Brainbow. (a) Transgène du marquage Brainbow codant pour trois protéines fluorescentes (RFP, YFP et CFP) et résultats des recombinaisons. Seule la protéine placée directement après le promoteur est exprimée, ce qui conduit à l'expression exclusive de l'une des trois protéines. (b) En présence de trois copies du même transgène, treize couleurs distinctes peuvent être observées. Les trois couleurs primaires proviennent des expressions exclusives ou redondantes des transgènes, les trois couleurs secondaires proviennent de l'expression combinée de deux protéines différentes et enfin les sept autres couleurs sont dues aux combinaisons à trois protéines.

les protéines de façon combinatoire. Par exemple, l'association de trois copies d'un transgène codant pour 3 protéines fluorescentes permet d'exprimer treize couleurs de façon stochastique, les couleurs provenant des combinaisons à une, deux ou trois protéines (**Figure 2.16(b)**). Cette stratégie a tout d'abord été développée en 2007 par Jean Livet au sein de l'équipe dirigée par Jeff W. Lichtman et Joshua R. Sanes. La première démonstration a été effectuée sur des souris [89] et la méthode a depuis été adaptée pour d'autres organismes modèles tels que la drosophile [170, 171], le poisson Zèbre [173], ou encore l'embryon de poulet [140]. Plusieurs applications ont été proposées pour cette méthode de marquage notamment pour l'étude de la

connectivité dans le cerveau, et du lignage cellulaire [89, 129, 170, 171, 90, 91].

Le système d'imagerie que nous avons décrit précédemment est particulièrement intéressant pour ce type d'application car en général trois protéines aux spectres d'excitation distincts sont exprimées par les cellules ((i)CFP, (ii)YFP, et (iii)une variante de la RFP). De plus, les images correspondant aux différents chromophores doivent être parfaitement alignées, ce qui est par principe le cas avec notre méthode d'excitation. Les méthodes de marquage ont été développées et appliquées aux tissus à l'Institut de la vision au sein de l'équipe dirigée par Jean Livet : Karine Loulier, Raphaëlle Barry et Katherine Matho, et à l'École Normale Supérieure par Xavier Morin. Les protéines fluorescentes exprimées par les transgènes Brainbow ont été choisies après concertation avec l'équipe de Jean Livet afin qu'elles puissent être excitées de façon optimale par notre système. Étant donnée l'accordabilité dont nous disposons, nous avons choisi comme protéines fluorescentes : (i)CFP, (ii)YFP, et (iii) tdTomato ou mCherry. Celles-ci peuvent être excitées de façon quasi-optimale pour des impulsions synchronisées de longueur d'onde centrale $\lambda_1 = 850$ nm et $\lambda_2 = 1100$ nm (**Figure 2.17(a)**), et peuvent être détectées sur trois canaux spectraux disjoints (**Figure 2.17(b)**).

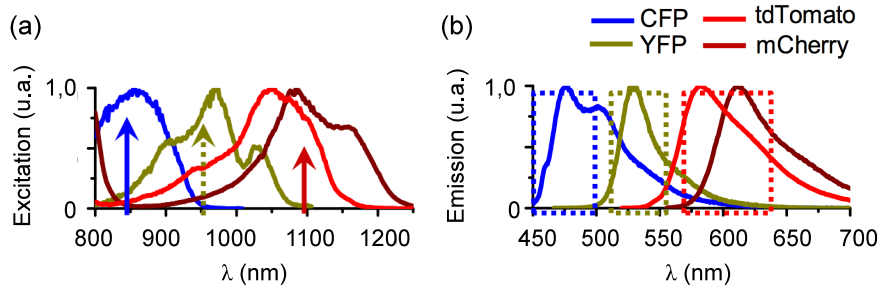


Figure 2.17: Spectre d'absorption à 2 photons et spectre d'émission des protéines fluorescentes encodées par les transgènes Brainbow.

2.4.2 Connectivité dans le cerveau

En neurosciences, un enjeu actuel est d'étudier les relations existant entre la structure et la fonction de circuits neuronaux du système nerveux central (cortex visuel, cortex auditif, etc.). Pour cela, plusieurs étapes sont nécessaires : (i) reconstruire le plan complet des connections entre les neurones formant le réseau étudié, (ii) visualiser comment le signal électrique se propage dans ce réseau suite à une

stimulation, et (iii) étudier comment le réseau évolue au cours du temps avec les stimulations perçues. Cependant, il n'existe pas encore d'approche permettant de répondre de façon satisfaisante à ces problématiques. Nous verrons que l'utilisation de stratégies de marquage multicolore combinées à la microscopie optique non linéaire offre la possibilité de reconstruire le connectome d'une sous partie du cerveau, ce qui correspond à la première problématique.

Travaux antérieurs : Trois approches ont été utilisées pour reconstruire les réseaux neuronaux : (i) la technique d'imprégnation argentique, (ii) la microscopie électronique, et (iii) les méthodes de marquage reposant sur la microscopie de fluorescence.

La méthode d'imprégnation argentique a été la première utilisée en particulier dans les travaux de Ramon y Cajal (1852-1934) et elle reste celle qui a le plus contribué au domaine. Cette méthode utilise la coloration de Golgi (1843–1926) pour marquer toutes les ramifications d'un nombre restreint de neurones, ce qui permet de les contraster par rapport à leur environnement et donc de visualiser clairement leur morphologie. Cet outil a permis à Cajal d'identifier les différents types de neurones, mais également de comprendre la façon dont ils s'organisent, fondant ainsi les bases de la théorie neurale sur laquelle repose notre compréhension des réseaux neuronaux [174]. Cependant, cette approche possède plusieurs inconvénients : tous les axones, dendrites et surtout les connexions ne peuvent être distingués à cause de la limite de résolution optique, et la méthode repose sur l'analyse d'un nombre éparé de données ne reflétant pas forcément l'ensemble du réseau neuronal.

Pour pallier aux problèmes de résolution optique, plusieurs études ont abordé la reconstruction de connectomes à l'aide de la microscopie électronique. Les premiers travaux ont permis de reconstruire des petites structures telles que le connectome du lobe optique du crustacé *Daphnia* [175, 176, 177], ou encore celui du nématode *Caenorhabditis Elegans* [178, 179, 180]. L'automatisation des approches d'imagerie [181, 182, 183] a par la suite permis de reconstruire de plus grandes structures telles qu'une partie des connexions de la rétine et du cortex visuel de la souris [184, 185]. Cependant, la microscopie électronique possède plusieurs inconvénients : malgré l'automatisation, les temps d'imagerie s'étendent sur plusieurs mois pour des volumes couvrant par exemple $450 \times 350 \times 52 \mu\text{m}^3$ [185], elle ne peut imager des échantillons vivants, et l'absence de marqueurs identifiant les neurones dans les séries de coupes empêche de vérifier l'exactitude du tracé du réseau [184, 185].

Pour permettre l'étude du connectome sur de grands volumes, plusieurs approches reposant sur l'utilisation de marqueurs combinée à la microscopie photonique sont apparues. Si les premiers traceurs étaient injectés physiquement, l'avènement des marqueurs génétiques a permis de cibler plus facilement et spécifiquement des régions d'intérêt. Cependant, l'utilisation d'un nombre limité de marqueurs exprimés de façon exclusive ne permet pas de reconstruire les connexions d'un réseau lorsque celui-ci devient trop compliqué, car trop peu de critères distinctifs sont accessibles. Pour maximiser ce nombre de critères, il est néanmoins possible d'utiliser les marqueurs de façon combinatoire comme cela est le cas pour les marquages Brainbow [89, 129]. Potentiellement, ce type d'approche peut être utilisé pour reconstruire le connectome de réseaux denses [89, 129, 170, 171]. Cependant, le développement des applications a été freiné à cause du manque de méthodes d'imagerie permettant de cartographier de grands volumes multicolore avec des résolutions cellulaires.

Approche utilisée : En vue de reconstruire le connectome de sous-réseaux neuronaux chez les vertébrés, nous avons donc choisi de combiner des approches de marquage Brainbow avec l'imagerie multicolore à deux photons. Comme nous l'avons vu, ces stratégies sont complémentaires : le marquage multicolore combinatoire permet de s'affranchir de la complexité intrinsèque des tissus étudiés, alors que la microscopie à deux photons offre la possibilité d'imager jusqu'à des profondeurs importantes sans dégrader les tissus, avec une résolution cellulaire et un bon contraste. Pour vérifier cela, nous avons commencé par imager des neurones pyramidaux situés dans les couches I à III d'une coupe de cortex cérébral d'une souris au stade de développement post-natal 28 (**Figure 2.18**). À ce stade les dendrites apicales et basales peuvent s'étendre sur plusieurs millimètres [186] ce qui justifie le choix de techniques d'imagerie adaptées à de grands volumes.

Les tissus ont été marqués par électroporation par Karine Loulier à l'Institut de la Vision. Les résultats visibles sur la **Figure 2.19** proviennent de quatre piles d'images contenant chacune 170 plans espacés de $1,0\,\mu\text{m}$ que l'on a assemblées a posteriori. L'ensemble représente un volume de $1\,450 \times 430 \times 170\,\mu\text{m}^3$ qui a été enregistré en 144 min avec un temps de $5\,\mu\text{s}$ par pixel en moyennant deux fois chaque image. Les dendrites des neurones pyramidaux marqués s'étendent sur l'ensemble du volume cartographié et peuvent être suivis visuellement grâce à leur couleur malgré la densité du réseau. Des efforts de traçage effectués sur ces données (Katherine Matho) montrent cependant que des algorithmes adaptés restent à concevoir

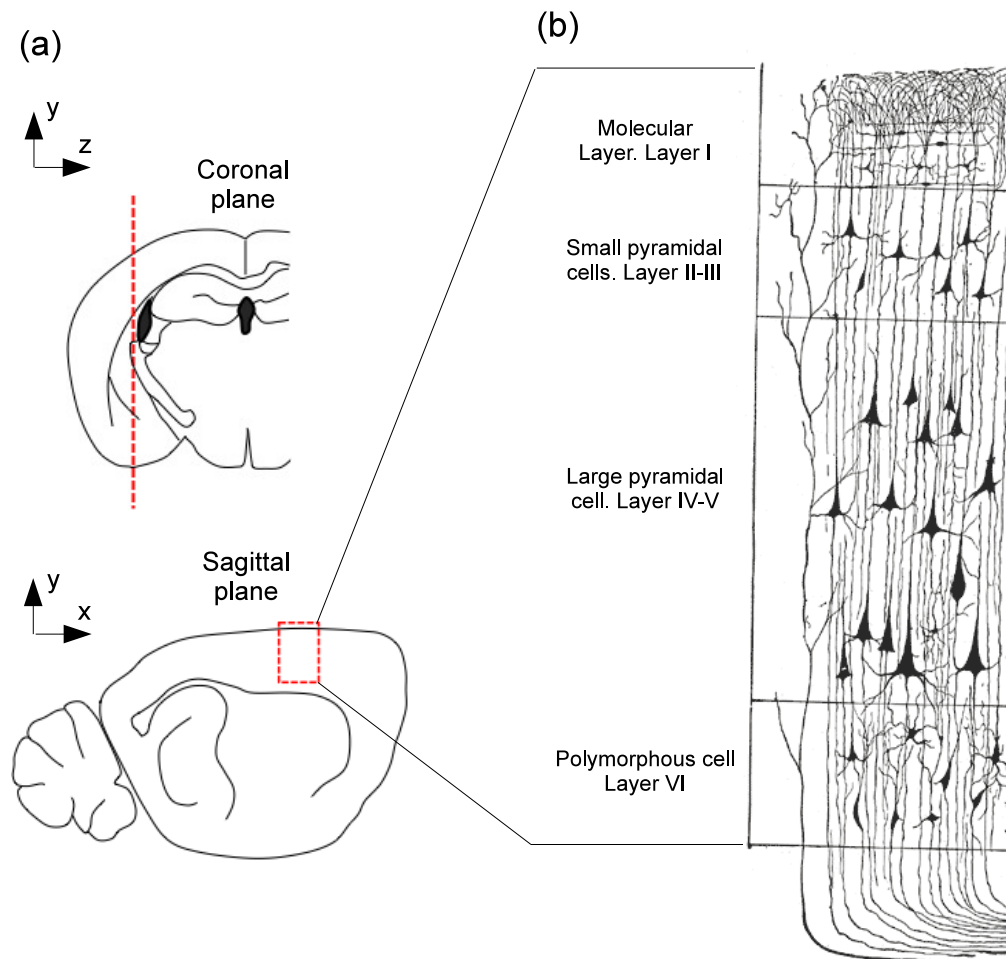


Figure 2.18: (a) Schéma représentant des coupes coronale et sagittale du cerveau de la souris. La structure que nous avons observée est le néocortex et elle correspond à la couche externe des hémisphères cérébraux (rectangle rouge). (b) Lithographie représentant la structure du néocortex chez le mammifère. On distingue six couches, la première étant la plus externe et la dernière la plus profonde. Dessin de Ramon y Cajal.

pour segmenter de façon automatique l'ensemble des dendrites pour chaque neurone pyramidal, même si des reconstructions assistées peuvent être obtenues sur des petites zones **Figure 2.19(a,b)**. De plus, nous avons également pu constater que si la résolution optique est suffisante pour tracer les dendrites proximales des neurones, elle ne permet pas de suivre sans ambiguïté l'ensemble des terminaisons axonales dans le cortex.

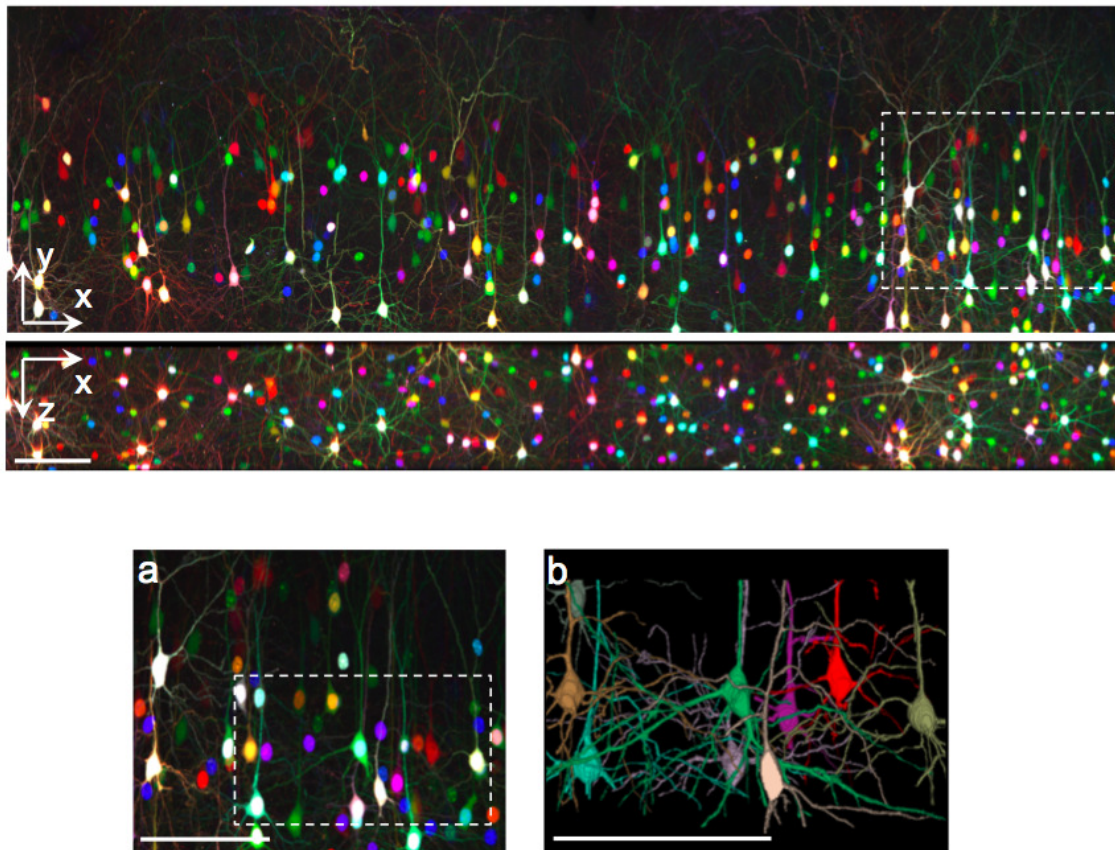


Figure 2.19: Neurones pyramidaux des couches I à III du cortex cérébral d'une souris. Seul un nombre restreint de neurones expriment les rapporteurs des transgènes Brainbow ce qui se traduit par un marquage épars. (a) Zoom extrait du volume cartographié. (b) Exemple de reconstruction manuelle obtenue à partir des données (Katherine Matho). Temps d'acquisition par pixel $5 \mu s$, barre d'échelle $100 \mu m$.

Exemple d'application : Dans un deuxième temps, nous avons travaillé en collaboration avec l'équipe de Jean Livet sur l'imagerie d'un réseau plus adapté aux approches optiques : le complexe olivaire supérieur, qui est un relai auditif localisé dans le tronc cérébral et organisé de façon tonotopique. On distingue principale-

ment trois noyaux différents : l'olive supérieure médiane (MSO), l'olive supérieure latérale (LSO), et le noyau médian du corps trapézoïde (MNTB) (**Figure 2.20**). Ceux-ci sont organisés de façon symétrique et sont étroitement impliqués dans la localisation azimuthale des sons. Les neurones du MSO sont sensibles aux décalages temporels entre les signaux synaptiques provenant des deux oreilles, alors que les neurones du LSO sont sensibles aux différences d'intensité. Dans les deux cas les deux MNTB interviennent dans la localisation des sons car ils fournissent des signaux inhibiteurs aux MSO et LSO en réponse aux signaux perçus par l'oreille opposée (**Figure 2.20**). La projection du noyau cochléaire (CN) sur le MNTB est tout particulièrement adaptée aux microscopies optiques car elle forme des synapses géantes appelées calice de Held [187].

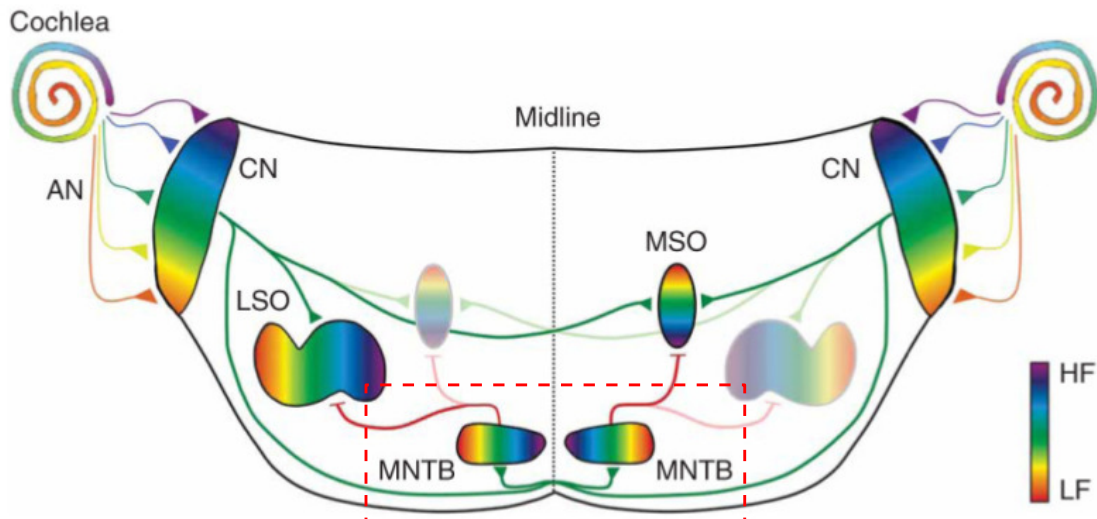


Figure 2.20: Complexe olivaire supérieur. Celui-ci est organisé de façon tonotopique et est formé de trois noyaux intervenant dans la localisation azimuthale des sons : l'olive supérieure médiane (MSO), l'olive supérieure latérale (LSO), et le noyau médian du corps trapézoïde (MNTB). Ces noyaux reçoivent tous les trois des signaux synaptiques provenant de la cochlée par l'intermédiaire des nerfs auditifs et des noyaux cochléaires. Adapté de [188].

Très peu d'études ont pu jusqu'alors fournir des modèles à partir de reconstruction globale des connexions d'un circuit neuronal. De telles données sont nécessaires pour mieux comprendre l'intrication des différents noyaux du circuit auditif, mais nécessitent de pouvoir imager les différents noyaux entièrement avec une résolution cellulaire et un bon contraste. Nous avons essayé de cartographier les MNTB gauche et droite avec une résolution à l'échelle cellulaire. Ces expériences ont été faites sur

des tissus fixés de souris Thy1-Brainbow1.0 possédant un marquage multicolore dans les projections calicéales (du CN vers le MNTB contralatéral). Les résultats que nous avons obtenus sont visibles sur la **Figure 2.21**. La carte illustrant la structure globale des deux MNTB au sein du complexe olivaire supérieur est issue d'une reconstruction de cinq piles d'images contenant chacune 120 plans espacés de $1,0\ \mu\text{m}$ que l'on a assemblés a posteriori (**Figure 2.21(a)**). Les deux noyaux ainsi que les calices provenant des noyaux cochléaires sont visibles grâce au marquage. L'ensemble représente un volume de $3\,400 \times 790 \times 120\ \mu\text{m}^3$ enregistré en 150 min avec un temps de $5\ \mu\text{s}$ par pixel en moyennant deux fois chaque image.

Malgré ces résultats encourageants, les profondeurs d'imagerie que l'on peut atteindre ne sont pas suffisantes pour reconstruire les connexions sur l'ensemble des deux MNTB. Les dimensions du MNTB sont généralement de l'ordre de : $200\text{-}250\ \mu\text{m}$ suivant l'axe dorsoventral ; $500\text{-}700\ \mu\text{m}$ suivant l'axe médiolateral ; et $1000\text{-}1200\ \mu\text{m}$ suivant l'axe rostrocaudal. Ainsi en coupant les tissus suivant l'axe dorsoventral il apparaît nécessaire de disposer d'une qualité d'imagerie non dégradée sur au moins $200\text{-}250\ \mu\text{m}$. En pratique, nous avons constaté que la résolution se dégradait de façon visible sur une centaine de micromètres (**Figure 2.21(b)**), ce qui laisse à penser que la profondeur d'imagerie dont on dispose n'est pas encore suffisante. Nous explorons actuellement plusieurs solutions pour continuer ce projet : (i) mettre au point des algorithmes de segmentation robustes des données, (ii) imager les tissus suivant deux côtés de façon à pouvoir cartographier une épaisseur de $200\ \mu\text{m}$ avec une bonne résolution, (iii) restaurer la qualité des images à l'aide de stratégies de correction des aberrations, ou (iv) adapter des méthodes de *block face imaging* pour lesquelles le tissu est imagé puis coupé en série afin de cartographier des profondeurs toujours inférieures à la profondeur de pénétration.

2.4.3 Lignage et étude clonale

En neurosciences, un autre domaine d'étude à l'interface avec la biologie du développement consiste à comprendre comment les différentes régions du système nerveux central se forment. Pour cela il est nécessaire de pouvoir observer directement ou indirectement les processus de divisions cellulaires, de différenciation et de réorganisation des tissus à l'échelle cellulaire, de manière à pouvoir reconstituer le lignage cellulaire, c'est à dire relier chacune des cellules à ses progénitrices. Si la reconstruction du lignage d'organismes simples et transparents tels que le

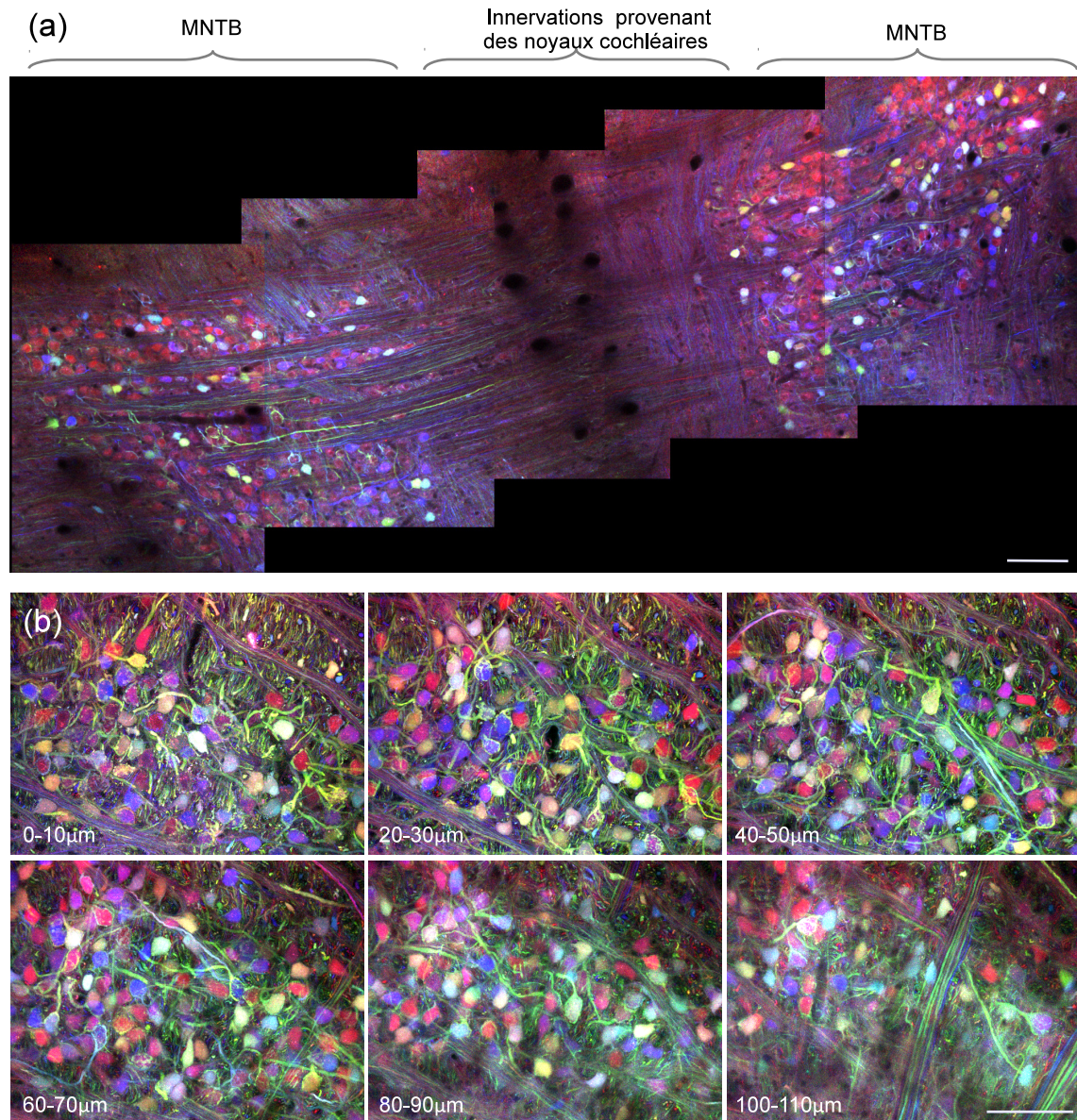


Figure 2.21: Noyaux médians du corps trapézoïde au sein du complexe olivaire supérieur marqués à l'aide de rapporteurs exprimés par les transgènes Brainbow. (a) Carte illustrant la structure globale des deux MNTB au sein du complexe olivaire supérieur. La carte est issue d'une reconstruction de cinq piles d'images contenant chacune 120 plans espacés de $1,0\mu\text{m}$. Les deux noyaux sont visibles de part et d'autre de la ligne médiane et au milieu on peut observer des axones reliant les noyaux cochléaires aux deux noyaux. (b) Contraste obtenu sur un noyau en fonction de la profondeur d'imagerie. Ces images ont été enregistrées sur un échantillon différent. Temps d'acquisition par pixel $5\mu\text{s}$, barre d'échelle $100\mu\text{m}$.

nématode *Caenorhabditis Elegans*, ou encore la plante marine *Ciona Intestinalis* a pu être réalisée par microscopie conventionnelle [189, 190], l'étude du développement des vertébrés nécessite des méthodes permettant de différencier et suivre un grand nombre de cellules au cours du temps. En marquant individuellement quelques cellules d'un embryon et en les suivant pendant plusieurs heures à l'aide de méthodes de microscopie de fluorescence, plusieurs études ont pu reconstituer des phases de l'organogenèse chez le medaka [191, 192], ou les premiers cycles de divisions cellulaires chez le poisson zébré [193]. Dans le cas de tissus opaques, épais et optiquement peu accessible, il faut en revanche se tourner vers des méthodes indirectes utilisant des rapporteurs du lignage cellulaire. Par exemple, une approche utilisant plusieurs rapporteurs exprimés par un même transgène a permis de suivre l'évolution d'un nombre restreint de clones au sein des cryptes des intestins [90]. C'est le type d'approche vers lequel nous nous sommes tournés en vue de mettre au point une méthode d'étude du développement du système nerveux central chez les vertébrés.

Discernabilité des clones : Afin de vérifier que la méthode d'imagerie permet d'identifier plusieurs clones parmi une population de cellules nous avons d'abord considéré des échantillons fixés avec peu de couleurs différentes. Plus particulièrement, nous nous sommes intéressés à des cellules possédant deux transgènes indépendants pouvant exprimer chacun trois rapporteurs (CFP, YFP, mCherry). Ainsi sur un volume suffisamment important on peut s'attendre à visualiser six clones différents correspondant aux combinaisons à un et deux rapporteurs. Pour le vérifier, nous avons cartographié un tissu de cortex de souris sur un volume de $900 \times 720 \times 370 \mu\text{m}^3$ (**Figure 2.22(a)**). Dans le volume imagé deux types de cellules sont visibles : des astrocytes et des neurones pyramidaux. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux astrocytes car eux seuls étaient marqués par un à deux transgènes intégratifs exprimant chacun trois rapporteurs. L'ensemble des astrocytes a été segmenté par Willy Supatto en utilisant Imaris, un logiciel de traitement d'images interfacé avec Matlab (**Figure 2.22(b)**). A partir des données segmentées, nous avons calculé pour chaque cellule le poids des signaux de fluorescence relatifs définis comme :

$$C_{R,G,B} = I_{\text{Norm},R,G,B} / (I_{\text{Norm},R} + I_{\text{Norm},G} + I_{\text{Norm},B}) \quad (2.2)$$

où $I_{\text{Norm},R,G,B}$ est l'intensité normalisée dans chaque canal définie par $I_{\text{Norm},R,G,B} = (I_{R,G,B} - I_{\text{Min},R,G,B}) / (I_{\text{Max},R,G,B} - I_{\text{Min},R,G,B})$. Nous avons représentés ces mesures

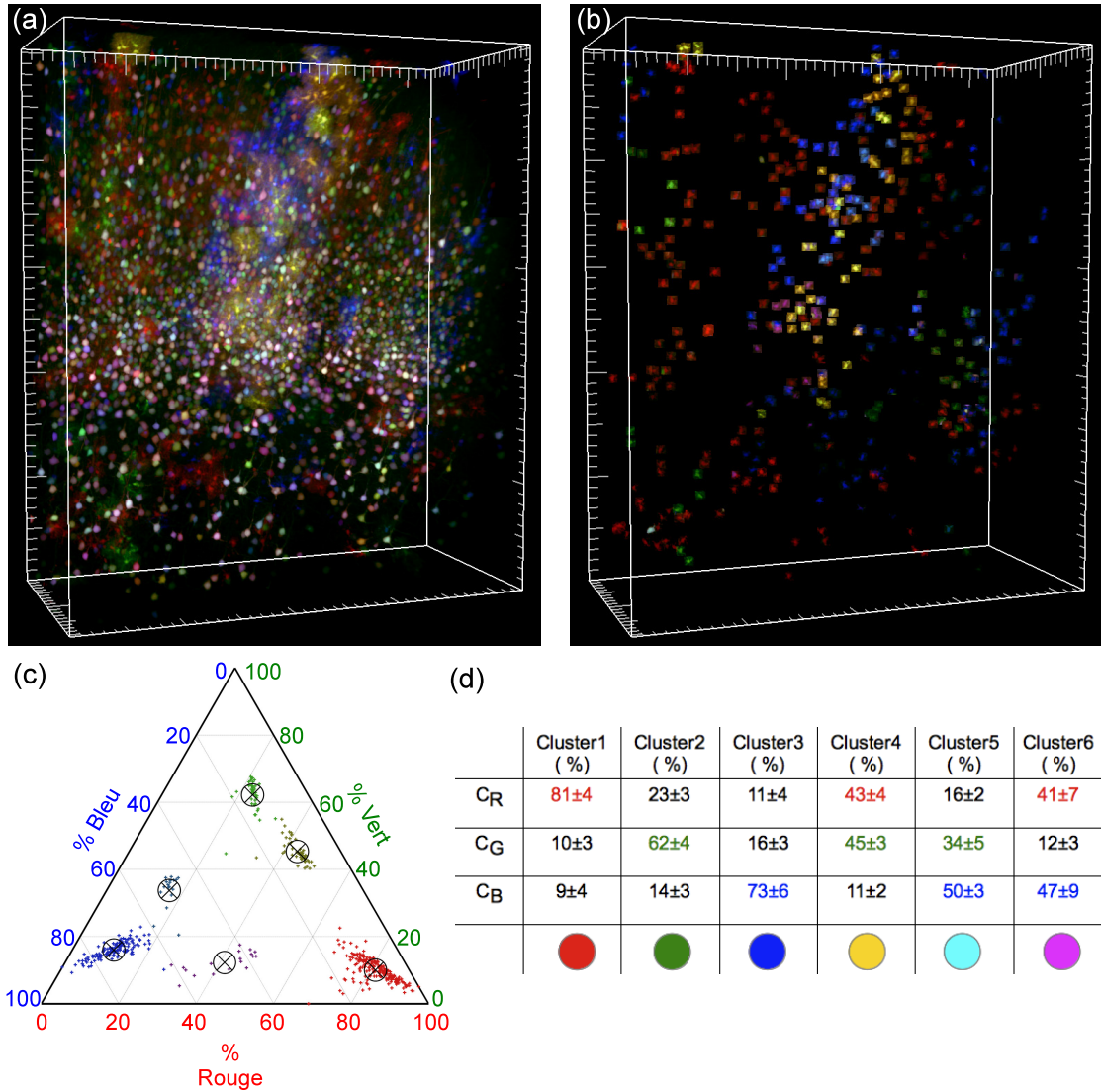


Figure 2.22: Discernabilité des clones. (a) Composites d'images de fluorescence reconstruites à partir de six piles différentes. Le volume total est de $900 \times 720 \times 370 \mu\text{m}^3$. (b) Astrocytes segmentés au sein du volume imagé. Les couleurs observées indiquent que chaque cellule possède un à deux transgènes indépendants codant pour trois protéines fluorescentes. On peut donc s'attendre à visualiser jusqu'à six clones au sein de cette population de cellules. (c) Diagramme ternaire des astrocytes détectés segmentés sur l'ensemble du volume. Six agrégats peuvent être identifiés à partir d'un algorithme de partitionnement de données type K-Means (Matlab). (d) Coordonnées ternaires des clones ainsi que leur extension à $\pm\sigma$.

sur un graphique ternaire (**Figure 2.22(c)**). Les points situés aux sommets du graphique ternaire représentent les cellules exprimant exclusivement une protéine, alors

que les points situés aux milieux des arêtes sont des cellules exprimant conjointement deux protéines. En pratique, nous trouvons que les cellules exprimant une seule protéine fluorescente ne sont pas tout à fait localisées aux sommets du graphique. Cela, est dû au mélange des signaux de fluorescence à la détection (**Figure 2.22(d)**). Cependant, à l'aide d'une telle représentation nous retrouvons bien six clones différents correspondant à l'expression de deux transgènes possédant chacun trois rapporteurs. D'autre part, à partir de l'extension moyenne des différents agrégats $\sigma_{\text{Moyen}} = 4\%$ nous avons pu estimer le nombre de clones qu'il serait possible d'identifier sans ambiguïtés à l'aide d'un tel système. Ce nombre est en fait donné par le rapport entre la surface moyenne d'un clone (triangle équilatéral de côté $6\sigma_{\text{Moyen}}$) et la surface totale du diagramme ternaire (triangle équilatéral de côté $C = 100\%$) soit
$$N_{\text{Clone}} = \frac{1/2 C^2 \sin \alpha}{1/2 (6\sigma_{\text{Moyen}})^2 \sin \alpha} \simeq 16 \text{ clones.}$$
 L'estimation donnée est bien évidemment une limite haute, car dans le cas où les signaux se recouvrent à la détection la surface totale occupée devient alors inférieur à $1/2 C^2 \sin \alpha$.

Application à l'imagerie de moelle épinière d'embryon de poulet : Enfin nous avons vérifié que notre système d'imagerie multicolore pouvait être utilisé pour des études longitudinales du développement de tissus embryonnaires dynamiques. Pour cela nous avons observé le développement de tranches épaisses de moelles épinières d'embryon de poulet entre les stades d'Hamburger et Hamilton 18 et 26 ce qui correspond à des stades embryonnaires compris entre trois et cinq jours après la ponte. Le marquage a été effectué par Xavier Morin (IB-ENS) par électroporation de transgènes Brainbow dans le tube neural. Les moelles que nous avons regardées étaient marquées de façon éparse et seulement d'un côté de la ligne médiane, si bien que nous avons pu observer la croissance axonale des neurones commissuraux et des motoneurones pour les stades considérés (**Figure 2.23**). Les neurones commissuraux ont la particularité de changer brusquement leur direction de croissance après avoir traversé la ligne médiane du tube neural entre les stades 22 et 24. Au même stade, les motoneurones étendent leurs axones hors de la moelle épinière en direction des muscles squelettiques, formant ainsi la racine ventrale des nerfs spinaux. Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 2.24**. La représentation de la demi-moelle marquée a été reconstruite à partir d'une pile de 120 images espacées chacune de $2,0 \mu\text{m}$. Sur cette représentation on peut bien observer les axones des neurones commissuraux ayant traversé la ligne médiane du tube neural (partie gauche) ainsi

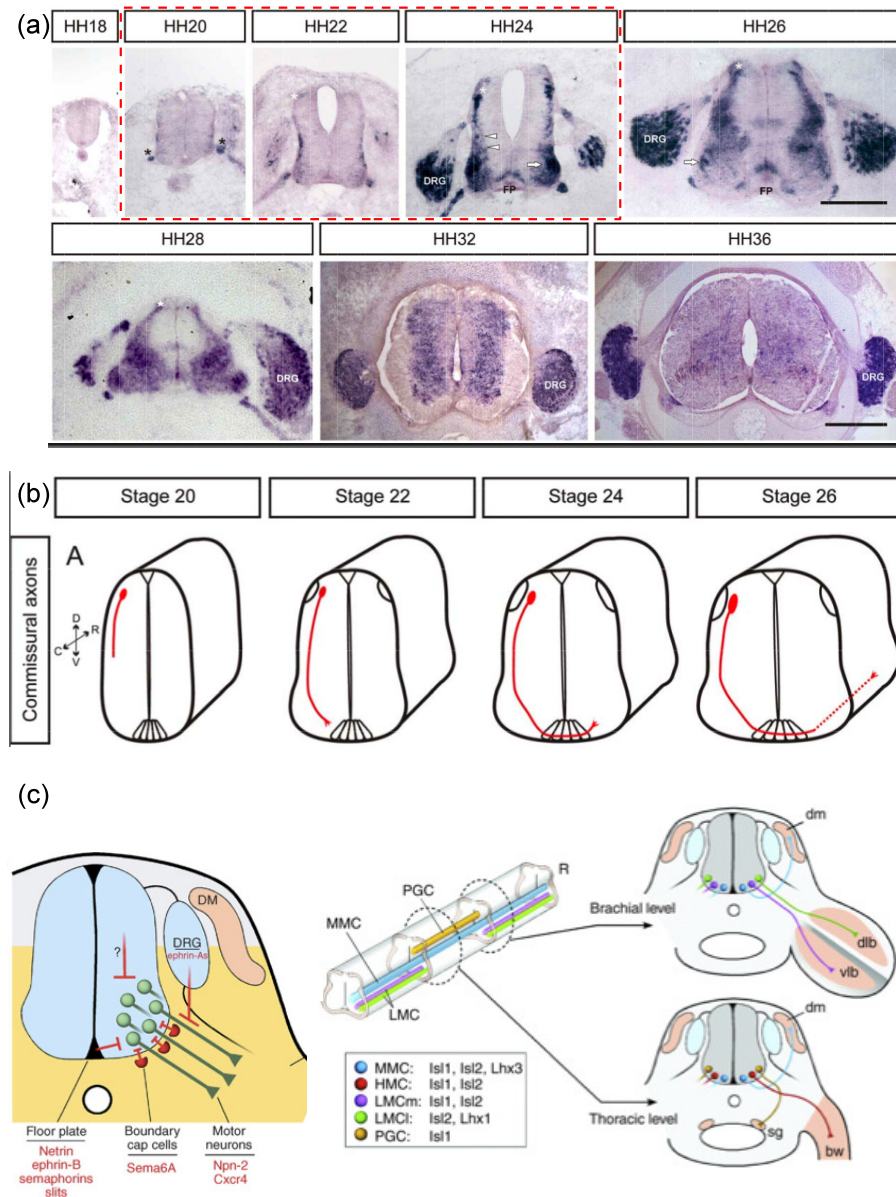


Figure 2.23: (a) Coupes histologiques de moelles épiinières de poulet pour des stades de Hamburger Hamilton compris entre 18 et 36. (b) Trajectoire suivie par les axones des neurones commissuraux au cours du développement embryonnaire. Entre les stades 22 et 24 les axones des neurones commissuraux traversent la ligne médiane du tube neural pour changer brusquement de direction suite à la sécrétion par le tube neural ventral de molécules à effet répulsif. (c) Trajectoire suivie par les axones des motoneurones. Aux mêmes stades ceux-ci envoient leurs axones vers les muscles squelettiques. Adapté de [194, 195].

que les axones des motoneurones (partie droite). Au cours de leur croissance, les cônes de croissance des axones sont particulièrement dynamiques. Cet exemple souligne l'intérêt de notre approche pour imager des tissus biologiques multicolore à des vitesses d'imagerie ne pouvant être obtenues à l'aide de systèmes séquentiels : les cônes de croissance ayant une dynamique rapide pour un système séquentiel, les différents canaux ne pourraient pas être superposés et l'information colorimétrique propre au marquage Brainbow serait alors perdue.

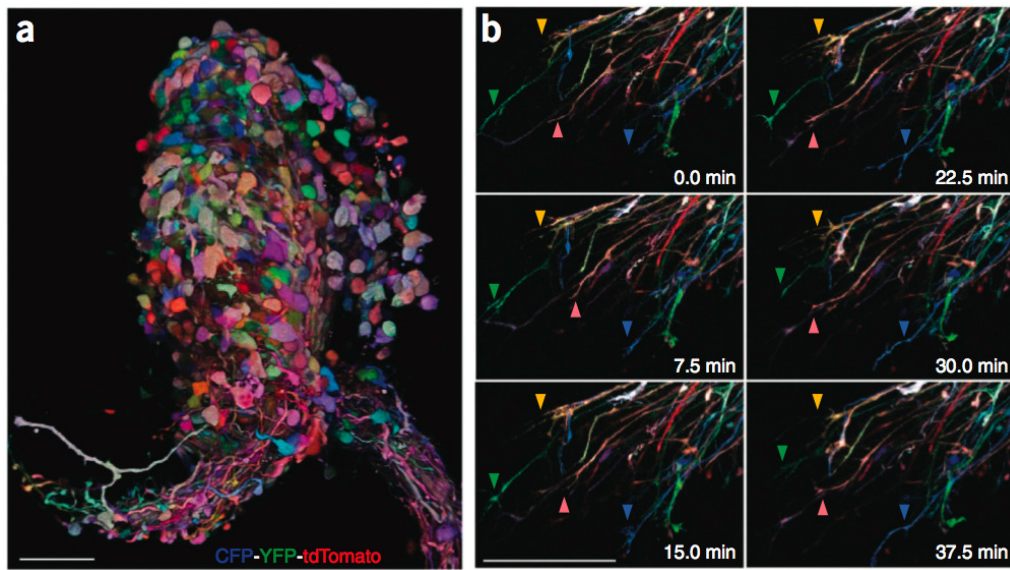


Figure 2.24: Imagerie multicolore de moelle épinière d'embryon de poulet mise en culture. (a) Représentation tri-dimensionnelle d'une demie moelle exprimant les rapporteurs des transgènes Brainbow. On peut observer les neurones commissuraux ayant traversé la ligne médiane du tube neural (partie gauche) ainsi que les motoneurones (partie droite). (b) Motoneurones d'un autre échantillon au cours de leur croissance. Ces représentations sont des projections maximales de piles d'images enregistrées continûment. Adapté de [140].

2.4.4 Étude du photo-blanchiment en multicolore

Nous concluons cette partie par une étude préliminaire du photo-blanchiment en excitation à une et deux couleurs.

Étude du photo-blanchiment d'une protéine rouge : Les protéines fluorescentes rouges sont usuellement excitées par des longueurs d'onde du proche infra-rouge comprises entre 1000 et 1300 nm [78, 80]. Cependant le spectre d'absorption

à deux photons de certaines protéines possède également des pics d'absorption pour des longueurs d'onde plus énergétiques comprises entre 600 et 800 nm (mKamala et TagRFP par exemple) [78, 80]. Des schémas d'excitation simultanée avec des protéines bleues ont ainsi été proposés [130, 131, 79], mais il a été observé que le photo blanchiment des protéines rouges est plus important dans ces conditions que lors d'une excitation à 1 000–1 300 nm.

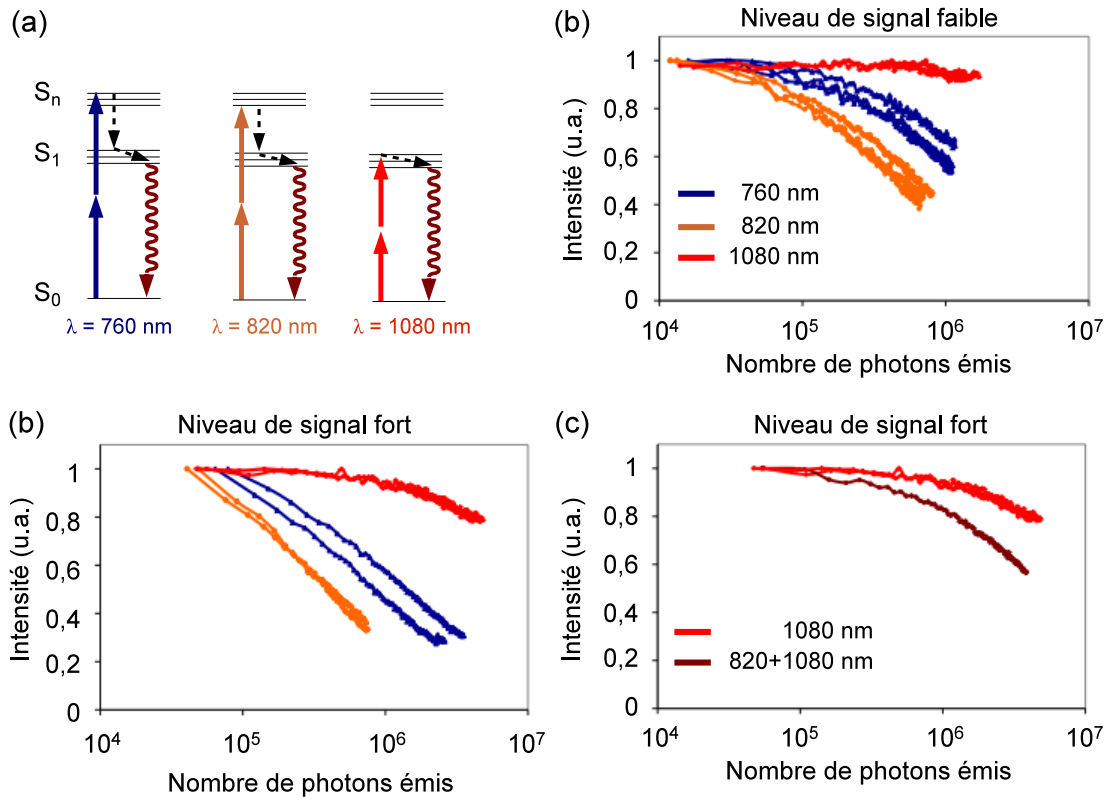


Figure 2.25: Comparaison des vitesses de photo-blanchiment de la mRFP en fonction de la longueur d'onde d'excitation. (a) Diagrammes énergétiques. Les longueurs d'onde d'excitation sont : $\lambda = 760$, $\lambda = 820$ et $\lambda = 1080$ nm. (b,c) Evolution des signaux de fluorescence mesurés pour un même nombre initial de photons détectés. Dans les deux cas le photo-blanchiment est plus rapide à $\lambda = 760$ et $\lambda = 820$ nm qu'à $\lambda = 1080$ nm. (d) Photo-blanchiment pour une excitation de la mRFP à $\lambda = 1080$ nm avec et sans une deuxième source à $\lambda = 820$ nm permettant d'exciter une protéine bleue.

Pour vérifier cela, nous avons comparé les taux de photo-blanchiment d'une protéine rouge mRFP possédant des pics d'absorption décalés dans le visible pour plusieurs longueurs d'onde d'excitation : $\lambda = 760$, $\lambda = 820$, et $\lambda = 1080$ nm et ceci pour un même signal de fluorescence initial. Les résultats obtenus sont présentés sur

la **Figure 2.25**. On constate que les vitesses de photo-blanchiment sont plus importantes pour des longueurs d'onde décalées vers le visible $\lambda = 760$, et $\lambda = 820$ nm que pour une longueur d'onde du proche infra-rouge $\lambda = 1080$ nm (**Figure 2.25(a-c)**).

Ces résultats ont plusieurs conséquences pour l'imagerie multicolore : (i) l'excitation simultanée de plusieurs protéines avec une longueur d'onde énergétique conduit à l'augmentation des vitesses de photo-blanchiment, (ii) l'excitation conjointe d'une protéine bleue peut conduire à un photo-blanchiment supplémentaire des protéines rouges et éventuellement vertes (**Figure 2.25(d)**). Les protéines bleues et rouges sont donc à choisir avec attention car une excitation parasite de la protéine rouge dans la bande bleue de son spectre d'excitation peut conduire à une augmentation des vitesses de photo-blanchiment.

Étude du photo-blanchiment d'une protéine verte : Nous avons également comparé le photo-blanchiment d'une GFP pour des processus d'excitation à 2 photons à 1 et 2 couleurs. Les longueurs d'onde utilisées étaient $\lambda = 925$ nm pour un processus d'excitation à 1 couleur et $\lambda_1 = 820$ nm et $\lambda_2 = 1080$ nm pour un processus d'excitation à 2 couleurs (**Figure 2.26(a)**). Les comparaisons ont été faites pour un niveau de signal initial similaire. Cependant pour la fluorescence à 2 couleurs le signal mesuré dépend des puissances d'excitation des deux faisceaux; afin de dégager des tendances, nous avons donc exploré deux cas différents pour la fluorescence à 2 couleurs : (i) cas où la puissance à $\lambda_1 = 820$ nm est faible et où la puissance à $\lambda_2 = 1080$ nm est élevée et (ii) cas où les puissances sont réparties de façon inverse. Les résultats sont présentés sur la **Figure 2.26(b)**. On peut constater que les vitesses de photo-blanchiment sont inchangées par rapport à une excitation monochromatique dans le cas où la puissance du faisceau à $\lambda = 1080$ nm est la plus élevée alors que le photo-blanchiment est plus rapide dans le cas inverse. Ce dernier résultat semble dû à une excitation résiduelle de la GFP à 1 couleur par la longueur d'onde la plus énergétique $\lambda_1 = 820$ nm. Cette situation est similaire à celle rencontrée dans le paragraphe précédent ; il n'est donc pas surprenant d'observer un photo-blanchiment plus important dans le cas où la puissance du faisceau de longueur d'onde la plus énergétique est la plus élevée.

En conclusion, nos mesures indiquent qu'il peut être très défavorable d'exciter une protéine rouge dans la gamme 760–820 nm et qu'il est avantageux de décaler l'excitation des protéines bleues vers l'infra-rouge (850 voir 900 nm) lorsque l'on image simultanément une protéine bleue et une protéine rouge. Des études supplé-

mentaires seront nécessaires pour identifier tous les mécanismes mis en jeu lors d'une excitation multicolore et pour minimiser les effets négatifs. Néanmoins l'excitation 850/1100 nm semble un bon compromis pour l'application *Brainbow*.

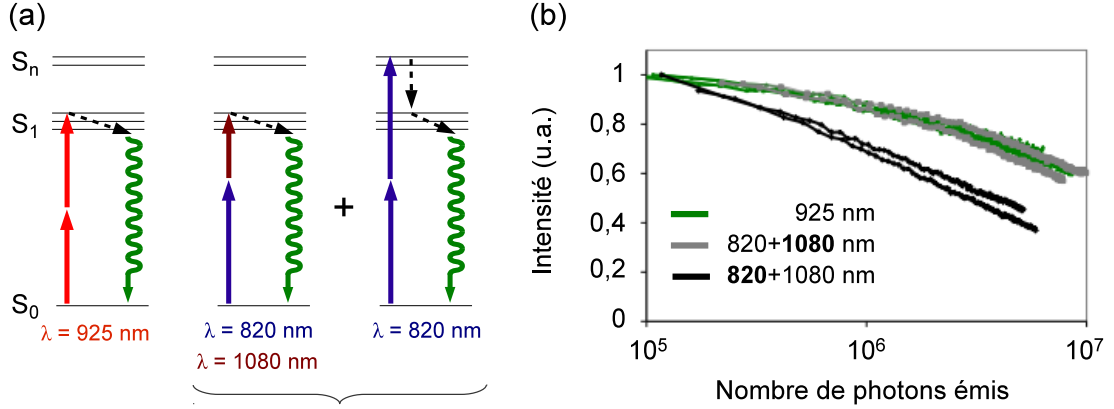


Figure 2.26: Comparaison des vitesses de photo-blanchiment de la GFP pour des processus d'excitation à 1 et 2 couleurs. (a) Diagrammes énergétiques. Les longueurs d'onde d'excitation sont : $\lambda = 925$ nm pour une excitation à 1 couleur, et $\lambda_1 = 820$ nm et $\lambda_2 = 1080$ nm pour une excitation à deux couleurs. (b) Signaux de fluorescence mesurés pour un même nombre de photons détectés. La vitesse de photo-blanchiment est inchangée lorsque la puissance du photon le moins énergétique est la plus élevée (820 + 1080 nm) alors qu'elle est plus élevée dans le cas contraire (820 + 820 nm).

2.4.5 Conclusion et perspectives

Nous avons montré qu'il est possible d'exciter efficacement et simultanément trois protéines fluorescentes aux spectres disjoints à l'aide de deux trains d'impulsions synchronisés. Contrairement aux autres méthodes employées actuellement, notre stratégie possède plusieurs avantages : simplicité de mise en œuvre, contrôle indépendant des différents signaux de fluorescence, alignement intrinsèque des différentes images, possibilité de combinaison avec des modes de contrastes cohérents (voir **Chapitre 3**).

Une application directe de cette méthode, mise en œuvre au laboratoire, consiste à imager de grands volumes de tissus marqués avec des transgènes *Brainbow* dans le but d'étudier la connectivité ou le lignage cellulaire dans le cortex et le tronc cérébral de souris. Suite à ces études nous avons notamment estimé que 16 couleurs distinctes peuvent être résolues sans ambiguïté en tenant compte de la variabilité

de l'expression des couleurs et du bruit de mesure. Pour l'étude de réseaux neuronaux, il faut maintenant travailler sur l'automatisation de l'imagerie du traitement des données car de grands volumes ne pourront être reconstruits efficacement et rapidement sans ce pré-requis. Pour cela des algorithmes de segmentation robustes, ainsi que des méthodes permettant d'augmenter la profondeur de pénétration sont à mettre au point afin que les données puissent être traitées automatiquement (éclaircissement des tissus, optique adaptative, ou encore block face). En revanche, des études sur le lignage cellulaire dans le système nerveux central peuvent être poursuivies dès maintenant. Il serait notamment intéressant d'observer le développement de tissus *in vivo* marqués par un nombre adéquat de clones.

Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing

Pierre Mahou¹, Maxwell Zimmerley^{1,4},
Karine Loulier^{2,4}, Katherine S Matho²,
Guillaume Labroille¹, Xavier Morin³, Willy Supatto¹,
Jean Livet², Delphine Débarre¹ & Emmanuel Beaurepaire¹

We achieve simultaneous two-photon excitation of three chromophores with distinct absorption spectra using synchronized pulses from a femtosecond laser and an optical parametric oscillator. The two beams generate separate multiphoton processes, and their spatiotemporal overlap provides an additional two-photon excitation route, with submicrometer overlay of the color channels. We report volume and live multicolor imaging of 'Brainbow'-labeled tissues as well as simultaneous three-color fluorescence and third-harmonic imaging of fly embryos.

Multicolor imaging approaches are increasingly used in biology for a variety of purposes: tracking cell anatomy, movement and lineage¹; visualizing specific molecules; and recording activity and signaling events at the subcellular level². A major challenge is to translate these approaches to the imaging of intact and live tissues. Two-photon-excited fluorescence (2PEF) microscopy allows subcellular-scale three-dimensional (3D) imaging of complex media over depths of several hundreds of micrometers, and it has become an indispensable tool for volume and live-tissue studies³. However, although any single fluorescent protein or dye can generally be observed using 2PEF microscopy⁴, current methods do not provide simultaneous, efficient and independent two-photon excitation of more than two spectrally distinct chromophores. To image three fluorophores with two-photon absorption spectra covering a large near-infrared spectrum (for example, 750–1,200 nm, as is needed to image the fluorescent proteins encoded by 'Brainbow' transgenes⁵), solutions have thus far included sequential imaging with a tunable laser, excitation with a single blue-shifted wavelength^{6,7} or the use of one laser to excite two chromophores with overlapping spectra and a second red-shifted laser⁸. However, the former approach is incompatible with multicolor imaging of fast events, and the two others do not allow independent optimization of each signal⁹.

Here we demonstrate a strategy for optimal and simultaneous two-photon imaging of three chromophores with distinct absorption spectra. We achieve three-color excitation by synchronizing the pulse trains from a femtosecond optical parametric oscillator (OPO) and its pump, which results in nonlinear processes produced by either one of the two sources and by their combination. Specifically, we use the combination as an additional 'virtual' excitation wavelength for two-photon-excited fluorescence. We show that this arrangement allows simultaneous two-photon excitation of blue, green-yellow and red fluorophores with independent control of their relative excitation efficiencies and automatic submicrometer overlay of the color channels. We report volume and live multicolor imaging of mouse brain and chicken spinal cord tissue labeled with 'Brainbow' transgenes, which enable stochastic expression of three fluorescent proteins in a Cre-dependent manner, and simultaneous three-channel fluorescence and third-harmonic generation (THG) imaging of developing *Drosophila melanogaster* embryos.

Red chromophores and fluorescent proteins⁴ can be efficiently excited at 1,000- to 1,300-nm wavelengths by an OPO pumped by a femtosecond laser such as a titanium:sapphire (Ti:S) oscillator (as in ref. 10). In such a setup, the OPO beam and a remaining fraction of the pump laser beam can be spatially overlapped to produce two independent nonlinear processes such as multiphoton excitation of two fluorophores. We also take advantage of the synchronous nature of the pump and OPO pulse trains and temporally overlap them in the microscope (**Fig. 1a** and **Supplementary Fig. 1**). This generates nonlinear processes resulting both from single-beam excitation (regular 2PEF, harmonic generation) and two-beam excitation (two-color 2PEF, sum-frequency generation (SFG), four-wave mixing and so on). We use this configuration to excite blue and red chromophores with the pump and OPO beams, respectively, and to simultaneously excite a third green-yellow chromophore not accessible by either beam alone using a two-beam two-photon process. In such a two-color two-photon mechanism¹¹, the chromophore is excited by the simultaneous absorption of one photon from each beam. Because the energy carried by a photon is hc/λ , where h is Planck's constant, c is the velocity of light and λ is the wavelength associated with the photon, synchronizing pulses with center wavelengths λ_1 (750–860 nm) and λ_2 (1,000–1,300 nm) produces an effect equivalent to an additional two-photon excitation wavelength at $\lambda_3 = 2/(1/\lambda_1 + 1/\lambda_2)$ (850–1,000 nm). This 'virtual' wavelength is adjusted by tuning λ_1 and λ_2 (**Supplementary Figs. 2 and 3**), and it can be easily measured through an SFG process in nonlinear potassium dihydrogen phosphate (KDP) crystal powder (**Fig. 1b**). This strategy for multicolor excitation is illustrated in **Figure 1c**;

¹Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole Polytechnique, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 7645 and INSERM U696, Palaiseau, France. ²Institut de la Vision, INSERM U968, UPMC Université Paris 6 UMR_S 968 and CNRS UMR 7210, Paris, France. ³Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure, CNRS UMR 8197, and INSERM U1024, Paris, France. ⁴These authors contributed equally to this work. Correspondence should be addressed to E.B. (emmanuel.beaurepaire@polytechnique.edu).

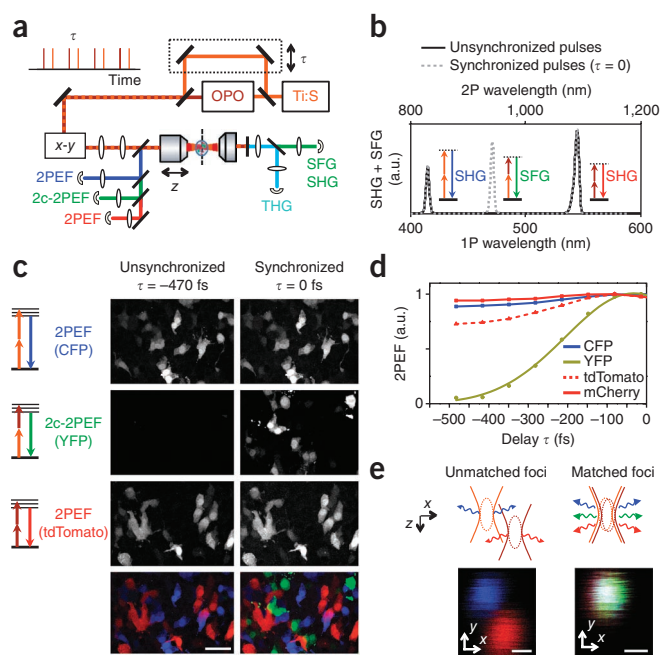


Figure 1 | Principles of multicolor two-photon imaging using synchronized pulses. **(a)** Imaging setup. Pulse trains from a femtosecond laser (Ti:S) and an OPO are synchronized using a delay line (τ) and coaligned in a microscope. Excitation with unsynchronized pulses can produce blue and red 2PEF, second- and third-harmonic generation (SHG and THG, respectively). Pulse synchronization additionally gives access to two-beam processes such as sum-frequency generation (SFG) and two-color two-photon-excited fluorescence (2c-2PEF). **(b)** Measured SHG and SFG spectra from a doubling crystal at focus with unsynchronized and synchronized pulse trains (a.u., arbitrary units). A third peak due to SFG appears when pulses are synchronized. **(c–e)** Effect of temporal and spatial pulse overlap on 2c-2PEF. **(c)** Three-channel fluorescence imaging of HEK cells expressing transgenes for CFP, YFP and tdTomato using unsynchronized and synchronized pulses (850 nm and 1,100 nm). Scale bar, 50 μm . **(d)** Measured 2PEF signals. Adjusting the delay between the pulse trains provides an independent control of the YFP signal level. **(e)** The wavelength-mixing image (green-yellow) is present only if the two foci remain overlapped. Scale bars, 0.5 μm .

we observed that only synchronized pulse trains provided an efficient simultaneous excitation of blue, green and red fluorescent proteins in human embryonic kidney (HEK) cells.

Because of unequal fluorophore efficiencies and concentrations in samples, and because scattering-induced attenuation with depth is color dependent (**Supplementary Fig. 4**), it is crucial to have independent control over the strength of the three signals for quantitative multicolor imaging. Such an independent control is straightforward in our scheme: assuming Gaussian temporal profiles for the excitation pulses and no overlap of the excitation spectra, the intensities of the blue, red and green-yellow fluorescence

respectively scale as $(P_1)^2$, $(P_2)^2$ and $2P_1P_2\exp(-\tau^2/2\sigma^2)$, where P_1 and P_2 are the Ti:S and OPO average powers, τ is the adjustable delay between the two pulse trains and 2σ is the $1/e^2$ width of the pulses' temporal intensity intercorrelation (**Fig. 1c,d**). Therefore the efficiencies of the one-beam processes (blue and red fluorescence) are controlled by adjusting the Ti:S and OPO average power, and the efficiency of the two-beam process (green-yellow fluorescence) is controlled by adjusting the delay between the two pulse trains. A benefit of this scheme is that the detection of a 'green' image is a confirmation of the proper spatial overlap of the focused Ti:S and OPO beams (**Fig. 1e** and **Supplementary Fig. 5**), thus ensuring that the 'red', 'blue' and 'green' images are overlaid at submicrometer scale without spatial shift or distortion with respect to one another.

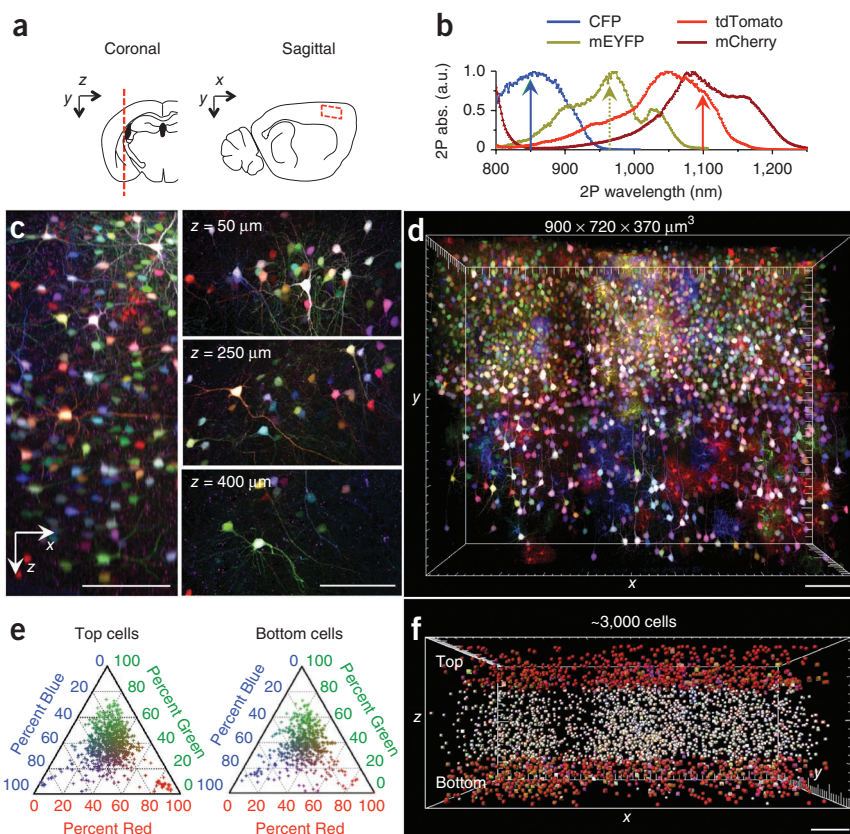
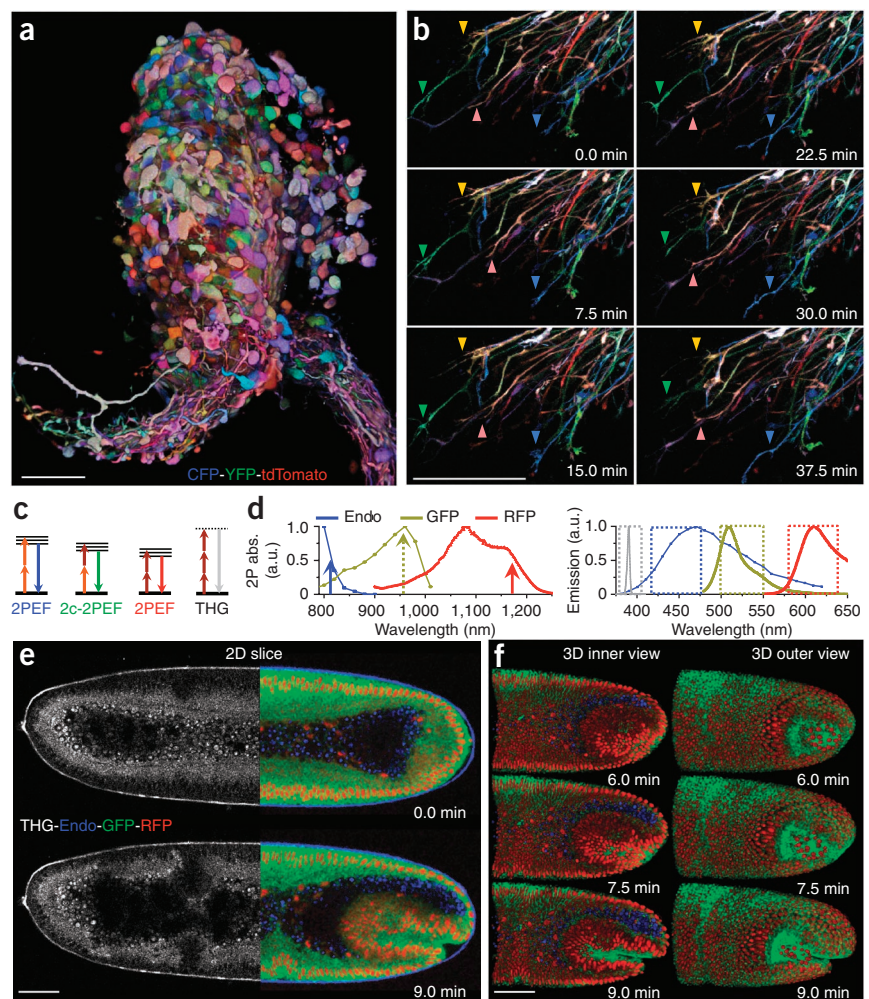


Figure 2 | Deep imaging and colorimetric analysis of Brainbow-labeled mouse cortical samples using multicolor two-photon imaging. **(a)** Region of mouse brain tissue imaged (dashed line and box). **(b)** Two-photon (2P) excitation spectra of the fluorescent proteins encoded by the Brainbow constructs mCerulean (CFP), mEYFP, tdTomato and/or mCherry. Arrows indicate the effective excitation wavelengths. **(c)** Multicolor images extracted from a 450- μm -thick z stack recorded on a Brainbow-electroporated mouse cortex (maximum-intensity projections of a reslice in the xz direction and of 100- μm -thick regions at different depths). **(d)** Three-dimensional view of a $900 \times 720 \times 370\text{-}\mu\text{m}^3$ volume of Brainbow-labeled mouse cortical tissue imaged with synchronized 850- and 1,100-nm pulses. **(e,f)** Automated detection of $>3,000$ cell bodies present in the imaged volume. Colorimetric analysis **(e)** of cells highlighted in red **(f)** confirms that the color balance is preserved over the imaged volume. (See also **Supplementary Videos 1–3** and **Supplementary Fig. 10**.) Pixel dwell time, 5 μs . Scale bars, 100 μm .

Figure 3 | Continuous three-color 2PEF and THG imaging of live embryonic tissue. (a,b) Three-dimensional at time t (3D+ t) imaging of live Brainbow-labeled E3.5 (a) and E4 (b) chicken spinal cord tissue (Online Methods). (a) View of an electroporated slice, showing the section of a half-labeled neural tube. (b) Maximum-intensity projections of growing motor neurons extracted from continuous imaging with multicolor pixel dwell time of 5 μ s. (See also **Supplementary Videos 4–6**.) (c–f) Multicolor 3D+ t 2PEF-THG imaging of a developing *Drosophila* embryo. (c) Nonlinear processes used for simultaneous four-channel imaging. (d) 2P excitation and emission spectra of endogenous fluorescence ('Endo'), GFP and RFP⁴. Arrows indicate the effective excitation wavelengths and boxes indicate the detection range of the four channels. (e) Frames extracted from a simultaneous THG and three-channel fluorescence 3D+ t data set. (f) Maximum-intensity projections of the posterior pole part at different times. (See also **Supplementary Videos 7–10**.) Excitation wavelengths: 850 nm and 1,100 nm (a,b); 820 nm and 1,175 nm (e,f). Pixel dwell time, 5 μ s. Scale bars, 50 μ m.



We demonstrate volume multicolor two-photon microscopy using wavelength mixing by imaging mouse brains electroporated with Brainbow transgenes expressing mCerulean, mEYFP and tdTomato (and/or mCherry) (Fig. 2; Online Methods). Synchronized 850- and 1,100-nm pulses provide simultaneous and efficient excitation of these fluorescent proteins. **Figure 2, Supplementary Figure 6 and Supplementary Videos 1–3** show neurons imaged with subcellular resolution in $900 \times 720 \times 370\text{-}\mu\text{m}^3$, $370 \times 410 \times 450\text{-}\mu\text{m}^3$ and $1,450 \times 430 \times 170\text{-}\mu\text{m}^3$ volumes of sparsely labeled mouse cortex. The method results in one-shot multicolor imaging of neurons with in-depth image quality equivalent to that obtained using sequential excitation (**Supplementary Fig. 7**). The respective powers of the two beams were automatically adjusted according to depth to compensate for the differential attenuation of the three signals, and color balance correction was performed across the field of view (**Supplementary Figs. 8 and 9**). This acquisition strategy maintains an unchanged balance among colors as a function of depth, which in turn allows comprehensive automated detection and quantitative colorimetric analysis of labeled cells (**Fig. 2, Supplementary Fig. 10 and Supplementary Video 1**) and color-based 3D segmentation in neurite tracing efforts (**Supplementary Fig. 11 and Supplementary Videos 2 and 3**).

A key advantage of the proposed method is that all signals are generated simultaneously. This results in an acquisition speed comparable to that of single-channel imaging and prevents motion-induced mismatch between color channels. We demonstrate this advantage through recordings of time-lapse 3D multichannel images of neural development in live thick slices of embryonic chicken spinal cord electroporated with the Brainbow constructs and recorded with a multicolor pixel dwell time of 5 μ s (**Fig. 3a,b and Supplementary Videos 4–6**; Online Methods).

The coloring allowed us to easily track the movements of individual cells in the developing neuroepithelium and the growth of motor and commissural neurons.

We further illustrate the benefit of our approach for live imaging through multichannel images of gastrulating *Drosophila* embryos; these images combine three-color fluorescence (mRFP1, EGFP and blue endogenous fluorescence) and third-harmonic generation (**Fig. 3c–f and Supplementary Video 7**). Multicolor imaging of mesoderm invagination is performed with one 3D stack every 11 s (**Supplementary Video 8**). The rapid morphogenetic movement of germ-band extension in a *Drosophila* embryo is visualized with one four-channel image recorded every 1.5 s and one four-channel 3D stack recorded every 45 s (**Fig. 3**). Such a temporal resolution is necessary to catch the rapid cell movements at the posterior pole of the embryo ($10\text{--}15\text{ }\mu\text{m min}^{-1}$) and cannot be obtained by sequential excitation of the various chromophores. Notably, simultaneous acquisition permits linear unmixing of images despite rapid tissue evolution, providing an unbiased contrast on individual channels (**Supplementary Fig. 12**). These data also illustrate that our multicolor fluorescence imaging scheme is directly compatible with simultaneous imaging using coherent nonlinear signals such as THG, which is detected at one-third of the OPO wavelength. THG provides contrasted images of tissue morphology based on their intrinsic optical properties¹² and has proven useful for imaging zebrafish

embryos¹³, mouse brain¹⁴ and other tissues¹⁰. However, because of laser and OPO tunability limitations, THG had not previously been efficiently detected with, for example, simultaneous GFP fluorescence. Its integration with diverse fluorescent-protein imaging schemes such as are shown here should enable its use in additional applications.

Multicolor genetic labeling strategies are opening new avenues for reconstructing neuronal connectivity and tracking cell migrations or lineage during development^{5,15}. However, the lack of appropriate multicolor tissue imaging methods has hindered the use of these strategies in thick or live samples. In particular, rapid multicolor imaging with multiphoton microscopy has remained challenging¹⁶. The simple and robust scheme proposed here addresses this issue with a number of unique features. First, it provides simultaneous and spatially colocalized excitation of the three fluorophores with internal control. This may prove critical for quantitative approaches such as multicolor fluorescence correlation spectroscopy, FRET and ratiometric imaging. Second, unlike linear microscopy-based setups such as confocal, this design has the practical advantages of multiphoton excitation: superior performance for deep-tissue imaging³ and increased detection efficiency due to the absence of overlap between excitation and emission spectra¹⁷. Third, as compared to other multiphoton strategies such as single-wavelength excitation of multiple chromophores^{6,7} or sequential illumination at three wavelengths, our scheme provides efficient and independent control over the strength of the three signals or reduced acquisition times, respectively. Besides the applications already discussed, this approach can also be used with a large range of fluorophore combinations such as Dendra2 Green, Dendra2 Red and mKate; DAPI, GFP and mCherry; and others (**Supplementary Fig. 1**). Finally, it can be adapted to other imaging geometries such as multiphoton light-sheet microscopy¹⁸. Multicolor two-photon imaging with wavelength mixing should therefore find a broad range of applications in experimental systems biology.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Note: Supplementary information is available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. McMahon and A. Stathopoulos (California Institute of Technology) for the *mcd8-GFP/H2A-RFP Drosophila* line, R. Barry for transgene preparation, S. Fouquet for technical assistance and M.-C. Schanne-Klein, M. Joffe, J.-L. Martin and J.-A. Sahel for helpful comments and discussions. This work was supported by Agence Nationale de la Recherche, Fondation Louis D de l'Institut de France, Ville de Paris, Inserm Avenir and Ecole des Neurosciences de Paris.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

E.B., P.M., D.D., M.Z., G.L. and W.S. designed, implemented and performed imaging. J.L., K.L., X.M. and K.S.M. designed and implemented Brainbow strategies. X.M. prepared chicken embryo samples. W.S. prepared *Drosophila*. P.M., W.S. and K.S.M. performed image analysis. P.M., W.S., D.D., J.L. and E.B. analyzed the data and wrote the manuscript.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare competing financial interests: details are available in the online version of the paper.

Published online at <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.2098>.
Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Jefferis, G.S. & Livet, J. *Curr. Opin. Neurobiol.* **22**, 101–110 (2012).
2. Yasuda, R. *Curr. Opin. Neurobiol.* **16**, 551–561 (2006).
3. Helmchen, F. & Denk, W. *Nat. Methods* **2**, 932–940 (2005).
4. Drobizhev, M., Makarov, N.S., Tillo, S.E., Hugues, T.E. & Rebane, A. *Nat. Methods* **8**, 393–399 (2011).
5. Livet, J. *et al. Nature* **450**, 56–62 (2007).
6. Dunn, K.W. *et al. Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **283**, C905–C916 (2002).
7. Lansford, R., Bearman, G. & Fraser, S.E. *J. Biomed. Opt.* **6**, 311–318 (2001).
8. Entenberg, D. *et al. Nat. Protoc.* **6**, 1500–1520 (2011).
9. Butko, M.T. *et al. BMC Biotechnol.* **11**, 20 (2011).
10. Débarre, D. *et al. Nat. Methods* **3**, 47–53 (2006).
11. Lakowicz, J.R., Gryczynski, I., Malak, H. & Gryczynski, Z. *Photochem. Photobiol.* **64**, 632–635 (1996).
12. Oron, D. *et al. J. Struct. Biol.* **147**, 3–11 (2004).
13. Olivier, N. *et al. Science* **329**, 967–971 (2010).
14. Farrar, M.J., Wise, F.W., Fetcho, J.R. & Schaffer, C.B. *Biophys. J.* **100**, 1362–1371 (2011).
15. Lichtman, J.W. & Denk, W. *Science* **334**, 618–623 (2011).
16. Haralalka, S., Cartwright, H.N. & Abmayr, S.M. *Methods* **56**, 55–62 (2012).
17. Garini, Y., Young, I.T. & McNamara, G. *Cytometry A* **69**, 735–747 (2006).
18. Truong, T.V., Supatto, W., Koos, D.S., Choi, J.M. & Fraser, S.E. *Nat. Methods* **8**, 757–760 (2011).

ONLINE METHODS

Multicolor two-photon imaging setup. Imaging was performed on a custom-built laser scanning microscope incorporating a femtosecond Ti:S/OPO chain (Coherent and APE), orthogonal galvanometer mounted mirrors (GSI Lumonics) and a water-immersion objective (25× 1.05 numerical aperture (NA), Olympus). Ti:S and OPO beams were combined using a dichroic mirror (1000-DCXR, Chroma or DMSP-1000, Thorlabs). Pulses were synchronized with a motorized delay line (**Supplementary Fig. 1**), and the relative divergence of the two beams was controlled using telescopes. Beam polarizations were linear. Beam powers were independently controlled with wave plates and polarizers. Signals were detected in the epi- and trans-directions by photomultiplier modules (SensTech) counting electronics. Scanning and acquisition were synchronized using lab-written LabVIEW software and a multichannel I/O board (PCI-6115, National Instruments). Fluorescence was collected in the backward (epi) direction using a dichroic mirror (695dcxr, Chroma) and directed toward three independent detectors with dichroics and filters, listed below. Coherent scattering (such as THG, SHG and SFG) was detected in the forward direction. We note that in addition to two-color 2PEF (2c-2PEF), other multiple-wave processes can happen in the sample. In particular, with femtosecond pulses, four-wave mixing (FWM)¹⁹ is efficiently produced at wavelength $1/(2/\lambda_{\text{Ti:S}} - 1/\lambda_{\text{OPO}})$ and, if present, should be separated from the red fluorescence. Since FWM is narrowband and mostly forward-scattered, fluorescence selection can generally be done using epidetection and appropriate filters. In addition, it is possible to red-shift the FWM signal away from the fluorescence wavelengths by choosing closer λ_1 and λ_2 wavelengths.

Laser chains and accessible two-photon excitation wavelengths.

The wavelength combinations accessible using synchronized Ti:S/OPO pulses are illustrated in **Supplementary Figure 2**. We tested this excitation scheme with two different laser chains. The first chain (Ti:S1/OPO1) was the combination of a femtosecond oscillator (Chameleon-ultra2, Coherent) and a KTP-based optical parametric oscillator (OPO-Basic, APE). In this system, the OPO wavelength is controlled by the pump Ti:S wavelength and tunability is limited. OPO pulse duration was compressed to 80–100 fs at the objective focus using an external prism-based compressor, and Ti:S pulse duration at focus was approximately 250–280 fs. This configuration was used for simultaneous THG and three-channel 2PEF imaging of *Drosophila* embryos. The Ti:S1, OPO1 and two-color virtual excitation $\lambda_3 = 2/(1/\lambda_1 + 1/\lambda_2) = 2/(1/\lambda_{\text{Ti:S}} + 1/\lambda_{\text{OPO}})$ wavelengths were equal to 820 nm, 1,175 nm and 965 nm (**Fig. 3** and **Supplementary Videos 7, 9 and 10**). The second chain (Ti:S2/OPO2) was the combination of a femtosecond oscillator (Chameleon-ultra2, Coherent) and an independently tunable periodically poled crystal-based OPO (OPO-automatic, APE). Pulse durations at the objective focus were approximately 160 fs and 400 fs, respectively. This configuration with tunable OPO wavelength was used for Brainbow-labeled mouse-brain and chick spinal cord samples as well as for *Drosophila* imaging. The Ti:S2, OPO2 and two-color virtual excitation wavelengths were respectively set to 850 nm, 1,100 nm and 959 nm for Brainbow-labeled tissue imaging, and to 820 nm, 1,100 nm and 930 nm for *Drosophila* imaging (**Figs. 1–3** and **Supplementary Videos 1–6** and **8**).

Axial resolution. Beam magnifications were adjusted to the pupil size of the objective in order to obtain comparable resolutions for all channels. Resolutions were estimated from multiphoton imaging of fluorescent beads and KDP powder. Measured 2PEF FWHM z resolutions at the sample surface in the blue and red channels with the 25× 1.05NA objective were as follows: 2.5 μm and 3.0 μm for *Drosophila* experiments with Ti:S1 and OPO1 (820 nm/1,175 nm); 2.0 μm and 3.0 μm for Brainbow-labeled tissue experiments with Ti:S2 and OPO2 (850 nm/1,100 nm).

Experimental conditions for Brainbow imaging on fixed tissues (mCerulean, mEYFP and tdTomato/mCherry). Excitation: Ti:S2, OPO2 and two-color equivalent excitation $\lambda_3 = 2/(1/\lambda_{\text{Ti:S}} + 1/\lambda_{\text{OPO}})$ wavelengths were set to 850 nm, 1,100 nm and 959 nm, respectively (**Supplementary Fig. 3a**). Detection: we used FF520-Di02 and FF560-FDi01 dichroics and FF01-475/64-25, FF01-538/40-25 and FF01-607/70-25 filters (Semrock) (**Supplementary Fig. 3b**). The pixel dwell time was 5 μs , and the voxel size was $0.60 \times 0.60 \times 1.0 \mu\text{m}^3$ (**Fig. 1c**), $0.48 \times 0.48 \times 1.0 \mu\text{m}^3$ (**Fig. 2c,d**, **Supplementary Figs. 6, 7 and 9c** and **Supplementary Videos 1–3**) or $0.60 \times 0.60 \mu\text{m}^2$ (**Supplementary Figs. 8 and 9a,b**). Images were averaged two times for **Figure 2c,d**, **Supplementary Figures 6, 7 and 9c** and **Supplementary Videos 1–3** and four times for **Figure 1c**. Laser power for both beams was automatically adjusted with depth.

Experimental conditions for dynamic Brainbow experiments (mCerulean, mEYFP and tdTomato/mCherry). Excitation and detection parameters were identical to those used for fixed Brainbow tissues imaging (**Supplementary Fig. 3a,b**). The pixel dwell time was 5 μs , and the voxel size was $0.80 \times 0.80 \times 2.0 \mu\text{m}^3$ (**Fig. 3a** and **Supplementary Video 4**) or $0.6 \times 0.6 \times 2.0 \mu\text{m}^3$ (**Fig. 3b** and **Supplementary Videos 5 and 6**). Laser power for both beams was automatically adjusted with depth, only for **Figure 3a** and **Supplementary Video 4**.

Experimental conditions for *Drosophila* embryo experiments (endogenous fluorescence, GFP, and RFP). Excitation: Ti:S1, OPO1 and two-color virtual excitation $\lambda_3 = 2/(1/\lambda_{\text{Ti:S}} + 1/\lambda_{\text{OPO}})$ wavelengths set to 820 nm, 1,175 nm, and 965 nm (**Supplementary Fig. 3c**) for **Figure 3e,f**, **Supplementary Figure 12** and **Supplementary Videos 7, 9 and 10**, and to 820 nm, 1,100 nm and 930 nm (**Supplementary Fig. 3e**) for **Supplementary Video 8**. Detection: we used FF500-Di02 and FF560-FDi01 dichroics, and FF01-447/55-25, FF01-525/50-25 and FF01-607/70-25 filters (Semrock, USA) (**Supplementary Fig. 3d,f**). The pixel dwell time was 5 μs , and the voxel size was $0.80 \times 0.80 \times 3.0 \mu\text{m}^3$ (**Fig. 3e,f**, **Supplementary Fig. 12** and **Supplementary Video 7**), $0.80 \times 0.80 \times 1.5 \mu\text{m}^3$ (**Supplementary Video 8**) or $0.60 \times 0.60 \mu\text{m}^2$ (**Supplementary Videos 9 and 10**). Images were not averaged for **Figure 3e,f**, **Supplementary Figure 12** or **Supplementary Videos 7 and 8**; images were averaged two times for **Supplementary Videos 9 and 10**.

Effect of spatial mismatch on two-color excitation. In the case of multiphoton microscopy, chromatic aberrations of the microscope and objective cause foci mismatches between the Ti:S and OPO beams, which must be avoided. The effect of wavelength-dependent aberrations can be described as follows: (i) at the center

of the field of view, the two foci exhibit axial (z) mismatch; and (ii) toward the edge of the field of view, foci are mismatched both axially and laterally. The z mismatch at the center of the field was canceled by controlling the relative divergence of the beams using telescopes before injection inside the microscope. Then the extension of the field with overlapping foci was measured for different objectives by recording two-color 2PEF images of homogeneous fluorescent samples and SFG images of KDP powder. In practice, we found that two-thirds of the lateral field of view could be used with the 25× 1.05NA objectives for a second-order process with the pump and OPO wavelength set to 850 nm and 1,100 nm. Detection of the two-color process was a diagnostic of beam (and image) coalignment at the precision of the diffraction-limited foci (Supplementary Fig. 3).

Control of signal level and color balance with depth. Signal attenuation in thick tissues due to scattering of the excitation light (and fluorescence) is wavelength-dependent. This hinders quantitative colorimetric analysis (for example, for neuron tracing in 3D images). This differential signal attenuation was characterized and avoided as follows. First, blue, green-yellow and red 2PEF signal levels were adjusted at the tissue surface using the Ti:S and OPO powers and the delay between pulse trains. In the case of non-overlapping excitation spectra, the three signals scale as: $I_{\text{Blue}} \propto (P_{\text{Ti:S}})^2$, $I_{\text{Red}} \propto (P_{\text{OPO}})^2$ and $I_{\text{Green}} \propto 2P_{\text{OPO}} P_{\text{Ti:S}} \times g(\tau)$, where $P_{\text{Ti:S}}$ is the Ti:S power, P_{OPO} is the OPO power, τ is the delay between the two pulse trains and $g(\tau)$ the temporal intensity intercorrelation of the pulse trains. In the case of Fourier transform-limited Gaussian temporal profiles, $g(\tau) \propto \exp(-\tau^2/2\sigma^2)$, where 2σ is related to the $1/e^2$ temporal width of the OPO and Ti:S pulses by the relation $\sigma = (\sigma_{\text{OPO}}^2 + \sigma_{\text{Ti:S}}^2)^{1/2}$. We note that if excitation spectra overlap so that two chromophores are excited by a single wavelength, the expressions above should be modified to take into account the excitation cross-talk. However, even in this case, the relative strength of the three signals can be adjusted independently using combinations of the experimental parameters $P_{\text{Ti:S}}$, P_{OPO} and τ . Signal attenuation with depth was characterized from low-resolution, large-scale tissue imaging (Supplementary Fig. 4a). Finally, this information was used in the microscope acquisition program to automatically adjust the powers of the two beams according to depth. This resulted in a constant balance between the different colors at all depths (Supplementary Figs. 4b and 10).

Image analysis. Image analysis was performed using ImageJ (US National Institutes of Health), Fiji (<http://fiji.sc/>), TrakEM2²⁰ MATLAB (MathWorks) and Imaris (Bitplane).

Color balance correction across the field of view. Excitation and detection efficiency usually depends on the position in the field of view and may differ by channel. This must be corrected for in the case of colorimetric analysis. For Brainbow-labeled tissue-imaging applications, we normalized the images using images of homogeneous media (fluorescent plastic slides, Supplementary Fig. 8a,c). Supplementary Figure 8d,e shows an example of an image before and after correction.

Multicolor mosaic stitching. Mosaic stitching was performed using MATLAB or Fiji after color-balance correction. xy translation between images was evaluated using single z slices, or

maximum-intensity projections when possible. Supplementary Figure 9 and Supplementary Videos 1 and 2 show examples of stitched images.

Automated high-content cell detection and color analysis in large volumes of Brainbow tissue. Analyses were carried out on a mosaic of Brainbow-labeled mouse cerebral cortex consisting of six z stacks encompassing a total volume of $900 \times 720 \times 370 \mu\text{m}^3$ (Supplementary Video 1). We ensured a constant color balance in the z and xy directions by adjusting laser powers with depth (Supplementary Fig. 4) and by lateral renormalization (Supplementary Fig. 8), respectively. We used Imaris to automatically detect >3,000 cells present in the imaged volume (Fig. 2 and Supplementary Fig. 10) and extract the average cell-body signal intensity in each channel. Manual inspection indicated that there were 25% false negatives (labeled cells undetected by the algorithm), <5% false positives and that the detection efficiency did not depend on depth. These data were exported into MATLAB to measure the relative color intensities for each cell, as displayed in ternary graphs (Fig. 2e and Supplementary Fig. 10).

Image segmentation. A densely labeled volume (Supplementary Fig. 11a) was selected from the image stacks shown in Supplementary Video 2. After cropping and uniform level adjustment with Adobe Photoshop, the corresponding stack of 171 RGB TIFF images was loaded into TrakEM2 4 (available as a Fiji plug-in, <http://www.ini.uzh.ch/~acardona/trakem2.html>). Neurites were traced in each plane using the TrakEM2 Arealist mode. The area list of each segmented neuron was then exported as an image series so the neuron could be color-coded in Adobe Photoshop with a hue matching that in the parent image. In Fiji, traces of all segmented neurons were combined into a unique image series. The resulting segmented image stack was then rendered using the Fiji/ImageJ 3D viewer plug-in, and interpolation along the z axis was performed to allow isotropic rendering (Supplementary Fig. 11b and Supplementary Video 3).

Linear spectral unmixing. We perform linear spectral unmixing for the three-color *Drosophila* imaging experiments. Mixing was only observed between spectrally adjacent channels. To unmix the contributions of two chromophores A and B detected in channels C_1 and C_2 , one solves the following linear equations:

$$\begin{pmatrix} C_1 \\ C_2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} R_{A1} & R_{B1} \\ R_{A2} & R_{B2} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} A \\ B \end{pmatrix}$$

where R_{A1} (and R_{A2}) and R_{B1} (and R_{B2}) are the normalized contributions of chromophores A and B in channel 1 (and 2), respectively. Supplementary Figure 12 shows an example in the case of three-color imaging of a *Drosophila* embryo labeled with GFP and RFP. Mixing ratios between the green and red channels were estimated from images of GFP and GFP-RFP-labeled embryos. Mixing ratios between the blue and green channels were estimated from images of GFP-RFP-labeled embryos.

Fluorescent HEK cells. HEK-293 cells expressing a single color of fluorescent protein (mCerulean²¹, EYFP²² or tdTomato²³) were separately generated by transient transfection with a CMV promoter-driven expression vector derived from pEGFP-N1

(Clontech) using Lipofectamine2000 reagent (Invitrogen). Two days after transfection, the three types of cells were harvested, mixed in equal proportions and plated on collagen-coated glass coverslips (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in 10 mM HCl, Sigma C3867) at a density of 5.10^4 cells cm^{-2} . Cells were maintained for an additional day in culture before fixation with 4% paraformaldehyde and mounting in Vectashield medium (Vector Labs).

Brainbow labeling. Mouse brains and chicken spinal cords imaged in **Figures 2** and **3** were produced by electroporating novel Brainbow transgenes expressing mCerulean²¹, mEYFP²² and tdTomato and/or mCherry²³ in the mouse embryonic cortical neuroepithelium or chicken spinal cord. The procedure and associated transgenes for creating semi-sparse trichromatic labeling of nerve cells will be described in a separate article. Mouse brains imaged in **Supplementary Figures 5** and **6** were produced as detailed in ref. 24 from *Thy1-Brainbow-1.0* line L⁵, which expresses mCerulean²¹, mEYFP and dTomato²³. Briefly, Brainbow mice were intercrossed with CAGGS-*CreER* animals²⁵, and newborn pups were injected with 20–50 μg Tamoxifen (Sigma T-5648). Mice were housed in a 14 h light/10 h dark cycle with free access to food, and all animal procedures were carried out in accordance with institutional guidelines (UPMC and Inserm).

Tissue preparation. For fixed brain imaging, 20-d-old mice were deeply anesthetized and perfused with 4% paraformaldehyde. Brains were harvested, postfixed overnight with the same fixative at 4 °C and washed in PBS. Sections 200–500 μm thick were cut using a vibrating microtome (Leica VT1000S) and mounted in Vectashield (Vector Labs) before imaging. For live imaging experiments, chicken embryos electroporated at E2 as described in ref. 26 were harvested at E3 (**Fig. 3a** and **Supplementary Video 4**) or E4 (**Fig. 3b,c** and **Supplementary Video 5** and **6**) and dissected in PBS. The electroporated portions of the thoracic and lumbar regions were cut into 200- to 250- μm -thick slices with

a McIlwain tissue chopper. Slices were mounted in 60–100 μL DMEM/F12 medium with 1% low melting point agarose in 35-mm glass-bottom culture dishes (MatTek) covered with 3 mL DMEM/F12 medium supplemented with 4% FCS, 1 mM sodium pyruvate, and 1 $\times$ penicillin or streptomycin; they were maintained at 38 °C for 3–6 h before imaging.

Drosophila embryos. For fly imaging experiments, we used a transgenic line of *Drosophila melanogaster* exhibiting a ubiquitous expression of red (mRFP1) and green (EGFP) fluorescent proteins (gift from A. McMahon and A. Stathopoulos at the California Institute of Technology). In this line, the red labeling of nuclei (H2A-RFP) is obtained with a fusion protein between histone 2A and the red fluorescent protein (such as that in Bloomington stock center strain #23650, <http://flystocks.bio.indiana.edu/Reports/23650.html>). In addition, a fusion protein between mouse lymphocyte marker mCD8 and the green fluorescent protein (mCD8-GFP) labels cell membranes²⁷. Embryos from *H2A-RFP/mCD8-GFP* flies were collected, staged, dechorionated and glued on glass cover slips following standard procedure, as described in ref. 28. Gastrulating embryos were imaged in water at 21 °C.

19. Mahou, P. *et al. Biomed. Opt. Express* **2**, 2837–2849 (2011).
20. Cardona, A. *et al. PLoS Biol.* **8**, e1000502 (2010).
21. Rizzo, M.A., Springer, G.H., Granada, B. & Piston, D.W. *Nat. Biotechnol.* **22**, 445–449 (2004).
22. Zacharias, D.A., Violin, J.D., Newton, A.C. & Tsien, R.Y. *Science* **296**, 913–916 (2002).
23. Shaner, N.C. *et al. Nat. Biotechnol.* **22**, 1567–1572 (2004).
24. Weissman, T.A., Sanes, J.R., Lichtman, J.W. & Livet, J. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2011**, 763–769 (2011).
25. Guo, C., Yang, W. & Lobe, C.G. *Genesis* **32**, 8–18 (2002).
26. Morin, X., Jaouen, F. & Durbec, P. *Nat. Neurosci.* **10**, 1440–1448 (2007).
27. Lee, T. & Luo, L.Q. *Neuron* **22**, 451–461 (1999).
28. Supatto, W., McMahon, A., Fraser, S.E. & Stathopoulos, A. *Nat. Protoc.* **4**, 1397–1412 (2009).

Chapitre 3

Microscopie non linéaire multimodale

Sommaire

3.1	Introduction	87
3.2	Microscopie THG-FWM	88
3.2.1	Mise en contexte	88
3.2.2	Système expérimental	89
3.2.3	Conditions d'accord de phase	90
3.2.4	Susceptibilité non linéaire	92
3.2.5	Estimation de susceptibilité non linéaire	94
3.2.6	Sources de contrastes au cours des divisions cellulaires	98
3.2.7	Effets de structures dans les échantillons	100
3.2.8	Effets des résonances électroniques	102
3.3	Microscopie multimodale cohérente et incohérente	105
3.3.1	Imagerie THG combinée à la fluorescence	105
3.3.2	Imagerie multimodale de contrastes endogènes	108
3.4	Conclusions et perspectives	112

3.1 Introduction

Au cours du chapitre précédent nous avons présenté un système pour la microscopie biphotonique multi-couleurs. Cependant l'utilisation de protéines fluorescentes

n'est pas toujours possible ou souhaitée. En complément, de nombreux modes de contraste cohérents apportent des informations structurelles ou spectroscopiques sur les échantillons à l'échelle macro-moléculaire tels que la génération de seconde harmonique (SHG) [196], la génération de troisième harmonique (THG) [20, 21], le mélange à quatre ondes non résonnant (FWM) [197], ou résonnant (CARS et SPE) [198, 121, 199]. Ces techniques sont tout d'abord apparues comme compléments de la fluorescence [96, 95] mais commencent à devenir des alternatives crédibles pour certaines applications, par exemple en biologie du développement [18]. Cependant, pour mieux tirer parti de la diversité des contrastes en microscopie non linéaire, il peut être avantageux de combiner ces différents signaux plutôt que de les utiliser de façon indépendante. Ainsi, au cours de ce chapitre nous généralisons la méthode d'excitation par mélange de fréquence présentée dans le chapitre précédent à l'imagerie multimodale de signaux cohérents ou incohérents. Dans une première partie nous étendrons ces résultats à l'imagerie cohérente simultanée de deux modes de contraste complémentaires (THG et FWM), puis nous présenterons des stratégies permettant de combiner l'imagerie cohérente sans marquage (SHG, THG, et FWM) à l'imagerie de fluorescence multicolore.

3.2 Microscopie THG-FWM

3.2.1 Mise en contexte

L'imagerie THG détecte les variations spatiales de la susceptibilité non linéaire d'ordre trois à l'échelle du volume focal, $\Delta\chi^{(3)}(-3\omega, \omega, \omega, \omega)$ [20, 21], telles que celles produites par des corps lipidiques dans un environnement aqueux [114]. Cette méthode s'est ainsi révélée utile pour l'imagerie du développement embryonnaire de petits organismes [200, 60, 18, 61, 115]. Cependant les images de THG résultent d'interférences constructives ou destructives et sont souvent complexes à interpréter, si bien qu'avant d'utiliser les signaux de THG il est souvent nécessaire d'identifier leur origine par colocalisation avec d'autres signaux.

Parmi les signaux cohérents pouvant être utilisés, le FWM sonde également la susceptibilité non linéaire d'ordre trois. Les sources de contraste du FWM dans les tissus sont multiples et peuvent provenir de résonances vibrationnelles (signal CARS) [10, 119, 120], de résonances électroniques en présence d'absorption à un ou deux photons (signal SPE) [199, 201, 197, 202], ou encore des contributions non

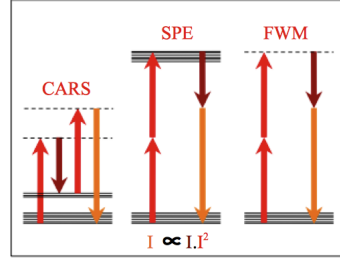


Figure 3.1: Mécanismes de contraste non linéaires résultant d'un mélange à quatre onde : CARS, SPE, et FWM non résonnant.

résonnantes (signal que nous désignerons FWM pour toute la suite)[203, 201, 197] (**Figure 3.1**). Si la microscopie CARS est très étudiée, peu de travail a été fait concernant l'utilisation des signaux FWM et SPE en microscopie. Le FWM se révèle notamment être un signal de choix pour une comparaison avec le signal de THG. En effet, en l'absence d'absorption à un, deux ou trois photons on peut s'attendre à ce que tous deux sondent la partie non résonnante de la susceptibilité non linéaire. De plus dans le cas du FWM la construction du signal se fait de façon constructive sur l'ensemble du volume focal, ce qui limite les effets géométriques liés à la construction cohérente du signal compliquant l'interprétation des signaux THG.

3.2.2 Système expérimental

Pour produire efficacement et simultanément les signaux de THG et de FWM nous avons utilisé des trains d'impulsions synchronisés fournis par un laser titane-saphir et un OPO. Les impulsions femtosecondes sont particulièrement adaptées pour produire ces deux signaux car l'intensité de ces deux derniers croît en $1/\tau^2$ où τ est la durée des impulsions. Le schéma de principe est visible sur la **Figure 3.2** : les faisceaux d'excitation sont recombinaés spatialement à l'aide d'un miroir dichroïque et synchronisés temporellement grâce à une ligne à retard, puis envoyés vers un microscope détaillé au premier chapitre. Étant donné que les signaux de fréquences centrales respectives $2\omega_1 - \omega_2$ et $3\omega_2$ sont émis dans des bandes de fréquences étroites et distinctes ils peuvent être détectés simultanément. De plus, pour une telle configuration des signaux THG de fréquences centrales respectives $3\omega_1$, $2\omega_1 + \omega_2$, et $\omega_1 + 2\omega_2$ sont également produit simultanément. Cependant, ceux-ci sont produit dans l'UV et sont pour des raisons pratiques difficilement détectables (mauvaise transmission des optiques, faible efficacité des détecteurs, absorption des tissus).

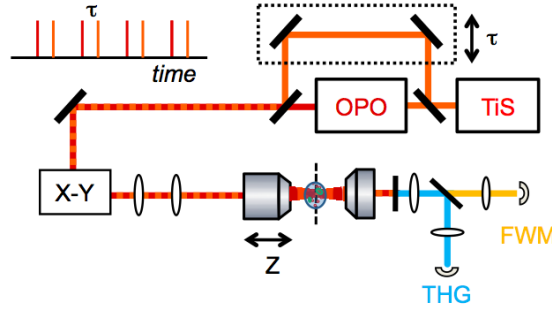


Figure 3.2: Montage expérimental. Un laser titane saphir (TiS) et un oscillateur paramétrique optique sont recombinaés spatialement et superposés temporellement avant d'être envoyés dans un microscope à balayage. Les signaux cohérents sont détectés simultanément dans deux bandes spectrales différentes.

3.2.3 Conditions d'accord de phase

Les signaux de THG et de FWM se construisent de façon cohérente : le signal total produit sur l'ensemble du volume focal résulte d'interférences entre les ondes émises par chaque dipôle du milieu. La construction des signaux est gouvernée par deux conditions d'accord de phase différentes si bien que la sensibilité aux structures dans les échantillons sera différente pour les deux mécanismes de contraste. Pour la génération de troisième harmonique et le mélange à quatre ondes les conditions d'accord de phase pour des ondes excitatrices planes s'écrivent de la façon suivante :

$$\begin{aligned}\Delta \mathbf{k}^{\text{THG}} &= \mathbf{k}_{3\omega} - 3\mathbf{k}_{\omega} = 0 \\ \Delta \mathbf{k}^{\text{FWM}} &= \mathbf{k}_{2\omega_1 - \omega_2} + \mathbf{k}_{\omega_2} - 2\mathbf{k}_{\omega_1} = 0\end{aligned}\tag{3.1}$$

Ces conditions doivent être satisfaites pour que les ondes excitatrices soient en phase avec les ondes créées et que le signal puisse se construire de façon cohérente. D'autre part dans le cas de faisceaux gaussiens focalisés, les ondes excitatrices accumulent un déphasage de π au passage du plan focal. Ainsi en géométrie focalisée, les signaux de THG et de FWM se construisent de façon cohérente sur une distance l vérifiant les relations suivantes :

$$\begin{aligned}|\Delta \mathbf{k}^{\text{THG}} - 3\Delta \mathbf{k}_{G,\omega}| \times l &\ll \pi \\ |\Delta \mathbf{k}^{\text{FWM}} - (\Delta \mathbf{k}_{G,\omega_2} - 2\Delta \mathbf{k}_{G,\omega_1})| \times l &\ll \pi\end{aligned}\tag{3.2}$$

où $\Delta \mathbf{k}_{G,\omega}$ est le déphasage induit par la phase de Gouy. Dans le cas d'une émission sur l'axe et en négligeant la dispersion entre les différentes ondes ($\mathbf{k}_{3\omega} - 3\mathbf{k}_\omega \approx 0$ et $\mathbf{k}_{2\omega_1 - \omega_2} + \mathbf{k}_{\omega_2} - 2\mathbf{k}_{\omega_1} \approx 0$) on peut définir des longueurs de cohérence effectives l^{THG} et l^{FWM} pour chacun des processus [204, 205] :

$$\begin{aligned} l^{THG} &= \frac{\pi}{3\Delta k_{G,\omega}} \approx l_{Axial}/3 \\ l^{FWM} &= \frac{\pi}{2\Delta k_{G,\omega_1} - \Delta k_{G,\omega_2}} \approx l_{Axial} \end{aligned} \quad (3.3)$$

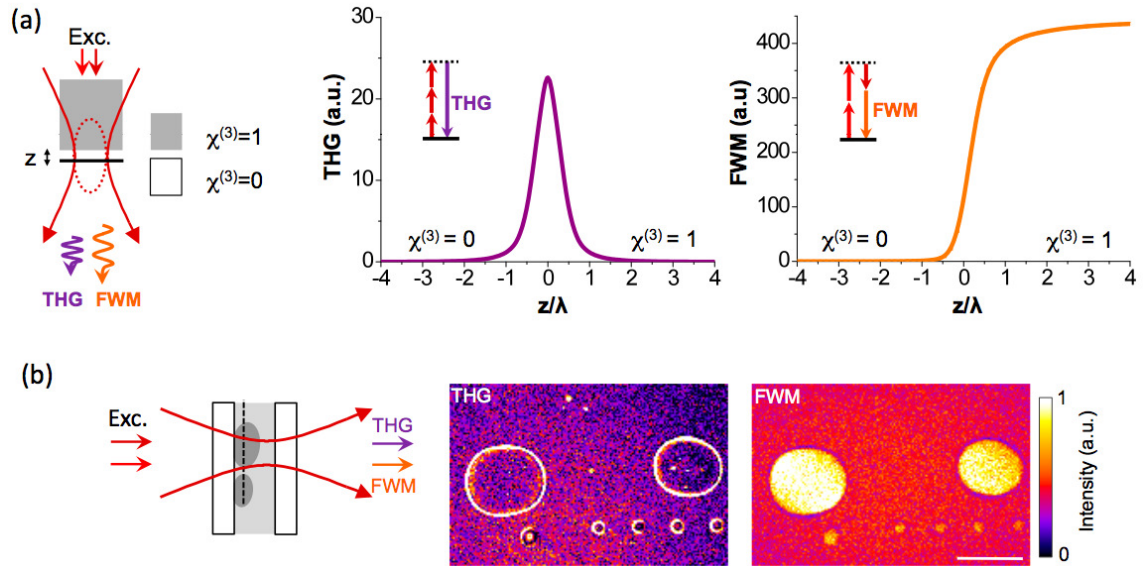


Figure 3.3: Effets des conditions d'accord de phase et de la géométrie sur les signaux THG et FWM. (a) Calcul de l'intensité THG et FWM obtenues lorsque l'on balaye un faisceau gaussien focalisé au voisinage d'une interface délimitant deux milieux isotropes. Le signal de THG est maximal lorsque le faisceau est centré sur l'interface ($z = 0$). Longueurs d'onde d'excitation $\lambda_1 = 1,2\mu m$ et $\lambda_2 = 0,8\mu m$, ouverture numérique $NA = 1,2$. (b) Images THG et FWM obtenues sur des gouttelettes lipidiques immergées dans l'eau. Pour la THG les signaux proviennent des zones de fortes hétérogénéités (interface lipide-eau), alors que pour le FWM un signal spécifique reflète les zones homogènes différentes (lipide ou eau). Barre d'échelle 50 μm .

où l_{Axial} représente l'étendue axiale du faisceau de focalisation. La longueur de cohérence effective de la THG est donc plus petite que l'étendue axiale du volume focal alors que celle du mélange à quatre ondes est du même ordre de grandeur.

Par conséquent les signaux THG refléteront principalement les hétérogénéités ou interfaces à l'échelle du volume focal, soit $|\Delta\chi^{(3)}|^2$, alors que les signaux de FWM refléteront plutôt la distribution moyenne d'émetteurs du milieu à l'échelle du volume focal, soit $|\chi^{(3)}|^2$ (**Figure 3.3**). Ces résultats ont plusieurs conséquences. Tout d'abord, étant donné que les signaux cohérents augmentent comme le carré du volume de cohérence on peut s'attendre à ce que les signaux de THG soient plus faibles que les signaux de FWM pour des impulsions d'énergie et de durée comparables. Cependant, les signaux de THG ont l'avantage de se construire sur un fond noir ce qui permet de ne pas noyer les variations de signal dans le bruit de photon du signal de fond, contrairement au cas du FWM.

3.2.4 Susceptibilité non linéaire

Dans un milieu homogène les champs de troisième harmonique $\mathbf{E}^{\text{THG}}$ et de mélange à quatre ondes $\mathbf{E}^{\text{FWM}}$ sont gouvernés par les équations de propagation suivantes, valables pour des champs transverses [75] :

$$\begin{aligned}\nabla \times \nabla \times \mathbf{E}^{\text{THG}}(\mathbf{r}) - k_{3\omega}^2 \mathbf{E}^{\text{THG}}(\mathbf{r}) &= \frac{4\pi (3\omega)^2}{c^2} \mathbf{P}^{\text{THG}}(\mathbf{r}) \\ \nabla \times \nabla \times \mathbf{E}^{\text{FWM}}(\mathbf{r}) - k_{2\omega_1 - \omega_2}^2 \mathbf{E}^{\text{FWM}}(\mathbf{r}) &= \frac{4\pi (2\omega_1 - \omega_2)^2}{c^2} \mathbf{P}^{\text{FWM}}(\mathbf{r})\end{aligned}\quad (3.4)$$

où $\mathbf{P}^{\text{THG}}$ et $\mathbf{P}^{\text{FWM}}$ sont les polarisations non linéaires induites pour les signaux THG et FWM de fréquences respectives 3ω et $2\omega_1 - \omega_2$. Les polarisations non linéaires $\mathbf{P}^{\text{THG}}$ et $\mathbf{P}^{\text{FWM}}$ sont reliées aux champs focalisés par l'intermédiaire des relations suivantes :

$$\begin{aligned}P_i^{(THG)} &= \frac{\epsilon_0}{4} \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega) E_j E_k E_l \\ P_i^{(FWM)} &= \frac{3\epsilon_0}{4} \sum_{j,k,l} \chi_{ijkl}^{(3)}(-(2\omega_1 - \omega_2); \omega_1, -\omega_2, \omega_1) E_j^{(1)} E_k^{(2)*} E_l^{(1)}\end{aligned}\quad (3.5)$$

où $\chi^{(3)}$ est la réponse non linéaire du milieu pour un processus d'ordre trois, appelée susceptibilité d'ordre trois. Il s'agit d'un tenseur qui traduit l'influence des différents états de polarisation sur le signal créé. Les indices 1 et 2 font référence aux deux champs focalisés dans le cas du mélange à quatre ondes. Pour un milieu isotrope les

susceptibilités non linéaires peuvent s'écrire de la façon suivante [198, 121, 75] :

$$\begin{aligned}\chi_{ijkl}^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega) &= \chi_{1122}^{THG} (\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{ik}\delta_{jl} + \delta_{il}\delta_{jk}) \\ \chi_{ijkl}^{(3)}(-(2\omega_1 - \omega_2); \omega_1, -\omega_2, \omega_1) &= \chi_{1122}^{FWM} (\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{ik}\delta_{jl}) + \chi_{1221}^{FWM} (\delta_{il}\delta_{jk}).\end{aligned}\quad (3.6)$$

Ainsi, pour la génération de troisième harmonique le tenseur $\chi^{(3)}$ possède un seul élément indépendant $\chi_{1122}^{(3)}$, alors que pour le mélange à quatre ondes il en possède deux : $\chi_{1122}^{(3)}$ et $\chi_{1221}^{(3)}$. Le lien entre les éléments $\chi_{1122}^{(3)}$ et $\chi_{1221}^{(3)}$ est usuellement décrit par le facteur de dépolarisation défini de la façon suivante :

$$\rho_R = \chi_{1122}^{FWM} / \chi_{1111}^{FWM} = \chi_{1122}^{FWM} / (2\chi_{1122}^{FWM} + \chi_{1221}^{FWM}) \quad (3.7)$$

Pour des milieux isotropes les polarisations non linéaires peuvent donc s'écrire comme :

$$\begin{aligned}\mathbf{P}^{THG} &= \frac{3\epsilon_0}{4} \chi_{1122}^{THG} (\mathbf{E} \cdot \mathbf{E}) \mathbf{E} \\ \mathbf{P}^{FWM} &= \frac{3\epsilon_0}{4} \chi_{1122}^{FWM} \left[2 (\mathbf{E}^{(1)} \cdot \mathbf{E}^{(2)*}) \mathbf{E}^{(1)} + \frac{2\rho_R}{1 - \rho_R} (\mathbf{E}^{(1)} \cdot \mathbf{E}^{(1)}) \mathbf{E}^{(2)*} \right]\end{aligned}\quad (3.8)$$

Pour la THG et le FWM les éléments $\chi_{1122}^{(3)}$ et ρ_R dépendent généralement des propriétés spectroscopiques des matériaux. Le paramètre $\chi_{1122}^{(3)}$ est usuellement décomposé en une partie spectralement résonnante $\chi_{1122}^{(3)R}$ et une partie non résonnante $\chi_{1122}^{(3)NR}$, alors que le facteur de dépolarisation ρ_R varie usuellement entre 0 et 0,75 et vaut 1/3 dans un milieu purement non résonnant. Pour la génération de troisième harmonique, $\chi_{1122}^{(3)R}$ est relié aux absorptions à un, deux ou trois photons [116], alors que pour le mélange à quatre ondes $\chi_{1122}^{(3)R}$ est exalté par les résonances vibrationnelles (CARS) ou électroniques [197, 206, 121, 199, 202].

Plusieurs modèles semi-empiriques ont été proposés pour relier la partie non résonnante du tenseur $\chi^{(3)}$ aux indices de réfraction [75]. La règle de Miller généralisée, valable pour certains matériaux, propose par exemple de relier le paramètre du tenseur aux indices par un simple produit $\chi^{(3)}(\omega_4, \omega_3, \omega_2, \omega_1) \approx n(\omega_4)n(\omega_3)n(\omega_2)n(\omega_1)$, si bien que $\chi^{THG} \approx n(3\omega)n(\omega)^3$ et $\chi^{FWM} \approx n(\omega)^4$. Finalement dans le cas de champs polarisés linéairement selon x on peut négliger les composantes suivant y et z des champs focalisés en première approximation. Les polarisations non linéaires deviennent alors scalaires et loin de toutes résonances se mettent sous la forme :

$$\begin{aligned}
P^{\text{THG}} &= \frac{3\epsilon_0}{4} \chi_{1122}^{\text{THG}} E^3(3\omega) \\
P^{\text{FWM}} &= \frac{9\epsilon_0}{4} \chi_{1122}^{\text{FWM}} E^{(1)2}(\omega_1) E^{(2)*}(\omega_2)
\end{aligned} \tag{3.9}$$

Loin de toute résonance, on peut ainsi s'attendre à ce que la THG et le FWM sondent le même paramètre physique $\chi^{(3)NR}$. Cependant, il est en pratique difficile de trouver des matériaux qui sont transparents sur toute la gamme de fréquences allant de ω à 3ω .

3.2.5 Estimation de susceptibilité non linéaire

Pour estimer la susceptibilité non linéaire de quelques milieux que l'on trouve dans les tissus biologiques nous avons choisi la méthode du *z-scan*. Cette méthode consiste à sceller un liquide dans une cuve étanche afin de mesurer successivement les signaux produits au niveau des différentes interfaces pour la THG (Eau/Verre, Verre/Liquide, Verre/Air) et dans les différents milieux pour le FWM (Eau, Verre, Liquide). Nous verrons que ces mesures peuvent être utilisées pour estimer de façon relative la susceptibilité non linéaire du milieu placé dans la cuve, soit le paramètre χ_{liq}/χ_{glass} .

Nous avons choisi comme milieux d'étude l'eau, le chlorotrifluoroéthylène (huile d'immersion Voltaef) et la trioléine (huile végétale). Les liquides ont été scellés entre deux lamelles de microscope (**Figure 3.4(a)**), et les signaux de THG et FWM ont été détectés simultanément sur deux détecteurs pendant que le foyer de l'objectif se déplaçait selon l'axe de propagation de l'excitation, z (**Figure 3.4(a)**). On peut constater comme attendu qu'un signal THG apparaît bien au niveau des différentes interfaces alors qu'un signal de FWM spécifique à chaque milieu est mesuré (**Figure 3.4(b)**).

Comme nous allons voir, pour chaque liquide le paramètre χ_{liq}/χ_{glass} peut être estimé à partir des profils d'intensité. Les solutions de **Eq. 3.5** peuvent s'exprimer à l'aide des fonctions de Green [204] :

$$\mathbf{E}_\omega(\mathbf{r}) = -\frac{4\pi\omega^2}{c^2} \iiint_V dV \left(\mathbf{I} + \frac{\nabla\nabla}{k_\omega^2} \right) G(\mathbf{R} - \mathbf{r}) \mathbf{P}_\omega(\mathbf{r}) \tag{3.10}$$

Où V est le volume du milieu excité et G est définie par:

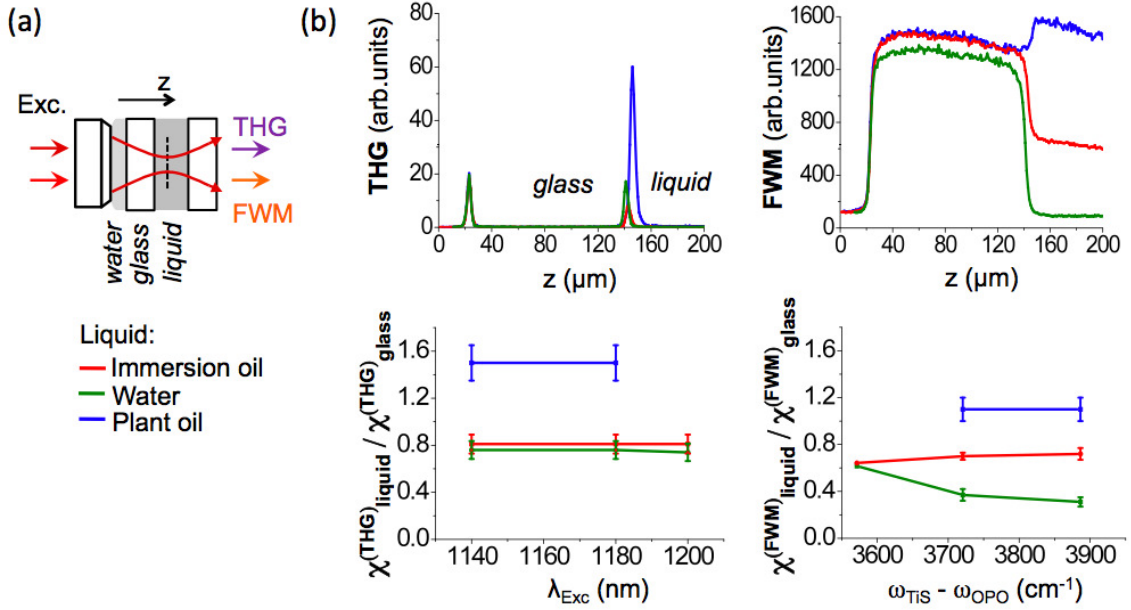


Figure 3.4: Effet du $\chi^{(3)}$ sur les contrastes THG et FWM. (a) Géométrie z -scan utilisée pour estimer les susceptibilités non linéaires χ^{THG} et χ^{FWM} pour plusieurs liquides. Un objectif corrigé lamelle est utilisé et son foyer est balayé axialement (z) au travers d'une interface liquide/verre. (b) Profils mesurés (haut) pour la THG et le FWM pour les différents liquides étudiés (eau, huile végétale, et huile d'immersion). Sur la partie basse figurent les estimations de χ^{THG} et χ^{FWM} faites pour plusieurs longueurs d'onde de l'OPO et pour plusieurs différences de fréquences entre le titane-saphir et l'OPO. Adapté de [207]

$$G(\mathbf{R} - \mathbf{r}) = \frac{\exp[ik_{\omega}|\mathbf{R} - \mathbf{r}|]}{4\pi|\mathbf{R} - \mathbf{r}|} \quad (3.11)$$

Le signal non linéaire collecté se calcule alors en intégrant $|\mathbf{E}_{\omega}(\mathbf{R})|^2$ sur l'angle solide de l'objectif de détection, soit :

$$\mathcal{P}_{\omega} = \frac{n_{\omega\epsilon_0 c}}{2} \int_0^{\theta_{\text{Max}}} d\theta \int_0^{2\pi} \mathbf{R}^2 \sin\theta d\phi |\mathbf{E}_{\omega}(\mathbf{R})|^2 \quad (3.12)$$

Ainsi dans une solution pure, pour des champs d'excitation polarisés linéairement et pour des susceptibilités non linéaires réelles (milieu non résonnant) le signal de FWM peut se mettre sous la forme :

$$\mathcal{P}_{2\omega_1 - \omega_2} = \left(\chi^{FWM}\right)^2 C(\omega_1, \omega_2, \text{NA}) \quad (3.13)$$

où $C(\omega_1, \omega_2, \text{NA})$ est une fonction tenant compte des profils d'excitation. Dans le cas

du FWM la valeur relative de la susceptibilité non linéaire par rapport à celle du verre peut donc être estimée en comparant directement les signaux mesurés dans les liquides et dans le verre soit :

$$\frac{\chi_{liq}^{FWM}}{\chi_{glass}^{FWM}} = \sqrt{\frac{I_{liq} - I_{noise}}{I_{glass} - I_{noise}}} \quad (3.14)$$

où I_{liq} et I_{glass} sont les intensités du signal de FWM du liquide et du verre mesurées juste avant et juste après l'interface liquide/verre. I_{noise} est le bruit sur la mesure provenant principalement d'un filtrage imparfait du laser titane-saphir mesuré dans l'air et corrigé par la transmission de la cuve (car nous supposons que le $\chi^{(3)}$ de l'air est nul en première approximation). Une analyse similaire peut être développée pour la THG pour estimer χ^{THG} à partir des profils d'intensité. Cependant pour la THG le signal provient des interfaces soit :

$$\mathcal{P}_{1/2} = C(\omega) |\chi_1^{THG} b_1 J(b_1 \Delta k_1) - \chi_2^{THG} b_2 J(b_2 \Delta k_2)|^2 \quad (3.15)$$

où b est le paramètre confocal : $b = \frac{2n(\omega)\lambda}{\pi} \left(\frac{n(\omega)^2 - NA^2}{NA^2} \right)$,

où J est l'intégrale d'accord de phase : $J(b\Delta k) = \int_0^{+\infty} \frac{\exp(ib\Delta k\phi)}{(1 + 2i\phi)^2} d\phi$,

où $\Delta k = 3k_\omega - k_{3\omega}$ est le désaccord de phase, et où 1/2 font référence aux deux milieux définissant l'interface. Ainsi en comparant les intensités obtenues pour deux interfaces différentes (une interface liquide/verre et une interface verre/air, profils non visibles), la valeur relative de la susceptibilité non linéaire par rapport à celle du verre peut être estimée :

$$\frac{\chi_{liq}^{(THG)}}{\chi_{glass}^{(THG)}} = \left(1 \pm \sqrt{\frac{I_{glass/liq}}{I_{glass/air}}} \times C \right) \frac{b_{liq} J(b_{liq} \Delta k_{liq})}{b_{glass} J(b_{glass} \Delta k_{glass})} \quad (3.16)$$

où C est un facteur de normalisation prenant en compte les fluctuations de puissance et les changements de transmission entre le premier et le second balayage en z . Si l'ouverture numérique d'excitation est modérée l'équation précédente peut être simplifiée pour donner :

$$\frac{\chi_{liq}^{(THG)}}{\chi_{glass}^{(THG)}} = \left(1 \pm \sqrt{\frac{I_{glass/liq}}{I_{glass/air}} \times C} \right) \quad (3.17)$$

Une ambiguïté demeure pour la détermination de $\chi^{(THG)}$ à cause des deux signes possibles dans l'**Eq. 3.17**. Cette ambiguïté peut être levée en mesurant les signaux d'interface entre les différents liquides [116, 114]. En utilisant cette méthodologie, nous avons estimé les susceptibilités non linéaires relatives de différents milieux en fonction de la différence de fréquences entre le laser titane-saphir et l'OPO pour le FWM ($3550cm^{-1}$ à $3890cm^{-1}$), et en fonction de la longueur d'onde de l'OPO pour la THG ($1140nm$ à $1200nm$). Les mesures sont visibles sur la **Figure 3.4(b)**.

Comme pour les études précédentes [114], les données montrent que $\chi_{water}^{THG} < \chi_{oil}^{THG}$ ce qui explique pourquoi les interfaces eau/lipide sont visibles en microscopie THG [115]. Les mesures indiquent également que les χ^{FWM} sont différents pour les liquides considérés à $3890cm^{-1}$ où aucune résonance vibrationnelle n'est présente pour les trois liquides (**Figure 3.4(b)**). Par conséquent, on peut bien s'attendre à pouvoir distinguer avec un bon contraste des corps lipidiques dans un milieu aqueux avec le FWM non résonnant comme nous l'avons déjà illustré sur la **Figure 3.3**.

De plus, en comparant les résultats obtenus pour les deux processus d'excitation on peut remarquer que les inégalités relatives entre les $\chi^{(3)}$ sont conservées dans les deux cas : $\chi_{water}^{(3)} < \chi_{immersion\ oil}^{(3)} < \chi_{glass}^{(3)} < \chi_{plant\ oil}^{(3)}$. Cependant des différences quantitatives sont observées pour l'huile végétale et pour l'eau, car pour ces liquides $\chi_{liquid}^{THG}/\chi_{glass}^{THG}$ est plus élevé que $\chi_{liquid}^{FWM}/\chi_{glass}^{FWM}$. Cela pourrait être dû à une exaltation de χ^{THG} par des résonances, car l'huile végétale et l'eau possèdent des pics d'absorption entre 1100 et 1200 nm. Une autre différence est également visible pour l'eau. Ceci est dû à la présence d'un signal CARS, puisque la liaison OH possède des résonances vibrationnelles entre $3300cm^{-1}$ and $3600cm^{-1}$. Finalement, il est difficile de se placer loin de toutes résonances dans des tissus biologiques et l'on peut s'attendre à ce que les paramètres sondés pour la THG et le FWM diffèrent. Cependant, les résultats montrent tout de même que l'on peut s'attendre à ce que les images de THG et de FWM soient fortement corrélées, ce qui permet d'utiliser les images de FWM pour mieux identifier les sources de contraste visibles en THG.

3.2.6 Sources de contrastes au cours des divisions cellulaires

La microscopie THG s'est révélée utile pour étudier les divisions cellulaires du développement précoce de l'embryon du poisson zèbre [18]. En particulier, les images THG révèlent avec un contraste remarquable les frontières entre les cellules et leurs constituants (noyau et cytoplasme) [60, 18]. Cependant, l'interprétation des images n'est pas immédiate car un même signal de THG peut provenir de plusieurs structures (interfaces ou inclusions), et d'une variation locale du $\chi^{(3)}$ pouvant être positive ou négative. Afin de mieux comprendre l'origine des différents signaux observés nous avons effectué des acquisitions simultanées THG-FWM au cours de divisions cellulaires d'un embryon de poisson zèbre de stade précoce. Ces expériences ont été réalisées avec Nadine Peyriéras et Louise Duloquin (Institut de Neurobiologie Alfred Fessard CNRS, Gif/Yvette). Les images obtenues sont visibles sur la **Figure 3.5**.

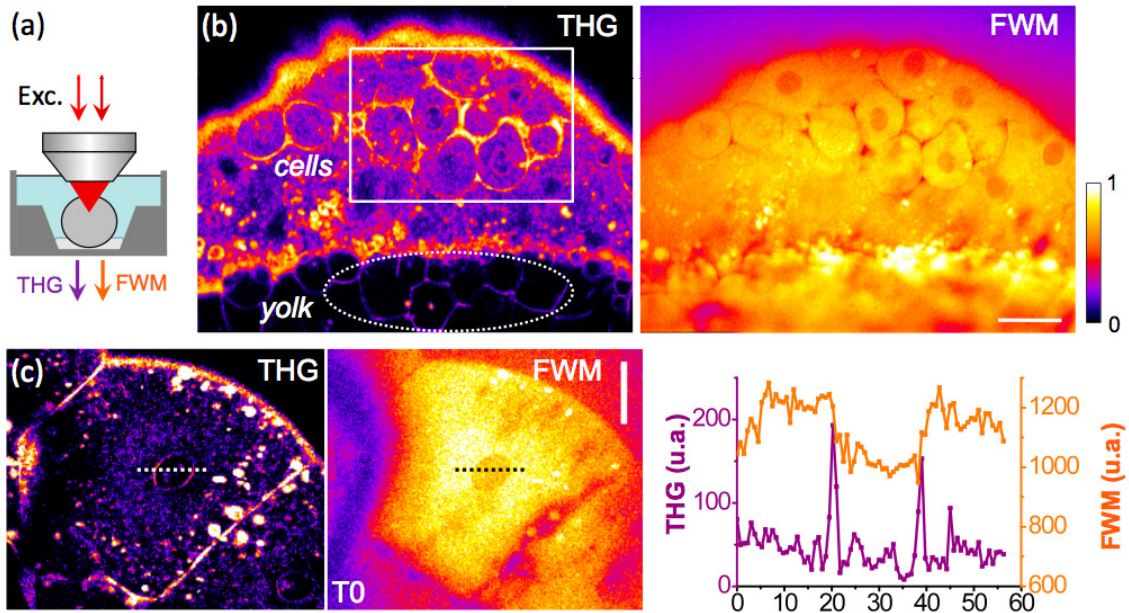


Figure 3.5: Imagerie THG-FWM d'un embryon précoce de poisson zèbre. (a) Géométrie d'imagerie. (b,c) Acquisition simultanée des deux modes d'imagerie montrant les types de contraste visibles dans les images. La THG fait apparaître les variations spatiales de la susceptibilité non linéaire $\Delta\chi^{(3)}$. Le FWM révèle en revanche la distribution de $\chi^{(3)}$. L'origine des contrastes visibles sur les images de THG pour les cellules, les noyaux, les vésicules, et les structures du yolk peut être identifiée grâce aux images de FWM. Barre d'échelle $30\ \mu\text{m}$. Temps d'acquisition par pixel $5\ \mu\text{s}$.

On peut tout d'abord constater que le signal de FWM non résonnant n'est pas

homogène spatialement et qu'il fournit une image de la morphologie des échantillons. Ceci est en accord avec les résultats obtenus pour les mesures de susceptibilité non linéaire prédisant que des milieux différents (par exemple eau/huile) possèdent des susceptibilités non linéaires différentes. Cela a notamment des implications pour la microscopie CARS, car en présence de résonance le signal mesuré résulte d'interférences entre le FWM non résonnant et résonnant $I_{CARS} \propto |\chi^{(3)r}|^2 + |\chi^{(3)nr}|^2 + 2\chi^{(3)nr} \Re(\chi^{(3)r})$ [206, 121]. Ainsi le FWM non résonnant peut compliquer la détection de signaux résonnants peu intenses ou comparables au signal non résonnant. Pour résoudre ce problème plusieurs méthodes ont été proposées (excitation et détection résolues en polarisation, et diffusion Raman stimulée) : [122, 141, 123, 124].

On peut également remarquer que les images de THG et de FWM sont corrélées : loin des résonances la THG révèle les variations spatiales de la susceptibilité non linéaire $\Delta\chi^{(3)}$, alors que le FWM est un indicateur des niveaux de $\chi^{(3)}$ sondés par la THG. Par exemple, la THG produit des images contrastées au niveau des contours cellulaires et des frontières noyaux/cytoplasmes suggérant que ces trois milieux possèdent des propriétés optiques différentes. Cette hypothèse est confirmée par les images de FWM dans lesquelles une baisse du signal est détectée autour de chaque cellule et dans les noyaux par rapport au cytoplasme. Le FWM indique donc que le milieu inter-cellulaire a un $\chi^{(3)}$ moyen à l'échelle du volume focal plus faible que le cytoplasme et que le signal THG n'est pas du à une accumulation locale de lipides.

Enfin, les signaux obtenus dans la région du vitellus sont également remarquables. Chez l'embryon précoce de poisson zèbre, le vitellus est formé de globules séparées par des interstices [208]. Alors que les contours des globules sont visibles en THG, l'ensemble du vitellus produit un signal fort et non contrasté pour le FWM. À partir des rapports entre les signaux THG pour des interfaces suivant xy et xz il peut être estimé que les interstices entre les globules ont une largeur inférieure à 500 nm [18]. Étant donné que les signaux varient comme le carré du volume cohérent il n'est donc pas surprenant de ne pas distinguer ces interfaces dans les images de FWM (**Figure 3.5(b)**). Ainsi, ces observations confirment que les images de THG possèdent une meilleure sensibilité aux variations spatiales de $\chi^{(3)}$. Cependant les images sont difficiles à interpréter car plusieurs géométries et valeurs de $\Delta\chi^{(3)}$ peuvent donner un même signal. Les images FWM peuvent donc être utilisées pour lever ces ambiguïtés.

3.2.7 Effets de structures dans les échantillons

Nous allons maintenant nous intéresser aux signaux produits pour des géométries plus complexes que de simples interfaces entre deux milieux homogènes. Pour cela nous allons considérer des milieux de susceptibilité moyenne constante et de granularité variable. Une modélisation simple de ces milieux peut être obtenue à l'aide de structures tridimensionnelles de type damier : alternance de domaines cubiques de susceptibilité non linéaire $\chi_1^{(3)} = 0$ et $\chi_2^{(3)} = 1$ (**Figure 3.6(a)**). Nous avons effectué ces simulations afin de mieux comprendre les origines des contrastes que nous avons pu observer dans les cellules d'embryon de poisson zèbre. En effet, dans les images le signal de FWM est relativement constant sur l'ensemble du cytoplasme alors que le signal de THG est très hétérogène (**Figure 3.5(c)**).

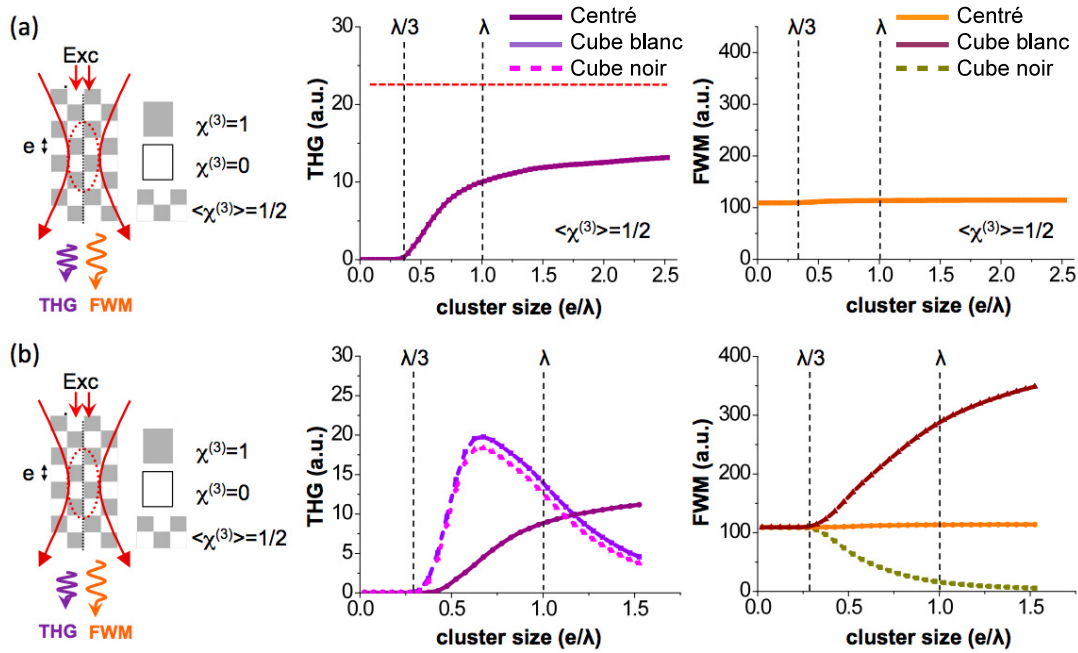


Figure 3.6: Calcul de l'intensité THG et FWM dans le cas d'un milieu tridimensionnel de granularité variable et de susceptibilité non linéaire moyenne $\langle \chi^{(3)} \rangle$ constante. (a) Le faisceau est centré sur un coin de cube et la granularité varie entre $\lambda/20$ et $2,5\lambda$ ce qui permet d'explorer des structures différentes pour une susceptibilité non linéaire constante à l'échelle du volume focal. (b) Le faisceau est centré sur un cube blanc ou noir et la granularité varie entre $\lambda/20$ et $1,5\lambda$. On peut voir que la THG et le FWM ont des réponses différentes aux structures. Longueurs d'onde d'excitation $\lambda_1 = 1,2\mu\text{m}$ et $\lambda_2 = 0,8\mu\text{m}$, ouverture numérique $NA = 1,2$.

Les résultats obtenus sont visibles sur la **Figure 3.6**. Nous nous sommes d'abord

intéressés au cas où un coin de cube est centré sur le volume focal. Dans ce cas, la susceptibilité non linéaire à l'échelle du volume focal $\langle \chi^3 \rangle$ est indépendante de la taille caractéristique du maillage qui varie entre $\lambda/20$ et 2.5λ (**Figure 3.6(b)**). On peut remarquer que le signal FWM ne dépend pas de la granularité alors que l'intensité THG varie uniquement pour des structures comprises entre $\lambda/3$ et λ . Ces résultats peuvent être interprétés de la façon suivante. Pour une granularité $e \ll l^{THG}$ le milieu est homogène à l'échelle des longueurs d'onde impliquées et par conséquent $THG \rightarrow 0$ et $FWM \propto \langle \chi^{(3)} \rangle^2$. En revanche pour des granularités comprises entre $\lambda/3$ et λ le milieu n'est plus homogène à l'échelle de la longueur de cohérence. Ainsi, un signal THG peut être observé car les interférences sont partiellement non destructives alors que $\langle \chi^{(3)} \rangle$ et le signal de FWM sont toujours inchangés. Finalement, pour $e \gg \lambda$ la géométrie ressemble à des interfaces multiples et un signal constant pour la THG et le FWM est prédit.

En réalité la situation est plus complexe que celle que nous venons de décrire, car le signal mesuré dépend également de la position des structures par rapport au volume focal. Pour décrire plus justement cette géométrie nous avons donc considéré deux cas supplémentaires : (i) le volume focal est centré sur un cube de susceptibilité $\chi^3 = 0$, (ii) il est centré sur un cube de susceptibilité $\chi^3 = 1$. Pour le premier cas $\langle \chi^3 \rangle$ diminue avec la granularité alors que pour le deuxième cas $\langle \chi^3 \rangle$ augmente. On peut remarquer que le signal de FWM varie toujours comme $\langle \chi^3 \rangle$ alors que le signal de THG ressemble maintenant à celui d'un objet isolé (**Figure 3.6(b)**).

Finalement en présence de milieux granulaires ($\lambda/3 < e < \lambda/5$) on peut s'attendre à ce que les signaux de THG et de FWM dépendent tous deux de la granularité car la valeur moyenne et la variance des signaux doivent varier avec la taille des structures balayées (**Figure 3.6(b)**). En effet, quelle que soit la position des structures sondées par rapport aux faisceaux excitateurs la dispersion entre les signaux THG et FWM augmente tout comme la courbe moyenne attendue (résultats plus prononcés pour la THG). Cependant si de telles variations peuvent être observées expérimentalement pour la THG car les images se construisent sur un fond noir, elles sont difficilement observables pour le FWM à cause du bruit de photon du signal moyen limitant la sensibilité aux petits signaux. Cette interprétation pourrait rendre compte des contrastes que l'on peut observer dans le cytoplasme des cellules du poisson zèbre, car malgré une hétérogénéité du signal de THG le signal de FWM semble invariant (**Figure 3.7(a)**). D'autre part, l'évolution des contrastes dans les cellules au cours des cycles de division a également attiré notre attention. Après la disparition

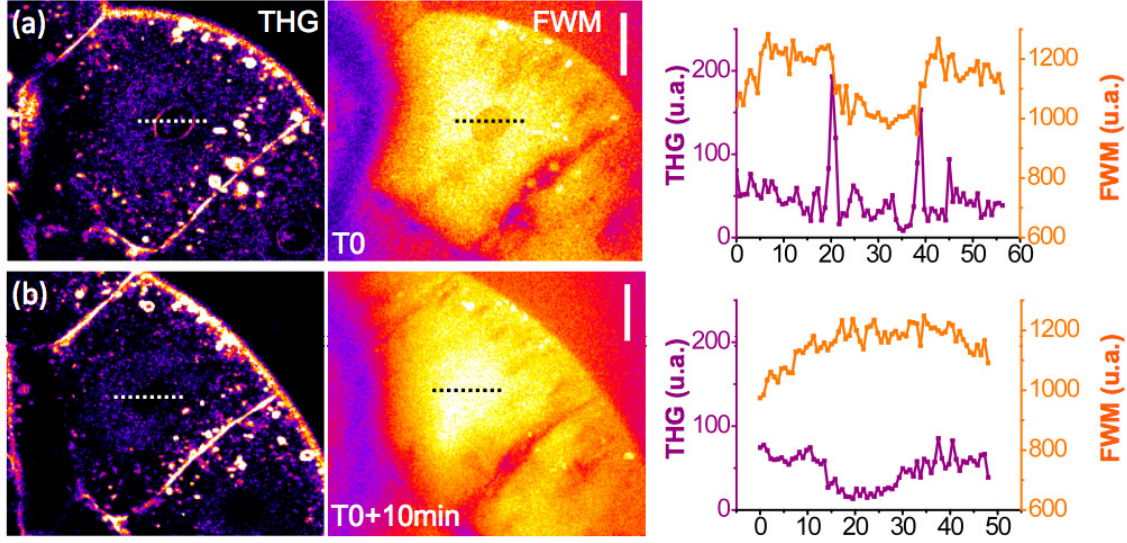


Figure 3.7: Imagerie THG-FWM d'un embryon précoce de poisson zèbre. (a,b) Cellule avant et après la disparition de l'enveloppe nucléaire. Barre d'échelle $30\ \mu\text{m}$. Temps d'acquisition par pixel $5\ \mu\text{s}$

du signal d'interface noyau/cytoplasme en THG (correspondant à la disruption de l'enveloppe nucléaire) nous avons pu remarquer que le signal de FWM s'homogénéise sur l'ensemble de la cellule alors que le signal de THG est quasi nul au niveau du noyau et d'aspect granulaire dans le cytoplasme. Nous avons attribué ces variations à une différence d'organisation entre la région nucléaire et le cytoplasme, en lien avec les résultats que nous avons obtenus pour les simulations sur des milieux granulaires. Cependant plus de données sont nécessaires pour clairement identifier ces contrastes observés pendant les divisions cellulaires.

3.2.8 Effets des résonances électroniques

En présence de résonances électroniques, par exemple en se rapprochant d'une absorption à deux photons, la partie résonnante de la susceptibilité non linéaire peut être exaltée par effet paramétrique stimulé (SPE), ce qui offre potentiellement une source de contraste spécifique pour l'imagerie FWM (**Figure 3.8(a)**). Quelques études récentes ont proposé d'utiliser ce mécanisme en microscopie non linéaire [199, 202], avec comme perspective de sonder la présence d'absorbeurs sans photo-blanchiment[209]. Ces résultats nous ont paru particulièrement intéressants car beaucoup de marqueurs endogènes (NADH, elastine, collagène, etc.) sont exci-

tables à deux photons par le faisceau de pompe dans les conditions utilisées pour la microscopie THG-FWM par exemple.

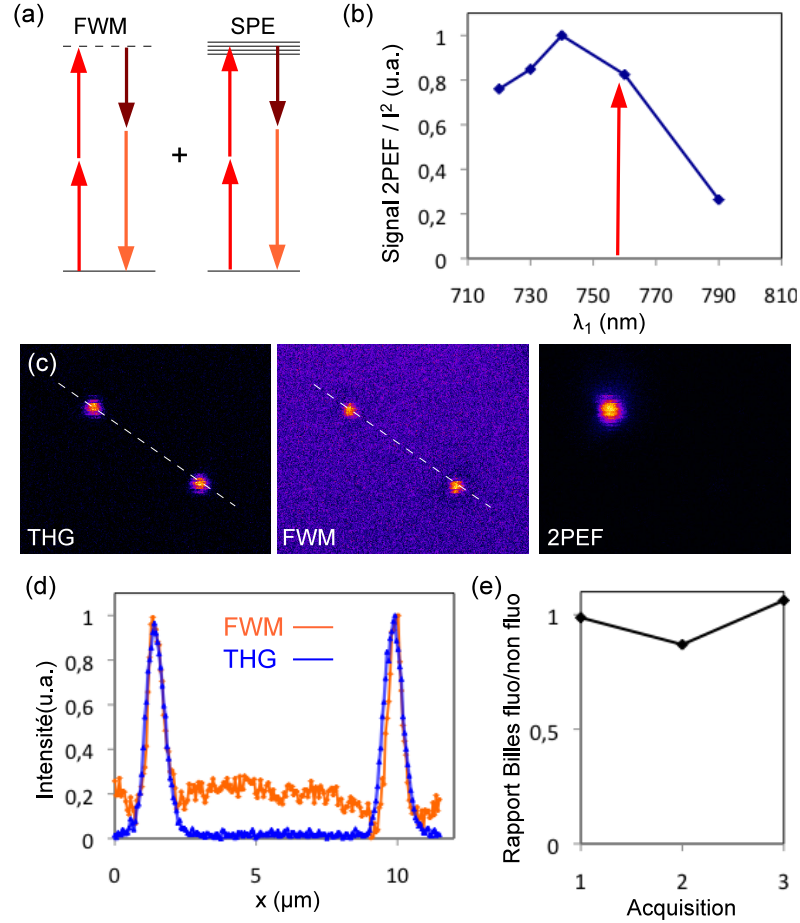


Figure 3.8: (a) Signaux résultant d'un mélange à quatre ondes hors résonances vibrationnelles. (b) Spectre d'absorption à deux photons des billes fluorescentes utilisées. (c) Imagerie THG-FWM-2PEF simultanée de billes fluorescente et non fluorescente de même taille : $0,5 \mu\text{m}$. (d) Profils extraits des images de THG et de FWM. (e) Rapport d'intensité des signaux FWM pour plusieurs couples de billes fluorescentes et non fluorescentes. Nous avons normalisé pour chaque couple l'intensité FWM par le signal mesuré en THG.

Nous avons donc voulu vérifier si ce principe fournissait une source de contraste exploitable en microscopie. Pour cela, nous avons tout d'abord cherché à vérifier si un signal SPE comparable au signal FWM non résonnant était effectivement produit par des objets fluorescents modèles, tels que des billes de polystyrène marquées. Le spectre d'absorption à deux photons des billes fluorescentes que nous avons utilisées

est visible sur la **Figure 3.8(b)**. Celui-ci est maximal entre 730 et 760 nm, nous avons donc utilisé des trains d’impulsions synchronisés de longueurs d’onde centrales $\lambda_1 = 760$ et $\lambda_2 = 1100$ nm pour produire un signal de FWM. Afin de dissocier la contribution du signal provenant du SPE de celle du FWM nous avons imagé des billes marquées et non marquées de même taille nominale $0,5 \mu\text{m}$ (**Figure 3.8(c–e)**).

La comparaison des images FWM et de fluorescence permet d’identifier les billes qui sont fluorescentes, alors que les images de THG permettent de calibrer la taille des billes. Cela est nécessaire pour dissocier les variations de signal induites par des tailles de billes différentes par rapport à celles dues au SPE. Nous avons mené cette expérience pour plusieurs couples de billes fluorescentes/non fluorescentes et nos résultats montrent que la contribution du signal SPE est trop faible pour être visible par rapport au FWM provenant des autres molécules non fluorescentes du milieu dans nos conditions expérimentales. Ce résultat négatif indique que le signal SPE spécifique est faible pour des concentrations en absorbeurs même importantes et qu’il sera donc probablement très difficile à détecter ou isoler dans le cas d’espèces endogènes (**Figure 3.9**).

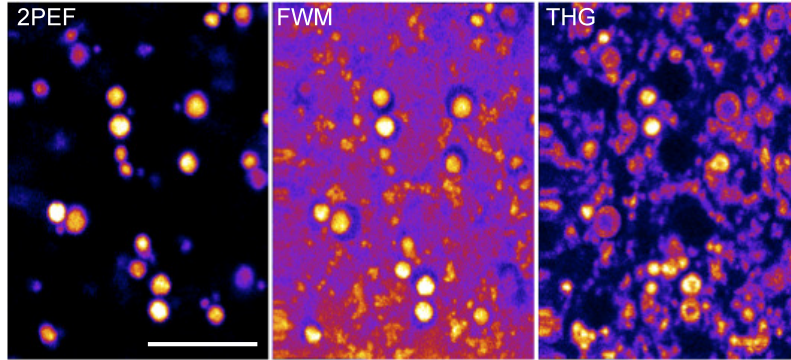


Figure 3.9: Images 2PEF–FWM–THG de gouttelettes de vitellus d’un embryon de drosophile. Ces structures produisent un signal fort en fluorescence excitée à deux photons que l’on retrouve dans les images de FWM. Cependant les images de THG montrent que la susceptibilité non linéaire de ces gouttelettes est différentes de celle du milieu les entourant. Ce contraste non résonnant est suffisant pour expliquer les signaux FWM. Barre d’échelle $50 \mu\text{m}$.

3.3 Microscopie multimodale cohérente et incohérente

3.3.1 Imagerie THG combinée à la fluorescence

Comme nous avons pu le voir, la microscopie THG révèle les variations des propriétés optiques des milieux à l'échelle du volume focal avec une sensibilité limitée par le bruit de photon, ce qui rend ce mécanisme de contraste adapté pour l'imagerie structurale d'échantillons biologiques. Ainsi, il semble intéressant de combiner ce mode de contraste avec l'imagerie de fluorescence multi-photonique afin de disposer d'une image structurale aidant à l'interprétation des images de fluorescence. Au cours de cette section nous allons présenter diverses implémentations de cette stratégie et quelques exemples d'applications qui pourraient en découler.

3.3.1.1 Imagerie THG combinée à la fluorescence

L'imagerie THG d'un rapporteur fluorescent est l'implémentation la plus directe de l'imagerie structurale couplée à l'imagerie de fluorescence car les impulsions générant les signaux de THG peuvent être simultanément utilisées pour exciter un chromophore. À cause de raisons technologiques (faible efficacité quantique des détecteurs et mauvaise transmission des optiques dans l'ultraviolet), des faibles coefficients d'absorption des tissus entre 1 000-1 400 nm, et de la baisse des coefficients de diffusion avec la longueur d'onde, la THG est généralement produite par des impulsions de longueur d'onde centrale comprise entre 1 000 et 1 400 nm. Ainsi l'imagerie THG est particulièrement compatible avec l'imagerie à deux photons de protéines rouge-orange [78, 80]. D'autre part, il existe plusieurs types de sources lasers pour lesquelles les impulsions dans l'infra-rouge 1 000-1 400 nm sont générées à partir d'un laser de pompe émettant dans la plage de longueurs d'onde : 700-1 000 nm, si bien que l'imagerie THG-deux photons est également possible pour des protéines bleues ou vertes en utilisant les impulsions du laser de pompe ou en synchronisant les trains d'impulsion des deux lasers comme nous avons pu le voir dans les parties précédentes. Cependant, si l'imagerie de fluorescence biphotonique est possible avec des impulsions de durée relativement longue au foyer de l'objectif (200-400 fs), la génération de troisième harmonique requiert des impulsions courtes (préférentiellement 100 fs ou moins).

Pour coupler l'imagerie THG avec l'imagerie de fluorescence d'une, deux, ou trois

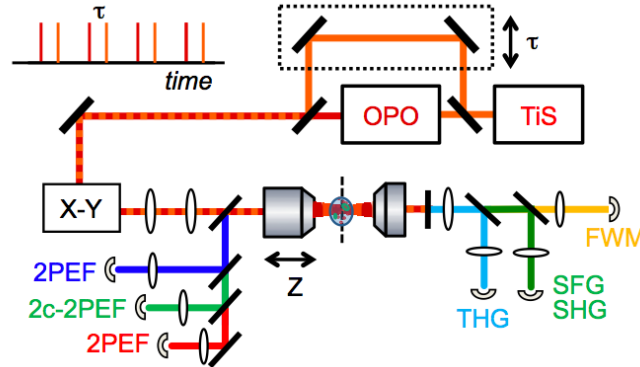


Figure 3.10: Montage expérimental. Un laser titane saphir (TiS) et un oscillateur paramétrique optique sont recombinaés spatialement et superposés temporellement avant d'être envoyés dans un microscope à balayage.

protéines fluorescentes, nous avons donc utilisé un système produisant des trains d'impulsions synchronisées pour lequel l'un des deux faisceaux a un spectre large et la dispersion est pré-compensée. Le schéma de principe est visible **Figure 3.10**. Un oscillateur paramétrique optique à spectre large (OPO) dont la dispersion est pré-compensée est pompé de façon synchrone par un laser titane saphir. Les faisceaux d'excitation sont recombinaés spatialement à l'aide d'un miroir dichroïque et synchronisés temporellement à l'aide d'une ligne à retard, pour finalement être envoyés vers le microscope que nous avons présenté au premier chapitre. Les différents signaux étant créés dans des bandes spectrales différentes, leur détection peut se faire simultanément sur plusieurs détecteurs.

3.3.1.2 Résultats avec un fluorophore

Une situation intéressante consiste à utiliser des trains d'impulsion synchronisés pour l'imagerie morphologique combinée à l'imagerie de fluorescence d'une protéine verte ne pouvant être excitée efficacement par l'un des deux trains d'impulsions. Pour vérifier la faisabilité d'une telle stratégie nous avons filmé en THG-deux photons la phase de cellularisation d'un embryon de drosophile exprimant une myosine-GFP. Nous avons utilisé pour cela des impulsions synchronisées de longueur d'onde centrale : $\lambda_1 = 820 \text{ nm}$ et $\lambda_2 = 1175 \text{ nm}$ permettant d'exciter la GFP avec une longueur d'onde équivalente $\lambda_3 = 965 \text{ nm}$. Les résultats visibles sur la **Figure 3.11** montrent que l'imagerie simultanée THG et de fluorescence d'une GFP peut se faire efficacement à l'aide d'impulsions synchronisées.

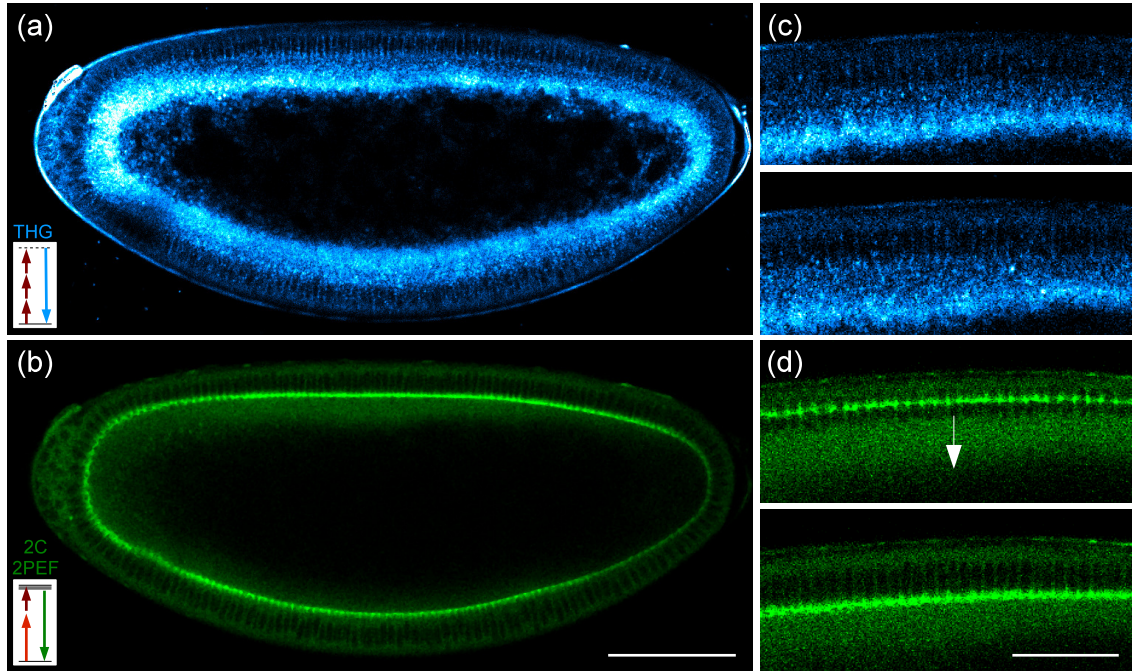


Figure 3.11: Imagerie simultanée THG-GFP d'un embryon de drosophile exprimant une myosine-GFP. (a,b) Image THG et GFP de l'embryon de drosophile au cours de sa phase de cellularisation. La myosine est alors localisée au niveau du front de cellularisation comme on peut le voir sur l'image de GFP. (c,d) Extrait d'images enregistrées en début et fin de séquence montrant la progression du front de cellularisation. Barre d'échelle : (a,b) $100\ \mu\text{m}$, (c,d) $50\ \mu\text{m}$. Temps d'acquisition par pixel $5\ \mu\text{s}$

3.3.1.3 Résultats avec trois fluorophores

Plus généralement, les stratégies reposant sur des trains d'impulsions synchronisés permettent de combiner l'imagerie THG à l'imagerie de trois chromophores distincts. Pour cette démonstration nous avons suivi la phase de gastrulation d'un embryon de drosophile présentant une fluorescence endogène bleue (NADH) localisée dans les vésicules du yolk et exprimant des protéines vertes (GFP) et rouges (RFP) localisées au niveau des membranes cellulaires et de la chromatine. Les différents fluorophores ont été excités par des impulsions synchronisées de longueurs d'onde centrales $\lambda_1 = 820\text{ nm}$ et $\lambda_2 = 1175\text{ nm}$ ce qui nous a permis de détecter simultanément les différents signaux sur quatre détecteurs différents avec une résolution temporelle de 45 s par pile de 18 images espacées tous les $3,0\ \mu\text{m}$ (**Figure 3.12** adapté de [140]).

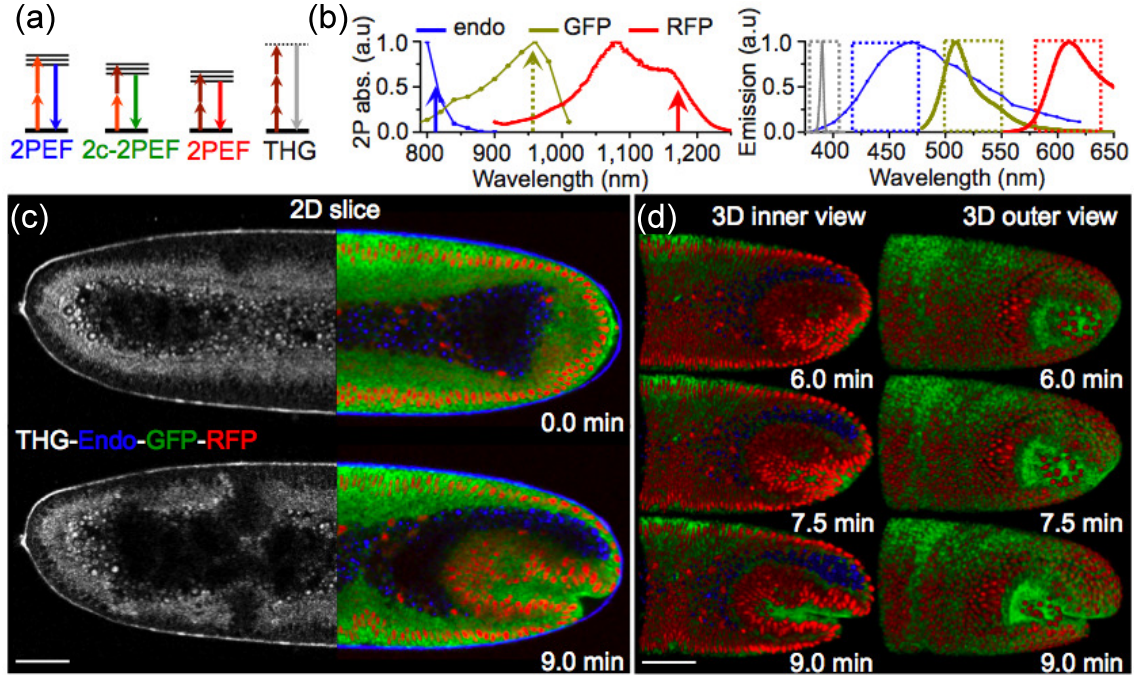


Figure 3.12: Imagerie THG combinée à l'imagerie simultanée de trois fluorophores différents dans un embryon de drosophile. (a,b) Les différents signaux ont été produits à partir d'impulsions synchronisées de longueurs d'onde centrales $\lambda_1 = 820$ nm et $\lambda_2 = 1175$ nm et détectés dans quatre bandes spectrales différentes. (c,d) Image du développement d'un embryon de drosophile au cours de sa phase de gastrulation pour une résolution temporelle de 45 s par pile de 18 images espacées tous les $3,0 \mu\text{m}$. Barre d'échelle $50 \mu\text{m}$. Temps d'acquisition par pixel $5 \mu\text{s}$.

3.3.2 Imagerie multimodale de contrastes endogènes

Lorsque l'insertion de marqueurs exogènes n'est pas possible ou souhaitée, il est intéressant de combiner des contrastes endogènes pour sonder les tissus. Comme nous avons pu le voir dans la **Section 3.2**, une approche consiste à coupler l'imagerie THG avec un mode de contraste complémentaire tel que le FWM car cela permet d'obtenir des images morphologiques pouvant être interprétées sans ambiguïté [207]. Plus généralement, il est également possible d'utiliser des modes de contraste supplémentaires donnant par exemple accès à l'organisation ou à la composition chimique des milieux. Nous présenterons dans cette section quelques exemples d'imagerie multimodale réalisés avec des impulsions femtosecondes synchronisées permettant de répondre à ces problématiques.

3.3.2.1 Imagerie de quatre signaux endogènes

Si l'association de deux types de signaux est souvent utilisée en microscopie non linéaire (SHG-2PEF [96, 95], THG-2PEF [61], THG-SHG [18]), la détection simultanée de quatre signaux non linéaires endogènes tels que SHG, THG, 2PEF et FWM a été très peu rapportée jusqu'ici pour des raisons de complexité de mise en oeuvre. Par exemple bien que les lasers à spectre large permettent de produire simultanément quatre contrastes non linéaires endogènes (SHG, THG, 2PEF et FWM) à partir d'un seul faisceau [210], l'utilisation de telles sources dans un système à balayage pour l'imagerie rapide et robuste d'échantillons biologiques reste à démontrer. Une alternative consiste à utiliser deux bandes d'excitation spectralement étroites. Ainsi les signaux de SHG, de THG et de fluorescence sont produits par des interactions non linéaires à un faisceau alors que le FWM résulte d'une interaction entre les deux faisceaux synchronisés. Une telle stratégie est illustrée sur la **Figure 3.13** qui présente l'imagerie simultanée de quatre signaux non linéaires (THG-FWM-SHG-2PEF) sur un némathode anesthésié (collaboration Renault Legouis CNRS centre génétique moléculaire, Gif/Yvette).

Dans cette expérience, les signaux cohérents THG, FWM et SHG sont détectés vers l'avant et séparés à l'aide de dichroïques alors que le signal de fluorescence 2PEF est détecté vers l'arrière (**Figure 3.10**). De forts signaux de THG et de FWM peuvent être observés sur les vésicules des cellules épithéliales que l'on peut difficilement marquer avec des protéines fluorescentes [211]. Ces compartiments sont principalement constitués de lipides et ont été observés précédemment par microscopie CARS [51, 211, 212]. Les images de THG et de FWM apportent des informations complémentaires sur la structure comme pour l'imagerie d'embryons de poissons zèbres. Par exemple, les signaux de THG délimitent les contours du pharynx et de la vulve alors que les signaux de FWM renseignent sur la distribution générale du $\chi^{(3)}$. La fluorescence endogène produite par le laser titane-saphir provient principalement des lysosomes des cellules intestinales [213, 211]. Enfin, un signal de SHG produit par l'OPO provient spécifiquement des muscles du pharynx, de reptation et de la vulve [196]. On note qu'une partie résiduelle du signal de fluorescence était visible dans l'image de SHG à cause d'un filtrage imparfait et que nous l'avons retiré à partir d'une combinaison linéaire des images brutes.

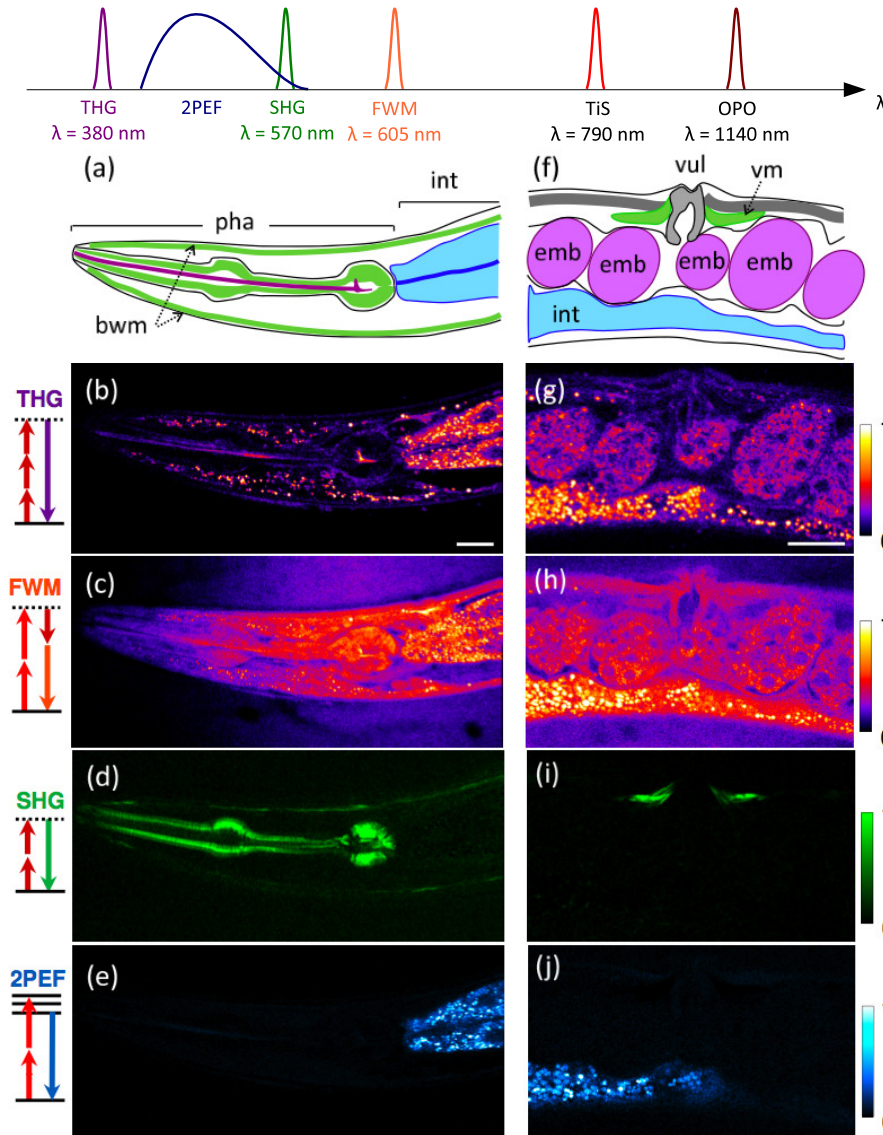


Figure 3.13: Imagerie multimodale simultanée de quatre signaux non linéaires intrinsèques (THG-FWM-SHG-2PEF) effectuée sur un nématode de type sauvage (*C. Elegans*). Les quatre signaux ont été enregistrés à partir de différentes parties du nématode adulte : le pharynx (a-e), et le bas ventre (f-j). Les images THG et FWM apportent des informations sur la morphologie du vers, alors que les images SHG révèlent spécifiquement les muscles, et que les images de fluorescence font apparaître des vésicules intestinales. pha : pharynx; int : intestin; bwm : muscles de reptation; emb : embryon; vul : vulve; vm : muscle de la vulve. Barre d'échelle $20 \mu\text{m}$. Temps d'acquisition par pixel $10 \mu\text{s}$. (collaboration Renaud Legouis, CNRS-Centre de Génétique Moléculaire).

3.3.2.2 Imagerie THG-CARS

Étant donné que l'imagerie simultanée THG-FWM est possible avec des trains d'impulsions femtosecondes synchronisés, il en est de même pour l'imagerie THG-CARS à condition de régler la différence de fréquence des lasers sur une résonance vibrationnelle. Cependant, les prérequis pour l'imagerie THG et CARS sont antinomiques. L'optimisation des signaux THG nécessite des impulsions courtes, alors que l'imagerie CARS requiert des spectres d'excitation étroits afin de sonder avec une bonne spécificité le spectre vibrationnel des molécules.

La durée des impulsions en microscopie CARS est de l'ordre de quelques picosecondes ($\tau = 5$ ps correspondant à une résolution spectrale en amplitude de 4 cm^{-1}) ce qui permet par exemple de résoudre les modes d'élongation CH_2 des lipides à 2840 cm^{-1} et CH_3 (protéines) à 2870 cm^{-1} . Avec les impulsions relativement longues de notre chaîne accordable $\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$ ($\tau_{\text{TiS}/\text{OPO}} = 100/280$ fs pour des impulsions limitées par transformée de Fourier et $\tau_{\text{TiS}/\text{OPO}} = 160/390$ fs au foyer du microscope) on peut résoudre les modes CH_2 (lipides) à 2840 cm^{-1} et OH (eau) à $3100\text{--}3600 \text{ cm}^{-1}$ avec des longueurs d'onde d'excitation valant par exemple $\lambda_1 = 830 \text{ nm}$ ($\sigma_1 = 12048 \text{ cm}^{-1}$) et $\lambda_2 = 1086 \text{ nm}$ ($\sigma_1 = 9208 \text{ cm}^{-1}$) (**Figure 3.14(a)**). Cependant pour de telles durées d'impulsions d'OPO on peut s'attendre à produire entre 9 et 16 fois moins de signal en THG que dans les configurations utilisées précédemment pour l'imagerie simultanée THG-deux photons (durée d'impulsions d'OPO $\tau_{\text{OPO}} = 100$ fs).

De plus, en tenant compte des propriétés des impulsions ($\text{TiS}_1/\text{OPO}_1$) la résolution spectrale à mi-hauteur en amplitude donnée par la largeur de TF ($E_1(t) E_2(t)^*$) est alors de 234 cm^{-1} (impulsion limitée par transformée de Fourier) ou de 197 cm^{-1} (en tenant compte de la dispersion des nos impulsions). Comme on peut le voir sur la (**Figure 3.14(b)**), une telle configuration permet d'exciter sélectivement les lipides par rapport à l'eau, mais ne permet cependant pas de résoudre les différents modes de vibrations CH_2/CH_3 . D'autre part, étant donné que la résolution spectrale est actuellement plus large que celle des raies vibrationnelles spécifiques des lipides, il serait avantageux d'utiliser des impulsions encore plus étroites spectralement pour augmenter la sélectivité CARS et réduire le signal FWM non spécifique, mais cela se ferait au détriment du niveau de signal THG. Une solution pourrait consister à utiliser deux répliques spatiales des trains d'impulsions pour produire efficacement avec une des répliques un signal CARS/SRS spécifique en façonnant les impulsions,

et pour produire avec la deuxième réplique non façonnée les autres signaux non linéaires (THG-SHG-2PEF).

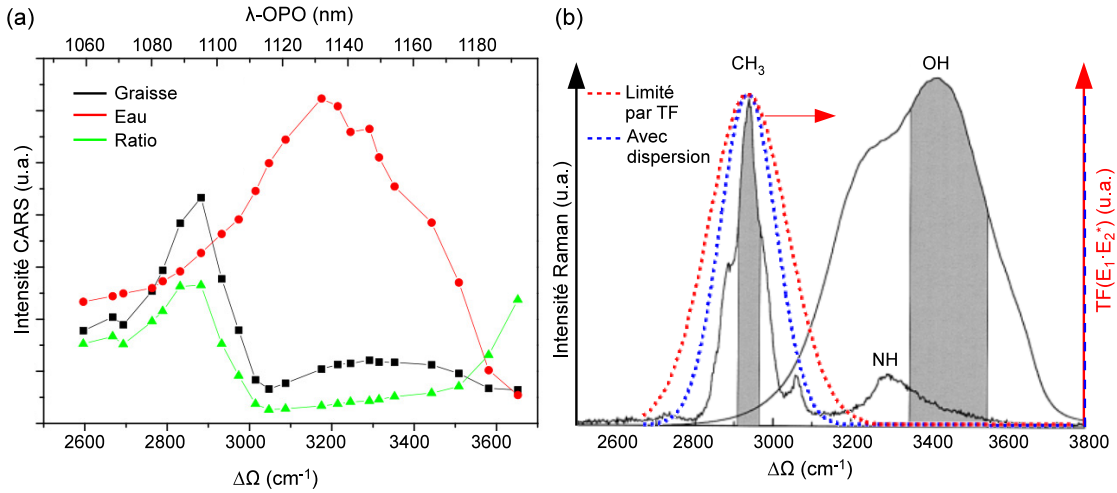


Figure 3.14: Microspectroscopie CARS de structures lipidiques et aqueuses (gouttelette d'huile dans de l'eau) au moyen d'impulsions femtoseconde. (a) Spectre CARS de régions aqueuses et lipidiques pour des impulsions synchronisées faisant approximativement 160 fs (TiS₁) et 390 fs (OPO₁) (les impulsions présentent de la dispersion en sortie des lasers et en accumulent à la traversée des optiques. Leurs spectres correspondent à des impulsions limitées par transformée de Fourier de durées respectives 100 fs et 280 fs). (b) Spectre Raman de l'eau et du *Stratum Corneum* adapté de [214]. Pour comparaison nous avons rajouté les résolutions spectrales correspondant à nos impulsions dans le cas où elles seraient limitées par transformée de Fourier, et telles qu'elles sont au foyer du microscope.

3.4 Conclusions et perspectives

Nous avons tout d'abord montré que la microscopie THG-FWM pouvait être mise en œuvre simplement et efficacement en synchronisant deux trains d'impulsions tels que ceux générés par un laser titane-saphir et un oscillateur paramétrique optique. Nous avons également vérifié expérimentalement que le signal FWM non résonnant reflète directement les propriétés optiques sondées par la THG en l'absence de résonance, à savoir $\chi^{(3)}(-3\omega, \omega, \omega, \omega)$. Ainsi l'imagerie THG-FWM peut être utilisée pour mieux interpréter les signaux THG comme nous l'avons montré dans le cas des divisions cellulaires dans l'embryon de poisson zèbre. Par ailleurs, bien que certaines études aient mis en évidence une contribution électronique en présence d'absorption

à deux photons [199, 202], nous n'avons pu constater un tel effet pour des concentrations en absorbeurs présentes dans des billes fluorescentes. Cela suggère que les contrastes que nous avons pu observer dans les tissus proviennent majoritairement des contributions $\chi^{(3)}$ sans résonance électronique.

Plus généralement, nous avons montré que le mélange de deux longueurs d'onde d'excitation au moyen d'impulsions femtosecondes synchronisées permet de combiner efficacement dans un microscope plusieurs effets non linéaires tels que la fluorescence (2PEF), la génération de seconde (SHG) et troisième (THG) harmonique, ainsi que le mélange à quatre onde (FWM). Cependant cette approche n'est pas directement compatible avec l'imagerie spécifique de signaux vibrationnels type CARS ou SRS. Ainsi, il pourrait être intéressant de développer des schémas d'excitation hybrides combinant impulsions femtosecondes et picosecondes pour combiner efficacement des signaux vibrationnels (CARS, SRS), harmoniques et de fluorescence.

Combined third-harmonic generation and four-wave mixing microscopy of tissues and embryos

Pierre Mahou,¹ Nicolas Olivier,¹ Guillaume Labroille,¹
Louise Duloquin,² Jean-Marc Sintes,¹ Nadine Peyri  ras,²
Renaud Legouis,³ Delphine Débarre,¹ and Emmanuel Beaurepaire¹

¹Laboratory for Optics and Biosciences, Ecole Polytechnique ParisTech, CNRS, and
INSERM U696, Palaiseau, France,

²Alfred Fessard Institute for Neurobiology (INAF), CNRS, Gif/Yvette, France,

³Center for Molecular Genetics (CGM), CNRS, Gif/Yvette, France

emmanuel.beaurepaire@polytechnique.edu

Abstract: Nonlinear microscopy can be used to probe the intrinsic optical properties of biological tissues. Using femtosecond pulses, third-harmonic generation (THG) and four-wave mixing (FWM) signals can be efficiently produced and detected simultaneously. Both signals probe a similar parameter, *i.e.* the real part of the third-order nonlinear susceptibility $\chi^{(3)}$. However THG and FWM images result from different phase matching conditions and provide complementary information. We analyze this complementarity using calculations, z-scan measurements on water and oils, and THG-FWM imaging of cell divisions in live zebrafish embryos. The two signals exhibit different sensitivity to sample size and clustering in the half-wavelength regime. Far from resonance, THG images reveal spatial variations $|\Delta\chi^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega)|$ with remarkable sensitivity while FWM directly reflects the distribution of $\chi^{(3)}(-2\omega_1 + \omega_2; \omega_1, -\omega_2, \omega_1)$. We show that FWM images provide $\chi^{(3)}$ maps useful for proper interpretation of cellular THG signals, and that combined imaging carries additional structural information. Finally we present simultaneous imaging of intrinsic THG, FWM, second-harmonic (SHG) and two-photon-excited fluorescence (2PEF) signals in live *Caenorhabditis elegans* worms illustrating the information provided by multimodal nonlinear imaging of unstained tissue.

  2011 Optical Society of America

OCIS codes: (180.4315) Nonlinear microscopy; (170.3880) Medical and biological imaging; (190.4160) Multiharmonic generation; (190.4380) Nonlinear optics, four-wave mixing

References and links

1. W. R. Zipfel, R. M. Williams, and W. W. Webb, "Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences," Nat. Biotechnol. **21**, 1369-1377 (2003).
2. W. Mohler, A. C. Millard, and P. J. Campagnola, "Second harmonic imaging of endogenous structural proteins," Methods **29**, 97-109 (2003).
3. D. Oron, D. Yelin, E. Tal, S. Raz, R. Fachima, and Y. Silberberg, "Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy," J. Struct. Biol. **147**, 3-11 (2004).
4. C. K. Sun, S.-W. Chu, S.-Y. Chen, T.-H. Tsai, T.-M. Liu, C.-Y. Lin, and H.-J. Tsai, "Higher harmonic generation microscopy for developmental biology," J. Struct. Biol. **147**, 19-30 (2004).

- ## 1. Introduction

#153141 - \$15.00 USD Received 19 Aug 2011; revised 19 Sep 2011; accepted 19 Sep 2011; published 26 Sep 2011
(C) 2011 OSA 1 October 2011 / Vol. 2, No. 10 / BIOMEDICAL OPTICS EXPRESS 2838

a broad range of applications in the life sciences [1]. In addition to 2PEF imaging of exogenous labels and fluorescent proteins, multiphoton microscopy can be used to probe the intrinsic nonlinear optical properties of tissues. A growing literature shows that physiologically and/or structurally relevant information is obtained through the detection of coherent signals such as second-harmonic generation (SHG) [2], third-harmonic generation (THG) [3, 4, 5], or four-wave mixing (FWM) processes [6] such as coherent Raman scattering (CARS, etc) [7, 8] or stimulated parametric emission (SPE) [9]. In particular, THG imaging detects spatial variations of the electronic part of the third-order nonlinear susceptibility $\chi^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega)$ [10, 11], such as lipid inclusions in an aqueous environment [12], and has proven useful for embryo and tissue imaging applications [3, 4, 5, 13, 14]. When experimentally available, the combination of different nonlinear contrasts usually provides complementary information. Using pulsed excitation provided by a femtosecond Ti:sapphire oscillator and a synchronously pumped optical parametric oscillator (OPO), THG and four-wave mixing (FWM) signals can in principle be efficiently produced and detected simultaneously. In isotropic media exhibiting no electronic nor vibrational resonance, THG and FWM can be viewed as both probing a similar parameter, *i.e.* the real part of $\chi^{(3)}$. However THG and FWM signal levels result from different phase matching conditions. In contrast with FWM, TH coherent signal buildup in the forward direction is frustrated by the Gouy phase shift of the focused excitation beam, resulting in no THG from a homogeneous medium having normal dispersion [10, 15]. Non-resonant FWM has received relatively little attention for nonlinear microscopy applications, apart for being considered as an unwanted “non-resonant background” in CARS microscopy. However, given their different dependence on sample size, combined THG and FWM imaging of the same objects should provide more structural information than either modality alone. In this study we first discuss the contrast mechanisms of THG and FWM imaging as a function of sample size and geometry and we then present imaging examples from model liquids and live tissues. We discuss the properties of the images and some implications for THG and CARS microscopy. THG and FWM are shown to provide complementary information on $\chi^{(3)}$ variations, compatible with other femtosecond laser-based imaging modalities.

2. THG and FWM contrast mechanisms

In this part we first summarize a model for describing coherent nonlinear microscopy used in previous studies [16, 17], and we briefly discuss THG and FWM $\chi^{(3)}$. We use numerical simulations relying on the Debye-Wolf description of focused fields [18] and on the Green’s function formalism [19] to review the contrast mechanisms of THG and FWM microscopies, and to highlight their different sensitivities to sample structure and size in the half-wavelength regime.

2.1. Excitation fields near focus

Throughout this paper, we assume that the excitation beams entering the objective are Gaussian with linear polarization along the x axis. In this case the vectorial nature of the focused fields can be neglected for parametric processes in isotropic media [16, 25, 17]. The x component of the field near focus can be expressed as [19]:

$$E_f(\rho, \phi, z) = \int_0^{2\pi} \int_0^{\theta_{\max}} \exp\left(\frac{\sin^2 \theta}{f_0^2}\right) \sin \theta \sqrt{\cos(\theta)} [\cos \theta + \sin^2 \psi (1 - \cos \theta)] \cdot \exp(-ik_\omega \rho \sin \theta \cos(\psi - \phi)) \exp(-ik_\omega z \cos \theta) d\theta d\psi \quad (1)$$

where $n(\omega)$ (resp. k_ω) is the index of refraction (resp. wave vector) at the fundamental wavelength, $\theta_{\max} = \arcsin(NA/n(\omega))$, with NA being the numerical aperture of the objective, and

f_0 is the filling factor of the objective (ratio between the beam waist and the diameter of the back aperture).

2.2. THG-FWM third-order polarization and nonlinear susceptibility

The third-order polarizations induced by the focused fields are described by:

$$\mathbf{P}^{(THG)} = \chi^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega) \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} \cdot \mathbf{E} \quad (2)$$

$$\mathbf{P}^{(FWM)} = \chi^{(3)}(-(2\omega_1 - \omega_2); \omega_1, -\omega_2, \omega_1) \cdot \mathbf{E}_1 \cdot \mathbf{E}_2^* \cdot \mathbf{E}_1 \quad (3)$$

where 1 and 2 denote the two excitation fields in the case of FWM.

For isotropic media the THG and FWM nonlinear susceptibilities can be written as [7, 8, 15]:

$$\chi_{ijkl}^{(3)}(-3\omega; \omega, \omega, \omega) = \chi_{1111}^{(THG)} (\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{ik}\delta_{jl} + \delta_{il}\delta_{jk}) \quad (4)$$

$$\chi_{ijkl}^{(3)}(-(2\omega_1 - \omega_2); \omega_1, -\omega_2, \omega_1) = \chi_{1111}^{(FWM)} (\delta_{ij}\delta_{kl} + \delta_{ik}\delta_{jl}) + \chi_{1221}^{(FWM)} (\delta_{il}\delta_{jk}) \quad (5)$$

If we consider isotropic media with isotropic resonances and beams linearly polarized along the x axis, the THG and FWM third-order polarizations read:

$$P^{(THG)} = 3\chi^{(THG)} E^3(\omega) \quad (6)$$

$$P^{(FWM)} = 3\chi^{(FWM)} E_1^2(\omega_1) E_2^*(\omega_2) \quad (7)$$

The THG and FWM nonlinear susceptibility tensors then only have one independent element and can be developed as follows:

$$\chi^{(THG)} = \chi^{(THG)nr} + \chi^{(THG)r} \quad (8)$$

$$\chi^{(FWM)} = \chi^{(FWM)nr} + \chi^{(FWM)r} \quad (9)$$

where nr and r denote the nonresonant and resonant parts of the tensors. $\chi^{(THG)r}$ describes resonant THG and is related to one-, two- or three-photon absorption, see [20]. $\chi^{(FWM)r}$ denotes resonant FWM and can be related to vibrational (*e.g.* CARS) or electronic (*e.g.* stimulated parametric emission) resonance, see [6, 7, 8, 9, 21].

Several semiempirical models have been proposed for relating the nonresonant component of $\chi^{(3)}$ to linear indices [15, 22]. A generalized version of Miller's rule valid for some materials [15] proposes that $\chi^{(3)}(\omega_4, \omega_3, \omega_2, \omega_1) \approx n(\omega_4)n(\omega_3)n(\omega_2)n(\omega_1)$, so that $\chi^{(THG)} \approx n(3\omega)n(\omega)^3$ and $\chi^{(FWM)} \approx n(\omega)^4$. Far from resonance, THG and FWM can therefore be expected to probe a similar parameter $\chi^{(3)nr}$. However it is in practice uncommon to find materials that are transparent (*i.e.* non-resonant) for the frequency range involved in the processes considered here, *i.e.* encompassing ω and 3ω .

2.3. Propagation of the harmonic fields and signal creation

Once the polarization distribution near focus has been calculated, fields scattered from all positions $\mathbf{r}$ in the focal region are propagated to a position $\mathbf{R}$ in the collection optics aperture:

$$E_{FF}(\mathbf{R}) = \int_V P(\mathbf{r}) G_{FF}(\mathbf{R}-\mathbf{r}) dV \quad (10)$$

where V spans the excitation volume and $\mathbf{G}_{FF}$ is the far-field Green's function

$$G_{FF}(\mathbf{R}) = \frac{\exp(ikR)}{4\pi R} [\mathbf{I} - \mathbf{R}\mathbf{R}/R^2] \quad (11)$$

where $R = |\mathbf{R}|$ and $\mathbf{I}$ is the third-order identity tensor. Finally the total THG/FWM intensity scattered in the forward direction is estimated by integrating $|E_{FF}(\mathbf{R})|^2$ over the front aperture of a transmission-collecting objective.

2.4. Phase-matching and structure sensitivity of THG and FWM

We used the previous analysis to compare the THG and FWM signals obtained from model geometries. We first considered the “classical” geometry where the focal point is z -scanned through a xy interface between two homogeneous media having different nonlinear susceptibilities: $\chi_1^{(3)} = 0$ and $\chi_2^{(3)} = 1$. We then analyzed the situation of a two-media sample exhibiting heterogeneity in the sub-wavelength range while having a constant average $\chi^{(3)}$ over the focal region. Specifically, we considered a 3-dimensional checkerboard-like sample with variable grid size, one grid corner being centered at the focus.

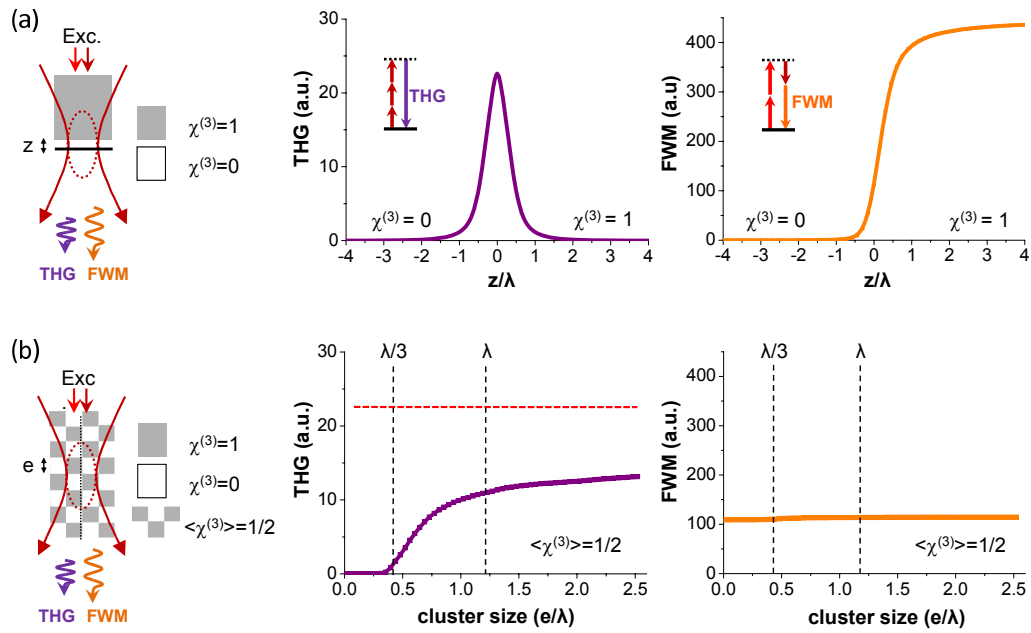


Fig. 1. Effect of phase matching and geometry on THG-FWM contrast. (a) Calculation of the THG and FWM intensity obtained when scanning a focused Gaussian beam across a transverse interface between vacuum and an isotropic nonlinear medium. The THG intensity is highest when the interface is in focus ($z = 0$). (b) Calculation of the THG and FWM intensity obtained from a three-dimensional checkerboard-like medium as a function of granularity. This geometry corresponds to a constant average value of $\langle \chi^{(3)} \rangle$ inside the excitation volume, with variable sub-wavelength spatial distribution. In this configuration, THG and FWM exhibit different sensitivities to sample granularity in the half-wavelength regime. The dashed red line on the THG graph indicates the signal level for a transverse interface geometry with similar $\langle \chi^{(3)} \rangle$, shown for comparison. Simulation conditions: $NA = 1.2$, Excitation with $\lambda_1 = 1.2\mu\text{m}$ and $\lambda_2 = 0.8\mu\text{m}$

The interface case illustrates the effect of the different phase-matching conditions for the two processes. As pointed out in previous studies, under tight focusing conditions there is no significant phase mismatch between the excitation and forward-scattered beams in FWM (or CARS), so that the coherent construction length (or effective coherence length $l_{c,eff}^{(FWM)}$) is comparable to the axial extent of the interaction volume [25]; in contrast the coherent construction length for forward-THG is smaller because phase matching is frustrated by the (tripled) Gouy phase shift of the excitation beam, so that $l_{c,eff}^{(THG)} \approx 0.7\lambda$ [16]. This results in THG being observed only near heterogeneities or interfaces, whereas FWM increases with the excited volume. Since coherent signals scale as the square of the coherence volume, THG signals are expected to be significantly smaller than FWM signals for comparable pulse energy and duration. On the other hand, THG selectively highlights spatial $\langle \chi^{(3)} \rangle$ interfaces and heterogeneities over a dark background (Fig. 1).

The case of a structured sample is more intriguing. In the geometry considered here, the average value of $\chi^{(3)}$ inside the excitation volume is constant and the sample characteristic size varies from $\lambda/20$ to 2.5λ . It is seen that FWM does not depend on sample granularity, whereas THG intensity exhibits significant variation for structure sizes in the range $\lambda/3 - \lambda$, and almost no change outside this range. This can be interpreted as follows. For granularity $e \ll l_{c,eff}^{(THG)}$ the medium may be seen as homogeneous for the THG process, and therefore $THG \rightarrow 0$ and $FWM \propto \langle \chi^{(3)} \rangle^2$. In contrast for cube sizes in the range $\lambda/3 - \lambda$ the medium is not homogeneous at the scale of the THG coherence length, and THG is observed due to partly non-destructive interferences, whereas $\langle \chi^{(3)} \rangle$ and FWM are unchanged. Finally for $e \gg \lambda$ the sample geometry resembles a corner interface with the same average $\langle \chi^{(3)} \rangle$, and constant THG and FWM signals are predicted. Although the signals can also depend on sample position, these simulations indicate that the association of THG and FWM microscopy may provide more information on the sub-wavelength $\chi^{(3)}$ spatial distribution than either modality alone, and motivates this combination.

3. Experimental results

3.1. Experimental setup

THG and FWM are third-order electronic processes, and can be efficiently produced and detected simultaneously using femtosecond pulses. The experimental setup is depicted in Fig. 2. Excitation pulses were provided by a titanium:sapphire (TiS) oscillator (80MHz, Chameleon, Coherent) and by a KTP-based synchronously pumped optical parametric oscillator (OPO) (APE). TiS and OPO pulses were overlapped using a dichroic mirror (Chroma 1000dcxr) and synchronized in the sample using a delay line. Imaging was performed on a lab-built microscope incorporating galvanometer mirrors (GSI Lumonics), photomultiplier tubes (PMT, SensTech), counting electronics, and water immersion objectives (Olympus). TiS and OPO beam polarizations in the microscope were linear and co-aligned. The objectives used for excitation were a $60\times 1.2NA$ coverslip-corrected and a $20\times 0.95NA$ with its pupil underfilled (approximately 0.75 effective excitation NA). For the experiments presented in this study, TiS and OPO pulse durations at the sample were approximately 250fs. Coherent scattering (THG, FWM, and optionally SHG) was detected in the forward direction and selected with dichroics and filters (Semrock).

3.2. Nonlinear susceptibility measurement of isotropic media with THG and FWM

We performed z-scan measurements to evaluate $\chi^{(THG)}$ and $\chi^{(FWM)}$ for several isotropic media. We analyzed three types of liquids: water, chlorotrifluoroethylene (Votalef[®] immersion oil) and triolein (plant oil). For the measurements, the liquid was sealed between two

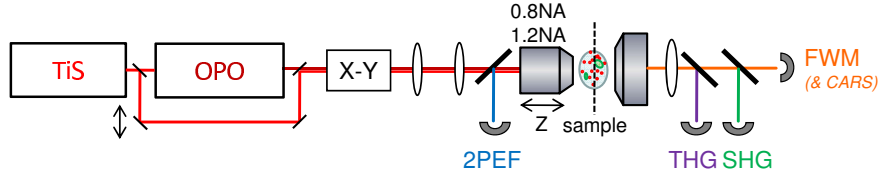


Fig. 2. Experimental setup. Ti:S: femtosecond titanium:sapphire laser. OPO: optical parametric oscillator. X-Y: beam scanning system. In this study coherent signals (FWM, THG, SHG) are detected in the transmitted direction and 2PEF signals are epidetected.

microscope coverslips (see Fig. 3). THG and FWM radiations were separated using a dichroic mirror and detected simultaneously on two detectors. Shortpass filters (Semrock) were used to isolate the signals from scattered laser noise.

In the absence of resonance, the value of $\chi^{(FWM)}$ of a pure liquid relative to glass can be estimated from a z -scan profile such as the ones displayed in Fig. 3 using the relation:

$$\frac{\chi_{liq}^{(FWM)}}{\chi_{glass}^{(FWM)}} = \sqrt{\frac{I_{liq} - I_{noise}}{I_{glass} - I_{noise}}} \quad (12)$$

where I_{liq} (resp. I_{glass}) is the FWM intensity measured in liquid (resp. glass) just after (resp. before) the glass-liquid interface, and I_{noise} is noise principally due to imperfectly rejected TiS light, measured in air and corrected by the transmission of the setup. Measuring I_{liq} and I_{glass} close to the interface minimizes aberration variations between different experiments and the subsequent measurement errors [23].

The THG $\chi^{(3)}$ of a liquid relative to glass can be estimated from two z -scan experiments: (i) a water-glass-liquid scan as shown in Fig. 3, and (ii) a water-glass-air reference scan (not shown). Following [20, 24], the $\chi^{(3)}$ relative to glass can be estimated as:

$$\frac{\chi_{liq}^{(THG)}}{\chi_{glass}^{(THG)}} = \left(1 \pm \sqrt{\frac{I_{glass/liq}}{I_{glass/air}}} \times C \right) \frac{b_{liq} J(b_{liq} \Delta k_{liq})}{b_{glass} J(b_{glass} \Delta k_{glass})} \quad (13)$$

where b is the confocal parameter: $b = \frac{2n(\omega)\lambda}{\pi} \left(\frac{n(\omega)^2 - NA^2}{NA^2} \right)$,

J is the phase matching integral: $J(b\Delta k) = \int_0^{+\infty} \frac{\exp(ib\Delta k\phi)}{(1 + 2i\phi)^2} d\phi$,

$\Delta k = 3k_\omega - k_{3\omega}$ is the phase mismatch, and C is a normalization factor that takes into account power fluctuation and transmission changes between the first and second z -scan. $I_{glass/liq}$ and $I_{glass/air}$ are the THG signals measured at the glass/liquid and glass/air interface in the first and second z -scan. Under moderate numerical aperture excitation, the above equation can be simplified as follows:

$$\frac{\chi_{liq}^{(THG)}}{\chi_{glass}^{(THG)}} = \left(1 \pm \sqrt{\frac{I_{glass/liq}}{I_{glass/air}}} \times C \right) \quad (14)$$

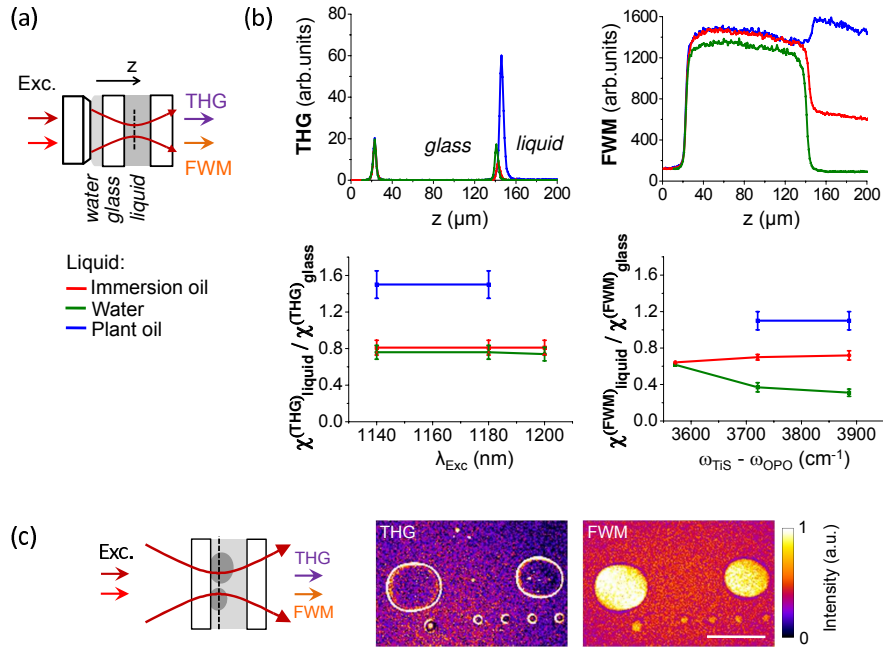


Fig. 3. Effect of $\chi^{(3)}$ on THG-FWM contrast. (a) z -scan geometry used for estimating $\chi^{(THG)}$ and $\chi^{(FWM)}$ of various liquids relative to glass. The focus of a coverslip-corrected objective is scanned through a water-glass and a glass-liquid interface. (b) Top, THG (left) and FWM (right) z -scan profiles for different liquids (immersion oil, water, plant oil). The displayed profiles are normalized to their values at the first interface. Bottom, estimated values of $\chi^{(THG)}$ (left) and $\chi^{(FWM)}$ (right) relative to glass (see text), for different OPO wavelengths and TiS-OPO frequency differences. Deviation of the water $\chi^{(FWM)}$ curve near 3600cm^{-1} is due to the presence of CARS at this frequency shift. It can be seen that $\chi_{\text{water}}^{(3)} < \chi_{\text{oil}}^{(3)}$ in all the conditions explored here. (c) Simultaneously recorded images of immersion oil droplets in water for $\lambda_{\text{OPO}} = 1140\text{nm}$ and $\omega_{\text{TiS}} - \omega_{\text{OPO}} = 3890\text{cm}^{-1}$. Water/immersion oil interfaces are visible in the THG images, and immersion oil produces a stronger FWM signal than water. Scale bar: $50\mu\text{m}$.

As seen from this expression an ambiguity remains in the determination of $\chi^{(THG)}$ due to the two possible signs. This ambiguity was resolved using additional relative measurements at the interfaces between the different liquids. [12, 20]

We estimated $\chi^{(FWM)}$ as a function of the frequency difference between the Ti:S and the OPO for frequency shifts ranging from 3550cm^{-1} to 3890cm^{-1} , and $\chi^{(THG)}$ as a function of the OPO wavelength between 1140nm and 1200nm . The measured values relative to glass are displayed in Fig. 3.

Consistent with previous studies [12], these data show that $\chi_{\text{water}}^{(THG)} < \chi_{\text{oil}}^{(THG)}$, which explains why water/lipid interfaces are visible in THG microscopy [14]. The measurements also indicate that $\chi^{(FWM)}$ values for water, immersion and plant oil are significantly different at 3890cm^{-1} where there are no vibrational resonances for the three liquids (Fig. 3b). Therefore nonresonant FWM microscopy is expected to distinguish oil droplets from water with a good contrast, as illustrated in Fig. 3c.

These experiments indicate that $\chi^{(THG)}$ and $\chi^{(FWM)}$ have comparable values, and that their relative values for the materials considered here have similar relative order, *i.e.* $\chi_{water}^{(3)} < \chi_{immersion\ oil}^{(3)} < \chi_{glass}^{(3)} < \chi_{plant\ oil}^{(3)}$ holds true for both processes.

Quantitative differences are observed in the case of plant oil and water for which the ratio $\chi_{liquid}^{(THG)} / \chi_{glass}^{(THG)}$ is found to be higher than $\chi_{liquid}^{(FWM)} / \chi_{glass}^{(FWM)}$. This may be related to resonant enhancement of the $\chi^{(THG)}$, since both liquids exhibit absorption in the 1100nm-1200nm range. Another difference between THG and FWM is observed in the spectral dependence of $\chi^{(FWM)}$ for water (Fig. 3b). This is attributed to the presence of resonant CARS from water, since OH bonds exhibits vibrational resonance between $3300cm^{-1}$ and $3600cm^{-1}$, whereas immersion and plant oils have no vibrational resonance in the frequency range studied here. Consistently, the estimated value for $\chi^{(FWM)}$ of water decreases with the frequency shift, while the estimated $\chi^{(FWM)}$ of immersion oil is constant. We conclude that, despite the possible presence of electronic or vibrational resonances, the FWM signal can generally be considered as a qualitative $\chi^{(3)}$ map for analyzing THG images.

3.3. THG-FWM microscopy of a zebrafish embryo during early divisions

THG microscopy has proven effective for studying cell divisions in the early zebrafish embryo [5]. In particular, THG images highlight the boundaries of cells, nuclei, and yolk platelets with remarkable contrast [4, 5]. However the interpretation of these images is not immediate, since a strong THG signal can originate from different sample geometries (interfaces or inclusions), and from either a local increase or a local decrease in $\chi^{(3)}$. To gain insight into the origin of these THG signals, we recorded time-lapse THG-FWM images of zebrafish embryos during early cell divisions. The embryos were mechanically dechorionated, and maintained in the observation chamber using low-density agarose as described in [4, 5]. Representative images are shown in Fig. 4.

A first straightforward observation is that non-resonant FWM signals are not homogeneous in space, and therefore provide an image of the sample. As expected from $\chi^{(3)}$ measurements in water and lipids, different media produce different signal levels. For example, the lipid-rich interface between the cells and the yolk is particularly visible in the FWM images. This has implications for CARS imaging since the FWM signal is what is usually termed “non-resonant background” in the context of CARS microscopy, where it interferes coherently with resonant vibrational CARS signals and signal scales as $I_{CARS} \propto |\chi^{(3)r}|^2 + |\chi^{(3)nr}|^2 + 2\chi^{(3)nr} \Re(\chi^{(3)r})$ [7, 8]. As illustrated in Fig. 4, this electronic (non-resonant) contribution is not homogeneous and, in short, generally hinders the detection of non-lipid-related signals in CARS microscopy.

Another observation is that THG and FWM images are significantly different. As discussed above, THG images highlight the spatial variations $\Delta\chi^{(3)}$, and FWM can be qualitatively used as a $\chi^{(3)}$ map to interpret THG images. In the zebrafish embryo during early divisions, THG signals produce contrasted images of cell contours. Such a contrast could result either from a $\chi^{(3)}$ difference between adjacent cells, or from the presence of a large inter-cellular space at this stage of development. The latter interpretation was proposed in [5] and is here confirmed by combined THG-FWM imaging: a local FWM signal decrease is consistently detected around cells (figure 4b). This indicates that the cytoplasm has higher $\chi^{(3)}$ than the extracellular medium, and that it is the inter-cellular spacing rather than optical differences between cells

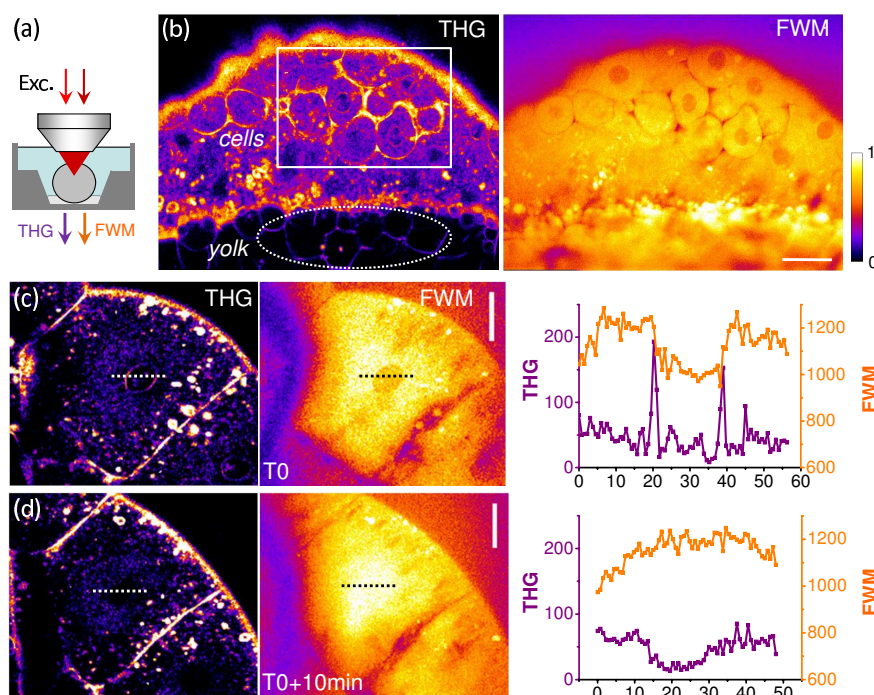


Fig. 4. THG-FWM microscopy of a zebrafish embryo during early divisions. (a) Imaging geometry. (b) Simultaneous THG and FWM images showing the different contrasts. THG highlights the spatial variations $\Delta\chi^{(3)}$. FWM reveals $\chi^{(3)}$ distribution, which is not homogeneous. THG contrast from cells, nuclei contours, vesicles, and yolk structures can be understood from the FWM image. (c,d, and Media 1) Dividing cells before (c) and after (d) disruption of the nuclear envelope. THG and FWM images provide different information about the structural reorganisation of the cytoplasm and the nucleus (see text). Pixel accumulation time: $5\mu s$. Scale bars: $30\mu m$.

or a local lipid accumulation near membranes which is responsible from the high THG signal around cells. //

Signals in the yolk region are also remarkable. In the early zebrafish embryo, the vitelline stores form a foam-like arrangement of packed yolk globules (or platelets) separated by canaliculi filled with ooplasm (see e.g. [26]). The yolk generally produces a strong FWM signal, and the contours of the yolk globules are readily visible in THG microscopy images. From the ratio between xy and xz oriented yolk interfaces in THG images [5], the spacing (ooplasm) between globules can be estimated to be less than $500nm$ wide, in agreement with morphological observations [26]. Since signal in coherent nonlinear microscopy scales as the squared volume of the probed structure, this small size explains why these contours do not clearly emerge against the strong coherent signal from the yolk globules in the FWM images (figure 4b). This observation again illustrates the complementarity of the two images. THG exhibits superior sensitivity to $\chi^{(3)}$ spatial variations, but images must be interpreted with care (different geometries and different $\Delta\chi^{(3)}$ signs give the same signal), while FWM signal level provide clearer information about the geometry and media being observed.

More intriguing is the time dependence of THG-FWM signals from nuclei during cell divisions. As previously reported, THG highlights the contours of the cell nuclei. FWM images

indicate that the nuclei exhibit reduced $\chi^{(3)}$ compared to the cytoplasm, which explains why nuclear contours are visible in THG images (Figure 4c). Before cell division, the THG signal from the nucleus disappears [5], most likely when the nuclear envelope is disrupted. THG-FWM imaging shows that this THG signal coincides with an increase in nuclear FWM signal, which then becomes comparable to cytoplasmic FWM signal (Figure 4d). This may reflect a redistribution of material between the nucleus and the cytoplasm, and/or a reorganization of the nucleus. This latter hypothesis is strengthened by the observation that, after the disruption of the nuclear envelope, FWM is constant across the cytoplasm and nucleus whereas THG is lower in the nucleus (Figure 4d). This difference between the evolution of the two signals may be related to a sub-wavelength material reorganization, as illustrated by the simulations shown in Figure 1. Although more experiments are obviously needed to fully decipher these images, they illustrate that combining $\chi^{(3)}$ signals with different phase matching conditions provides information about intracellular structures at the sub- μm scale.

3.4. Label-free multimodal THG-FWM-SHG-2PEF imaging of live *Caenorhabditis elegans* worms

In addition to THG and FWM, other nonlinear signals can be produced with femtosecond pulses in biological tissues. We recorded simultaneous THG-FWM-SHG-2PEF images of live unlabeled *C. elegans* worms, shown in Fig. 5. Young adult worms from the wild type strain N2 were transferred to a microscope slide coated with a thin layer of agarose gel and were immobilized using sodium azide and levamisole. Coherent THG, FWM, and SHG signals were detected in the forward direction and separated with two dichroics, while 2PEF was epidetected. Signals were detected using standard pixel accumulation times, i.e. 5-10 μs . We note that coherent nonlinear signals (THG, SHG, FWM) are emitted over spectrally separated narrow bandwidths (a few nanometers), so that independent detection of multiple coherent signals is relatively simpler than multicolor fluorescence detection.

Strongest signals in both THG and FWM images were obtained from vesicles in the intestinal cells and in the epithelium. These compartments are mostly lipidic and have been imaged previously using coherent Raman microscopies in various physiological contexts [27, 28, 29]. Apart from these lipid-related signals, THG and FWM signals provided complementary information, as in the zebrafish embryo. THG revealed optical variations $(\Delta\chi^{(3)})^2$ such as interfaces over a dark background, while FWM revealed the distribution of $(\chi^{(3)})^2$ levels within the sample. For example contrasted THG signals delineated interfaces in the pharynx and vulva, corresponding to signal level variations in the FWM image. Epithelial lipids not easily accessible to staining [28] are visible in FWM images and produce contrasted THG signals.

2PEF from fluorescent vesicles was simultaneously produced by the Ti:S beam and detected on a fourth channel. This signal identifies a particular subset of lysosome-related gut vesicles [30, 28], and is not observed from *e.g.* the epithelial lipid vesicles visible in the THG/FWM images. Finally, SHG was also simultaneously obtained from the pharynx, body wall, and vulva muscles with remarkable specificity [2]. A small amount of 2PEF was detected in the SHG channel due to imperfect filtering, and was removed by linear combination of the raw images.

4. Discussion

Far from resonance, THG and FWM probe a similar parameter (the real part of the third-order nonlinear susceptibility, even if $\chi^{(THG)}$ and $\chi^{(FWM)}$ are generally different). However the two

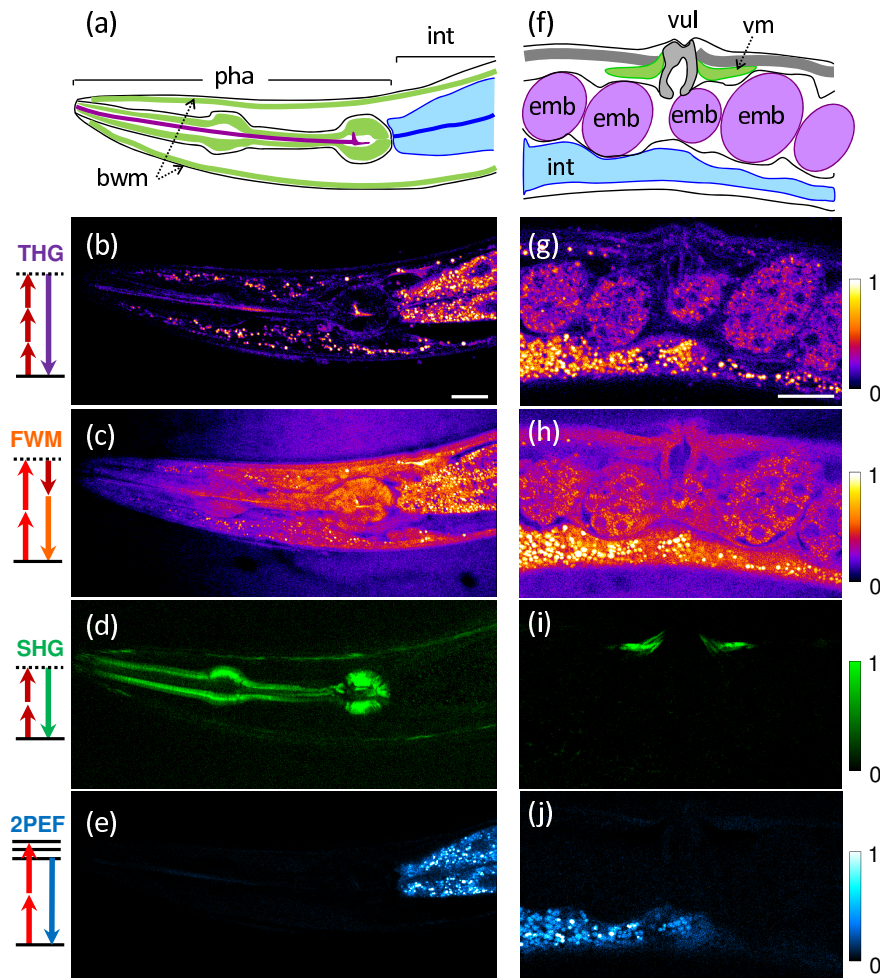


Fig. 5. Simultaneous THG-FWM-SHG-2PEF imaging of live unstained *C. elegans* worms. The four signals were detected simultaneously from the pharynx (a-e) and the midbody (f-j) of young adults. THG/FWM provide complementary morphological information from the pharynx, intestinal cells, embryos, and lipid stores. Additionally, SHG reveals pharynx, vulva, and crawling muscles, and 2PEF reveals fluorescent gut vesicles. pha: pharynx; int: intestine; bwm: body wall muscles; emb: embryo; vul: vulva; vm: vulva muscles. Scale bars: 20 μm . See also Media 2.

signals result from different phase-matching conditions and therefore provide different information. Practical implementation of THG imaging is much simpler because it requires a single excitation beam and no spatio-temporal synchronization. As such, it is easily combined with *e.g.* SHG imaging. Moreover, THG highlights heterogeneities and produce contrasted, background-free images amenable to algorithmic analysis [5]. However THG image interpretation is complex, so that when working on a new application, THG contrast often needs to be characterized. FWM images provide $\chi^{(3)}$ maps and are therefore useful for THG image interpretation. Moreover, we have shown that combined THG-FWM imaging has the potential to provide additional size information in the sub-wavelength range.

We note that with the experimental conditions used here (250 fs pulses), FWM signals were significantly higher than THG signals. This is related to the fact that the coherence length is shorter for THG than for FWM with focused beams, and that coherent signals scale as the square of the effectively probed volume. However balancing between the signals could be achieved by adjusting the relative power or temporal characteristics of the OPO and TiS pulses.

We also point out that wave-mixing processes such as FWM are sensitive to chromatic aberration induced by the microscope and the sample. Any mismatch between the foci results in efficiency drop and dark artefacts in the images - a difficulty common to imaging techniques combining two laser beams.

Our experiments show that, despite these technical difficulties, efficient multimodal imaging combining simultaneous 2PEF, THG, FWM and SHG signals is possible in live organisms, and illustrate the complementary information provided by these modalities.

Acknowledgments

We thank M. Zimmerley, M. Joffre, M.-C. Schanne-Klein, W. Supatto and J.-L. Martin for discussions and comments. This work was supported by Fondation Louis D de l'Institut de France, by Agence Nationale de la Recherche (ANR-RIB) and by ERC COST Action MP0603.

Chapitre 4

Faisceau de Bessel et microscopie à profondeur de champ étendue

Note : ceci est une version raccourcie du manuscrit ne comportant que les travaux publiés à la date de la soutenance. La version complète sera mise en ligne ultérieurement.

Chapitre 5

Microscopie non linéaire à nappe de lumière

Note : ceci est une version raccourcie du manuscrit ne comportant que les travaux publiés à la date de la soutenance. La version complète sera mise en ligne ultérieurement.

Conclusion

Au cours de cette thèse nous avons développé et mis en œuvre des stratégies permettant d'améliorer deux aspects des microscopes non linéaires actuels : le nombre de signaux non linéaires simultanément observables d'une part, la vitesse d'acquisition d'autre part.

Dans un premier temps, nous avons ainsi exploré la possibilité de produire des signaux multiples au moyen de deux trains d'impulsions synchronisés de longueur d'onde centrale distincte (**Chapitre 2**). Nous avons montré que cette approche permet d'exciter de façon optimale et simultanée trois protéines fluorescentes respectivement bleue, jaune, et rouge. Une application directe de cette méthode, mise en œuvre au laboratoire, consiste à imager de grands volumes de tissus marqués avec des transgènes Brainbow dans le but d'étudier la connectivité ou le lignage cellulaire dans le cortex et le tronc cérébral de souris. Suite à ces études nous avons pu estimer que 16 couleurs distinctes peuvent être résolues sans ambiguïté en tenant compte de la variabilité de l'expression des couleurs et du bruit de mesure. D'autre part, nous avons également montré que cette approche permet de combiner efficacement l'imagerie de fluorescence multi-couleurs avec l'imagerie morphologique sans marquage fournie par les signaux de THG, ou plus généralement de combiner plusieurs signaux non linéaires tels que la fluorescence, la génération de seconde (SHG) et troisième (THG) harmoniques, ainsi que le mélange à quatre ondes (FWM) (**Chapitre 3**).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié théoriquement et expérimentalement la possibilité d'augmenter la vitesse d'imagerie. Pour cela, nous avons tout d'abord analysé et testé expérimentalement plusieurs manières de produire des faisceaux de Bessel focalisés afin d'augmenter la profondeur de champ d'un microscope à balayage (**Chapitre 4**). Il résulte de cette étude que l'utilisation d'un modulateur de phase spatial reconfigurable (*spatial light modulator*) se révèle être la méthode la plus

performante.

Enfin, en vue d'augmenter la vitesse d'acquisition tout en préservant le sectionnement optique, nous avons construit un microscope biphotonique à nappe de lumière de profil spatial programmable. Dans cette géométrie nous avons comparé des profils d'excitation de type gaussien et de Bessel (**Chapitre 5**). Nous avons montré que les faisceaux de Bessel permettent d'homogénéiser la résolution le long du champ de vue contrairement aux faisceaux gaussiens et qu'ils permettent également de diminuer les variations des signaux de fluorescence liées aux aberrations que subit le faisceau au cours de sa propagation. Cependant, l'utilisation de faisceaux de Bessel impose quelques compromis car le volume total illuminé est plus important. Nous avons pu remarquer que cela a pour effet de réduire le sectionnement optique et de diminuer l'effet de parallélisation de l'excitation.

Suite aux travaux sur l'imagerie multi-couleurs (collaboration avec les équipes de Jean Livet–Institut de la Vision et de Xavier Morin–ENS), plusieurs applications portant sur l'étude des connectomes, ou sur le lignage cellulaire peuvent maintenant être poursuivies. Pour l'étude de réseaux neuronaux, il est désormais essentiel de travailler sur l'automatisation de l'imagerie et le traitement des données car de grands volumes ne pourront être reconstruits efficacement sans ce prérequis. Pour cela des algorithmes de segmentation des données robustes, ainsi que des méthodes permettant d'augmenter la profondeur de pénétration sont à mettre au point afin que les données puissent être traitées automatiquement (transparisation des tissus, optique adaptative, ou encore block face). En revanche, des études sur le lignage cellulaire dans le système nerveux central peuvent être menées dès à présent grâce au système d'imagerie que nous avons présenté. Il serait notamment intéressant d'observer le développement de tissus *in vivo* marqués par un nombre adéquat de clones.

Par ailleurs, le microscope à profondeur de champ étendue que nous avons implémenté au laboratoire pourrait par la suite servir à scanner rapidement des lames histologiques dont le contenu en collagène fibrillaire ou en lipide doit être dosé rapidement. De plus, il serait intéressant de confirmer expérimentalement les effets d'accord de phase prédits en THG pour des faisceaux de Bessel fortement focalisés dont nous avons montré numériquement qu'ils modifiaient fortement les signaux produits par différentes géométries d'échantillon. Dans un deuxième temps, ces effets pourraient être exploités pour sonder l'organisation sub-micrométrique de milieux organisés.

Enfin, le microscope à nappe de lumière biphotonique construit au laboratoire peut être directement utilisé avec des profils d'excitation gaussiens pour l'imagerie de fluorescence rapide (10 ms par image de 1000×1000 pixels avec un voxel de $0,67 \times 0,67 \times 3,0 \mu\text{m}^3$). D'autre part, ce microscope pourra servir à comparer de façon plus quantitative la robustesse aux aberrations et à la diffusion de profils d'excitation de type gaussien et de Bessel. Par ailleurs, il sera nécessaire d'étudier expérimentalement la photo-toxicité induite par les deux types de faisceaux et de la comparer à celle induite par l'imagerie point à point. Enfin, la transposition des approches multi-couleurs dans une géométrie orthogonale pourrait permettre de disposer d'un système pour l'imagerie multi-couleurs biphotonique rapide.

Bibliographie

- [1] P D Nellist, M F Chisholm, N Dellby, O L Krivanek, M F Murfitt, Z S Szilagy, A R Lupini, A Borisevich, W H Sides, and S J Pennycook. Direct sub-angstrom imaging of a crystal lattice. *Science*, 305(5691):1741, 2004.
- [2] Rolf Erni, Marta D Rossell, Christian Kisielowski, and Ulrich Dahmen. Atomic-resolution imaging with a sub-50-pm electron probe. *Physical Review Letters*, 102(9):096101, 2009.
- [3] Delphine Débarre. *Microscopie par génération de troisième harmonique appliquée à la biologie*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2006.
- [4] Ernst Abbe. A Contribution to the Theory of the Microscope and the nature of Microscopic Vision. *Proceedings of the Bristol Naturalists' Society*, 1:200–261, 1874.
- [5] Ernst Abbe. On the Estimation of Aperture in the Microscope. *Journal of the Royal Microscopical Society.*, 1(3):388–423, 1881.
- [6] Ernst Abbe. The Relation of Aperture and Power in the Microscope. *Journal of the Royal Microscopical Society*, 3(6):790–812, 1883.
- [7] F Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part I. *Physica*, 9(7):686–698, 1942.
- [8] F Zernike. Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II. *Physica*, 9(10):974–986, 1942.
- [9] Shmuel Roth and Isaac Freund. Second harmonic generation in collagen. *The Journal of Chemical Physics*, 70(4):1637, 1979.

- [10] M D Duncan, J Reintjes, and T J Manuccia. Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope. *Optics Letters*, 7(8):350–352, 1982.
- [11] W Denk, J H Strickler, and W W Webb. Two-photon laser scanning fluorescence microscopy. *Science New York NY*, 248(4951):73–76, 1990.
- [12] Tony Wilson. *Confocal microscopy*. Academic Press: London, 1990.
- [13] K Svoboda, D W Tank, and W Denk. Direct measurement of coupling between dendritic spines and shafts. *Science*, 272(5262):716–719, 1996.
- [14] J M Squirrell, D L Wokosin, J G White, and B D Bavister. Long-term two-photon fluorescence imaging of mammalian embryos without compromising viability. *Nature Biotechnology*, 17(8):763–767, 1999.
- [15] Willy Supatto, Delphine Débarre, Bruno Moulia, Eric Brouzés, Jean-Louis Martin, Emmanuel Farge, and Emmanuel Beaurepaire. In vivo modulation of morphogenetic movements in *Drosophila* embryos with femtosecond laser pulses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4):1047–1052, 2005.
- [16] Karel Svoboda and Ryohei Yasuda. Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience, June 2006.
- [17] Tanja A Schwickert, Randall L Lindquist, Guy Shakhbar, Geulah Livshits, Dimitris Skokos, Marie H Kosco-Vilbois, Michael L Dustin, and Michel C Nussenzweig. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature*, 446(7131):83–87, 2007.
- [18] N Olivier, M A Luengo-Oroz, L Duloquin, E Faure, T Savy, I Veilleux, X Solinas, D Debarre, P Bourguine, A Santos, N Peyrieras, and E Beaurepaire. Cell Lineage Reconstruction of Early Zebrafish Embryos Using Label-Free Nonlinear Microscopy. *Science*, 329(5994):967–971, 2010.
- [19] I Freund and M Deutsch. Second-harmonic microscopy of biological tissue. *Optics Letters*, 11(2):94, 1986.
- [20] Y Barad, H Eisenberg, M Horowitz, and Y Silberberg. Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation. *Applied Physics Letters*, 70(8):922–924, 1997.

- [21] M Müller, J Squier, K R Wilson, and G J Brakenhoff. 3D microscopy of transparent objects using third-harmonic generation. *Journal of Microscopy*, 191(3):266–274, 1998.
- [22] R Yuste and W Denk. Dendritic spines as basic functional units of neuronal integration. *Nature*, 375(6533):682–684, 1995.
- [23] F Helmchen, K Svoboda, W Denk, and D W Tank. In vivo dendritic calcium dynamics in deep-layer cortical pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 2(11):989–996, 1999.
- [24] Weigang Wang, Jeffrey B Wyckoff, Victoria Centonze Frohlich, Yuri Oleynikov, Stefan Hüttelmaier, Jiri Zavadil, Lukas Cermak, Erwin P Bottinger, Robert H Singer, John G White, Jeffrey E Segall, and John S Condeelis. Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Research*, 62(21):6278–6288, 2002.
- [25] Katarina Wolf, Irina Mazo, Harry Leung, Katharina Engelke, Ulrich H Von Andrian, Elena I Deryugina, Alex Y Strongin, Eva-B Bröcker, and Peter Friedl. Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis. *The Journal of Cell Biology*, 160(2):267–277, 2003.
- [26] Thorsten R Mempel, Sarah E Henrickson, and Ulrich H Von Andrian. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature*, 427(6970):154–9, 2004.
- [27] Lois L Cavanagh, Roberto Bonasio, Irina B Mazo, Cornelia Halin, Guiying Cheng, Adrianus W M Van Der Velden, Annaiah Cariappa, Catherine Chase, Paul Russell, Michael N Starnbach, Pandelakis A Koni, Shiv Pillai, Wolfgang Weninger, and Ulrich H Von Andrian. Activation of bone marrow-resident memory T cells by circulating, antigen-bearing dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(10):1029–1037, 2005.
- [28] Amy McMahon, Willy Supatto, Scott E Fraser, and Angelike Stathopoulos. Dynamic analyses of *Drosophila* gastrulation provide insights into collective cell migration. *Science*, 322(5907):1546–1550, 2008.

-
- [29] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, and Watt W Webb. Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nature Biotechnology*, 21(11):1369–1377, 2003.
- [30] M Gu and C J R Sheppard. Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy*, 177(2):128–137, 1995.
- [31] A Periasamy, P Skoglund, C Noakes, and R Keller. An evaluation of two-photon excitation versus confocal and digital deconvolution fluorescence microscopy imaging in *Xenopus* morphogenesis. *Microscopy Research and Technique*, 47(3):172–181, 1999.
- [32] J Mertz. Nonlinear microscopy. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Iv Physique Astrophysique*, 2(8):1153–1160 ST – Nonlinear microscopy, 2001.
- [33] H Szmazinski, I Gryczynski, and J R Lakowicz. Spatially localized ballistic two-photon excitation in scattering media. *Biospectroscopy*, 4(5):303–310, 1998.
- [34] Jinpin Ying, Feng Liu, and R. R. Alfano. Spatial Distribution of Two-Photon-Excited Fluorescence in Scattering Media. *Applied Optics*, 38(1):224, January 1999.
- [35] Andrew K. Dunn, Vincent P. Wallace, Mariah Coleno, Michael W. Berns, and Bruce J. Tromberg. Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples. *Applied Optics*, 39(7):1194, March 2000.
- [36] Nicholas J Durr, Christian T Weisspfennig, Benjamin A Holfeld, and Adela Ben-Yakar. Maximum imaging depth of two-photon autofluorescence microscopy in epithelial tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 16(2):026008, 2011.
- [37] Patrick Theer and Winfried Denk. On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy. *Journal of the Optical Society of America A Optics image science and vision*, 23(12):3139–3149, 2006.
- [38] Emmanuel Beaurepaire and Jerome Mertz. Epifluorescence Collection in Two-Photon Microscopy. *Applied Optics*, 41(25):5376, September 2002.

- [39] M Oheim, E Beaurepaire, E Chaigneau, J Mertz, and S Charpak. Two-photon microscopy in brain tissue: parameters influencing the imaging depth. *Journal of Neuroscience Methods*, 111(1):29–37, 2001.
- [40] Joseph P Zinter and Michael J Levene. Maximizing fluorescence collection efficiency in multiphoton microscopy. *Optics Express*, 19(16):15348–62, 2011.
- [41] H J Koester, D Baur, R Uhl, and S W Hell. Ca²⁺ fluorescence imaging with pico- and femtosecond two-photon excitation: signal and photodamage. *Biophysical Journal*, 77(4):2226–2236, 1999.
- [42] Z F Mainen, M Maletic-Savatic, S H Shi, Y Hayashi, R Malinow, and K Svoboda. Two-photon imaging in living brain slices. *Methods San Diego Calif*, 18(2):231–239, 181, 1999.
- [43] Dejan Vucinic, Jr. Bartol, and Terrence J. Sejnowski. Hybrid reflecting objectives for functional multiphoton microscopy in turbid media. *Optics Letters*, 31(16):2447, August 2006.
- [44] Christian A Combs, Aleksandr V Smirnov, Jason D Riley, Amir H Gandjbakhche, Jay R Knutson, and Robert S Balaban. Optimization of multiphoton excitation microscopy by total emission detection using a parabolic light reflector. *Journal of Microscopy*, 228(Pt 3):330–337, 2007.
- [45] Christoph J. Engelbrecht, Werner Göbel, and Fritjof Helmchen. Enhanced fluorescence signal in nonlinear microscopy through supplementary fiber-optic light collection. *Optics Express*, 17(8):6421, April 2009.
- [46] Brian G Saar, Christian W Freudiger, Jay Reichman, C Michael Stanley, Gary R Holtom, and X Sunney Xie. Video-rate molecular imaging in vivo with stimulated Raman scattering. *Science*, 330(6009):1368–70, 2010.
- [47] Alberto Diaspro, Giuseppe Chirico, and Maddalena Collini. Two-photon fluorescence excitation and related techniques in biological microscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 38(02):97–166, May 2005.
- [48] Demirhan Kobat, Michael E Durst, Nozomi Nishimura, Angela W Wong, Chris B Schaffer, and Chris Xu. Deep tissue multiphoton microscopy using longer wavelength excitation. *Optics Express*, 17(16):13354–13364, 2009.

- [49] H J Van Staveren, C J Moes, J Van Marie, S A Prahl, and M J Van Gemert. Light scattering in Intralipid-10% in the wavelength range of 400-1100 nm. *Applied Optics*, 30(31):4507–4514, 1991.
- [50] A N Yaroslavsky, P C Schulze, I V Yaroslavsky, R Schober, F Ulrich, and H J Schwarzmair. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues in vitro in the visible and near infrared spectral range. *Physics in Medicine and Biology*, 47(12):2059–2073, 2002.
- [51] Thomas Hellerer, Claes Axäng, Christian Brackmann, Per Hillertz, Marc Pilon, and Annika Enejder. Monitoring of lipid storage in *Caenorhabditis elegans* using coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(37):14658–14663, 2007.
- [52] Josephine Herz, V Siffrin, and AE Hauser. Expanding two-photon intravital microscopy to the infrared by means of optical parametric oscillator. *Biophysical journal*, 98(4):715–723, 2010.
- [53] Aymeric Leray and Jerome Mertz. Rejection of two-photon fluorescence background in thick tissue by differential aberration imaging. *Optics Express*, 14(22):10565–10573, 2006.
- [54] A Leray, K Lillis, and J Mertz. Enhanced background rejection in thick tissue with differential-aberration two-photon microscopy. *Biophysical Journal*, 94(4):1449–1458, 2008.
- [55] Lu Wei, Zhixing Chen, and Wei Min. Stimulated emission reduced fluorescence microscopy: a concept for extending the fundamental depth limit of two-photon fluorescence imaging. *Biomedical optics express*, 3(6):1465–75, 2012.
- [56] Zhixing Chen, Lu Wei, Xinxin Zhu, and Wei Min. Extending the fundamental imaging-depth limit of multi-photon microscopy by imaging with photo-activatable fluorophores. *Optics Express*, 20(17):18525, July 2012.
- [57] Martin J Booth, Michael Schwertner, and Tony Wilson. Aberrations and adaptive optics in confocal and multiphoton microscopy. In *Frontiers in Optics*, OSA Technical Digest Series, pages FWN2+. Optical Society of America, 2004.

- [58] Nicolas Olivier, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy. *Optics Letters*, 34(20):3145–3147, 2009.
- [59] Alexander Jesacher, Anisha Thayil, Kate Grieve, Delphine Débarre, Tomoko Watanabe, Tony Wilson, Shankar Srinivas, and Martin Booth. Adaptive harmonic generation microscopy of mammalian embryos. *Optics Letters*, 34(20):3154–3156, 2009.
- [60] Chi-Kuang Sun, Shi-Wei Chu, Szu-Yu Chen, Tsung-Han Tsai, Tzu-Ming Liu, Chung-Yung Lin, and Huai-Jen Tsai. Higher harmonic generation microscopy for developmental biology. *Journal of Structural Biology*, 147(1):19–30, 2004.
- [61] Delphine Débarre, Willy Supatto, Emmanuel Farge, Bruno Moulia, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. Velocimetric third-harmonic generation microscopy: micrometer-scale quantification of morphogenetic movements in unstained embryos. *Optics Letters*, 29(24):2881–2883, 2004.
- [62] Gaddum Duemani Reddy and Peter Saggau. Fast three-dimensional laser scanning scheme using acousto-optic deflectors. *Journal of Biomedical Optics*, 10(6):064038, 2005.
- [63] Vijay Iyer, Tycho M Hoogland, and Peter Saggau. Fast functional imaging of single neurons using random-access multiphoton (RAMP) microscopy. *Journal of Neurophysiology*, 95(1):535–545, 2006.
- [64] J Bewersdorf, R Pick, and S W Hell. Multifocal multiphoton microscopy. *Optics Letters*, 23(9):550–560, 1998.
- [65] J Squier, G J Brakenhoff, A H Buist, and M Mu. Real time two-photon absorption microscopy using multi point excitation. *Journal of Microscopy*, 192(2):217–226, 1998.
- [66] V Andresen, A Egner, and S W Hell. Time-multiplexed multifocal multiphoton microscope. *Optics Letters*, 26(2):75–77, 2001.
- [67] Justin E Jureller, Hee Y Kim, and Norbert F Scherer. Stochastic scanning multiphoton multifocal microscopy. *Optics Express*, 14(8):3406–3414, 2006.

- [68] G J Brakenhoff, J Squier, T Norris, A C Bliton, M H Wade, and B Athey. Real-time two-photon confocal microscopy using a femtosecond, amplified Ti:sapphire system. *Journal of Microscopy*, 181(Pt 3):253–259, 1996.
- [69] D Oron and Y Silberberg. Third-harmonic generation with cylindrical Gaussian beams. *Journal Of The Optical Society Of America B Optical Physics*, 21(11):1964–1968, 2004.
- [70] Eran Tal, Dan Oron, and Yaron Silberberg. Improved depth resolution in video-rate line-scanning multiphoton microscopy using temporal focusing. *Optics Letters*, 30(13):1686–1688, 2005.
- [71] Philipp J Keller, Annette D Schmidt, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science*, 322(5904):1065–1069, 2008.
- [72] Florian O Fahrbach and Alexander Rohrbach. A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams. *Optics Express*, 18(23):24229–24244, 2010.
- [73] Thomas A Planchon, Liang Gao, Daniel E Milkie, Michael W Davidson, James A Galbraith, Catherine G Galbraith, and Eric Betzig. Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nature Methods*, 8(5):417–423, 2011.
- [74] Willy Supatto, Thai V Truong, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Advances in multiphoton microscopy for imaging embryos. *Current opinion in genetics development*, 21(Box 1):538–548, 2011.
- [75] Robert W Boyd. *Nonlinear Optics*, volume 5 of *Electronics & Electrical*. Academic Press, 2003.
- [76] C. J. R. SHEPPARD and M. GU. Image formation in two-photon fluorescence microscopy. *Optik*, 86(3):104–106, 1990.
- [77] Maria Göppert-Mayer. Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen. *Annalen der Physik*, 401(3):273–294, 1931.

- [78] M Drobizhev, S Tillo, N S Makarov, T E Hughes, and A Rebane. Absolute two-photon absorption spectra and two-photon brightness of orange and red fluorescent proteins., 2009.
- [79] Shane E Tillo, Thomas E Hughes, Nikolay S Makarov, Aleks Rebane, and Mikhail Drobizhev. A new approach to dual-color two-photon microscopy with fluorescent proteins. *BMC Biotechnology*, 10(1):6, 2010.
- [80] Mikhail Drobizhev, Nikolay S Makarov, Shane E Tillo, Thomas E Hughes, and Aleksander Rebane. Two-photon absorption properties of fluorescent proteins. *Nature Methods*, 8(5):393–399, 2011.
- [81] Warren R Zipfel, Rebecca M Williams, Richard Christie, Alexander Yu Nikitin, Bradley T Hyman, and Watt W Webb. Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(12):7075–7080, 2003.
- [82] Alex C Kwan, Karen Duff, Gunnar K Gouras, and Watt W Webb. Optical visualization of Alzheimer’s pathology via multiphoton-excited intrinsic fluorescence and second harmonic generation. *Optics Express*, 17(5):3679, 2009.
- [83] Karsten Konig and Iris Riemann. High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution. *Journal of Biomedical Optics*, 8(3):432–439, 2003.
- [84] Thomas H Chia and Michael J Levene. Detection of counterfeit U.S. paper money using intrinsic fluorescence lifetime. *Optics Express*, 17(24):22054–22061, 2009.
- [85] Brian A Wilt, Laurie D Burns, Eric Tatt Wei Ho, Kunal K Ghosh, Eran A Mukamel, and Mark J Schnitzer. Advances in light microscopy for neuroscience. *Annual Review of Neuroscience*, 32(1):435–506, 2009.
- [86] J W Lichtman and W Denk. The Big and the Small: Challenges of Imaging the Brain’s Circuits. *Science*, 334(6056):618–623, 2011.
- [87] Kenneth W Dunn, Ruben M Sandoval, Katherine J Kelly, Pierre C Dagher, George A Tanner, Simon J Atkinson, Robert L Bacallao, and Bruce A Mo-

- litoris. Functional studies of the kidney of living animals using multicolor two-photon microscopy. *American journal of physiology Cell physiology*, 283(3):C905–C916, 2002.
- [88] Kensuke Yamauchi, Meng Yang, Ping Jiang, Mingxu Xu, Norio Yamamoto, Hiroyuki Tsuchiya, Katsuro Tomita, Abdool R Moossa, Michael Bouvet, and Robert M Hoffman. Development of real-time subcellular dynamic multicolor imaging of cancer-cell trafficking in live mice with a variable-magnification whole-mouse imaging system. *Cancer Research*, 66(8):4208–4214, 2006.
- [89] Jean Livet, Tamily A Weissman, Hyuno Kang, Ryan W Draft, Ju Lu, Robyn A Bennis, Joshua R Sanes, and Jeff W Lichtman. Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature*, 450(7166):56–62, 2007.
- [90] Hugo J Snippert, Laurens G Van Der Flier, Toshiro Sato, Johan H Van Es, Maaïke Van Den Born, Carla Kroon-Veenboer, Nick Barker, Allon M Klein, Jacco Van Rheenen, Benjamin D Simons, and Hans Clevers. Intestinal crypt homeostasis results from neutral competition between symmetrically dividing Lgr5 stem cells. *Cell*, 143(1):134–144, 2010.
- [91] Kristoffer Weber, Michael Thomaschewski, Michael Warlich, Tassilo Volz, Kerstin Cornils, Birte Niebuhr, Maike Täger, Marc Lütgehetmann, Jörg-Matthias Pollok, Carol Stocking, Maura Dandri, Daniel Benten, and Boris Fehse. RGB marking facilitates multicolor clonal cell tracking. *Nature Medicine*, 17(4):504–509, 2011.
- [92] Joseph R Lakowicz, Ignacy Gryczynski, Henryk Malak, Martin Schrader, Peter Engelhardt, Hiroski Kano, and Stefan W Hell. Time-Resolved Fluorescence Spectroscopy and Imaging of DNA Labeled with DAPI and Hoechst 33342 Using Three-Photon Excitation. *Biophysical journal*, 72(2):567–578, 1997.
- [93] H Szmajnski, I Gryczynski, and J R Lakowicz. Three-photon induced fluorescence of the calcium probe Indo1. *Biophysical Journal*, 70(1):547–555, 1996.
- [94] Ignacy Gryczynski, Henryk Malak, and Joseph R. Lakowicz. Three-photon excitation of a tryptophan derivative using a fs-Ti : Sapphire laser. *Biospectroscopy*, 2(1):9–15, December 1998.

- [95] L Moreaux, O Sandre, and J Mertz. Membrane imaging by second-harmonic generation microscopy. *Journal Of The Optical Society Of America B Optical Physics*, 17(10):1685–1694, 2000.
- [96] L Moreaux, O Sandre, M Blanchard-Desce, and J Mertz. Membrane imaging by simultaneous second-harmonic generation and two-photon microscopy. *Optics Letters*, 25(5):320–322, 2000.
- [97] Aikaterini Zoumi, Alvin Yeh, and Bruce J Tromberg. Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(17):11014–11019, 2002.
- [98] Paul J Campagnola, Andrew C Millard, Mark Terasaki, Pamela E Hoppe, Christian J Malone, and William A Mohler. Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues. *Biophysical Journal*, 82(1 Pt 1):493–508, 2002.
- [99] Paul J Campagnola and Leslie M Loew. Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms. *Nature Biotechnology*, 21(11):1356–1360, 2003.
- [100] T Boulesteix, A-M Pena, N Pagès, G Godeau, M-P Sauviat, E Beaurepaire, and M-C Schanne-Klein. Micrometer scale ex vivo multiphoton imaging of unstained arterial wall structure. *Cytometry Part A the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(1):20–26, 2006.
- [101] Patrick Stoller, Peter M Celliers, Karen M Reiser, and Alexander M Rubenchik. Quantitative second-harmonic generation microscopy in collagen. *Applied Optics*, 42(25):5209–5219, 2003.
- [102] Ivan Gusachenko, Gaël Latour, and Marie-Claire Schanne-Klein. Polarization-resolved Second Harmonic microscopy in anisotropic thick tissues. *Optics Express*, 18(18):19339–19352, 2010.
- [103] Ivan Gusachenko, Viet Tran, Yannick Goulam Houssen, Jean-Marc Allain, and Marie-Claire Schanne-Klein. Polarization-Resolved Second-Harmonic Generation in Tendon upon Mechanical Stretching. *Biophysical journal*, 102(9):2220–2229, May 2012.

- [104] Alvin T Yeh, Nader Nassif, Aikaterini Zoumi, and Bruce J Tromberg. Selective corneal imaging using combined second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence. *Optics Letters*, 27(23):2082–2084, 2002.
- [105] Meng Han, Günter Giese, and Josef Bille. Second harmonic generation imaging of collagen fibrils in cornea and sclera. *Optics Express*, 13(15):5791–5797, 2005.
- [106] Julia G Lyubovitsky, Joel A Spencer, Tatiana B Krasieva, Bogi Andersen, and Bruce J Tromberg. Imaging corneal pathology in a transgenic mouse model using nonlinear microscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 11(1):014013, 2006.
- [107] Gaël Latour, Ivan Gusachenko, Laura Kowalczyk, Isabelle Lamarre, and Marie-Claire Schanne-Klein. In vivo structural imaging of the cornea by polarization-resolved second harmonic microscopy. *Biomedical optics express*, 3(1):1–15, 2012.
- [108] Periklis Pantazis, James Maloney, David Wu, and Scott E Fraser. Second harmonic generating (SHG) nanoprobe for in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(33):14535–14540, 2010.
- [109] Thomas Y F Tsang. Optical third-harmonic generation at interfaces. *Physical Review A*, 52(5):4116–4125, 1995.
- [110] Delphine Débarre, Willy Supatto, and Emmanuel Beaurepaire. Structure sensitivity in third-harmonic generation microscopy. *Optics Letters*, 30(16):2134, August 2005.
- [111] L. Canioni, S. Rivet, L. Sarger, R. Barille, Pierre Vacher, and Pierre Voisin. Imaging of Ca^{2+} intracellular dynamics with a third-harmonic generation microscope. *Optics Letters*, 26(8):515, April 2001.
- [112] R Barille, L Canioni, S Rivet, L Sarger, P Vacher, and T Ducret. Visualization of intracellular Ca^{2+} dynamics with simultaneous two-photon-excited fluorescence and third-harmonic generation microscopes. *Applied Physics Letters*, 79(24):4045–4047, 2001.
- [113] V Shcheslavskiy, G I Petrov, S Saltiel, and V V Yakovlev. Quantitative characterization of aqueous solutions probed by the third-harmonic generation microscopy. *Journal of Structural Biology*, 147(1):42–49, 2004.

- [114] Delphine Débarre and Emmanuel Beaurepaire. Quantitative Characterization of Biological Liquids for Third-Harmonic Generation Microscopy. *Biophysical Journal*, 92(2):603–612, 2007.
- [115] Delphine Débarre, Willy Supatto, Ana-Maria Pena, Aurélie Fabre, Thierry Tordjmann, Laurent Combettes, Marie-Claire Schanne-Klein, and Emmanuel Beaurepaire. Imaging lipid bodies in cells and tissues using third-harmonic generation microscopy. *Nature methods*, 3(1):47–53, 2006.
- [116] G Omar Clay, Andrew C Millard, Chris B Schaffer, Juerg Aus-der Au, Philbert S Tsai, Jeffrey A Squier, and David Kleinfeld. Spectroscopy of third-harmonic generation: evidence for resonances in model compounds and ligated hemoglobin. *Journal of the Optical Society of America B*, 23(5):932, 2006.
- [117] Stefan Witte, Adrian Negrean, Johannes C Lodder, Christiaan P J De Kock, Guilherme Testa Silva, Huibert D Mansvelder, and Marie Louise Groot. Label-free live brain imaging and targeted patching with third-harmonic generation microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15):5970–5975, 2011.
- [118] Matthew J Farrar, Frank W Wise, Joseph R Fetcho, and Chris B Schaffer. In vivo imaging of myelin in the vertebrate central nervous system using third harmonic generation microscopy. *Biophysical Journal*, 100(5):1362–1371, 2011.
- [119] Andreas Zumbusch, Gary Holtom, and X Xie. Three-Dimensional Vibrational Imaging by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering. *Physical Review Letters*, 82(20):4142–4145, 1999.
- [120] Andreas Volkmer, Ji-Xin Cheng, and X Sunney Xie. Vibrational Imaging with High Sensitivity via Epidetected Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy. *Physical Review Letters*, 87(2):2–5, 2001.
- [121] Andreas Volkmer. Vibrational imaging and microspectroscopies based on coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38(5):R59–R81, 2005.
- [122] J X Cheng, L D Book, and X S Xie. Polarization coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Optics Letters*, 26(17):1341–1343, 2001.

- [123] Christian W Freudiger, Wei Min, Brian G Saar, Sijia Lu, Gary R Holtom, Chengwei He, Jason C Tsai, Jing X Kang, and X Sunney Xie. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science*, 322(5909):1857–1861, 2008.
- [124] P Nandakumar, A Kovalev, and A Volkmer. Vibrational imaging based on stimulated Raman scattering microscopy. *New Journal of Physics*, 11(3):033026, 2009.
- [125] Th Forster. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik*, 437(1-2):55–75, 1948.
- [126] Kristin Hope and Mickie Bhatia. Clonal interrogation of stem cells. *Nature Methods*, 8(4 Suppl):S36–S40, 2011.
- [127] Jessica M Teddy, Rusty Lansford, and Paul M Kulesa. Four-color, 4-D time-lapse confocal imaging of chick embryos. *BioTechniques*, 39(5):703–710, 2005.
- [128] R Lansford, G Bearman, and S E Fraser. Resolution of multiple green fluorescent protein color variants and dyes using two-photon microscopy and imaging spectroscopy. *Journal of biomedical optics*, 6(3):311–318, 2001.
- [129] JW Lichtman, Jean Livet, and JR Sanes. A technicolour approach to the connectome. *Nature Reviews Neuroscience*, 9(6):417–422, 2008.
- [130] Katrin G Heinze, Andre Koltermann, and Petra Schwille. Simultaneous two-photon excitation of distinct labels for dual-color fluorescence crosscorrelation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19):10377–10382, 2000.
- [131] Takako Kogure, Satoshi Karasawa, Toshio Araki, Kenta Saito, Masataka Kinjo, and Atsushi Miyawaki. A fluorescent variant of a protein from the stony coral *Montipora* facilitates dual-color single-laser fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Nature Biotechnology*, 24(5):577–581, 2006.
- [132] David Entenberg, Jeffrey Wyckoff, Bojana Gligorić, Evanthia T Roussos, Vladislav V Verkhusha, Jeffrey W Pollard, and John Condeelis. Setup and use of a two-laser multiphoton microscope for multichannel intravital fluorescence imaging. *Nature Protocols*, 6(10):1500–1520, 2011.

- [133] Margaret T Butko, Mikhail Drobizhev, Nikolay S Makarov, Aleksander Rebane, Brendan C Brinkman, and Joseph G Gleeson. Simultaneous multiple-excitation multiphoton microscopy yields increased imaging sensitivity and specificity. *BMC biotechnology*, 11(1):20, 2011.
- [134] Igor Pastirk, Johanna Dela Cruz, Katherine Walowicz, Vadim Lozovoy, and Marcos Dantus. Selective two-photon microscopy with shaped femtosecond pulses. *Optics Express*, 11(14):1695–1701, 2003.
- [135] Rajesh S Pillai, Caroline Boudoux, Guillaume Labroille, Nicolas Olivier, Israel Veilleux, Emmanuel Farge, Manuel Joffre, and Emmanuel Beaurepaire. Multiplexed two-photon microscopy of dynamic biological samples with shaped broadband pulses. *Optics Express*, 17(15):12741–12752, 2009.
- [136] Guillaume Labroille, Rajesh S Pillai, Xavier Solinas, Caroline Boudoux, Nicolas Olivier, Emmanuel Beaurepaire, and Manuel Joffre. Dispersion-based pulse shaping for multiplexed two-photon fluorescence microscopy. *Optics Letters*, 35(20):3444–3446, 2010.
- [137] Dong Li, Wei Zheng, and Jianan Y Qu. Two-photon autofluorescence microscopy of multicolor excitation. *Optics Letters*, 34(2):202–204, 2009.
- [138] Dong Li, Wei Zheng, and Jianan Y Qu. Imaging of epithelial tissue in vivo based on excitation of multiple endogenous nonlinear optical signals. *Optics Letters*, 34(18):2853–2855, 2009.
- [139] Ke Wang, Tzu-Ming Liu, Juwell Wu, Nicholas G. Horton, Charles P. Lin, and Chris Xu. Three-color femtosecond source for simultaneous excitation of three fluorescent proteins in two-photon fluorescence microscopy. *Biomedical Optics Express*, 3(9):1972, July 2012.
- [140] Pierre Mahou, Maxwell Zimmerley, Karine Loulier, Katherine S Matho, Guillaume Labroille, Xavier Morin, Willy Supatto, Jean Livet, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Multicolor two-photon tissue imaging by wavelength mixing. *Nature methods*, 9(8):815, 2012.
- [141] E Ploetz, S Laimgruber, S Berner, W Zinth, and P Gilch. Femtosecond stimulated Raman microscopy. *Applied Physics B*, 87(3):389–393, 2007.

- [142] J R Lakowicz, I Gryczynski, H Malak, and Z Gryczynski. Two-color two-photon excitation of fluorescence. *Photochemistry and photobiology*, 64(4):632–635, 1996.
- [143] Ignacy Gryczynski, Henryk Malak, and Joseph R Lakowicz. Two-Color Two-Photon Excitation of Indole. *Biospectroscopy*, 3(2):97–101, 1996.
- [144] S Quentmeier, S Denicke, and K-H Gericke. Two-color two-photon fluorescence laser scanning microscopy. *Journal of fluorescence*, 19(6):1037–1043, 2009.
- [145] WM McClain. Polarization of two photon excited fluorescence. *The Journal of Chemical Physics*, 324:58–61, 1973.
- [146] S Denicke, S Quentmeier, J E Ehlers, and K H Gericke. Applications of the time-resolved two-colour two-photon excitation of UV fluorophores using femtosecond laser pulses. *Physica Scripta*, 80(4):048105, 2009.
- [147] S Denicke, K-H Gericke, A G Smolin, P S Shternin, and O S Vasyutinskii. Dynamics of two-color two-photon excited fluorescence of p-terphenyl: determination and analysis of the molecular parameters. *The journal of physical chemistry A*, 114(36):9681–9692, 2010.
- [148] Masahiko Daimon and Akira Masumura. Measurement of the refractive index of distilled water from the near-infrared region to the ultraviolet region. *Applied optics*, 46(18):3811–20, 2007.
- [149] Gaddum Duemani Reddy, Keith Kelleher, Rudy Fink, and Peter Saggau. Three-dimensional random access multiphoton microscopy for functional imaging of neuronal activity. *Nature Neuroscience*, 11(6):713–720, 2008.
- [150] Edward J Botcherby, Rimas Juskaitis, Martin J Booth, and Tony Wilson. Aberration-free optical refocusing in high numerical aperture microscopy. *Optics Letters*, 32(14):2007–2009, 2007.
- [151] E Botcherby, R Juskaitis, M Booth, and T Wilson. An optical technique for remote focusing in microscopy. *Optics Communications*, 281(4):880–887, 2008.
- [152] 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, July 2012.

- [153] J Tang, R N Germain, and M Cui. Superpenetration optical microscopy by iterative multiphoton adaptive compensation technique. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(22):8434–8439, 2012.
- [154] Gregory Sxe Jefferis and Jean Livet. Sparse and combinatorial neuron labeling. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(1):101–10, 2012.
- [155] Margaret E Buckingham and Sigolène M Meilhac. Tracing cells for tracking cell lineage and clonal behavior. *Developmental Cell*, 21(3):394–409, 2011.
- [156] Kai Kretzschmar and Fiona M. Watt. Lineage Tracing, January 2012.
- [157] Marie-Christine Birling, Françoise Gofflot, and Xavier Warot. Site-specific recombinases for manipulation of the mouse genome. *Methods In Molecular Biology Clifton Nj*, 561:245–263, 2009.
- [158] Allan M Wong, Jing W Wang, and Richard Axel. Spatial representation of the glomerular map in the Drosophila protocerebrum. *Cell*, 109(2):229–41, 2002.
- [159] Tudor C Badea, Yanshu Wang, and Jeremy Nathans. A noninvasive genetic/pharmacologic strategy for visualizing cell morphology and clonal relationships in the mouse. *Journal of Neuroscience*, 23(6):2314–2322, 2003.
- [160] Mario Buffelli, Robert W Burgess, Guoping Feng, Corrinne G Lobe, Jeff W Lichtman, and Joshua R Sanes. Genetic evidence that relative synaptic efficacy biases the outcome of synaptic competition. *Nature*, 424(6947):430–434, 2003.
- [161] Frank Schnutgen, Nathalie Doerflinger, Cécile Calléja, Olivia Wendling, Pierre Chambon, and Norbert B Ghyselinck. A directional strategy for monitoring Cre-mediated recombination at the cellular level in the mouse. *Nature Biotechnology*, 21(5):562–5, 2003.
- [162] Tudor C Badea, Zhong L Hua, Philip M Smallwood, John Williams, Thomas Rotolo, Xin Ye, and Jeremy Nathans. New Mouse Lines for the Analysis of Neuronal Morphology Using CreER(T)/loxP-Directed Sparse Labeling. *PLoS ONE*, 4(11):12, 2009.
- [163] Goichi Miyoshi, Jens Hjerling-Leffler, Theofanis Karayannis, Vitor H Sousa, Simon J B Butt, James Battiste, Jane E Johnson, Robert P Machold, and Gord

- Fishell. Genetic fate mapping reveals that the caudal ganglionic eminence produces a large and diverse population of superficial cortical interneurons. *Journal of Neuroscience*, 30(5):1582–1594, 2010.
- [164] C G Lobe, K E Koop, W Kreppner, H Lomeli, M Gertsenstein, and A Nagy. Z/AP, a double reporter for cre-mediated recombination. *Developmental Biology*, 208(2):281–292, 1999.
- [165] Mandar Deepak Muzumdar, Bosiljka Tasic, Kazunari Miyamichi, Ling Li, and Liqun Luo. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis New York NY 2000*, 45(9):593–605, 2007.
- [166] A Novak, C Guo, W Yang, A Nagy, and C G Lobe. Z/EG, a double reporter mouse line that expresses enhanced green fluorescent protein upon Cre-mediated excision. *Genesis New York NY 2000*, 28(3-4):147–155, 2000.
- [167] Susan M Dymecki, Russell S Ray, and Jun C Kim. Mapping cell fate and function using recombinase-based intersectional strategies. *Methods in Enzymology*, 477(10):183–213, 2010.
- [168] Emily J Boniface, Jianjun Lu, Tristan Victoroff, Meiying Zhu, and Wenbiao Chen. FLEX-based transgenic reporter lines for visualization of Cre and Flp activity in live zebrafish. *Genesis New York NY 2000*, 47(7):484–491, 2009.
- [169] Sheng-zhi Wang, Bao-hua Liu, Huizhong W Tao, Kun Xia, and Li I Zhang. A Genetic Strategy for Stochastic Gene Activation with Regulated Sparseness (STARS). *PLoS ONE*, 4(1):6, 2009.
- [170] Stefanie Hampel, Phuong Chung, Claire E McKellar, Donald Hall, Loren L Looger, and Julie H Simpson. Drosophila Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nature Methods*, 8(3):253–259, 2011.
- [171] Dafni Hadjiconomou, Shay Rotkopf, Cyrille Alexandre, Donald M Bell, Barry J Dickson, and Iris Salecker. Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nature Methods*, 8(3):260–266, 2011.

- [172] Guy Wachsman, Renze Heidstra, and Ben Scheres. Distinct Cell-Autonomous Functions of RETINOBLASTOMA-RELATED in Arabidopsis Stem Cells Revealed by the Brother of Brainbow Clonal Analysis System. *The Plant Cell*, 23(7):2581–2591, 2011.
- [173] Y Albert Pan, Jean Livet, Joshua R Sanes, Jeff W Lichtman, and Alexander F Schier. Multicolor Brainbow imaging in zebrafish. *Cold Spring Harbor protocols*, 2011(1):pdb.prot5546, 2011.
- [174] S Cajal. *Histology of the Nervous System of Man and Vertebrates*, volume 1. Oxford University Press, 1995.
- [175] E R Macagno. Cellular interactions and pattern formation in the development of the visual system of *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda). I. Interactions between embryonic reticular fibers and laminar neurons. *Developmental Biology*, 73(2):206–238, 1979.
- [176] E R Macagno. Cellular interactions and pattern formation in the development of the visual system of *Daphnia magna* (Crustacea, Branchiopoda). II. Induced retardation of optic axon ingrowth results in a delay in laminar neuron differentiation. *Journal of Neuroscience*, 1(9):945–955, 1981.
- [177] M S Flaster and E R Macagno. Cellular interactions and pattern formation in the visual system of the branchiopod crustacean, *Daphnia magna*. III. The relationship between cell birthdates and cell fates in the optic lamina. *Journal of Neuroscience*, 4(6):1486–1498, 1984.
- [178] S Ward, N Thomson, J G White, and S Brenner. Electron microscopical reconstruction of the anterior sensory anatomy of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Comparative Neurology*, 160(3):313–337, 1975.
- [179] D G Albertson and J N Thomson. The pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences*, 275(938):299–325, 1976.
- [180] J G White, E Southgate, J N Thomson, and S Brenner. The Structure of the Nervous System of the Nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 314(1165):1–340, 1986.

- [181] Winfried Denk and Heinz Horstmann. Serial Block-Face Scanning Electron Microscopy to Reconstruct Three-Dimensional Tissue Nanostructure. *PLoS Biology*, 2(11):e329, 2004.
- [182] KJ Hayworth, N Kasthuri, R Schalek, and JW Lichtman. Automating the Collection of Ultrathin Serial Sections for Large Volume TEM Reconstructions. *Microscopy and Microanalysis*, 12(S02):86–87, August 2006.
- [183] Kevin L Briggman and Winfried Denk. Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(5):562–570, 2006.
- [184] Kevin L Briggman, Moritz Helmstaedter, and Winfried Denk. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. *Nature*, 471(7337):183–188, 2011.
- [185] Davi D Bock, Wei-Chung Allen Lee, Aaron M Kerlin, Mark L Andermann, Greg Hood, Arthur W Wetzell, Sergey Yurgenson, Edward R Soucy, Hyon Suk Kim, and R Clay Reid. Network anatomy and in vivo physiology of visual cortical neurons. *Nature*, 471(7337):177–182, 2011.
- [186] Zhong-wei Zhang. Maturation of layer V pyramidal neurons in the rat prefrontal cortex: intrinsic properties and synaptic function. *Journal of Neurophysiology*, 91(3):1171–1182, 2004.
- [187] Hans Held. Die centrale Gehörleitung. *Archiv für Anatomie und Physiologie*, pages 201–248, 1893.
- [188] Karl Kandler, Amanda Clause, and Jihyun Noh. Tonotopic reorganization of developing auditory brainstem circuits. *Nature Neuroscience*, 12(6):711–717, 2009.
- [189] J E Sulston, E Schierenberg, J G White, and J N Thomson. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Developmental Biology*, 100(1):64–119, 1983.
- [190] Kaoru S Imai, Michael Levine, Nori Satoh, and Yutaka Satou. Regulatory blueprint for a chordate embryo. *Science*, 312(5777):1183–1187, 2006.

- [191] Yukihiro Hirose, Zoltan M Varga, Hisato Kondoh, and Makoto Furutani-Seiki. Single cell lineage and regionalization of cell populations during Medaka neurulation. *Development Cambridge England*, 131(11):2553–2563, 2004.
- [192] Martina Rembold, Felix Loosli, Richard J Adams, and Joachim Wittbrodt. Individual cell migration serves as the driving force for optic vesicle evagination. *Science*, 313(5790):1130–1134, 2006.
- [193] Philipp J Keller and Ernst H K Stelzer. Quantitative in vivo imaging of entire embryos with Digital Scanned Laser Light Sheet Fluorescence Microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(6):624–632, 2008.
- [194] Dario Bonanomi and Samuel L Pfaff. Motor axon pathfinding. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(3):a001735, 2010.
- [195] Pascal Joset, Andrin Wacker, Régis Babey, Esther A Ingold, Irwin Andermatt, Esther T Stoeckli, and Matthias Gesemann. Rostral growth of commissural axons requires the cell adhesion molecule MDGA2. *Neural development*, 6(1):22, 2011.
- [196] William Mohler, Andrew C Millard, and Paul J Campagnola. Second harmonic generation imaging of endogenous structural proteins. *Methods San Diego Calif*, 29(1):97–109, 2003.
- [197] Yong Wang, Chia-Yu Lin, Alexei Nikolaenko, Varun Raghunathan, and Eric O Potma. Four-wave mixing microscopy of nanostructures. *Advances in Optics and Photonics*, 3(1):1, 2010.
- [198] Jianfang Chen and Katsumi Midorikawa. Two-color two-photon 4Pi fluorescence microscopy. *Optics letters*, 29(12):1354–1356, 2004.
- [199] Keisuke Isobe, Shogo Kataoka, Rena Murase, Wataru Watanabe, Tsunehito Higashi, Shigeki Kawakami, Sachihiro Matsunaga, Kiichi Fukui, and Kazuyoshi Itoh. Stimulated parametric emission microscopy. *Optics Express*, 14(2):786–793, 2006.
- [200] Dan Oron, Dvir Yelin, Eran Tal, Sefi Raz, Rachel Fachima, and Yaron Silberberg. Depth-resolved structural imaging by third-harmonic generation microscopy. *Journal of Structural Biology*, 147(1):3–11, 2004.

-
- [201] Wei Min, Sijia Lu, Markus Rueckel, Gary R Holtom, and X Sunney Xie. Near-degenerate four-wave-mixing microscopy. *Nano Letters*, 9(6):2423–2426, 2009.
- [202] Xuejun Liu, Wolfgang Rudolph, and James L Thomas. Characterization and application of femtosecond infrared stimulated parametric emission microscopy. *America*, 27(4):787, 2010.
- [203] E O Potma, W P De Boeij, and D A Wiersma. Nonlinear coherent four-wave-mixing in optical microscopy, 2000.
- [204] Ji-Xin Cheng and X Sunney Xie. Green’s function formulation for third-harmonic generation microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 19(7):1604–1610, 2002.
- [205] Ji-Xin Cheng, Andreas Volkmer, and X Sunney Xie. Theoretical and experimental characterization of coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy. *Journal of the Optical Society of America B*, 19(6):1363, 2002.
- [206] Ji-Xin Cheng and X Sunney Xie. Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy: Instrumentation, Theory, and Applications. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(3):827–840, 2004.
- [207] Pierre Mahou, Nicolas Olivier, Guillaume Labroille, Louise Duloquin, Jean-Marc Sintès, Nadine Peyri  ras, Renaud Legouis, Delphine Débarre, and Emmanuel Beaurepaire. Combined third-harmonic generation and four-wave mixing microscopy of tissues and embryos. *Biomedical optics express*, 2(10):2837–49, 2011.
- [208] Ricardo Fuentes and Juan Fernández. Ooplasmic Segregation in the Zebrafish Zygote and Early Embryo : Pattern of Ooplasmic Movements and Transport Pathways. *Developmental Dynamics*, 239(June):2172–2189, 2010.
- [209] Xuejun Liu, Wolfgang Rudolph, and James L Thomas. Photobleaching resistance of stimulated parametric emission in microscopy. *Optics Letters*, 34(3):304–306, 2009.
- [210] R Selm, G Krauss, A Leitenstorfer, and A Zumbusch. Simultaneous second-harmonic generation, third-harmonic generation, and four-wave mixing microscopy with single sub-8 fs laser pulses. *Applied Physics Letters*, 99(18):181124, 2011.

- [211] Thuc T Le, Holli M Duren, Mikhail N Slipchenko, Chang-Deng Hu, and Ji-Xin Cheng. Label-free quantitative analysis of lipid metabolism in living *Caenorhabditis elegans*. *Journal Of Lipid Research*, 51(3):672–677, 2010.
- [212] Meng C Wang, Wei Min, Christian W Freudiger, Gary Ruvkun, and X Sunney Xie. RNAi screening for fat regulatory genes with SRS microscopy. *Nature Methods*, 8(2):135–138, 2011.
- [213] G V Clokey and L A Jacobson. The autofluorescent lipo-fuscin granules in the intestinal cells of *Caenorhabditis elegans* are secondary lysosomes. *Mechanisms Of Ageing And Development*, 35(1):79–94, 1986.
- [214] P J Caspers, G W Lucassen, E A Carter, H A Bruining, and G J Puppels. In vivo confocal Raman microspectroscopy of the skin: noninvasive determination of molecular concentration profiles. *The Journal of investigative dermatology*, 116(3):434–442, 2001.
- [215] A Bullen, S S Patel, and P Saggau. High-speed, random-access fluorescence microscopy: I. High-resolution optical recording with voltage-sensitive dyes and ion indicators. *Biophysical Journal*, 73(1):477–491, 1997.
- [216] Dejan Vućinić and Terrence J Sejnowski. A Compact Multiphoton 3D Imaging System for Recording Fast Neuronal Activity. *PLoS ONE*, 2(8):12, 2007.
- [217] F Anselmi, C Ventalon, A Begue, D Ogden, and V Emiliani. Three-dimensional imaging and photostimulation by remote-focusing and holographic light patterning. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(49):19504–9, 2011.
- [218] Edward J Botcherby, Christopher W Smith, Michael M Kohl, Delphine Débarre, Martin J Booth, Rimas Juskaitis, Ole Paulsen, and Tony Wilson. Aberration-free three-dimensional multiphoton imaging of neuronal activity at kHz rates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(8):2919–24, 2012.
- [219] Gergely Katona, Gergely Szalay, Pál Maák, Attila Kaszás, Máté Veress, Dániel Hillier, Balázs Chiovini, E Sylvester Vizi, Botond Roska, and Balázs Rózsa. Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes. *Nature Methods*, 9(2):201–8, 2012.

-
- [220] G H Patterson and D W Piston. Photobleaching in two-photon excitation microscopy. *Biophysical Journal*, 78(4):2159–62, 2000.
- [221] Tong-Sheng Chen, Shao-Qun Zeng, Qing-Ming Luo, Zhi-Hong Zhang, and Wei Zhou. High-order photobleaching of green fluorescent protein inside live cells in two-photon excitation microscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291(5):1272–5, 2002.
- [222] A Hopt and E Neher. Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy. *Biophysical Journal*, 80(4):2029–2036, 2001.
- [223] Guanghao Zhu, James Van Howe, Michael Durst, Warren Zipfel, and Chris Xu. Simultaneous spatial and temporal focusing of femtosecond pulses. *Optics Express*, 13(6):2153–2159, 2005.
- [224] M E Durst, G Zhu, and C Xu. Simultaneous Spatial and Temporal Focusing in Nonlinear Microscopy. *Optics Communications*, 281(7):1796–1805, 2008.
- [225] Na Ji, Hari Shroff, Haining Zhong, and Eric Betzig. Advances in the speed and resolution of light microscopy. *Current Opinion in Neurobiology*, 18(6):605–616, 2008.
- [226] E J Botcherby, R Juskaitis, and T Wilson. Scanning two photon fluorescence microscopy with extended depth of field. *Optics Communications*, 268(2):253–260, 2006.
- [227] J Durnin, J J Miceli Jr., and J H Eberly. Diffraction-free beams, 1987.
- [228] C J R Sheppard and T Wilson. Gaussian-beam theory of lenses with annular aperture. *IEE Journal on Microwaves Optics and Acoustics*, 2(4):105, 1978.
- [229] F Gori, G Guattari, and C Padovani. Bessel-Gauss beams. *Optics Communications*, 64(6):491–495, 1987.
- [230] Tomás Cizmár. *Optical traps generated by non-traditional beams*. PhD thesis, Masaryk University, 2006.
- [231] JOHN H. MCLEOD. The Axicon: A New Type of Optical Element. *Journal of the Optical Society of America*, 44(8):592, August 1954.

-
- [232] Oto Brzobohatý, Tomáš Cizmár, and Pavel Zemánek. High quality quasi-Bessel beam generated by round-tip axicon. *Optics Express*, 16(17):12688–12700, 2008.
- [233] T Cizmár, V Kollárová, X Tsampoula, F Gunn-Moore, W Sibbett, Z Bouchal, and K Dholakia. Generation of multiple Bessel beams for a biophotonics workstation. *Optics Express*, 16(18):14024–14035, 2008.
- [234] Guillaume Labroille. *Imagerie tridimensionnelle multiphotonique des tissus biologiques à l'aide d'impulsions façonnées*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2011.
- [235] Nicolas Olivier. *Contrast mechanism and wavefront control in coherent nonlinear microscopy*. PhD thesis, Ecole Polytechnique, 2009.
- [236] M. Strupler, A.-M. Pena, M. Hernest, P.-L. Tharaux, J.-L. Martin, E. Beaurepaire, and M.-C. Schanne-Klein. Second harmonic imaging and scoring of collagen in fibrotic tissues. *Optics Express*, 15(7):4054, April 2007.
- [237] M Strupler, M Hernest, C Fligny, J L Martin, P L Tharaux, and M C Schanne-Klein. Second harmonic microscopy to quantify renal interstitial fibrosis and arterial remodeling. *Journal of biomedical optics*, 13(5):54041, 2008.
- [238] Nicolas Olivier, Delphine Débarre, Pierre Mahou, and Emmanuel Beaurepaire. Third-harmonic generation microscopy with Bessel beams: a numerical study. *Optics Express*, 20(22):24886, October 2012.
- [239] Dan Oron, Eran Tal, and Yaron Silberberg. Scanningless depth-resolved microscopy. *Optics Express*, 13(5):1468–1476, 2005.
- [240] Jonathan Palero, Susana I C O Santos, David Artigas, and Pablo Loza-Alvarez. A simple scanless two-photon fluorescence microscope using selective plane illumination. *Optics Express*, 18(8):8491–8498, 2010.
- [241] Thai V Truong, Willy Supatto, David S Koos, John M Choi, and Scott E Fraser. Deep and fast live imaging with two-photon scanned light-sheet microscopy. *Nature Methods*, 8(9):757–760, 2011.

- [242] Omar E Olarte, Jacob Licea-rodriguez, Jonathan A Palero, Emilio J Gualda, David Artigas, Jürgen Mayer, Jim Swoger, James Sharpe, Israel Rochamendoza, Raul Rangel-rojo, and Pablo Loza-alvarez. Image formation by linear and nonlinear digital scanned light-sheet fluorescence microscopy with Gaussian and Bessel beam profiles. *Biomedical Optics Express*, 3(7):1492–1505, 2012.
- [243] H Siedentopf and R Zsigmondy. Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser, 1902.
- [244] A H Voie, D H Burns, and F A Spelman. Orthogonal-plane fluorescence optical sectioning: three-dimensional imaging of macroscopic biological specimens. *Journal of Microscopy*, 170(Pt 3):229–236, 1993.
- [245] Jan Huiskens, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H K Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686):1007–9, 2004.
- [246] Terrence F Holekamp, Diwakar Turaga, and Timothy E Holy. Fast three-dimensional fluorescence imaging of activity in neural populations by objective-coupled planar illumination microscopy. *Neuron*, 57(5):661–72, 2008.
- [247] Jan Huiskens and Didier Y R Stainier. Selective plane illumination microscopy techniques in developmental biology. *Development Cambridge England*, 136(12):1963–1975, 2009.
- [248] Alexander Rohrbach. Artifacts resulting from imaging in scattering media: a theoretical prediction. *Optics Letters*, 34(19):3041–3043, 2009.
- [249] V Garcés-Chávez, D McGloin, H Melville, W Sibbett, and K Dholakia. Simultaneous micromanipulation in multiple planes using a self-reconstructing light beam. *Nature*, 419(6903):145–147, 2002.
- [250] Florian O Fahrbach, Philipp Simon, and Alexander Rohrbach. Microscopy with self-reconstructing beams. *Nature Photonics*, 4(September):0–5, 2010.
- [251] Florian O Fahrbach and Alexander Rohrbach. Propagation stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media. *Nature Communications*, 3:632, 2012.

-
- [252] J Mertz. Molecular photodynamics involved in multi-photon excitation fluorescence microscopy. *European Physical Journal D*, 3(1):53–66, 1998.
 - [253] Jerome Mertz. Optical sectioning microscopy with planar or structured illumination. *Nature Methods*, 8(10):811–819, 2011.
 - [254] Uros Krzic, Stefan Gunther, Timothy E Saunders, Sebastian J Streichan, and Lars Hufnagel. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. *Nature Methods*, 9(juNe):1–7, 2012.
 - [255] Mihaela Balu, Tommaso Baldacchini, John Carter, Tatiana B Krasieva, Ruben Zadoyan, and Bruce J Tromberg. Effect of excitation wavelength on penetration depth in nonlinear optical microscopy of turbid media. *Journal of Biomedical Optics*, 14(1):010508, 2011.

Résumé : Le travail effectué au cours de cette thèse a porté sur le développement et la mise en œuvre de nouvelles stratégies en microscopie non linéaire permettant d'augmenter le nombre de signaux non linéaires simultanément observables d'une part, et la vitesse d'acquisition d'autre part. Dans un premier temps, nous avons exploré la possibilité de produire des signaux multiples au moyen de deux trains d'impulsions synchronisés de longueur d'onde centrale distincte. Nous avons montré que cette approche permet d'exciter de façon optimale et simultanée trois protéines fluorescentes respectivement bleue, jaune, et rouge. Une application de cette méthode consiste à imager de grands volumes de tissus marqués avec des transgènes Brainbow dans le but d'étudier la connectivité ou le lignage cellulaire. Plus généralement, nous avons montré que cette approche permet de combiner plusieurs signaux non linéaires tels que la fluorescence, la génération de seconde (SHG) et de troisième (THG) harmoniques, ainsi que le mélange à quatre ondes (FWM). Dans un deuxième temps, nous avons étudié la possibilité d'augmenter la vitesse d'imagerie. Pour cela, nous avons mis en œuvre plusieurs manières de produire des faisceaux de Bessel focalisés afin d'augmenter la profondeur de champ d'un microscope à balayage. Enfin, en vue d'augmenter la vitesse d'acquisition tout en préservant le sectionnement optique, nous avons construit un microscope biphotonique à nappe de lumière de profil spatial programmable. Dans cette géométrie nous avons comparé les propriétés d'imagerie de profils d'excitation de type gaussien et de Bessel pour des applications en biologie du développement.

Mots-clés : Microscopie multiphotonique, microscopie multimodale, microscopie à nappe de lumière, faisceau de Bessel, imagerie de tissus Brainbow.

Abstract: This work aimed at developing novel strategies in nonlinear microscopy to increase the number of available contrasts and the imaging speed. Firstly, we investigated the use of synchronized pulse trains for multimodal nonlinear microscopy. We showed that this configuration allows the simultaneous and effective two photon excitation of blue, green-yellow and red fluorescent proteins. We have applied this technique to image large volume of Brainbow labeled tissues to develop strategies for mapping neural networks and reconstructing cell lineage trees in the central nervous system. More generally, we showed that synchronized pulse trains provide access to a broad range of nonlinear optical effects such as: two photon excited fluorescence (2PEF), second (SHG) and third harmonic (THG) generation and four-wave mixing (FWM). We then investigated strategies to increase the imaging frame rate of nonlinear microscopes. For this purpose, we first designed and built optical schemes that rely on Bessel beams in order to increase the depth of field of raster scanning microscopes. Finally, to potentially increase the imaging frame rate without degrading the optical sectioning we developed a nonlinear light sheet microscope with programmable excitation beam shape. Using this microscope, we compared the imaging properties of different excitation profiles (Gauss and Bessel) for applications to embryo imaging.

Keywords : Multiphoton microscopy, multimodal microscopy, light sheet microscopy, Bessel beam, imaging of Brainbow-labeled tissues.