



Instrumentation avancée et nouvelles observables pour la microscopie biophotonique

Patrick Ferrand

► To cite this version:

Patrick Ferrand. Instrumentation avancée et nouvelles observables pour la microscopie biophotonique. Optique [physics.optics]. Université d'Aix-Marseille, 2014. tel-01100833

HAL Id: tel-01100833

<https://theses.hal.science/tel-01100833>

Submitted on 9 Jan 2015

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.



Université d'Aix-Marseille

Mémoire
présenté par

M. Patrick Ferrand

Maître de conférences à l'université d'Aix-Marseille
Institut Fresnel, CNRS UMR 7249

pour obtenir le diplôme d'habilitation à diriger des recherches

Instrumentation avancée et nouvelles observables pour la microscope biophotonique

Date de soutenance : 16 décembre 2014

Jury

Rapporteurs

- **M. Antoine Delon**, professeur à l'université Joseph Fourier, Laboratoire Interdisciplinaire de Physique (LIPhy)
- **Mme Sandrine Levêque-Fort**, chargée de recherche au CNRS, Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO)
- **M. Yves Mély**, professeur à l'université de Strasbourg, Laboratoire de Biophotonique et Pharmacologie

Examineurs

- **M. Hugues Giovannini**, professeur à l'université d'Aix-Marseille, Institut Fresnel
- **M. Didier Marguet**, directeur de recherche au CNRS, Centre d'Immunologie de Marseille Luminy
- **M. Hervé Rigneault**, directeur de recherche au CNRS, Institut Fresnel

**Instrumentation avancée et nouvelles observables
pour la microscope biophotonique**

Table des matières

I	Instrumentation avancée pour la microscopie biophotonique	7
1	Microscopie de fluctuations de fluorescence	9
1.1	Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence	9
1.2	Constat et motivation	11
1.3	Instrumentation développée	12
2	Microscopie à haute résolution axiale	17
2.1	Contexte	17
2.2	Principe de la microscopie ISO	18
2.3	Description du microscope	20
2.4	Résultats	21
3	Microscopie non-linéaire hypermodale	25
3.1	Mise en œuvre de l'imagerie rapide par balayage	25
3.2	Développement d'une interface complète d'imagerie	28
3.3	Quelques exemples d'applications	29
II	Nouvelles observables : l'ordre orientationnel	33
4	Nécessité de nouvelles observables	35
4.1	Que peut encore nous apprendre la microscopie ?	35
4.2	Notion d'ordre orientationnel	35
4.3	L'anisotropie de fluorescence	37
4.4	La déclinaison aux milieux ordonnés	39
4.5	Conclusion	43
5	Sonder l'ordre orientationnel	45
5.1	Principes de base	45
5.2	État de l'art	47
5.3	Description théorique	48
5.4	Comparaisons entre fluorescences à un et deux photons	52
5.5	Aspects expérimentaux	58

TABLE DES MATIÈRES

6	Démonstration sur quelques systèmes biologiques	61
6.1	Ordre moléculaire de la membrane cellulaire	61
6.2	Polymorphisme de filaments d'amyloïdes	66
6.3	Optimisation de la cadence de mesure	67
7	Perspectives	71
	Bibliographie	79
A	Curriculum vitæ détaillé	87
A.1	Diplômes	88
A.2	Activités de recherche	88
A.3	Activités de formation	88
A.4	Responsabilités collectives	90
A.5	Liste exhaustive de publications	92
B	Recueil d'articles	103
	Article 1. Ferrand <i>et al.</i> , Rev. Sci. Instrum., 2009	105
	Article 2. Le Moal <i>et al.</i> , J. Opt. Soc. Amer. A, 2011	113
	Article 3. Kress <i>et al.</i> , Biophys. J., 2013	123
	Article 4. Ferrand <i>et al.</i> , Biophys. J., 2014	147

Introduction

Ce mémoire retrace les travaux que j'ai menés depuis mon arrivée en 2005 dans l'équipe de biophotonique de l'institut Fresnel. Ma formation universitaire m'avait prédestiné à la physique de la matière condensée : mes travaux de thèse portaient sur l'étude des propriétés optiques de microstructures de silicium nanoporeux ; en post-doc, il s'agissait de cristaux photoniques tridimensionnels obtenus par auto-assemblage de colloïdes. Aussi, il y a en filigrane de ce mémoire le récit d'une reconversion thématique.

J'ai abordé la biophotonique avec l'enthousiasme de la nouveauté, et pour bagages mon bon sens de physicien et une modeste expérience de l'optique instrumentale. Je me suis plus particulièrement intéressé aux nouvelles méthodes de microscopie, qui ont émergé ces quinze dernières années et qui permettent d'apporter de nouvelles réponses aux problèmes de la biologie cellulaire.

Depuis les premières observations de cellules végétales par Hooke au XVII^e siècle [Hooke, 1665], ou celle des bactéries par Van Leeuwenhoek [Van Leeuwenhoek, 1674], la microscopie n'a en effet cessé de progresser. Elle a d'abord connu des perfectionnements mécaniques et optiques, notamment avec les assemblages de plusieurs lentilles, qui, dans leur version ultime contemporaine permettent d'atteindre une résolution limitée par la diffraction. La lumière, elle-même, est filtrée, polarisée pour révéler de nouveaux contrastes, en exploitant une grande variété d'interactions lumière-matière.

Dans le domaine de la fluorescence, ces quinze dernières années ont vu l'émergence de nouvelles méthodes. Basées sur des ruptures conceptuelles, ces dernières permettent d'accéder à un nouveau type d'informations. On peut citer la corrélation de fluorescence et ses variantes [Webb, 2001], dont nous parlerons dans la suite, qui analysent les signaux de fluorescence dans leur dimension dynamique et peuvent par exemple mettre en évidence le confinement d'espèces membranaires par des structures nanométriques. La technique FRET¹, pour sa part, mesure l'efficacité des transferts d'énergie entre molécules voisines. Combinée à la mesure locale du temps de vie par microscopie FLIM², elle permet de quantifier précisément des distances intramoléculaires, et ainsi de mettre en évidence des changements de conformation de protéines [Wallrabe et Periasamy, 2005]. Ces méthodes exploitent donc des observables physiques, mesurées de façon indirecte, témoins de la structure moléculaire ou de comportements collectifs à une échelle inférieure à la résolution d'imagerie. Les méthodes que j'ai développées, et que je détaille dans la seconde partie de

1. pour *Förster resonance energy transfer*.

2. pour *Fluorescence lifetime imaging*.

TABLE DES MATIÈRES

ce mémoire, partageant le même état d'esprit.

Je me suis dans un premier temps consacré à la compréhension fine et à l'optimisation de méthodes existantes. Cet angle d'attaque m'a paru pertinent car mon expérience de physicien me permettait de contribuer efficacement au terrain expérimental. La partie I de ce mémoire décrit des travaux réalisés dans ce cadre. Dans le chapitre 1, je propose une architecture expérimentale permettant de mener des mesures de fluctuations de fluorescence de façon optimale. Le chapitre 2 présente la démonstration expérimentale de la microscopie dite ISO, approche élégante utilisant le contrôle du front d'onde pour améliorer la résolution axiale des microscopes. Enfin, le chapitre 3 détaille un ensemble de travaux technologiques, qui s'inscrivent dans les derniers développements méthodologiques en microscopie non-linéaire dite hypermodale.

Cette expertise expérimentale m'a permis d'avoir une connaissance large des réalisations et enjeux de la microscopie, et ainsi de proposer de nouvelles méthodes, que je décris dans une seconde partie. Dans le chapitre 4, je montre comment l'ordre orientationnel peut compléter la microscopie de fluorescence en y ajoutant une information de nature structurale ; je décris l'anisotropie de fluorescence, dont l'utilisation pour étudier cet aspect m'est rapidement apparue inappropriée. En réponse, le chapitre 5 décrit le cadre conceptuel d'une méthode qui permet de quantifier l'ordre orientationnel, en se basant sur un nombre réduit d'hypothèses, et déclinée pour deux régimes de fluorescence, selon que l'absorption implique un ou deux photons. Le chapitre 6 décrit les premières démonstrations expérimentales, montrant la pertinence de cette méthode pour deux systèmes biologiques que sont la membrane cellulaire et les structures d'amyloïdes. Les perspectives de ces travaux font l'objet du dernier chapitre.

Je me suis efforcé d'adopter un discours synthétique et, je l'espère, accessible aux non-spécialistes. Aussi, pour ne pas en perturber la lecture, les quelques articles que je joins sont rassemblés en fin de mémoire, après mon curriculum vitæ détaillé et ma liste exhaustive de publications.

Première partie

Instrumentation avancée pour la microscopie biophotonique

Chapitre 1

Microscopie de fluctuations de fluorescence

“In fact, FCS is now so efficient and so sensitive that it can generate misleading data (if one is not meticulously careful about experimental design) faster than any other spectroscopy I know.”

— W. W. Webb, 2001 [Webb, 2001]

Cette phrase, écrite par l’un des pionniers du domaine, illustre à merveille le paradoxe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS, *Fluorescence correlation spectroscopy*) : il s’agit d’une technique relativement simple à mettre en œuvre, qui donne en temps réel des résultats quantitatifs ; cependant, ces résultats sont la synthèse de processus individuels, que le nombre colossal rend inobservables en pratique,

J’ai été introduit à la biophotonique par la FCS, qui était alors la méthode phare de notre équipe. Ma première contribution à ce domaine a été de proposer une architecture instrumentale versatile, capable de rendre plus faciles, plus fiables et plus précises, des mesures de FCS sur des membranes cellulaires.

1.1 Introduction à la spectroscopie de corrélation de fluorescence

Le principe de la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), illustré sur la Fig. 1.1, est simple : il s’agit de mesurer à grande cadence (souvent largement supérieure au MHz) les fluctuations temporelles d’un signal de fluorescence stationnaire. Ce signal $I(t)$ est analysé en construisant, soit en temps réel via un circuit électronique dédié, soit par calcul *a posteriori*, sa fonction d’autocorrélation $g(\tau)$, définie comme

$$g(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2},$$

où le symbole $\langle \rangle$ indique une moyenne sur le temps t . Cette fonction décrit dans quelle mesure, en moyenne, un signal change lorsqu'on laisse s'écouler un temps τ . Elle permet donc de quantifier l'amplitude des fluctuations, et surtout à quelle échelle temporelle celles-ci se produisent. Contrairement à une simple mesure d'intensité, qui fournirait une valeur moyenne, constante dans le cas d'un signal stationnaire, la FCS permet donc d'analyser, avec une grande richesse statistique, un signal dans sa dimension dynamique.

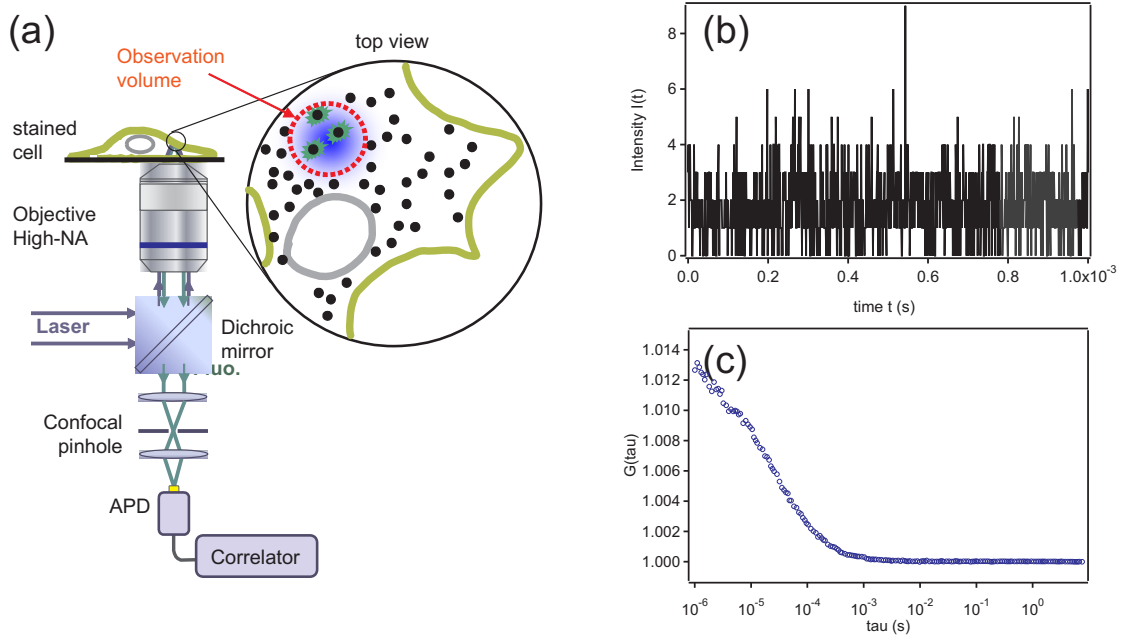


Figure 1.1 – (a) Montage expérimental de FCS en configuration confocale. Le volume de mesure est positionné sur la membrane cellulaire. (b) Signal de fluorescence $I(t)$ (seuls les premiers instants sont tracés), (c) Fonction d'autocorrélation $g(\tau)$ correspondante, construite après 10 s de mesure.

Les causes de ces fluctuations de fluorescence peuvent être variées : fluctuations du nombre de molécules, qui diffusent, dans le volume d'analyse, rotation des molécules, si l'excitation est polarisée, changements de conformations moléculaires, qui modifient les propriétés d'absorption ou d'émission, etc., si bien que les premières applications ont été les études physico-chimiques des solutions [Webb, 2001], suivies par les premières investigations en biologie cellulaire [Schwille, 2001]. C'est dans ce contexte, notre équipe menait depuis sa création en 2000 une importante série d'études sur la dynamique de la membrane cellulaire, en étroite collaboration avec des biologistes du Centre d'Immunologie de Marseille Luminy (CIML).

1.2 Constat et motivation

Les motivations de ces travaux sont basées sur des considérations à la fois instrumentales et méthodologiques.

Le besoin d'une instrumentation plus précise et plus souple

Mise en œuvre au foyer d'un objectif de microscope en mode confocal, la FCS fournit un volume d'analyse de dimensions latérales inférieures au micromètre, une sélectivité spatiale qui permet en principe des études ciblées sur les organelles des cellules vivantes. *En principe*, car la mesure est délicate. Dans un premier temps, il faut repérer, au moyen d'une imagerie confocale, la zone d'intérêt. Il faut ensuite positionner, très précisément dans les trois dimensions, le volume d'analyse sur cette zone. La mesure de FCS peut alors commencer, mais elle se fait à l'aveugle, sans aucun contrôle visuel *in situ*.

Il résulte en général de ce mode opératoire un grand nombre de données inexploitable, chaque fois qu'un évènement vient compromettre la stationnarité du signal de fluorescence (mouvement de la membrane, passage dans le volume d'une vésicule, etc.), et donc l'allure du corrélogramme. Le rejet de ces données, soumis à l'appréciation de l'opérateur, est donc un protocole fastidieux et arbitraire.

Le besoin d'une information spatiale

La FCS analyse les fluctuations d'intensité d'un point de vue *temporel*. Appliquée à des phénomènes de diffusion, elle pâtit d'un manque d'information spatiale. Pour illustrer cette affirmation, considérons le cas de la diffusion en deux dimensions, modèle couramment utilisé pour décrire la mobilité d'espèces moléculaires fluorescentes dans une membrane. Si l'on appelle w le rayon effectif de la surface analysée et D le coefficient de diffusion, on montre que la fonction d'autocorrélation $g(\tau)$ s'écrit comme

$$g(\tau) = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{1 + \frac{4D}{w^2} \tau} = 1 + \frac{1}{\langle N \rangle} \frac{1}{1 + \frac{\tau}{\tau_D}}, \quad (1.1)$$

où l'on a introduit le temps de diffusion $\tau_D = \frac{w^2}{4D}$ et le nombre moyen de molécules $\langle N \rangle$ dans la surface observée. Cette équation montre clairement que le délai τ_D peut être mesuré directement, de façon non ambiguë (il s'agit du temps caractéristique de l'épaule de la courbe, comme sur la Fig. 1.1c). En revanche, la détermination du coefficient de diffusion D est indirecte, puisqu'elle suppose la connaissance de la surface sondée w^2 . En outre, si la diffusion ne se fait plus librement, parce qu'elle est gênée par des obstacles ou un phénomène de transport, la FCS ne pourra en rendre compte et fournira des coefficients de diffusion biaisés.

La méthode dite des lois de diffusion FCS, telles qu'elle a été développée dans notre équipe, fournit une première réponse à ce manque d'information spatiale. Elle consiste à mesurer des temps de diffusion τ_D , pour plusieurs valeurs de surface observée w^2 . Les comportements observés sont confrontés à des simulations, ce qui permet de distinguer

différents types de scénarios de diffusion [Wawrezynieck *et al.*, 2005]. C'est désormais une méthode de routine pour nos partenaires biologistes du CIML.

Les autres variantes spatiotemporelles de la FCS exploitent plusieurs points de mesure séparés spatialement, obtenus en dupliquant les points de mesure [Dertinger *et al.*, 2007, Jaffiol *et al.*, 2006], ou en en déplaçant un point de mesure unique dans le spécimen [Kolin et Wiseman, 2007, Berland *et al.*, 1996, Petrášek et Schwille, 2008]. Ces méthodes tirent toutes leur bénéfice d'une corrélation spatio-temporelle entre deux volumes d'observation, situés aux points $\vec{r}_1$ et $\vec{r}_2$, définie comme

$$g(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau) = \frac{\langle I(\vec{r}_1, t) I(\vec{r}_2, t + \tau) \rangle}{\langle I(\vec{r}_1, t) \rangle \langle I(\vec{r}_2, t + \tau) \rangle}. \quad (1.2)$$

A titre d'exemple, la corrélation spatio-temporelle dans le cas de diffusion bidimensionnelle vu plus haut s'écrit analytiquement comme [Widengren et Mets, 2002]

$$g(\vec{r}_1, \vec{r}_2, \tau) = 1 + \frac{1}{N} \frac{1}{1 + \frac{4D}{w^2} \tau} \exp \left[-\frac{|\vec{r}_2(t + \tau) - \vec{r}_1(t)|^2}{w^2} \frac{1}{1 + \frac{4D}{w^2} \tau} \right]. \quad (1.3)$$

Indépendamment de la modalité de mesure de cette corrélation spatio-temporelle, on peut se convaincre de la valeur ajoutée apportée par une telle mesure en observant que le rôle distinct désormais joué par la surface de mesure w^2 et le coefficient de diffusion D .

En outre, les mesures en conditions de balayage permettent d'accéder aux phénomènes se déroulant à de grandes échelles de temps, sans pour autant endommager le spécimen par une longue mesure statique.

1.3 Instrumentation développée

Face à ces constats, mon ambition a donc été de proposer une architecture instrumentale permettant de mener avec une meilleure productivité et une meilleure fiabilité des mesures de FCS sur des membranes cellulaires, grâce à

- un recours systématique à l'imagerie confocale rapide, en préliminaire à la mesure de FCS ou *in situ*,
- un positionnement du point de mesure direct et rapide sur la région à analyser,
- une résolution spatiale et une sensibilité à l'état de l'art,
- une conception évolutive permettant de mesurer des corrélations spatio-temporelles dans différentes modalités.

Je décris dans cette section les résultats principaux de ces travaux. Pour une revue plus détaillée de l'état de l'art, des aspects technologiques, et l'ensemble des caractérisations effectuées, on se reportera à l'article [Ferrand *et al.*, 2009], reproduit en annexe, p. 105.

Architecture instrumentale

Techniquement, le système instrumental a été construit autour d'un microscope confocal à deux têtes, schématisé sur la Fig. 1.2. Ce sont donc deux voies de mesures qui se

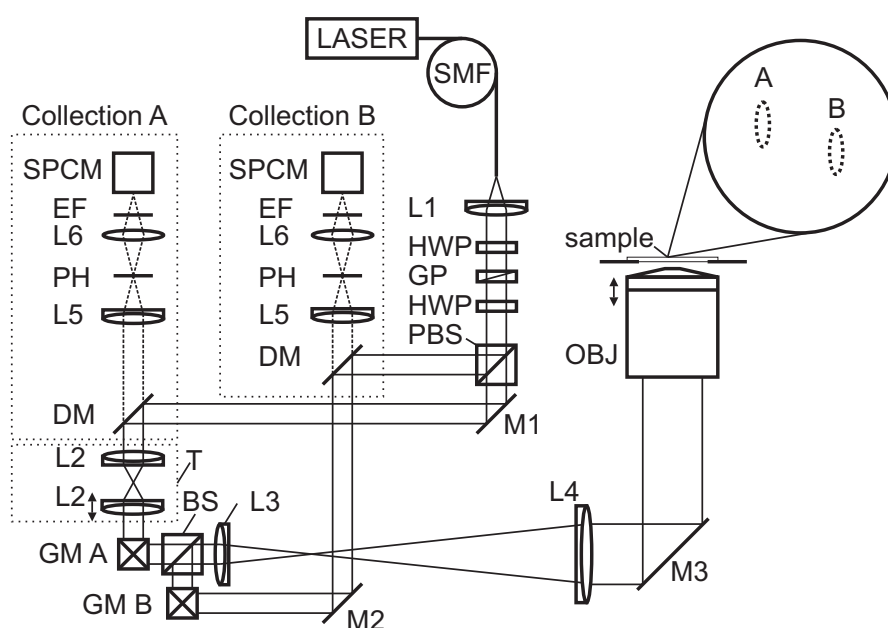


Figure 1.2 – Banc optique. Les deux jeux de miroirs galvanométriques sont notés GM A et GM B. Les deux volumes d'observations, notés A et B, peuvent être positionnés à loisir dans le volume de l'échantillon. D'après [Ferrand *et al.*, 2009].

partagent le même objectif de microscope. Le contrôle du balayage des faisceaux lasers se fait au moyen de miroirs galvanométriques. Ces derniers se prêtent particulièrement bien à notre contrainte de versatilité, puisqu'ils permettent, au choix

- un positionnement stable, à une position arbitraire, de façon quasi-instantanée,
- un balayage rapide de grand amplitude pour l'imagerie rapide,
- ou des oscillations à fréquence élevée (kHz) sur de courtes trajectoires.

L'ensemble est piloté par un jeu de cartes de génération de tension et comptage ultra rapides, ce qui permet d'atteindre des cadences d'imagerie de l'ordre d'une image par seconde. Enfin, l'ergonomie de l'interface utilisateur a été particulièrement soignée, pour permettre de basculer entre les différents modes de mesure en un minimum de manipulations.

Performances

Un important travail de calibration a été réalisé pour acquérir la maîtrise complète des positions relatives des deux volumes d'observation, transversalement comme longitudinalement. En exploitant la diaphonie existant entre les deux voies, lorsque les deux volumes sont très rapprochés, nous avons pu mettre au point un protocole précis qui garantit les positions relatives avec une précision de quelques nanomètres.

Le système offre des performances de résolution spatiale et de sensibilité à l'état de

l'art. Les faibles modifications de ces paramètres subies lorsque les volumes de mesures sont écartés de leur axe et qui peuvent être cruciales pour les mesures d'autocorrélation spatio-temporelles, ont également été quantifiées, au moyen de mesures de FCS sur une solution fluorescente étalon. Elles sont reportées sur la Fig. 1.3.

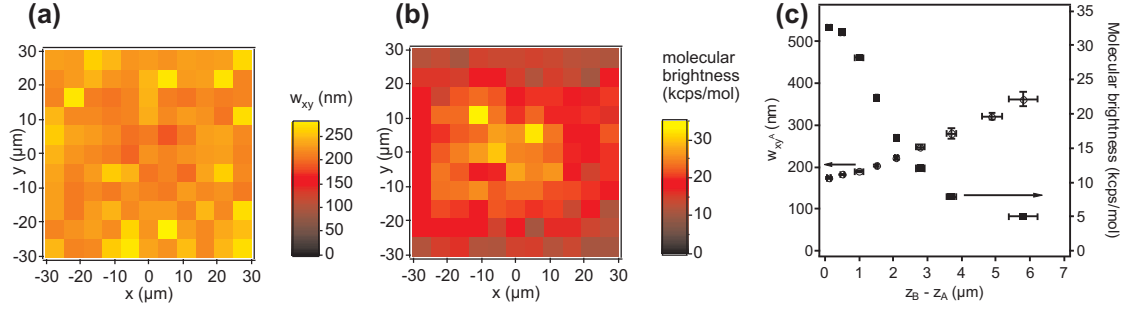


Figure 1.3 – Modifications des performances optiques en fonction du positionnement du volume de mesure. (a) Cartographie de la taille transverse w du volume observation en fonction du positionnement transverse de ce volume dans le plan focal. (b) Cartographie du taux de comptage par molécule dans les mêmes conditions. (c) Évolution de ces paramètres lorsque le volume de mesure est déplacé hors du plan focal. D'après [Ferrand *et al.*, 2009].

Modularité

L'instrument donne la mesure de sa flexibilité dans toutes les mesures exploitant les deux voies simultanément, comme la possibilité d'une imagerie confocale, simultanément à une mesure ponctuelle de FCS, illustrée sur la Fig. 1.4.

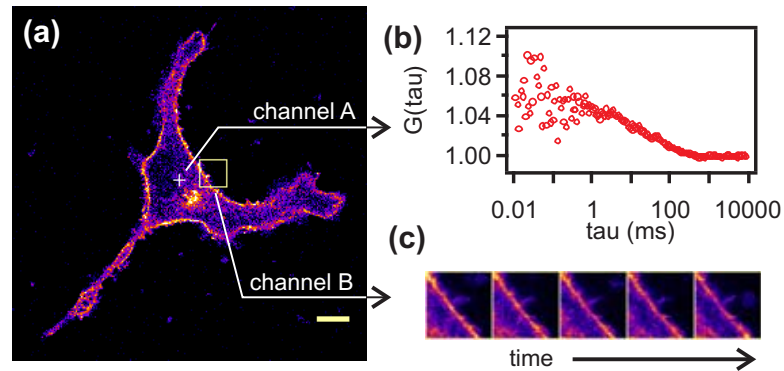


Figure 1.4 – Exemple de mesure simultanée de FCS et d'imagerie de contrôle. (a) Image préliminaire, permettant de choisir la zone à mesurer en FCS (canal A), et celle à imager en parallèle (canal B). (b) Corrélogramme. (c) Séquence d'image acquise simultanément. Dans le cas présent, aucun mouvement de cellule n'est observable. D'après [Ferrand *et al.*, 2009].

Corrélation spatio-temporelle

Un exemple de mesure de corrélations spatio-temporelles est illustré sur la Fig. 1.5. L'échantillon est constitué de billes fluorescentes de 20 nm de diamètre en solution. La mesure a été faite en un seul point, qui décrivant dans la solution une orbite circulaire de rayon $R = 0,5 \mu\text{m}$, avec une période de 1 ms. L'intensité de fluorescence est mesurée en $N = 20$ points de l'orbite, pour un grand nombre de révolutions, pendant une durée totale de 60 s.

A partir de la trace d'intensité, on peut donc reconstruire a posteriori la trace d'intensité $I_i(t)$, pour le i -ième point de l'orbite, comme illustré sur la Fig. 1.5a, avec un échantillonnage de 1 ms. L'objet sondé étant invariant par translation, la corrélation temporelle dépend simplement de la distance entre les points considérés et non de leur positions absolues, si bien que l'Eq. 1.2 est adaptée pour donner

$$g(k, \tau) = \frac{\langle I_i(t) I_{i+k}(t + \tau) \rangle_i}{\langle I_i(t) \rangle_i \langle I_{i+k}(t + \tau) \rangle_i}, \quad (1.4)$$

où k est le nombre de pas sur l'orbite qui sépare deux points de mesure, et $\langle \rangle_i$ indique désormais une moyenne à la fois sur le temps et sur la position i . Pour un écart de k points, la distance correspondante est $d_k = 2R|\sin(k\pi/N)|$. Finalement, la corrélation spatio-temporelle peut donc être tracée en fonction du délai τ , pour plusieurs distances d_k , comme le montre la Fig. 1.5b. Son allure, qui comporte un épaulement se décalant à mesure que la distance augmente, permet d'identifier sans ambiguïté que la fluctuation d'intensité est due à un processus de diffusion, comme le montrent les courbes théoriques tracées en arrière-plan.

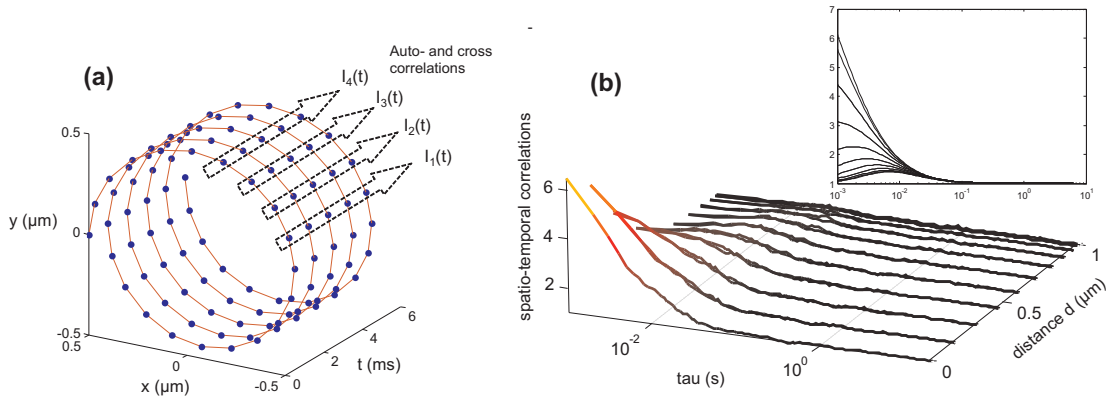


Figure 1.5 – Exemple de mesure de corrélation spatio-temporelle. (a) Schéma de l'orbite parcourue par le point de mesure dans la solution. (b) Corrélation spatio-temporelle extraite de la mesure. Un faisceau de courbes théoriques de corrélation spatio-temporelle pour un cas de diffusion 3D est représenté à l'arrière-plan.

Chapitre 2

Microscopie à haute résolution axiale

“The axial (z) resolution of any fluorescence microscope using a single lens is limited by diffraction to >500 nm.”

— J. Bewersdorf, A. Egner, and S. W. Hell, 2006

[Bewersdorf *et al.*, 2006]

Les travaux que je décris dans ce chapitre illustrent de façon emblématique comment l'apparition de nouveaux dispositifs peut faire émerger de nouvelles thématiques de recherche, et parfois de remettre en cause les certitudes les plus profondément établies, comme celle affirmée dans cet exergue.

Dans le cas présent, il est question des modulateurs spatiaux de lumière (nous utiliserons l'acronyme anglais SLM, pour *Spatial Light Modulator*), qui sont des dispositifs matriciels qui permettent de contrôler, de façon dynamique, les propriétés d'amplitude ou de phase, en différents points d'un front lumineux. Les SLMs permettent de façonner des fronts d'ondes avec une versatilité presque sans limite. Placés en amont d'une optique de focalisation, ils permettent ainsi de revisiter tous les champs de recherche utilisant des champs focalisés, au premier rang desquels figure naturellement la microscopie.

On doit l'idée de l'approche originale que je vais décrire ici à mes collègues Anne Sentenac et Emeric Mudry, de l'équipe SEMOX. En collaboration avec ces derniers, et Eric Le Moal, alors post-doc, j'en ai supervisé la démonstration expérimentale. J'en présente ici le contexte, le principe général et les premiers résultats obtenus.

2.1 Contexte

En imagerie optique, la direction axiale — le long de l'axe optique — est par construction le parent pauvre en termes de résolution. Ainsi, en microscopie, alors que les meilleurs objectifs offrent une résolution transverse d'une demie longueur d'onde, soit typiquement 200 nm, la résolution axiale est quant à elle dégradée d'un facteur trois. La raison, simple, peut aisément se comprendre en considérant comment la focalisation est opérée par une len-

tille : dans le plan focal transverse, la tache de focalisation résulte de l'interférence d'ondes contra-propagatives ; dans la direction axiale, toutes les ondes proviennent du même côté, la tache de focalisation est donc plus étalée dans cette direction, comme illustré sur la Fig. 2.1a, la résolution se trouve donc dégradée. On se convainc donc facilement qu'une résolution isotrope nécessite une focalisation parfaitement sphérique.

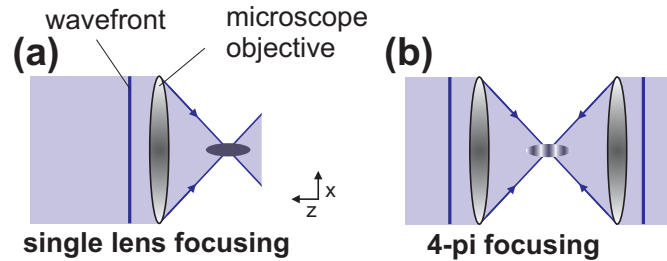


Figure 2.1 – Focalisation d'un faisceau de lumière par une lentille. (a) Focalisation conventionnelle, la tache de focalisation est allongée dans la direction de l'axe optique (b) Focalisation 4 pi. La tache est quasi-isotrope, flanquée de taches secondaires. Adapté de [Mudry et al., 2010]

En microscopie, ce constat a abouti au développement de méthodes exploitant des géométries de focalisation plus élaborées, dont la plus connue est la microscopie dite "4 pi" [Hell et Stelzer, 1992] : la focalisation est produite par deux objectifs de microscope en vis-à-vis ; l'addition de deux ondes contra-propagatives produit une tache de focalisation quasi sphérique, flanquée de taches secondaires, comme illustré sur la Fig. 2.1b. Après déconvolution, les images obtenues avec un tel système présentent en principe une résolution quasi isotrope. La mise en pratique de cette idée assez simple nécessite un montage interférométrique de grande précision, condition qui nécessite des alignements aussi fréquents que fastidieux, et le développement d'un système de contrôle actif des deux chemins optiques dans le statif de microscope. En raison de ces difficultés matérielles, et de la concurrence des méthodes de nanoscopie (STED, STORM, etc.), la microscopie 4pi n'a pas rencontré le succès escompté.

La microscopie ISO, pour *Isotropic Single Objective*, en propose une alternative particulièrement élégante, avec une configuration expérimentale bien plus simple.

2.2 Principe de la microscopie ISO

On pourrait croire à une boutade : puisqu'il faut deux objectifs, un objectif et son image par un miroir devraient faire l'affaire. La réalité n'est pas très loin. Le principe de microscopie ISO est schématisé sur la Fig. 2.2. Alors qu'une onde plane est focalisée en un point par une lentille, une onde possédant un front d'onde mis en forme de façon appropriée peut être focalisée en des points arbitraires de l'espace. En particulier, la focalisation peut être réalisée en deux points disposés sur le même axe longitudinal, comme illustré sur

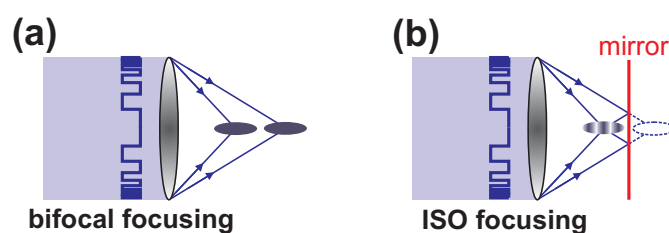


Figure 2.2 – Principe de la microscopie ISO. (a) Focalisation d'un faisceau mis en forme pour une focalisation bifocale (b) Focalisation ISO. Adapté de [Mudry *et al.*, 2010]

la Fig. 2.2a. Grâce à un miroir soigneusement positionné, la focalisation ISO permet la superposition cohérente des deux taches, réalisant une figure d'interférence similaire à celle de la microscopie 4pi.

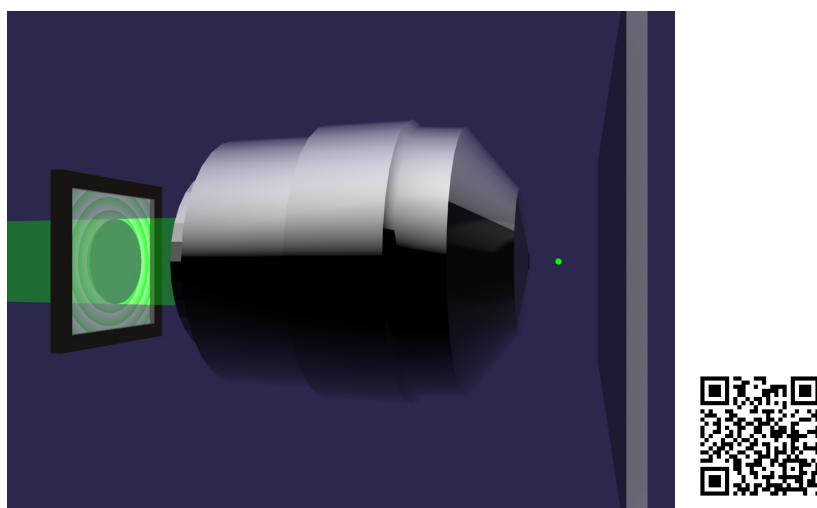


Figure 2.3 – Vue d'artiste de la microscopie ISO. Le faisceau laser est mis en forme par le SLM. Grâce à la présence du miroir, une tache quasi-sphérique est produite dans l'objet à sonder. Une vidéo explicative complète est déposée l'adresse <http://youtu.be/z8laT0xEYs>, accessible également en *flashant* le code QR ci-dessus.

D'un point de vue instrumental, l'intérêt est évident : l'interférence étant désormais produite de façon intégrée (comme l'est déjà la focalisation par une lentille), via un unique objectif de microscope, le système possède par construction une stabilité à toute épreuve. En modifiant le motif de phase du SLM, la tache quasi-sphérique obtenue peut être positionnée à loisir dans les trois dimensions du spécimen, permettant ainsi une imagerie 3D. En pratique, le temps de réponse d'un SLM (de l'ordre de la dizaine de ms) rend son utilisation rédhibitoire pour ce balayage tridimensionnel ; on le réserve donc au balayage axial, tandis que le balayage transverse se fait, classiquement, soit en déplaçant l'échantillon sur une

platine motorisée, soit par balayage du faisceau à l'aide de miroirs galvanométriques.

La principale contrainte introduite par cette méthode est la nécessaire présence d'un miroir. Ce dernier sera donc utilisé à la place de la classique lame de microscope comme substrat de l'échantillon à analyser.

2.3 Description du microscope

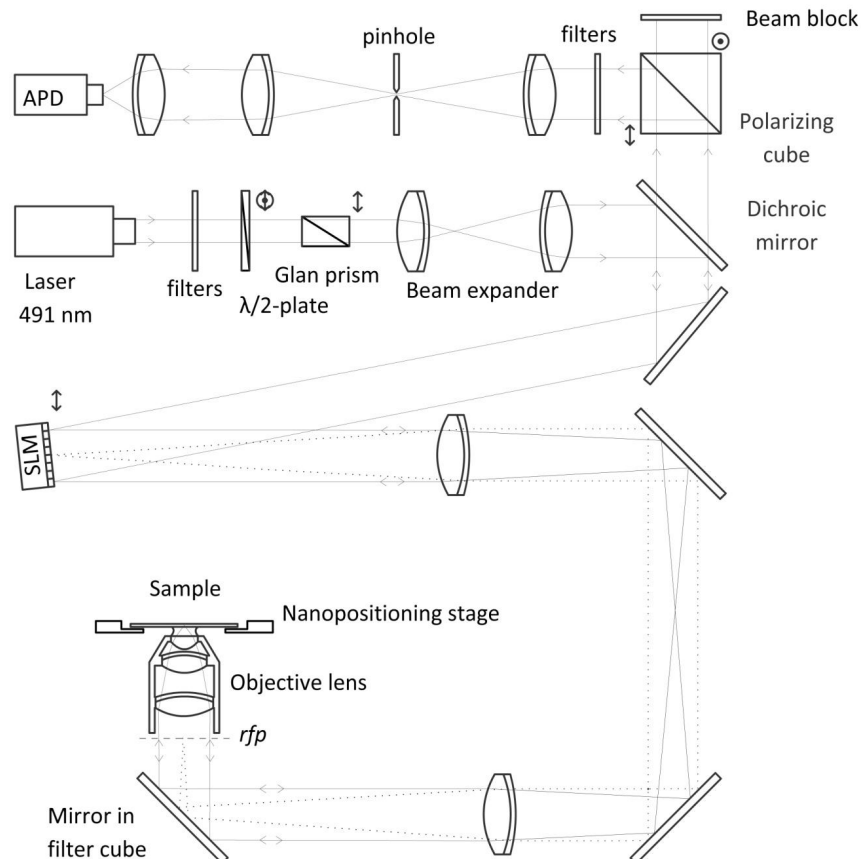


Figure 2.4 – Banc optique du microscope ISO. Le SLM est placé dans un plan conjugué au plan focal arrière (noté *rfp*) de l'objectif de microscope. D'après [Le Moal *et al.*, 2011].

Le montage optique est schématisé sur la Fig. 2.4. Il est basé sur un montage classique de microscopie confocale d'épi-fluorescence, à ceci près qu'un SLM est inséré entre le miroir dichroïque et l'objectif, dans un plan conjugué au plan focal arrière de l'objectif via un système afocal. On a bien compris que le SLM permet de produire deux taches de focalisation dans l'échantillon ; le fait qu'il se trouve également sur la trajet du faisceau de

fluorescence émise garantit en outre que chacune de ses taches restera conjuguée au trou de filtrage (*pinhole* sur la Fig. 2.4). A noter que cet effet, similaire dans son principe au *descan* opéré sur le trajet retour de fluorescence par des miroirs de balayage du faisceau, est possible dans la mesure où excitation et fluorescence ont des longueurs d'ondes voisines et voient donc de façon similaire les motifs de phase du SLM.

Concernant le motif de phase à afficher sur le SLM, plusieurs approches sont possibles : soit une segmentation de la pupille avec des motifs alternés de deux lentilles de Fresnel, soit un motif de phase déduit du calcul du rayonnement d'un dipôle et de son image. Nous avons pu tester les deux approches ; bien que différentes dans leur philosophie et dans le masque produit, elle donnent des résultats similaires en termes de résolution [Le Moal *et al.*, 2011].

2.4 Résultats

Pour mettre en évidence expérimentalement l'amélioration de résolution axiale, nous avons enregistré des images tridimensionnelles de microbilles fluorescentes isolées de 100 nm de diamètre, taille qui permet en très bonne approximation d'observer directement la fonction d'appareil du microscope et donc de quantifier la résolution spatiale. En pratique, les billes sont piégées dans un gel d'agarose, le tout étant placé sur un miroir métallique, comme illustré sur la Fig. 2.5a.

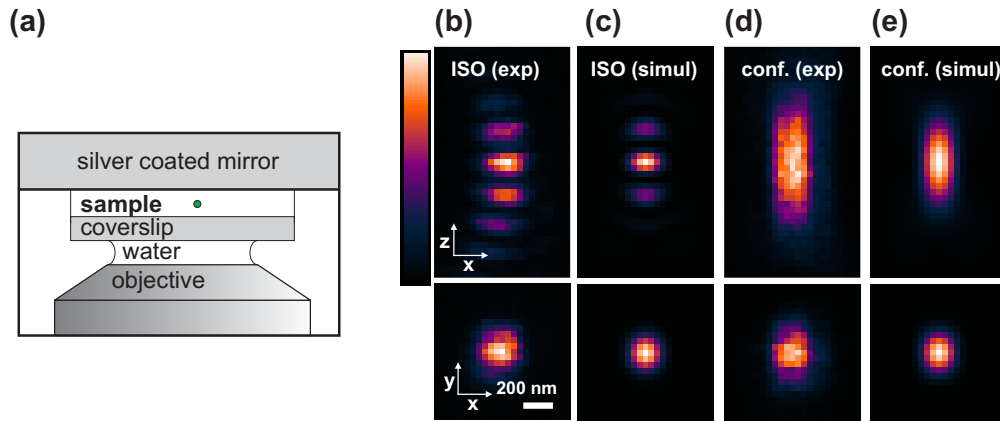
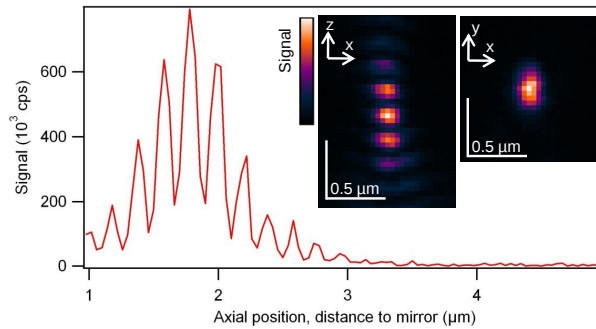


Figure 2.5 – (a) Configuration de la mesure sur bille isolée. Coupes longitudinales (xz) et transverses (xy) des images tridimensionnelles d'une microbille fluorescente, En géométrie ISO, (b) expériences et (c) simulation, et en mode confocal simple, (d) expériences et (e) simulation. Adapté de [Mudry *et al.*, 2010].

Les Figs. 2.5b-e donne un aperçu des résultats obtenus : conformément aux simulations, on observe une tache d'intensité zébrée, présentant un maximum en son centre. Les mêmes mesures en mode confocal standard (le SLM affiche alors un motif plat), permettent d'apprécier le gain dans la direction axiale. Pour cette première démonstration expérimentale, l'amplitude des lobes secondaires, de l'ordre 80% de l'intensité de la tache

principale, est certes trop importante pour permettre une déconvolution dans de bonnes conditions en situation d'imagerie. Il reste cependant une importante marge de progression, en utilisant des objectifs plus ouverts.

(a) 1-photon ISO



(b) 2-photon ISO

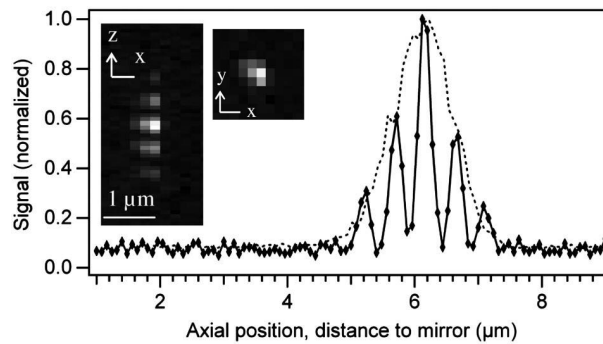


Figure 2.6 – Comparaison des profils d'intensité des images tridimensionnelles d'une microbille fluorescente. (a) Cas de fluorescence conventionnelle à 1 photon, d'après [Le Moal *et al.*, 2011]. (b) Cas de la fluorescence à deux photons, d'après [Le Moal *et al.*, 2012].

Les premiers résultats expérimentaux ont été publiés dans *Physical Review Letters* [Mudry *et al.*, 2010]. La théorie ainsi que la mise en œuvre expérimentale, ont fait l'objet d'un article détaillé dans *Journal of the Optical Society of America* [Le Moal *et al.*, 2011], et reproduit en annexe de ce mémoire, p. 113. Enfin, nous avons démontré expérimentalement que la géométrie ISO était compatible avec la microscopie à absorption de deux photons, et même plus favorable, en raison des intensités de lobes secondaires notablement diminuées, comme cela apparaît sur la Fig. 2.6b [Le Moal *et al.*, 2012].

Puisqu'elle améliore la résolution axiale grâce à une approche technique relativement simple, la microscopie ISO possède des atouts certains pour concurrencer la géométrie 4 pi. Dans le domaine de la superrésolution, cette dernière s'est déjà mariée avec succès à

la microscopie STED, sous l'acronyme iso-STED (sic) [Hell *et al.*, 2009]. C'est désormais également le cas de notre approche ISO, comme l'a démontré récemment un groupe chinois [Li *et al.*, 2012].

De façon plus générale, la géométrie ISO ne propose donc pas moins qu'une nouvelle façon de concentrer la lumière, en exploitant le potentiel du contrôle de front d'onde.

Chapitre 3

Microscopie non-linéaire hypermodale

“Tout est bon dans le photon.”
— Anonyme

L'optique non-linéaire propose un large éventail de contrastes pour la microscopie du vivant, en exploitant l'excitation à plusieurs photons de la fluorescence, les transitions vibrationnelles des liaisons chimiques (CARS, SRS, etc.), ou les mélanges d'ondes (FWM, SHG, THG), qui sondent les propriétés de symétrie de la matière.

Outre la nécessité de disposer de sources laser appropriées, la mise en œuvre de la microscopie non-linéaire sur des microscopes ouverts de laboratoires est un défi technologique, particulièrement en ce qui concerne la cadence d'acquisition des images : en accédant à des temps de mesure de l'ordre de la seconde, l'image n'est pas seulement rapide, elle peut constituer la brique élémentaire avec laquelle on compose pour construire des méthodes d'imagerie que je qualifie d'*hypermodales*, à savoir basées sur l'analyse de séquences d'images obtenues en faisant varier un paramètre (longueur d'onde, polarisation d'excitation, délai entre deux pulses, etc.).

C'est un défi technologique que j'ai relevé et que je décris ici, l'enjeu n'étant pas de mesurer plus vite, mais bel et bien d'étendre le champ des possibles.

3.1 Mise en œuvre de l'imagerie rapide par balayage

La nécessité de l'imagerie par balayage

Les processus non-linéaires se manifestent en présence de forts champs électromagnétiques. On les observe donc en concentrant la lumière, temporellement en utilisant des sources laser impulsives, et spatialement au foyer d'un objectif de microscope de grande ouverture. L'effet non-linéaire se produit donc exclusivement dans une région spatiale restreinte, de la taille d'une tache de diffraction, une propriété qui est exploitée pour produire des images tridimensionnelles. En contrepartie, l'acquisition d'images se fait par *balayage*, une modalité de mesure intrinsèquement lente, car basée sur des acquisitions séquentielles.

Les différentes approches d'imagerie rapide tridimensionnelles de la microscopie linéaire (éclairage par un disque de Nipkow, éclairage structuré) sont ici d'un apport limité.

Mise en œuvre technique

L'imagerie par balayage étant lente, il est crucial que le contrôle de l'instrument et l'acquisition des données, dont le temps d'exécution se rajoute à celui, incompressible, de la mesure à proprement parler, soit réduit au minimum. Pour comprendre l'enjeu que représentent ces considérations très techniques, il est important d'avoir en tête l'ordre de grandeurs du temps consacré aux diverses communications entre le micro-ordinateur et les instruments contrôlés.

a) Envoi de la commande



b) Execution de la commande



c) Réception des données ou rapports d'exécution



Figure 3.1 – Séquence de communications entre un ordinateur et un contrôleur d'instrument. Le temps consacré aux communications (étapes (a) et (c)) est de l'ordre de 100 ms.

Pour simplifier, on peut considérer la séquence de communication avec un contrôleur externe (dispositif mécanique motorisé, détecteur, etc.), qui est généralement la brique élémentaire de tout programme d'automatisation d'expérience et d'acquisition de données. On peut la décomposer en trois étapes successives illustrées sur la Fig. 3.1 : (a) le micro-ordinateur envoie la commande au contrôleur ; (b) ce dernier l'interprète, l'exécute, puis (c) retourne un rapport d'exécution, incluant le cas échéant des données mesurées. Indépendamment de la norme de communication (RS-232, USB, etc.), il faut savoir que le temps consacré aux communications, c'est-à-dire uniquement aux étapes (a) et (c) de la Fig. 3.1, descend difficilement sous la centaine de millisecondes. Négligeable lorsque l'exécution de la commande (étape (b)) est longue, ce temps de communication pèse significativement pour les mesures quasi-instantanées, et a fortiori de façon rédhibitoire lorsque

le nombre de mesures est important (il faudrait ainsi compter 16 min pour une modeste image de 100×100 points).

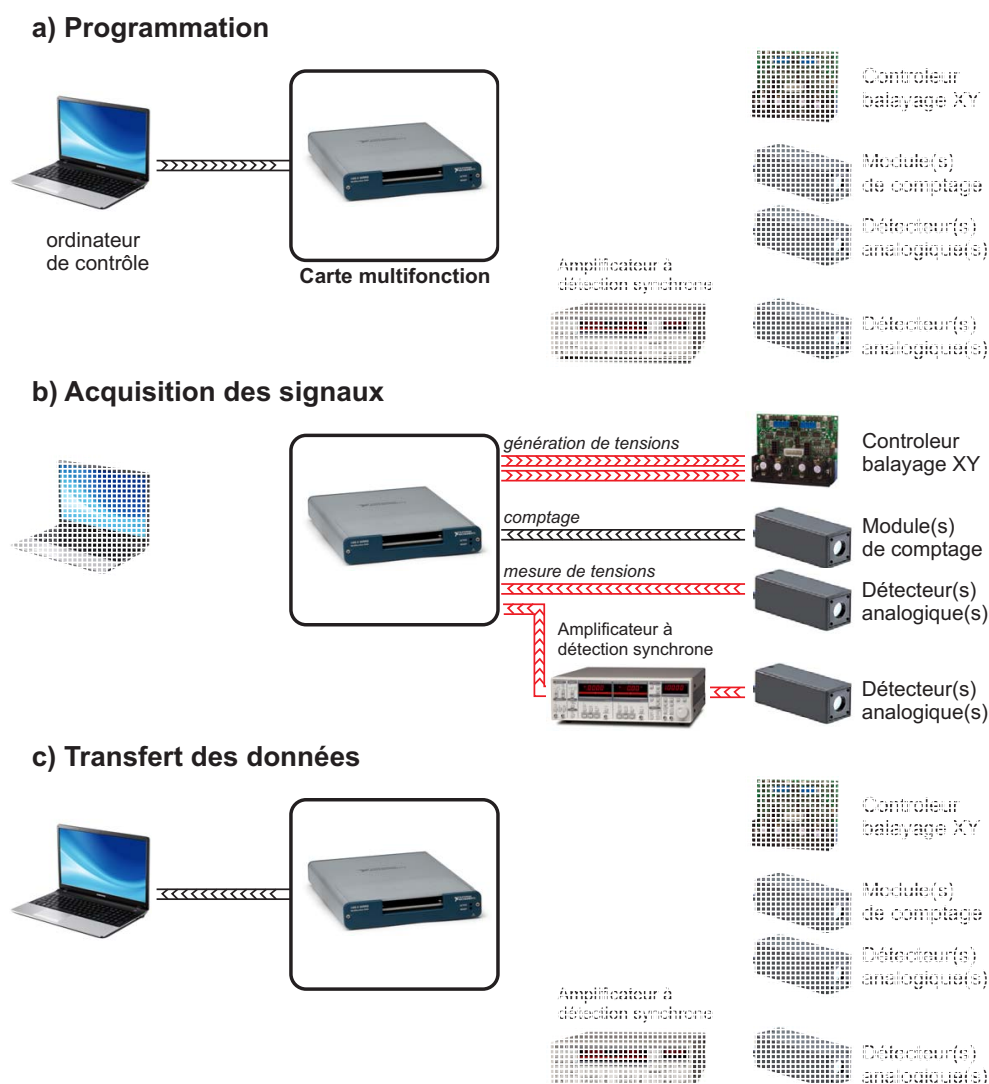


Figure 3.2 – Séquence d’une mesure de microscopie de balayage optimisée au moyen d’une carte multifonction programmable. Dans la pratique, les étapes (a) à (c) se déroulent quasi simultanément.

La solution que j’ai développée repose sur l’utilisation de cartes d’acquisitions multifonctions programmables (Série X, National Instruments) et sur le pilotage des instruments via des signaux analogiques (tensions) [Ferrand, 2014]. Ces derniers offrent l’avantage d’un adressage universel quasi-instantané. La séquence correspondant à l’acquisition d’une image

par balayage, et donc à une collecte *massive* de données, est illustrée sur la Fig. 3.2. Elle se décompose en trois étapes :

- (a) La carte est programmée pour la génération de tensions à haute cadence. Ces tensions, contrôlant la position xy du point de mesure, sont vouées à être appliquées aux deux voies d'un contrôleur de miroirs galvanométriques ou de platine de déplacement piézoélectrique, à une cadence pouvant atteindre un million d'échantillons par seconde, correspondant donc à des temps de pause de $1\ \mu s$ par pixel au minimum. La carte est également conditionnée pour réaliser, de façon synchrone à ces générations, des acquisitions, soit de tensions (provenant de détecteurs analogiques, éventuellement via un amplificateur à détection synchrone), soit de comptage d'impulsions TTL (provenant de modules de comptage de photons). Cette étape de programmation prend une fraction de secondes.
- (b) La séquence de mesure est exécutée, sans être ralentie par aucun temps de communication. Les différents signaux mesurés sont stockés dans la mémoire de la carte.
- (c) Les données mesurées sont transférées à l'ordinateur de contrôle.

Dans la pratique, la carte jongle avec les flux de données en exploitant des mémoires tampon, si bien que, de façon transparente pour l'utilisateur, les différentes étapes (a), (b) et (c) peuvent être menées de concert. Il en résulte des durées d'acquisition à peine supérieures au temps cumulé des multiples mesures.

Performances obtenues

La cadence maximale de mesure est de l'ordre du million d'échantillons par seconde, ce qui permet *en principe* une cadence de quelques images par seconde à la meilleure définition. Dans la pratique, ce n'est ni l'électronique, ni la vitesse des miroirs galvanométriques qui décident de la cadence maximale des mesures, mais davantage la recherche d'un rapport signal sur bruit acceptable.

Pour les signaux analogiques, on peut approcher ces cadences ultimes si les flux lumineux détectés sont suffisamment intenses. Pour les signaux provenant de modules de comptage de photons, ces derniers sont limités à des taux de comptage de quelques millions de photons par seconde (donc quelques photons par microseconde). Un temps de comptage de l'ordre de $100\ \mu s$ est donc un minimum pour obtenir des images d'un rapport signal sur bruit acceptable.

3.2 Développement d'une interface complète d'imagerie

Le contrôle d'un système de microscopie, allant de la simple observation en temps réel par l'opérateur à l'analyse d'image, en passant éventuellement par des opérations sur les images, requiert une interface à la fois élaborée par ses fonctions, et ergonomique pour être utilisée efficacement. De tels programmes existent : ce sont ceux développés par les grands fabricants de microscopes. Très élaborés, ils sont cependant verrouillés car conçus pour

des instruments clé en main, et se prêtent mal au développement de nouvelles méthodes instrumentales.

On peut penser au programme μ Manager¹, conçu quant à lui autour du programme d'analyse d'image ImageJ, et véritablement *ouvert*. Cependant, ne gérant pas les cartes d'acquisition rapides dans toute leur puissance, il est peu adapté à l'imagerie par balayage.

Fort de ce constat, j'ai très tôt travaillé à développer une bibliothèque de programmes pour le contrôle des expérimentations de microscopie à balayage et l'analyse d'images. J'ai ainsi pu mettre en place, en environnement de programmation LabVIEW, un noyau de programmes de haut niveau, associés à une interface ergonomique et des routines d'importation de données, qu'il m'est facile d'adapter à toute nouvelle modalité de mesure, et de déployer sur une grande variété de bancs expérimentaux. Une capture d'écran du panneau de contrôle est affichée en Fig. 3.3.

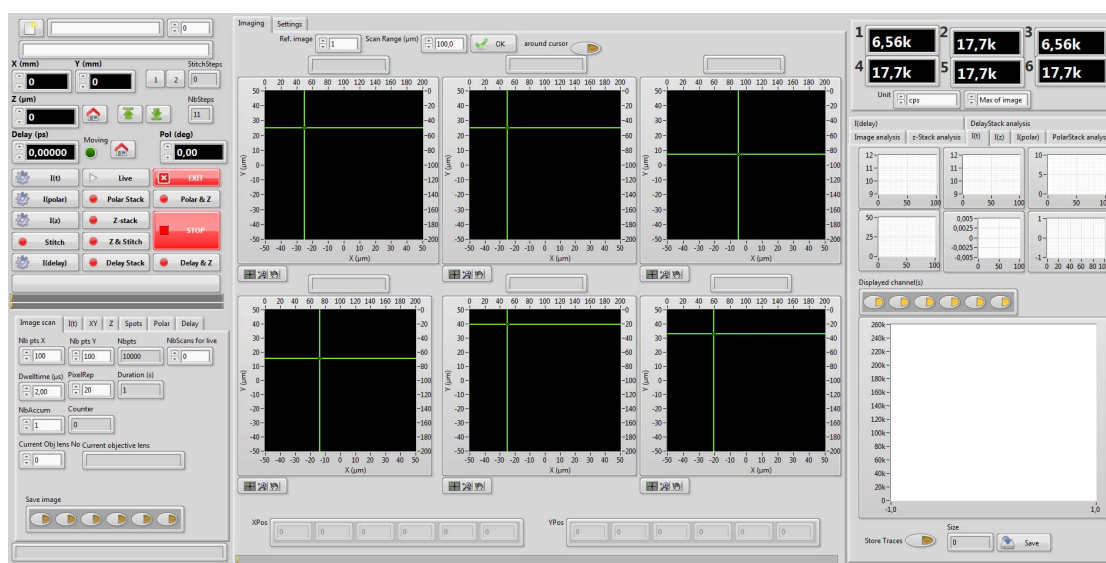


Figure 3.3 – Capture d'écran de l'interface d'imagerie. Les boutons de gauche permettent un lancement direct des modalités de mesure courantes. L'acquisition est effectuée en parallèle sur six voies, affichées simultanément. La définition de la région à mesurer est indiquée par l'utilisateur simplement en grossissant ou déplaçant l'image affichée. L'interface possède également quelques outils de pré-analyse des données mesurées.

3.3 Quelques exemples d'applications

Grâce à l'ensemble de ces outils, qui ont nécessité plusieurs années de développement, et auxquels je consacre encore aujourd'hui une part importante de mon activité, les développements instrumentaux en optique non-linéaire effectués dans notre équipe se déclinent

1. micro-manager.org

naturellement dans une modalité d'imagerie, condition *sine qua non* pour leur application en biologie.

Il s'agit notamment des méthodes hypermodales polarimétriques. Différents contrastes non-linéaires ont été étudiés. On peut citer le mélange à quatre ondes (FWM), la diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) [Bioud *et al.*, 2014], et la génération de second harmonique [Aït-Belkacem *et al.*, 2012], dont nous avons montré récemment la capacité à quantifier l'ordre moléculaire sans marquage, ou encore la fluorescence (à un et deux photons), dont il sera largement question dans la deuxième partie de ce mémoire.

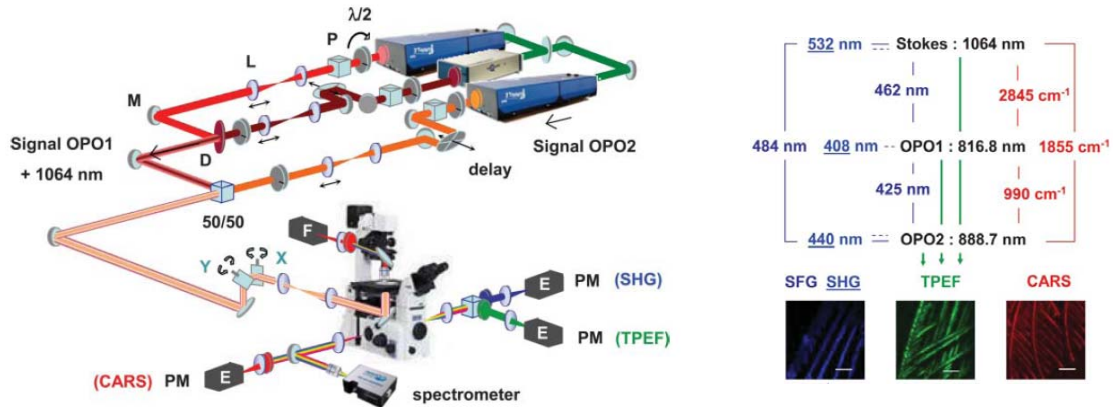


Figure 3.4 – Système de microscopie multimodale utilisant comme sources un laser pompe et deux oscillateurs paramétriques optiques (OPO1 et OPO2), permettant ainsi d'adresser différents processus non-linéaires simultanément. Gauche : Schéma du banc optique. Droite : Diagramme illustrant l'ensemble des contrastes qui peuvent être adressés sur des cristaux de TTB (1,3,5-tricyano-2, 4,6-tris(p-diethylaminostyryl)benzene). Adapté de [Brustlein *et al.*, 2011].

On peut également mentionner le développement de nouvelles sources : la microscopie non-linéaire se heurte en effet au coût et à la mise en œuvre délicate des sources lasers, notamment lorsqu'une synchronisation de plusieurs lasers est nécessaire. Notre équipe a fait plusieurs démonstrations en ce sens, comme l'utilisation d'oscillateurs paramétriques optiques, sources naturellement synchronisées pour la microscopie à mélange d'ondes [Brustlein *et al.*, 2011], comme illustré sur la Fig. 3.4. Plus récemment, la génération de solitons dans des fibres à cristaux photoniques a été proposée pour la génération d'impulsions en alternative aux lasers accordables [Saint-Jalm *et al.*, 2014].

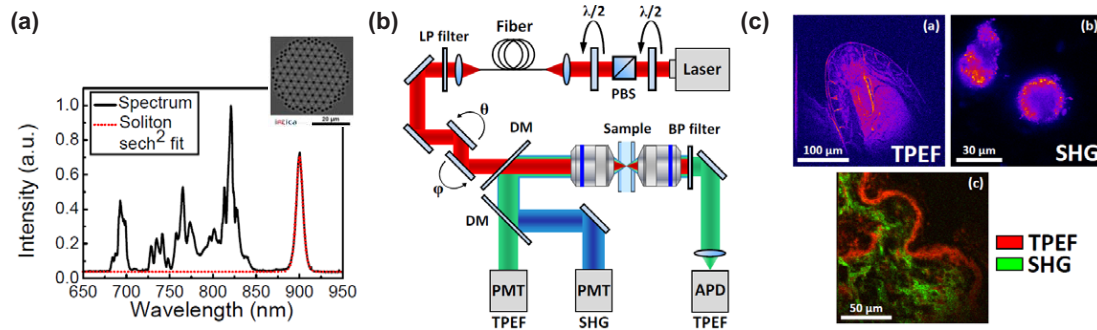


Figure 3.5 – Génération de pulses ultra-courts par des fibres à cristal photonique. (a) Spectre en sortie de fibre, montrant la présence du soliton à 900 nm. Vue en microscopie électronique de la fibre. (b) Montage expérimental. (c) Quelques exemples de mesures sur des échantillons biologiques. Adapté de [Saint-Jalm *et al.*, 2014].

Deuxième partie

Nouvelles observables :
l'ordre orientationnel

Chapitre 4

Nécessité de nouvelles observables

4.1 Que peut encore nous apprendre la microscopie ?

Aujourd'hui, grâce aux multiples interactions lumière-matière qu'elle sait sonder, la microscopie permet non seulement d'observer la morphologie d'un spécimen mais également d'en dresser un profil analytique détaillé. On peut ainsi, par exemple, grâce à des marqueurs fluorescents spécifiques, repérer les différents organelles de la cellule, ou grâce à la microscopie non-linéaire, imager sans marquage des tissus biologiques. Toutes ces techniques fournissent donc une cartographie tri-dimensionnelle d'une certaine grandeur physique, généralement un nombre de fluorophores ou de liaisons chimiques résonnantes, avec une résolution de l'ordre du micromètre.

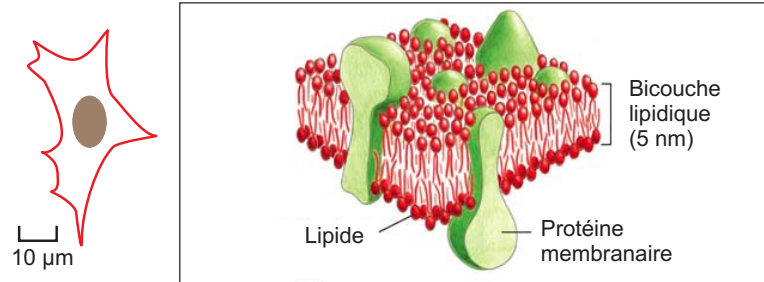
Cette résolution spatiale est cependant insuffisante pour révéler la véritable structure et le fonctionnement des structures étudiées, en raison des dimensions nanométriques de ces dernières. Si l'on prend l'exemple de la membrane plasmique, sur laquelle nous reviendrons par la suite, son épaisseur est inférieure à 10 nm. La microscopie permet donc de repérer sa présence, au mieux son contour approximatif, mais ne pourra en aucun cas révéler les plus fines de ses caractéristiques, telles que sa véritable morphologie à l'échelle moléculaire (y a-t-il des repliements ?) ou sa structure (y a-t-il des zones plus riches en cholestérol ? quelle est leur taille ?).

Les méthodes que j'ai développées, et que je détaille dans les chapitres qui suivent, proposent une réponse à cette problématique, en introduisant de nouvelles observables relatives à l'ordre orientationnel.

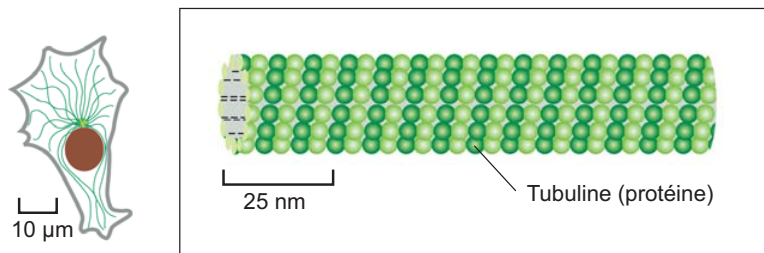
4.2 Notion d'ordre orientationnel

La Fig. 4.1, extraite d'un traité de biologie cellulaire [Alberts *et al.*, 2010], illustre trois composants majeurs de la cellule : (a) la membrane plasmique, qui constitue l'interface entre la cellule et le reste de l'organisme, (b) les microtubules, qui sont les canaux de transport de la cellule, et (c) les filaments d'actine, qui façonnent les propriétés mécaniques de la cellule. Pour chaque cas, la figure oppose, dans sa partie gauche, ce que montre la micro-

(a) Membrane plasmique



(b) Microtubules



(c) Filaments d'actine

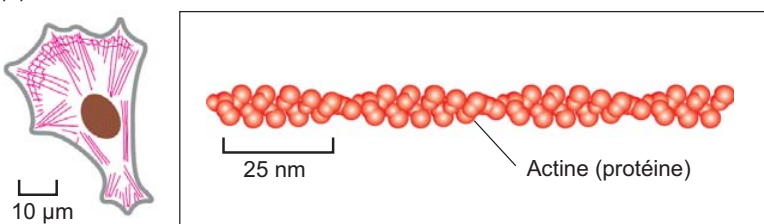


Figure 4.1 – Représentation schématique de quelques structures de la cellule. On notera les différences d'échelle entre l'image microscopique de gauche, et le modèle moléculaire de droite. Adapté de [Alberts *et al.*, 2010].

scopie de fluorescence à, dans sa partie droite, le modèle moléculaire communément admis par le biologiste, se basant sur une grande variété d'études complémentaires (microscopie électronique, analyses cristallographiques, biochimiques, etc.).

Ces trois exemples donnent un aperçu de la variété des agencements moléculaires que l'on rencontre dans les organismes vivants : mosaïque bidimensionnelle de lipides pour la membrane, structure polymérisée de protéines, tubulaire pour les microtubules ou hélicoïdale pour les filaments d'actine. Ces structures jouent un rôle majeur dans les propriétés et donc les fonctionnalités de ces composants. En outre — et cela n'apparaît pas sur cette figure — il s'agit d'entités hautement dynamiques, flexibles, et même fluides en ce qui concerne la membrane. Dans ces conditions, pour caractériser les propriétés structurales de cette matière molle, vouloir décrire l'agencement des molécules en termes de positions relatives, de façon cartésienne, est illusoire. Nous préférons donc nous intéresser à un autre indi-

cateur structural, moins précis mais plus robuste, que constituent les corrélations d'orientations entre molécules voisines, que nous qualifierons sous le terme générique d'*ordre orientationnel* et qui peuvent être étudiées en exploitant les spécificités de la fluorescence.

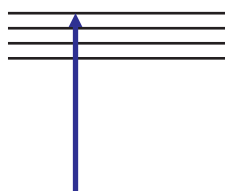
4.3 L'anisotropie de fluorescence

Sensibilité de la fluorescence à l'orientation

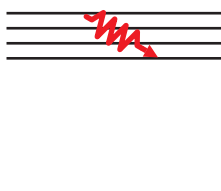
La fluorescence est un processus intrinsèquement sensible à l'orientation de molécules. Pour s'en convaincre, il est utile de rappeler que l'absorption de lumière, tout comme l'émission, résultent de couplages entre un champ électromagnétique et le déplacement des nuages électroniques de la matière.

La fluorescence d'un point de vue énergétique

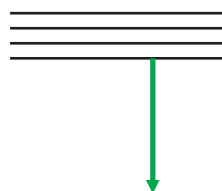
(a) Absorption



(b) Relaxation (qq ns)

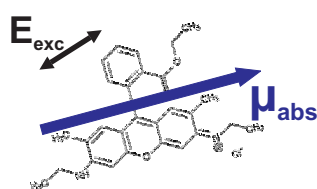


(c) Emission

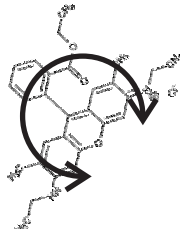


La fluorescence d'un point de vue dipolaire

(d) Absorption



(e) Relaxation (qq ns)



(f) Emission

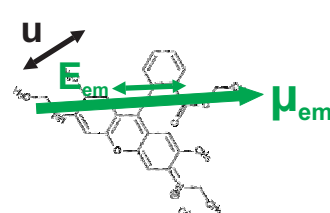


Figure 4.2 – La fluorescence, aspects énergétiques (a-c) et dipolaires (d-f). Outre l'accord énergétique (a), la probabilité d'absorption repose sur l'efficacité (d) du couplage entre le champ d'excitation $\vec{E}_{exc}$ et le moment dipolaire d'absorption $\vec{\mu}_{abs}$ de la molécule. La probabilité de détecter le photon émis dépend de l'efficacité (f) de transmission du champ rayonné $\vec{E}_{em}$ (ici aligné avec le moment $\vec{\mu}_{em}$ car supposé vu dans une direction d'observation perpendiculaire à ce dernier) à travers l'analyseur orienté selon $\vec{u}$. Le fluorophore choisi, ici la Rhodamine 6G, n'est qu'un exemple, où les orientations des moments de transition sont données à titre d'illustration. Les véritables orientations dépendent de la structure de la molécule et des niveaux énergétiques concernés.

Formellement, l'absorption implique un moment dipolaire de transition d'absorption $\vec{\mu}_{\text{abs}}$ tel que la probabilité d'absorber un photon s'écrit en fonction du champ électromagnétique $\vec{E}_{\text{exc}}$ comme

$$P_{\text{abs}} \propto |\vec{\mu}_{\text{abs}} \cdot \vec{E}_{\text{exc}}|^2, \quad (4.1)$$

indiquant par-là que le processus est d'autant plus efficace que moment et champ pointent dans des directions proches. Quant à l'émission de lumière, elle implique un moment dipolaire de transition d'émission $\vec{\mu}_{\text{em}}$ tel que dans la direction portée par $\vec{k}$, le champ lointain rayonné s'écrit $\vec{E}_{\text{em}} \propto \vec{k} \times (\vec{k} \times \vec{\mu}_{\text{em}})$: ce champ est donc à la fois perpendiculaire à la direction d'observation et dans le plan du dipôle $\vec{\mu}_{\text{em}}$. La lumière émise est donc polarisée de façon rectiligne. Derrière un polariseur définissant la direction d'analyse $\vec{u}$, la probabilité de détecter un photon de fluorescence est donc

$$P_{\text{em}} \propto |\vec{E}_{\text{em}} \cdot \vec{u}|^2. \quad (4.2)$$

Ainsi, outre l'aspect *énergétique* auquel on associe intuitivement la fluorescence, il convient donc, comme l'illustre la Fig. 4.2, de garder à l'esprit l'aspect *dipolaire* du processus, impliquant les conditions optiques d'excitation et de détection.

De la difficulté de mesurer des orientations

Les moments de transition étant liés à la molécule fluorescente, on conçoit que le sondage via un champ d'excitation et/ou une polarisation de détection *ad hoc* puisse, à distance, en révéler l'orientation. Par exemple, tourner un analyseur jusqu'à obtenir l'extinction de la fluorescence permet de déduire l'orientation de $\vec{\mu}_{\text{em}}$. La réalité n'est cependant pas aussi simple que cette expérience de pensée, car plusieurs facteurs peuvent brouiller les pistes.

En premier lieu, il est rare de disposer d'une molécule unique, qui plus est statique. Les conditions réalistes de mesure impliquent généralement une assemblée de molécules, souvent mobiles ; en conditions stationnaires, la mesure intègre donc inévitablement une moyenne à la fois d'ensemble et temporelle.

En outre, les orientation de $\vec{\mu}_{\text{abs}}$ et $\vec{\mu}_{\text{em}}$ peuvent être différentes. C'est peut être dû (i) aux propriétés intrinsèques de la molécule, (ii) au fait que la molécule a eu le temps de tourner avant d'émettre (C'est un cas fréquent en solution fluide, où les molécules peuvent effectuer une rotation sur elles-mêmes avec des temps typiques de quelques dizaines de picosecondes, généralement inférieurs à leur temps de vie, de l'ordre de la nanoseconde), ou encore (iii) à un transfert d'énergie entre molécules voisines (c'est une molécule voisine, orientée différemment, qui émet).

Principe de l'anisotropie de fluorescence

Pour ces raisons, les premières expérimentations mêlant fluorescence et polarisation de la lumière, apparues dans les années cinquante [Weber, 1953], ne se sont dans un premier temps pas focalisées sur la détermination pure d'orientations, mais ont plutôt indirectement exploité ces dernières pour étudier les propriétés de molécules fluorescentes en solution.

La méthode dite d'*anisotropie de fluorescence* repose sur des mesures menées de la façon suivante : on excite la fluorescence d'une solution grâce à une lumière polarisée, ce qui conduit, en vertu de l'Eq. 4.1, à la photo-sélection d'une fraction des molécules. Cette population partiellement orientée émet par fluorescence une lumière dont la polarisation partielle est analysée le long de deux directions orthogonales. En particulier, la technique permet de quantifier la dépolarisation induite par la rotation de la molécule ou un transfert d'énergie, phénomènes intimement liés aux propriétés de la solution (température, viscosité) comme de la molécule (taille, forme, rigidité). La grande sensibilité de la technique à ces multiples paramètres et sa facilité de mise en œuvre expliquent que l'anisotropie de fluorescence a été et reste encore une méthode de référence pour étudier les interactions de macromolécules biologiques, en régime stationnaire comme résolu en temps [Lakowicz, 2006].

4.4 La déclinaison aux milieux ordonnés

Premières applications

Bien que développée pour les milieux isotropes que sont les liquides, l'anisotropie de fluorescence a par la suite été exploitée pour l'étude de systèmes présentant une anisotropie marquée, à commencer par les membranes biologiques. On peut notamment citer les travaux pionniers d'Axelrod [Axelrod, 1979], reproduits sur la Fig. 4.3, portant sur des fluorophores à longue chaîne d'acyles, et visant à déterminer avec quelle orientation ceux-ci se fixent aux membranes lipidiques, ainsi que le degré de flexibilité de cette fixation.

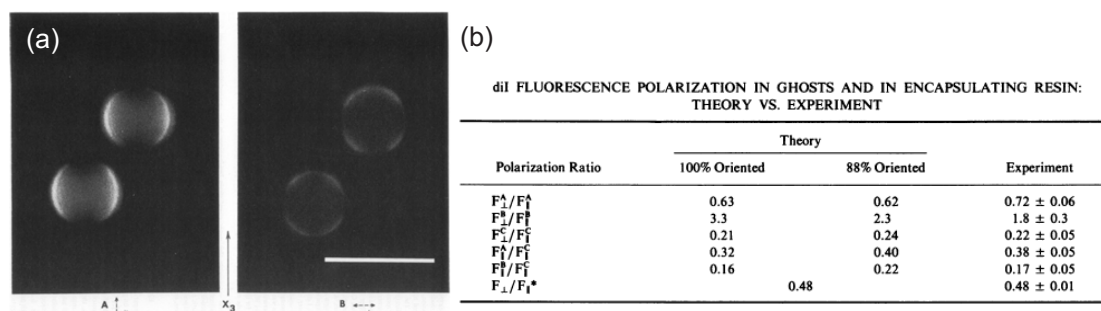


Figure 4.3 – Premiers travaux visant à étudier l'orientation du fluorophore Dil dans une membrane lipidique. (a) Images de fluorescence, sous différentes polarisation d'observation. (b) Données quantitative, permettant d'établir le degré d'orientation. Adapté de [Axelrod, 1979].

S'appuyant sur la même technique, Florine-Casteel ne s'est pas intéressée directement aux fluorophores en tant que tels, mais les a utilisés comme sondes. L'amplitude angulaire des mouvements de ces dernières s'est en effet révélée être un rapporteur pertinent de l'organisation moléculaire de membranes de liposomes [Florine-Casteel, 1990]. Par la

suite, cette approche a permis d'étudier des membranes artificielles [Solanko *et al.*, 2013, Timr *et al.*, 2014], des membranes de cellules [Benninger *et al.*, 2005] et d'autres systèmes biologique partiellement ordonnés, tels que les filaments d'actine [Borejdo et Burlacu, 1993] ou de septine [Vrabioiu et Mitchison, 2006].

En parallèle, plusieurs équipes ont développé une expertise dans la fixation rigide de sondes fluorescentes sur des protéines [Rocheleau *et al.*, 2003] [Lazar *et al.*, 2011].

Bien que reposant sur les mêmes principes généraux que ceux qui gouvernent son utilisation en solution, l'adaptation de l'anisotropie de fluorescence aux milieux ordonnés s'accompagne d'un certain nombre de ruptures, à la fois d'un point de vue méthodologique et expérimental. Les plus importantes sont décrites dans les paragraphes qui suivent.

Une information désormais orientationnelle

Contrairement aux solutions, dans laquelle l'anisotropie est induite par la photo-excitation, les milieux partiellement ordonnés sont intrinsèquement anisotropes, en raison de leur répartition angulaire inhomogène de fluorophores. Formellement, on peut donc décrire l'assemblée de fluorophores résultant de la moyenne temporelle et d'ensemble par une distribution angulaire tridimensionnelle. Cette dernière possède une orientation, des propriétés de symétrie et une forme qui résultent de l'interaction de la sonde fluorescente avec son environnement. Ainsi, par exemple, les études de milieux membranaires, à géométrie uniaxiale, utilisent des distributions à symétrie cylindrique, de forme conique [Axelrod, 1979, Florine-Casteel, 1990] ou gaussiennes [Benninger *et al.*, 2005].

Le rôle-clé du fluorophore

La méthode peut s'appuyer sur un important arsenal de molécules fluorescentes, qui peuvent s'insérer de façon spécifiques dans le composant à étudier [Lakowicz, 2006]. Par exemple, la Fig. 4.4 illustre le cas (a,b) des sondes lipidiques, qui s'insèrent de façon contrôlée dans la membrane plasmique et (c) des protéines fluorescentes qui, par fusion rendent fluorescente une portion de protéine donnée. De telles sondes sont donc autant de rapporteurs spécifiques de l'ordre moléculaire environnant, sous réserve que le lien soit suffisamment rigide de la structure d'intérêt, contrainte qui existait déjà pour les molécules en solution.

Comme illustré sur la Fig. 4.4, la forme de la distribution obtenue sera, outre l'environnement moléculaire, spécifique à la stratégie utilisée pour le marquage. Suivant que la sonde s'insère (a) perpendiculairement à la membrane, (b) de façon tangentielle à la membrane, ou (c) sur une partie d'une protéine membranaire, la distribution angulaire résultante, notée ici $f(\theta, \varphi)$, sera différente.

Aspect expérimental

D'un point de vue instrumental, comme le montre la Fig. 4.5, décliner l'anisotropie de fluorescence aux milieux ordonnés a nécessité de passer d'une configuration utilisant

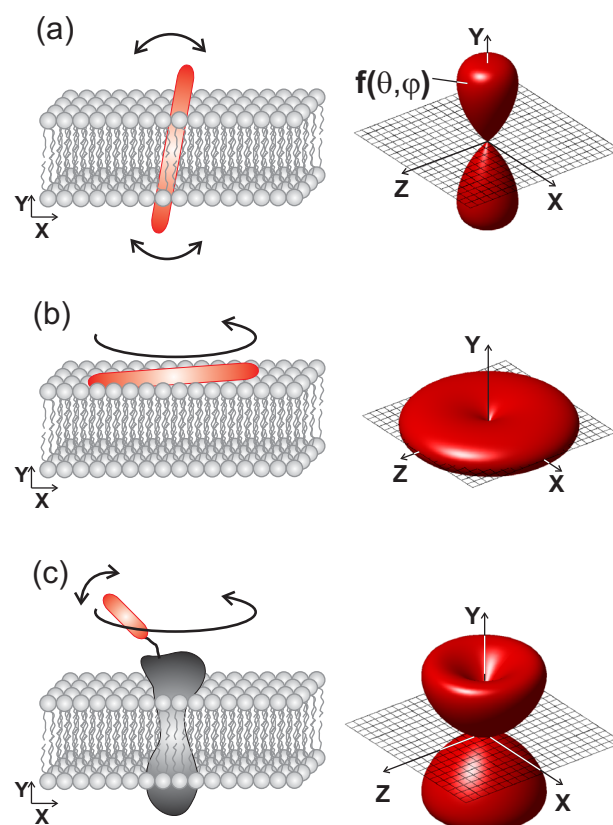


Figure 4.4 – Différents types de molécules fluorescentes permettant des mesures orientationnelles. A gauche, un schéma d'une molécule isolée. A droite, la distribution orientationnelle résultante pour des sondes lipidiques s'insèrent (a) perpendiculairement ou (b) parallèlement à la membrane. Déterminer les angles explorés par ces molécules renseigne sur les propriétés de la membrane. (c) Protéine membranaire fluorescente. Les angles explorés par le bras fluorescent peuvent renseigner sur la conformation de la protéine, comme sur les propriétés de la membrane.

cuvette et faisceaux collimatés à un système de microscopie permettant de recueillir des données sous forme d'images. Cette évolution s'est accompagnée de travaux théoriques visant à décrire l'anisotropie de fluorescence dans des conditions de faisceaux focalisés [Axelrod, 1979], et de la mise au point de protocoles permettant de quantifier les effets de biréfringence et de dichroïsme introduits par les composants optiques du microscope [Florine-Casteel, 1990].

Pour autant, le protocole de mesure est resté assez fidèle à ce qui avait été établi pour l'étude des solutions : généralement une polarisation rectiligne pour l'excitation, et la détection simultanée de la fluorescence sur deux canaux, correspondant à deux directions d'analyse de polarisations orthogonales (Fig. 4.5b). Alors même que cette géométrie était

(a) Mesure en solution (b) Mesure en microscopie

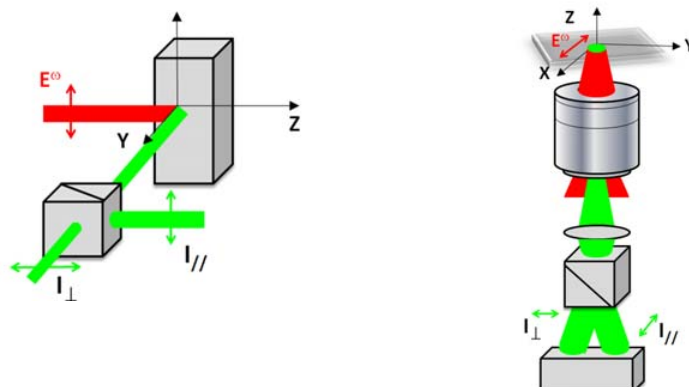


Figure 4.5 – Géométrie de mesure de l'anisotropie de fluorescence (a) en cuvette, pour l'analyse de solutions et (b) en microscopie, pour l'analyse de systèmes partiellement ordonnés. Adapté de [Brasselet *et al.*, 2013].

pertinente dans le cas d'un système isotrope tel qu'une solution, elle trouve ses limites dans le cas des systèmes ordonnés.

Limitations

En effet, ces deux angles orthogonaux définissent de fait dans le spécimen des directions privilégiées le long desquelles la sensibilité sera la meilleure, au détriment des directions intermédiaires. Pour se convaincre de ces limitations, on peut également invoquer des arguments plus généraux, selon lesquels l'information à recueillir est complexe (orientation et forme d'une distribution orientationnelle), tandis que la mesure fournit un nombre réduit de données (obtenues sous une ou deux polarisation d'excitation et/ou de collection).

Ce manque d'information est traditionnellement compensé partiellement par des suppositions sur le système étudié, notamment le modèle géométrique et l'orientation moyenne de sa distribution. Cette dernière est habituellement inférée grâce à l'image et à la connaissance du mode d'insertion. Dans ce cas, seules les régions orientées avantageusement pourront être analysées, comme cela a été le cas pour les travaux reportés sur la Fig. 4.3, p. 39, où Axelrod s'est limité à l'analyse des portions de membranes horizontales et verticales. La nécessité de telles suppositions limite cependant considérablement le champ d'application de l'anisotropie de fluorescence aux problèmes biologiques relativement simples. Les sondes dont l'orientation n'est pas connue, les assemblages moléculaires dont la morphologie est complexe sont autant de situations qui ne peuvent en bénéficier.

4.5 Conclusion

Dans ce chapitre, j'ai insisté sur la nécessité de fournir à la microscopie de nouvelles observables. En particulier, j'ai montré que les assemblages moléculaires pouvaient être décrits en termes d'ordre orientationnel, propriété qui traduit des corrélations d'orientations, et qui peut constituer un indicateur pertinent de la structure moléculaire à une échelle sub-résolution. La fluorescence est un processus sensible aux orientations. L'anisotropie de fluorescence est une technique établie depuis des décennies, qui exploite cette propriété dans le cas spécifique de la dynamique des solutions. Elle a progressivement été déclinée pour étudier l'ordre moléculaire, mais son application présente un certain nombre de limitations.

Il faut comprendre que ces limitations ne sont pas intrinsèques au processus de fluorescence utilisé, mais tiennent pour une large part à la méthode de mesure utilisée, héritée des mesures en solutions.

Chapitre 5

Sonder l'ordre orientationnel

“On se fait une idée précise de l'ordre, mais non pas du désordre.”

— Jacques-Henri Bernardin de St Pierre, *Paul et Virginie*.

Dans ce chapitre, nous reconsidérons la problématique de la détermination de distributions orientationnelles par le sondage de la fluorescence. Nous en établissons les limites théoriques, et en proposons une mise en œuvre expérimentale optimale.

5.1 Principes de base

Sonder le dipôle absorbant

Nous l'avons vu, la fluorescence est doublement sensible à l'orientation du fluorophore, via les efficacités des processus d'absorption et de détection. Cependant, ces deux processus n'étant pas simultanés, l'information d'orientation est partiellement perdue en cas de rotation de la molécule ou de transfert d'énergie. Si la dépolarisation qui en résulte est avantageusement exploitée par l'anisotropie de polarisation en solution, elle reste un facteur limitant pour la détermination d'orientations.

Pour une détermination fidèle de propriétés orientationnelles, il est ainsi plus judicieux de ne sonder qu'un seul processus. Deux approches sont possibles. On peut utiliser une excitation non sélective angulairement (au moyen d'un faisceau dépolarisé ou polarisé circulairement), et se concentrer sur l'analyse polarimétrique de la fluorescence émise, ciblant ainsi spécifiquement la distribution orientationnelle des moments dipolaires émetteurs $\vec{\mu}_{\text{em}}$. L'approche alternative consiste à sonder le spécimen sous différentes polarisations linéaires pour sonder spécifiquement la distribution des moments dipolaires d'absorption $\vec{\mu}_{\text{abs}}$, tout en collectant l'intensité totale de fluorescence émise, sans analyse polarimétrique.

Si ces deux approches sont équivalentes d'un point de vue conceptuel, chacune adressant cependant un moment dipolaire différent, la mise en œuvre expérimentale est à l'avantage de la deuxième. En effet, le faisceau exciteur étant un faisceau intense (laser), le

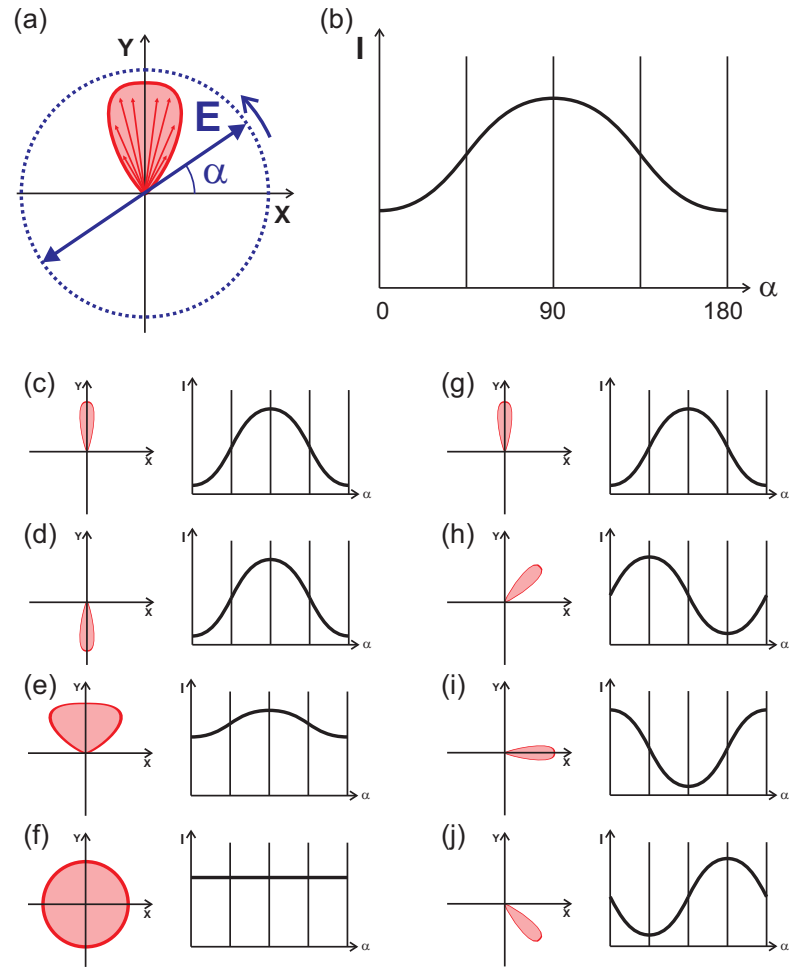


Figure 5.1 – (a) Un exemples de distribution angulaire de moments dipolaire, sondé par une onde polarisée rectiligne selon un angle α . (b) Variation d'intensité de fluorescence en fonction de α . (c-f) Cas de distributions de différentes ouvertures. (g-j) Cas de distributions d'orientations différentes.

contrôle en polarisation est plus précis que dans le cas d'un faible faisceau de fluorescence. En outre, d'un point de vue purement instrumental, que ce soient nos bancs d'optique ou les systèmes de microscopie du marché, le trajet du faisceau excitateur est en général plus accessible que la voie de collection, compacte et carénée, et se prête donc davantage à l'insertion d'éléments polarisants. Dans tout ce qui suit, nous allons donc décrire une méthode basée sur le sondage de la directionnalité de l'absorption de lumière.

La nécessité de plusieurs polarisations d'excitation

Déterminer à la fois l'orientation et la forme d'une distribution angulaire est un problème à plusieurs inconnues qui ne peut être résolu avec deux mesures, quelles qu'elles soient. L'approche que nous proposons repose sur l'expérience de pensée illustrée sur la Fig. 5.1.

La Fig. 5.1a représente une distribution angulaire bidimensionnelle de moments dipolaires d'absorption, excitée par une onde électromagnétique de polarisation rectiligne, selon une direction repérée dans le plan par son angle α . En fonction de cet angle, il est facile de se convaincre que l'efficacité d'absorption et donc l'intensité de fluorescence totale, pourra être maximale (pour $\alpha = 90^\circ$), ou minimale (pour $\alpha = 0$), comme illustré sur la Fig. 5.1b. En outre, parce que cette distribution possède une certaine ouverture, aucun angle ne permet d'annuler cette fluorescence. Ainsi, avant même de connaître précisément la forme prise par la variation $I(\alpha)$, on comprend que (i) son amplitude de variation renseigne sur l'ouverture angulaire de la distribution (Cf. Figs. 5.1c-f), (ii) la position angulaire de son maximum renseigne sur l'orientation de la distribution (Cf. Figs. 5.1g-j), à 180 degrés près (Cf. Figs. 5.1c,d). Le sondage sous plusieurs polarisations incidentes apparaît donc particulièrement adapté pour révéler les propriétés angulaires d'une distribution inconnue, comme l'ont montré les premières travaux menés dans notre équipe [Gasecka *et al.*, 2009].

5.2 État de l'art

On trouve dans la littérature mention de méthodes ciblant spécifiquement les dipôles absorbants, connues sous les noms de *dichroïsme linéaire* ou de *dichroïsme linéaire détecté par fluorescence*, selon que c'est l'intensité transmise ou la fluorescence est détectée, respectivement [Steinbach *et al.*, 2009]. Basées sur des excitations selon deux angles orthogonaux, ces méthodes souffrent des mêmes limitations angulaires que l'anisotropie de fluorescence. Sur la Fig. 5.1, elles correspondent à une mesure limitée aux deux angles $\alpha = 0$ et $\alpha = 90^\circ$. On se convainc facilement que ces deux mesures ne permettent pas de distinguer les cas f, h, et j, par exemple.

Les premiers travaux basés, comme nous le proposons, sur plusieurs d'angles d'excitation remontent à 2009 : Bernchou *et al.* ont ainsi pu mettre en évidence des textures de domaines lipidiques [Bernchou *et al.*, 2009], comme illustré sur la Fig. 5.2, en exploitant essentiellement les angles moyens de fluorophores insérés dans des membranes artificielles, ou plus récemment dans des membranes cellulaires [Solanko *et al.*, 2013]. On peut également citer des études menées sur des protéines membranaires, où DeMay *et al.* ont pu mettre

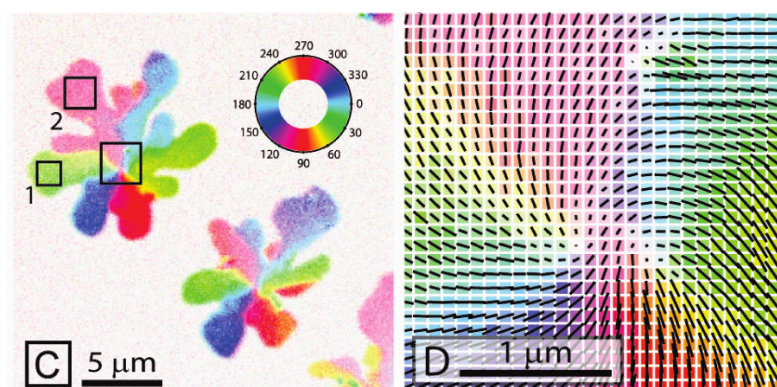


Figure 5.2 – Visualisation de textures de domaines lipidiques. Le code couleur correspond à l'orientation moyenne des fluorophores dans la membrane artificielle (elle-même dans le plan d'imagerie). La figure D est un détail de la figure C. Adapté de [Bernchou *et al.*, 2009].

en évidence, outre l'orientation moyenne, différents degrés d'orientation des fluorophores [DeMay *et al.*, 2011].

La principale limitation de toutes ces méthodes est leur approche purement phénoménologique, fournissant une information qualitative, qu'il est difficile de relier aux distributions angulaires sousjacentes. C'est cette lacune que la méthode que nous proposons, et dont nous décrivons la base théorique dans la suite, permet de combler.

5.3 Description théorique

Intensité de fluorescence d'une distribution arbitraire sous excitation polarisée

Nous allons désormais établir l'expression analytique de la modulation subie par la fluorescence lorsque le faisceau exciteur polarisé balaie angulairement le plan. La géométrie du problème est illustrée sur la Fig. 5.3. La distribution angulaire est donnée par la fonction $f(\theta, \varphi)$, où θ est l'angle zénithal et φ la longitude. Dans la mesure où le champ électrique ne peut déterminer les orientations de dipôles qu'à 180 degrés près, cette distribution est modélisée avec une symétrie centrale. En accord avec les systèmes que nous étudierons par la suite, elle est en outre représentée ici — mais ce n'est pas une limitation — avec une symétrie cylindrique autour d'un axe, lui-même orienté arbitrairement dans l'espace. Le champ électrique d'excitation $\vec{E}(\alpha)$ est supposé orienté dans le plan XY , avec un azimut noté α .

En régime stationnaire, l'intensité de fluorescence $I(\alpha)$ émise dans la direction Z est donc proportionnelle à la somme incohérente des émissions individuelles des dipôles présents, pondérées par leur poids dans la distribution $f(\theta, \varphi)$ et par l'efficacité P_{abs} avec

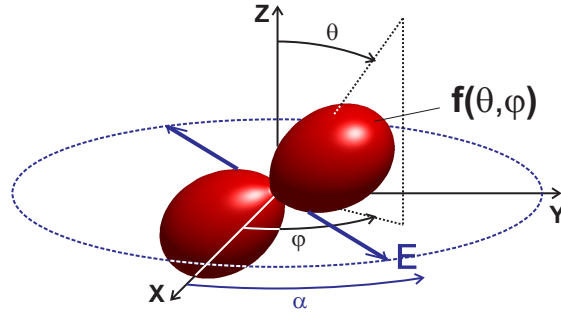


Figure 5.3 – Géométrie du problème.

laquelle ils ont été excités par la champ électrique, soit [Gasecka *et al.*, 2009]

$$I(\alpha) \propto \int_0^\pi d\theta \sin \theta \int_0^{2\pi} d\varphi P_{\text{abs}}(\theta, \varphi, \alpha) f(\theta, \varphi) J(\theta), \quad (5.1)$$

où le facteur $J(\theta)$ traduit comment l'efficacité de détection varie en fonction de l'inclinaison du dipôle absorbant par rapport au plan XY ¹.

Pour prendre en compte la possibilité des régimes multiphotoniques, il convient d'exprimer la probabilité d'absorption P_{abs} sous une forme plus générique que celle donnée dans l'Eq. 4.1, soit

$$P_{\text{abs}}^{n\text{ph}}(\theta, \varphi, \alpha) \propto \left[|\vec{\mu}_{\text{abs}}(\theta, \varphi) \cdot \vec{E}(\alpha)|^2 \right]^n, \quad (5.2)$$

pour une absorption à n photons. Connaissant les composantes des vecteurs $\vec{\mu}_{\text{abs}}(\theta, \varphi) = \mu(\sin \theta \cos \varphi; \sin \theta \sin \varphi; \cos \theta)$ et $\vec{E} = E(\cos \alpha; \sin \alpha; 0)$, cette expression devient

$$P_{\text{abs}}^{n\text{ph}}(\theta, \varphi, \alpha) \propto \sin^{2n}(\theta) \cos^{2n}(\varphi - \alpha).$$

La séparation des rôles des variables θ et φ permet d'écrire l'intensité de l'Eq. 5.1 sous la forme

$$I^{n\text{ph}}(\alpha) \propto \int_0^{2\pi} \cos^{2n}(\varphi - \alpha) p^{n\text{ph}}(\varphi) d\varphi, \quad (5.3)$$

où l'on a posé

$$p^{n\text{ph}}(\varphi) = \int_0^\pi f(\theta, \varphi) \sin^{2n}(\theta) J(\theta) \sin \theta d\theta. \quad (5.4)$$

Ces deux dernières équations nous conduisent à un constat majeur : l'Eq. 5.3 nous indique que la quantité mesurable dans cette configuration de mesure n'est pas la distribution tridimensionnelle $f(\theta, \varphi)$, mais uniquement une distribution réduite à sa dépendance azimutale $p^{n\text{ph}}(\varphi)$. Cette dernière, comme l'établit l'Eq. 5.4, somme la contribution de tous les

1. Dans le cas où le dipôle émetteur est colinéaire au dipôle absorbant, on montre que $J(\theta) = K_{\parallel} \sin^2 \theta + K_{\perp} \cos^2 \theta$. Par exemple, si la fluorescence est collectée au moyen d'un objectif d'ouverture numérique 1,2, $K_{\parallel} = 0,875$ et $K_{\perp} = 0,262$ [Axelrod, 1979] : toutes les orientations de dipôles sont détectables, les dipôles dans le plan l'étant avec une meilleure efficacité.

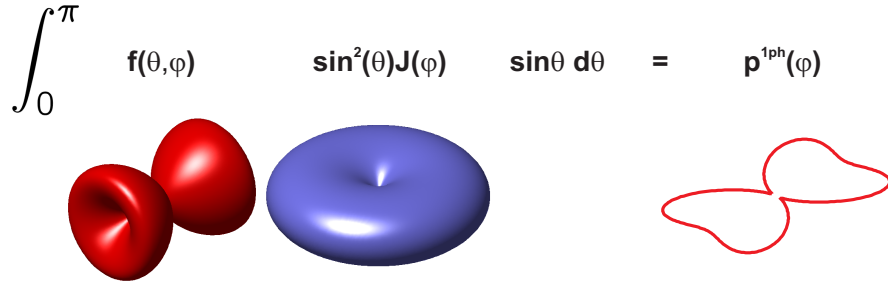


Figure 5.4 – Illustration d'une distribution tridimensionnelle $f(\theta, \varphi)$, du terme angulaire de pondération (on a supposé ici $n = 1$), et de la distribution azimutale $p^{1\text{ph}}(\varphi)$ résultante, telle que donnée par l'Eq. 5.4.

angles θ , avec un facteur de pondération $\sin^{2n}(\theta)J(\theta)$, qui va essentiellement sélectionner les dipôles d'orientation voisines du plan (soit $\theta \approx 90$). Comme l'illustre la Fig. 5.4, la dépendance azimutal $p^{n\text{ph}}(\varphi)$ est finalement très proche de la section par le plan XY de la distribution initiale. Calculée ici pour un processus d'absorption à un photon, cette ressemblance est même sensiblement plus prononcée pour les processus multiphotoniques.

Notion d'ordre de symétrie

La distribution azimutale pouvant avoir un éventail de formes assez large, il serait réducteur de lui associer un modèle géométrique. En tant que dépendance angulaire, elle est intrinsèquement périodique de période 2π et réelle. Cela permet, en toute généralité, de l'écrire comme une série de Fourier sous la forme

$$p^{n\text{ph}}(\varphi) = p_0 \left[1 + \sum_{j=1}^{+\infty} S_j^{n\text{ph}} \cos[j(\varphi - \varphi_j)] \right], \quad (5.5)$$

caractérisée par une infinité de paramètres S_j et φ_j . Il s'agit d'une décomposition sur une base de fréquences angulaires. Comme dans toute décomposition fréquentielle, la forme générale de la fonction est donnée par les premiers ordres, tandis que les ordres élevés en permettent la description fine.

Ordres accessibles

Il nous reste à introduire la décomposition de l'Eq. 5.5 dans la dépendance de l'intensité de l'Eq. 5.3, soit

$$I^{n\text{ph}}(\alpha) \propto p_0 \int_0^{2\pi} \cos^{2n}(\varphi - \alpha) \left[1 + \sum_{j=1}^{+\infty} S_j^{n\text{ph}} \cos[j(\varphi - \varphi_j)] \right] d\varphi.$$

Cette expression peut se réduire à quelques termes², en fonction du nombre n de photons impliqués dans le processus d'absorption. Ainsi, en fonction des cas, on peut montrer facilement que

$$I^{1\text{ph}}(\alpha) \propto \pi p_0 \left[1 + \frac{1}{2} S_2^{1\text{ph}} \cos[2(\alpha - \varphi_2)] \right], \quad (5.6)$$

$$I^{2\text{ph}}(\alpha) \propto \frac{3\pi p_0}{4} \left[1 + \frac{2}{3} S_2^{2\text{ph}} \cos[2(\alpha - \varphi_2)] + \frac{1}{6} S_4^{2\text{ph}} \cos[4(\alpha - \varphi_4)] \right], \quad (5.7)$$

$$I^{3\text{ph}}(\alpha) \propto \frac{\pi p_0}{2} \left[1 + \frac{15}{16} S_2^{3\text{ph}} \cos[2(\alpha - \varphi_2)] + \frac{3}{8} S_4^{3\text{ph}} \cos[4(\alpha - \varphi_4)] + \frac{1}{16} S_6^{3\text{ph}} \cos[6(\alpha - \varphi_6)] \right], \quad (5.8)$$

Ces équations sont riches d'enseignements. En premier lieu, elles démontrent que le signal d'intensité $I(\alpha)$, alors même que nous n'avons fait aucune approximation, se réduit à une forme mathématique simple. Ce signal ne contient finalement que la contribution des premiers ordres (pairs) de symétrie, le nombre d'ordres accessible augmentant avec le nombre de photons impliqués dans l'absorption. La lecture de la distribution $p^{n\text{ph}}(\varphi)$ sera donc forcément incomplète. Tout au mieux pourra-t-on lire quelques ordres, et ainsi accéder à distribution *reconstruite* que nous noterons $\tilde{p}^{n\text{ph}}(\varphi)$, définie comme le développement de $p^{n\text{ph}}(\varphi)$ de l'Eq. 5.5, limité aux seuls ordres accessibles. Ainsi, pour les différents cas,

$$\tilde{p}^{1\text{ph}}(\varphi) \propto 1 + S_2^{1\text{ph}} \cos[2(\varphi - \varphi_2)], \quad (5.9)$$

$$\tilde{p}^{2\text{ph}}(\varphi) \propto 1 + S_2^{2\text{ph}} \cos[2(\varphi - \varphi_2)] + S_4^{2\text{ph}} \cos[4(\varphi - \varphi_4)], \quad (5.10)$$

$$\tilde{p}^{3\text{ph}}(\varphi) \propto 1 + S_2^{3\text{ph}} \cos[2(\varphi - \varphi_2)] + S_4^{3\text{ph}} \cos[4(\varphi - \varphi_4)] + S_6^{3\text{ph}} \cos[6(\varphi - \varphi_6)], \quad (5.11)$$

Les Eqs. 5.6–5.8 nous indiquent également que le poids des différents ordres de symétrie *dans le signal de fluorescence* est variable : pour n donné, le poids d'un ordre diminue avec son indice ; pour un indice de symétrie donné, sa contribution augmente avec n . Par exemple, c'est dans la fluorescence à 3 photons que l'ordre S_2 signe le plus.

Le choix du régime d'absorption est donc crucial. Dans l'absolu, l'absorption à trois photons apparaît comme la plus performante car elle permet accéder aux ordres $j = 2, 4, 6$. Et même si la contribution de l'ordre 6 est faible, celles des ordres 2 et 4 est importante. Dans la pratique, des considérations expérimentales telles que la gamme spectrale d'excitation nécessaire en fonction du fluorophore ciblé, le niveau de signal de fluorescence attendu, ou même le coût de la source laser, donnent un clair avantage aux régimes à un ou deux photons.

Ce sont ces deux régimes que je vais décrire dans la section suivante : La fluorescence à un photon, par la simplicité de mise en œuvre, à la fois d'un point de vue méthodologique et instrumental, est la première modalité dans laquelle cette méthode a été développée. C'est également celle qui a été aujourd'hui la plus exploitée pour étudier des systèmes biologiques. Plus récemment, la fluorescence à deux photons a nécessité un développement

2. Il suffit d'appliquer la relation selon laquelle $\int_0^{2\pi} \cos(j\varphi) d\varphi = 2\pi\delta_j$.

méthodologique plus élaboré, mais son potentiel a déjà été démontré sur quelques systèmes tests.

Pour chaque cas, je donnerai les expressions qui permettent, à partir d'un signal de fluorescence $I(\alpha)$, d'extraire facilement les paramètres d'ordres S_j et φ_j accessibles. Ces paramètres seront illustrés pour quelques exemples de distributions, et confrontés aux modèles géométriques courants de la littérature.

5.4 Comparaisons entre fluorescences à un et deux photons

Fluorescence à absorption d'un photon

Dans l'expression de l'intensité de l'Eq. 5.6

$$I^{1\text{ph}}(\alpha) \propto \pi p_0 \left[1 + \frac{1}{2} S_2^{1\text{ph}} \cos[2(\alpha - \varphi_2)] \right], \quad (5.6)$$

que l'on peut réécrire comme

$$I^{1\text{ph}}(\alpha) \propto \pi p_0 \left[1 + \frac{1}{2} S_2^{1\text{ph}} \cos 2\varphi_2 \cos 2\alpha + \frac{1}{2} S_2^{1\text{ph}} \sin 2\varphi_2 \sin 2\alpha \right],$$

on peut identifier une série de Fourier de la forme

$$I(\alpha) \propto 1 + \sum_{k=1}^{+\infty} [A_k \cos(k\alpha) + B_k \sin(k\alpha)],$$

limitée ici au terme $k = 2$. En mettant à profit la propriété selon laquelle les coefficients A_k et B_k sont donnés par

$$A_k^{1\text{ph}} = \frac{2}{I_0^{1\text{ph}}} \sum_{i=1}^N I^{1\text{ph}}(\alpha_i) \cos(k\alpha_i), \quad (5.12)$$

$$B_k^{1\text{ph}} = \frac{2}{I_0^{1\text{ph}}} \sum_{i=1}^N I^{1\text{ph}}(\alpha_i) \sin(k\alpha_i), \quad (5.13)$$

où $I_0^{1\text{ph}} = \sum_{i=1}^N I^{1\text{ph}}(\alpha_i)$, et où la mesure est effectuée sur un nombre suffisant N d'angles discrets régulièrement espacés $\alpha_1 = 0, \dots, \alpha_i = 180 \frac{i-1}{N}, \dots, \alpha_N = 180 \frac{N-1}{N}$ (en degrés), on peut alors montrer facilement que les paramètres recherchés sont donnés par

$$S_2^{1\text{ph}} = 2 \sqrt{(A_2^{1\text{ph}})^2 + (B_2^{1\text{ph}})^2}, \quad (5.14)$$

$$\varphi_2 = \frac{1}{2} \text{atan2}(B_2^{1\text{ph}}, A_2^{1\text{ph}}), \quad (5.15)$$

où atan2 désigne la fonction *arc-tangente à quatre quadrants*, bien connue en programmation.

Pour faire le lien avec l'expérience de pensée proposée sur la Fig. 5.1, p. 46, on peut dire que le paramètre $S_2^{1\text{ph}}$ quantifie l'amplitude de modulation du signal, tandis que l'angle φ_2 renseigne sur l'angle pour lequel ce signal est maximal. Nous verrons des illustrations de ces affirmations dans quelques pages.

Cas de la fluorescence de deux photons

On procède de façon similaire pour la fluorescence à deux photons, partant de l'Eq. 5.7,

$$I^{2ph}(\alpha) \propto \frac{3\pi p_0}{4} \left[1 + \frac{2}{3} S_2^{2ph} \cos[2(\alpha - \varphi_2)] + \frac{1}{6} S_4^{2ph} \cos[4(\alpha - \varphi_4)] \right], \quad (5.7)$$

pour établir que

$$S_2^{2ph} = \frac{3}{2} \sqrt{(A_2^{2ph})^2 + (B_2^{2ph})^2}, \quad (5.16)$$

$$\varphi_2 = \frac{1}{2} \text{atan2}(B_2^{2ph}, A_2^{2ph}), \quad (5.17)$$

$$S_4^{2ph} = 6 \sqrt{(A_4^{2ph})^2 + (B_4^{2ph})^2}, \quad (5.18)$$

$$\varphi_4 = \frac{1}{4} \text{atan2}(B_4^{2ph}, A_4^{2ph}), \quad (5.19)$$

où les coefficients A_k^{2ph} et B_k^{2ph} sont donnés par des expressions similaires des Eqs. 5.12 et 5.13, en remplaçant l'intensité I^{1ph} par I^{2ph} .

Parmi les quatre paramètres donnés par les Eq. 5.16–5.19, on peut montrer³ que seul φ_2 quantifie l'orientation générale de la distribution, tandis que les trois autres ont trait à sa forme. Ainsi, au lieu de S_4^{2ph} et φ_4 , il est judicieux d'en définir, à partir de ces deux paramètres, deux nouveaux que sont

$$S_4^{(s)} = S_4^{2ph} \cos[4(\varphi_4 - \varphi_2)], \quad (5.20)$$

$$S_4^{(a)} = S_4^{2ph} \sin[4(\varphi_4 - \varphi_2)], \quad (5.21)$$

où $S_4^{(a)}$ possède la propriété d'être nul pour les distributions symétriques. Avec ces définitions, la fonction reconstruite de l'Eq. 5.10 peut se réécrire comme

$$\begin{aligned} \tilde{p}^{2ph}(\varphi) \propto & 1 + S_2^{2ph} \cos[2(\varphi - \varphi_2)] + S_4^{(s)} \cos[4(\varphi - \varphi_2)] \\ & + S_4^{(a)} \sin[4(\varphi - \varphi_2)], \end{aligned} \quad (5.22)$$

En résumé, les paramètres numériques que nous retiendrons pour quantifier l'information orientationnelle accessible via la fluorescence à absorption de deux photons sont donc S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$, $S_4^{(a)}$, qui renseignent sur la forme de la distribution, et φ_2 , qui renseigne sur son orientation dans le plan.

Récapitulatif

Nous avons défini dans ce chapitre un grand nombre de fonctions et de paramètres. La Fig. 5.5 en récapitule les plus importants, pour permettre d'en identifier le rôle concret et de confronter les fluorescences à un et deux photons. Aussi retrouvons-nous, de haut en bas,

3. Ce point est détaillé dans l'article 4 reproduit en annexe. p. 147.

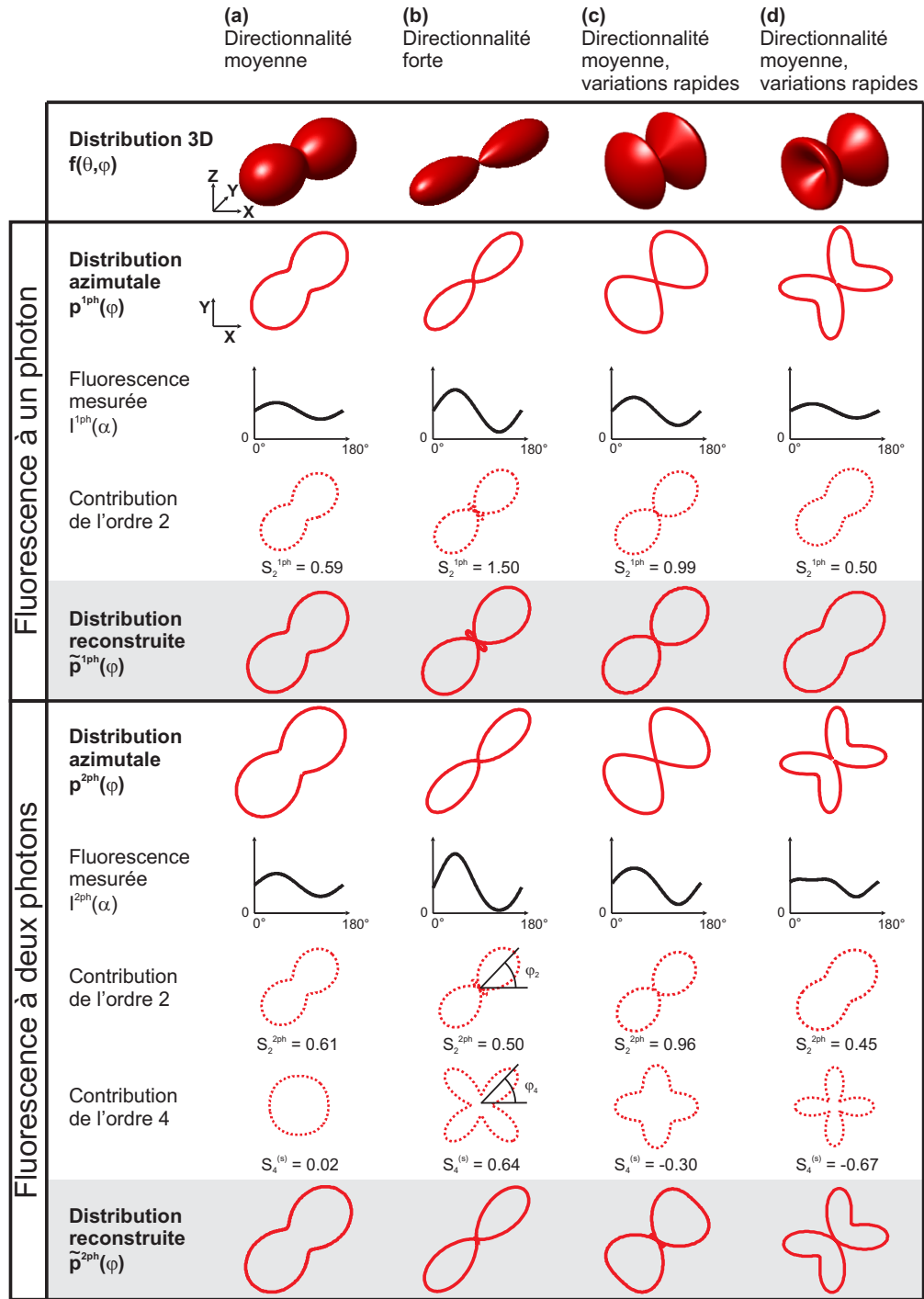


Figure 5.5 – Récapitulatif des grandeurs mathématiques mises en jeu dans la méthode. Dans chaque cas, on peut évaluer l'efficacité de la méthode en jugeant la fidélité avec laquelle la distribution $\tilde{p}^{nph}(\varphi)$ reproduit les caractéristiques de la distribution azimuthale initiale $p^{nph}(\varphi)$.

- une distribution tridimensionnelle $f(\theta, \varphi)$; Pour simplifier cette distribution est choisie de symétrie cylindrique, avec un axe de symétrie dans le plan XY , orienté avec un angle de 45° dans ce plan,

puis pour la fluorescence à un photon,

- la distribution azimutale $p^{1ph}(\varphi)$ correspondante, obtenue en appliquant l'Eq. 5.4,
- le signal de fluorescence $I^{1ph}(\alpha)$ théorique, d'après l'Eq. 5.3,
- la contribution de l'ordre 2 ; on a représenté en coordonnées polaires la fonction $1 + S_2^{1ph} \cos[2(\varphi - \varphi_2)]$, où S_2^{1ph} et φ_2 ont été calculés à partir de $I^{1ph}(\alpha)$ au moyen des Eqs. 5.14 et 5.15, respectivement,
- pour aboutir, en grisé, à la distribution ⁴ reconstruite $\tilde{p}^{1ph}(\varphi)$, d'après l'Eq. 5.9,

puis de façon similaire pour la fluorescence à deux photons,

- la distribution azimutale $p^{2ph}(\varphi)$ correspondante, obtenue en appliquant l'Eq. 5.4,
- le signal de fluorescence $I^{2ph}(\alpha)$ théorique, d'après l'Eq. 5.3,
- la contribution de l'ordre 2 seul ; on a représenté en coordonnées polaires la fonction $1 + S_2^{2ph} \cos[2(\varphi - \varphi_2)]$, où S_2^{2ph} et φ_2 ont été calculés à partir de $I^{2ph}(\alpha)$ au moyen des Eqs. 5.16 et 5.17, respectivement,
- la contribution de l'ordre 4 seul ; on a représenté en coordonnées polaires la fonction $1 + S_4^{(s)} \cos[4(\varphi - \varphi_2)]$, où $S_4^{(s)}$ a été calculés à partir de $I^{2ph}(\alpha)$ au moyen de l'Eq. 5.20,
- pour aboutir, en grisé, à la distribution reconstruite $\tilde{p}^{2ph}(\varphi)$, d'après l'Eq. 5.22.

De gauche à droite, quatre types de distributions orientationnelles arbitraires ont été reportés, de directionnalités (a) moyenne, (b) forte, (c) moyenne, car assez ouverte, mais présentant des variations abruptes, et (d) moyenne, creusée en son centre. La figure montre la nature simplement sinusoïdale du signal $I^{1ph}(\alpha)$ mesuré en fluorescence à un photon, et celle plus riche du signal $I^{2ph}(\alpha)$ mesuré en fluorescence à deux photons.

Dans chaque cas, on peut appréhender les caractéristiques angulaires portées par les ordres 2 et 4. Il apparaît notamment clairement que l'ordre 2 renseigne sur l'orientation moyenne de la distribution (angle φ_2) et sa directionnalité (via la valeur de S_2). L'ordre 4, quant à lui, permet de révéler et de quantifier (via la valeur de $S_4^{(s)}$) un niveau supplémentaire de détails, tel que le caractère fortement directionnel de la distribution (cas (b)), ou la présence de variations abruptes (cas (c) et (d)).

Les limitations de la fluorescence à un photon apparaissent ici nettement. Si elle permet raisonnablement de quantifier, via la valeur de S_2^{1ph} , la directionnalité des fonctions azimutale, elle pèche dès lors qu'il s'agit de distinguer des formes, car les distributions mono-paramétriques reconstruites $\tilde{p}^{1ph}(\varphi)$ sont souvent d'allures voisines. Ainsi, elles permettent difficilement de distinguer le cas (a) du cas (d), et le cas (b) du cas (c).

Seule la fluorescence à deux photons permet de lever le doute : dans chaque cas, alors même que seulement deux ordres (2 et 4) contribuent au signal mesuré, on constate que les principales caractéristiques des distributions azimutales $p^{2ph}(\varphi)$ sont reproduites de façon fidèle dans les distributions reconstruites $\tilde{p}^{2ph}(\varphi)$.

4. Cette distribution est identique à la contribution seule de l'ordre 2, car constituée exclusivement de celle-ci.

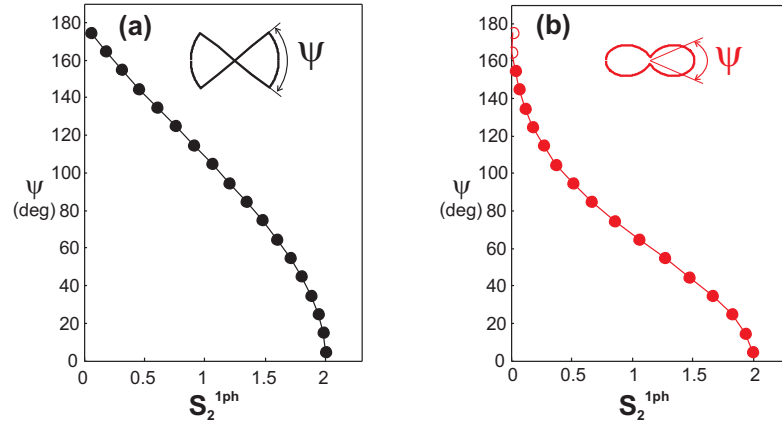


Figure 5.6 – Fluorescence à un photon. Lien entre la valeur du paramètre S_2^{1ph} et l'ouverture totale ψ pour une distribution de géométrie (a) conique ou (b) gaussienne.

Comparaison avec quelques modèles géométriques

La Fig. 5.5 nous a offert un aperçu des distributions telles qu'elles peuvent être reconstruites par notre méthode. Pour compléter cette description visuelle, il est important de s'intéresser aux paramètres d'un point de vue quantitatif.

À ce titre, nous donnons ici quelques exemples de valeurs numériques obtenues pour des modèles géométriques. Même si notre méthode ne nécessite pas d'invoquer de modèle géométrique, cette comparaison est instructive car elle permet un lien entre les observables que nous avons introduites et les grandeurs qui sont rapportées dans la littérature.

Nous commençons par la fluorescence à un photon avec la Fig. 5.6, qui montre la correspondance entre la valeur du paramètre S_2^{1ph} et l'ouverture angulaire d'une distribution, selon que celle-ci a une géométrie conique ou une dépendance angulaire gaussienne. Dans les deux cas, la valeur de S_2^{1ph} varie entre 0, pour une distribution isotrope, et 2, pour une distribution piquée. Comme nous l'avons mentionné précédemment, connaître S_2^{1ph} ne permet pas de présager de la pertinence d'un modèle géométrique donné. Néanmoins, cette grandeur reste pertinente car elle permet, par comparaison, de mettre en évidence des modifications d'ordre orientationnel, comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

En ce qui concerne la fluorescence à deux photons, la Fig. 5.7 représente la valeur du couple de paramètres $(S_2^{2ph}, S_4^{(s)})$ pour les distributions (a) simples ou (b) plus complexes⁵. Quelles que soient les géométries, les formes les plus directionnelles se retrouvent dans la même région, en haut à droite dans le plan $(S_2^{2ph}, S_4^{(s)})$. En ce qui concerne le paramètre S_2^{2ph} , on retrouve le comportement de la Fig. 5.6, à savoir une augmentation à mesure que les distributions se referment. Le paramètre $S_4^{(s)}$ peut avoir des comportements plus variés, allant de la croissance depuis 0 (cas simple gaussienne, (a), rouge) à la croissance depuis

5. Le modèle traité sur la Fig. 5.7b a deux variables (ψ et σ). Seules deux valeurs de σ sont représentées ici. L'ensemble des couples (ψ, σ) correspondrait à un faisceau de courbes balayant une partie du plan.

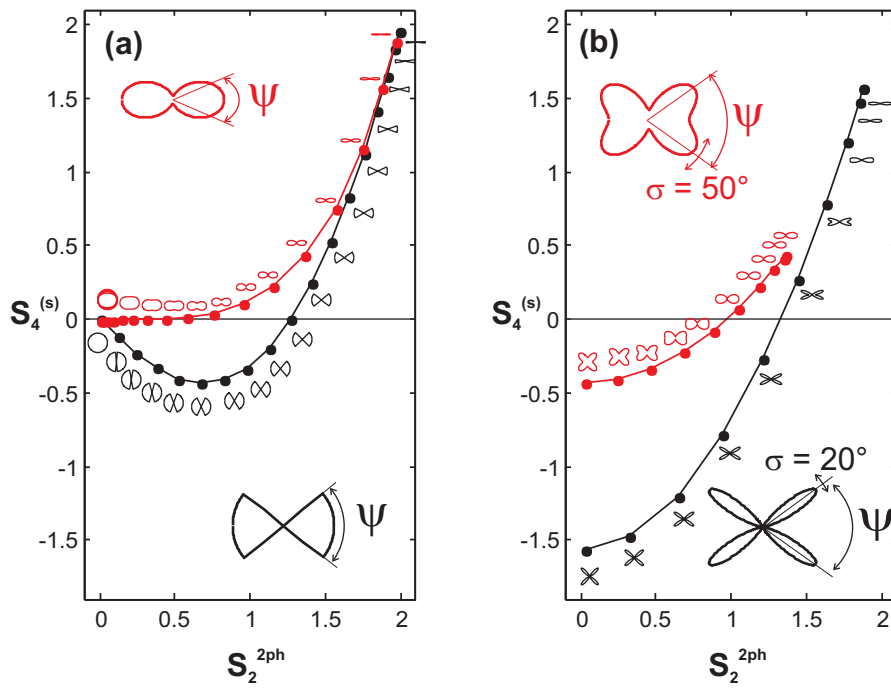


Figure 5.7 – Fluorescence à deux photons. Valeurs des paramètres S_2^{2ph} et $S_4^{(s)}$ pour des distributions (a) gaussiennes (rouge) ou de cônes pleins (noir) d'ouverture angulaire ψ , (b) double gaussiennes d'ouverture angulaire ψ et d'épaisseur σ . Sur les deux graphes, ψ est chaque fois incrémenté de 10° . D'après [Ferrand *et al.*, 2014]

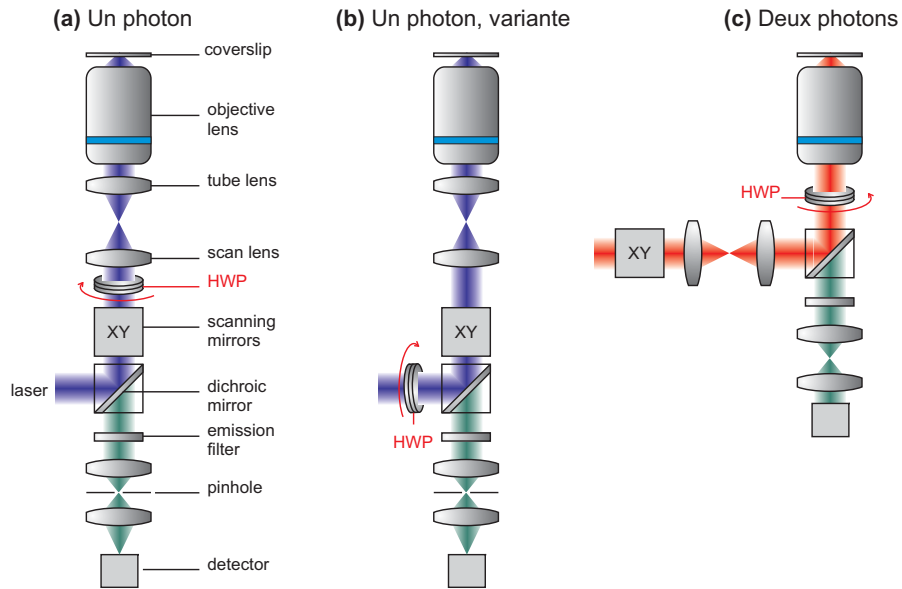


Figure 5.8 – Différents configurations optiques. La laser étant polarisé, c'est la rotation de la lame demi-onde (notée HWP) qui permet de faire tourner la polarisation du champ d'excitation dans le plan focal de l'objectif.

une valeur négative (les deux modèles de (b)), en passant par une décroissance suivie d'une remontée (cas du cône, (a), noir).

Ne nous y trompons pas, la méthode ne permet pas *systématiquement* de déterminer le modèle approprié. En revanche, les paramètres mesurés peuvent permettre d'évaluer de la pertinence d'un modèle géométrique donné. Par exemple, si l'on mesure $S_2^{2ph} \approx 0.5$ et $S_4^{(s)} \approx -0.5$ (des paramètres proches du cas (d) de la Fig. 5.5), on peut affirmer qu'un modèle de type cône ou double gaussienne est approprié, et qu'un modèle gaussien est inadapté.

5.5 Aspects expérimentaux

Principe du montage optique

En termes d'instrumentation, la méthode se réduit à un microscope de fluorescence par balayage, à ceci près que c'est une pile d'images qui doit être acquise, pour différents angles de polarisation d'excitation α . Il suffit donc en principe d'insérer sur le trajet du faisceau d'excitation une lame demi-onde motorisée, comme illustré sur la Fig. 5.8, afin de réaliser ce contrôle de façon séquentielle.

État de polarisation du champ excitateur

La principale hypothèse de travail de cette méthode est que le champ électrique d'excitation se trouve limité au plan XY , et de polarisation rectiligne. Il est bien connu, et les calculs que nous avons menés le confirment, qu'au voisinage du foyer d'un objectif de microscope de forte ouverture numérique, le champ électrique possède une composante axiale, aboutissant à une polarisation elliptique dans un plan longitudinal [Wang, 2013]. Cet effet est cependant limité à la bordure de la tache de focalisation. Ajoutons à cela le champ électrique intervient via sa puissance $2n$, on peut considérer raisonnablement que cet effet est négligeable.

Les principales difficultés instrumentales que l'on peut rencontrer en termes de contrôle de la polarisation proviennent du fait que l'on a à manipuler des polarisations linéaires n'étant ni (s) , ni (p) , mais intermédiaires. Dans ces conditions, chaque réflexion oblique sur une surface diélectrique est susceptible d'introduire de l'ellipticité (lorsque les phases des composantes (s) et (p) diffèrent) ou un changement de direction de polarisation (lorsque les amplitudes des composantes (s) et (p) diffèrent).

Idéalement, on introduira donc la lame demi-onde le plus tard possible dans le faisceau d'excitation (Figs. 5.8a et c), évitant ainsi un maximum d'éléments perturbateurs. Lorsque l'intérieur du microscope est difficilement accessible, une variante consiste à introduire la lame demi-onde plus tôt (Fig. 5.8b), mais il faut alors remplacer tout miroir diélectrique du trajet par son équivalent métallique, plus prévisible⁶ Et pour les inévitables éléments irremplaçables, tels que les filtres dichroïques, il est nécessaire d'en caractériser⁷ précisément les propriétés de biréfringence et de dichroïsme. En fonction de l'ampleur des distorsions, on peut choisir de corriger le champ électrique en introduisant dans le montage un compensateur de Soleil-Babinet, et/ou de prendre en compte les spécificités du champ dans l'analyse des données [Kress *et al.*, 2013] .

Concernant la voie de détection, le fait que l'on mesure l'intensité de la fluorescence, et non sa polarisation, impose simplement de s'assurer de l'absence de toute source de dichroïsme, qui introduirait un biais dans la mesure. Ici encore, cet effet peut être pris en compte *a posteriori* dans l'analyse des données. À noter que la présence de la lame demi-onde à la fois sur les trajets de l'excitation et de la fluorescence émise, comme dans les configurations (a) et (c) de la Fig. 5.8, ne pose pas de problème si cette lame est dépourvue de dichroïsme.

Précision

Nous avons quantifié avec quelle précision les différents paramètres orientationnels (S_2^{1ph} , S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$, etc.) pouvaient être mesurés dans des conditions pratiques. Des études détaillées ont été menées par simulation numérique de type Monte Carlo. Etant discutées en

6. Un miroir métallique introduit en effet systématique un déphasage de 180 entre les composantes (s) et (p) .

7. Cf. à ce sujet le protocole de diagnostic détaillé dans le *Supporting Material* de l'article [Kress *et al.*, 2013] joint en annexes, p. 123, ainsi que dans [Wang *et al.*, 2013].

détail dans les articles joints en annexe ([Kress *et al.*, 2013], p. 123 et [Ferrand *et al.*, 2014], p. 147), je m'en tiendrai ici à l'essentiel, à savoir que

- En fluorescence à un photon, il faut mesurer la fluorescence pour au minimum de $N = 3$ angles d'excitation régulièrement espacés ;
- En fluorescence à deux photons, ce nombre minimal est porté à $N = 5$;
- Le paramètre pertinent qui détermine la précision de la méthode n'est pas le nombre d'angle, ni le rapport signal sur bruit du signal, mais simplement le nombre total de photons collectés que nous avons noté $I_0^{nph} = \sum_{i=1}^N I^{nph}(\alpha_i)$;
- La valeur de l'incertitude sur les paramètres S_j^{nph} est indépendante de la valeur de ces derniers ;
- L'incertitude est inversement proportionnelle à la racine carrée de I_0^{nph} . Pour un niveau de fluorescence donné, on peut donc la réduire en augmentant le nombre N d'angles de mesure et/ou en augmentant le temps d'intégration de chaque mesure.

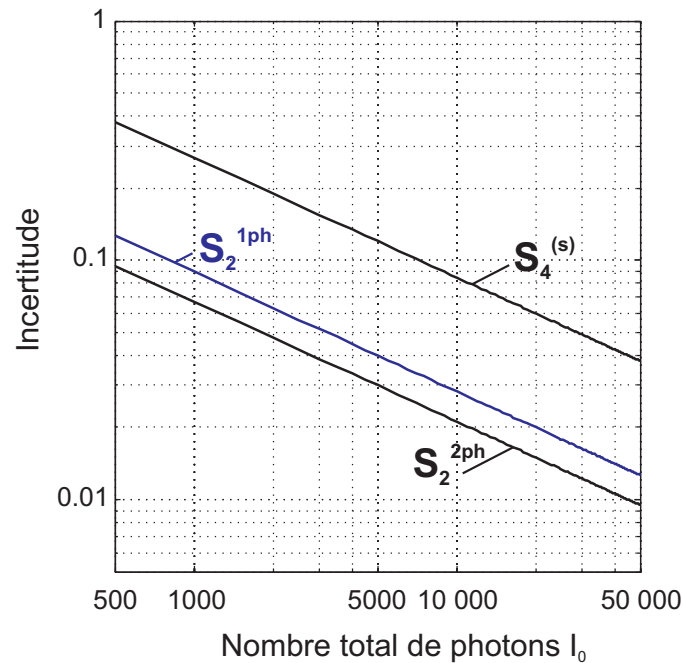


Figure 5.9 – Dépendance de l'incertitude des différents paramètres, en fonction du nombre total de photons I_0^{nph} .

Les valeurs des incertitudes (écart-types) sur S_2^{1ph} , S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$ en fonction du signal I_0^{nph} sont récapitulées sur la Fig. 5.9. Même pour un niveau de signal relativement faible (5000 photons sont assez faciles à obtenir, même pour un spécimen fragile), on constate que l'incertitude se situe entre 0.03 et 0.12 en fonction des paramètres, ce qui reste raisonnable, les paramètres variant dans une gamme de quelques unités.

Comme nous allons le voir dans la suite, cette précision permet de quantifier l'ordre orientationnel, et ses variations, avec une bonne sensibilité.

Chapitre 6

Démonstration expérimentale sur quelques systèmes biologiques

La méthode dont la théorie générale a été présentée dans le chapitre précédent, a été mise en œuvre expérimentalement, et décliné dans plusieurs configurations instrumentales. Nous nous sommes focalisés sur quelques systèmes biologiques-clés que sont la membrane cellulaire et les amyloïdes pour en mettre en évidence la valeur ajoutée par rapport aux autres méthodes établies. Il s'agit majoritairement de fluorescence à un photon, la fluorescence à deux photons, ayant été mise en œuvre plus récemment.

6.1 Ordre moléculaire de la membrane cellulaire

Notre premier objet d'étude a été la membrane cellulaire. Nous rappelons qu'il s'agit de l'interface où se produisent les échanges de matière et d'information entre la membrane et le reste de l'organisme. La membrane est donc une structure hautement dynamique, où se côtoie une grande variété d'espèces moléculaires, lipides comme protéines. Si les biologistes connaissent assez précisément les différentes espèces moléculaires présentes, la question est plutôt de savoir comment ces dernières s'organisent, à la fois spatialement et dynamiquement. Notre méthode renseigne donc sur le premier de ces aspects.

Premières démonstrations en fluorescence à un photon

Nous avons appliqué notre méthode à la membrane plasmique de cellules vivantes. Nous avons exploité la propriété de la sonde fluorescente di-8-ANEPPQ, dont la structure favorise une insertion perpendiculairement à la surface de la membrane, comme illustré sur la Fig. 6.1a.

Pour ces premières démonstrations, nous étions dans une configuration de fluorescence à un photon. Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, ce régime permet d'obtenir, outre l'orientation moyenne φ_2 , un paramètre S_2^{1ph} qui quantifie la directionnalité de

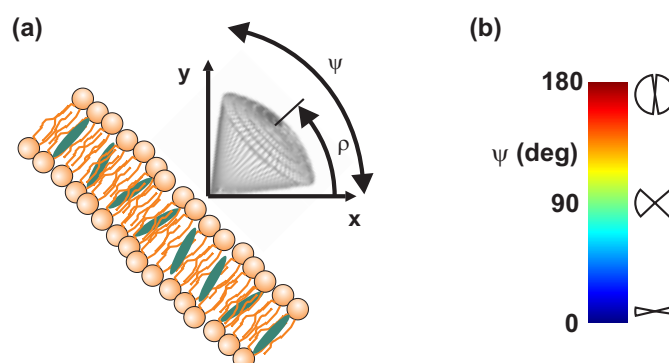


Figure 6.1 – (a) Schéma de la membrane, montrant les sondes lipidiques insérées le long des chaînes lipidiques et le modèle de cône d'ouverture angulaire ψ . (b) Echelle de couleur utilisée pour représenter sur les résultats la valeur de ψ .

la distribution de fluorophores. Afin de permettre au profane une figuration de distribution pour ce paramètre, nous lui avons associé un modèle géométrique de cône plein d'ouverture angulaire ψ . Ainsi, en accord avec la Fig. 5.6a, p. 56, un ordre orientationnel important ($S_2^{1ph} \rightarrow 2$) se traduit par un cône étroit (ψ petit) tandis que le désordre orientationnel, voire l'isotropie ($S_2^{1ph} \rightarrow 0$), se traduisent par un cône très ouvert (ψ proche de 180°). Les valeurs de ψ obtenues seront systématiquement représentées, en chaque pixel analysé, au moyen d'un code couleur, conformément à la Fig. 6.1.

Étude de l'organisation de la membrane cellulaire

Pour mettre en évidence la sensibilité de la méthode à la morphologie de la membrane, nous avons fait subir à cellule différents types de traitements qui affectent la membrane soit en agissant sur le cytosquelette, soit en modifiant sa composition en cholestérol. L'étude complète a été publiée dans *Biophysical Journal* (Article 3 en annexe, p. 123).

La Fig. 6.2 illustre une partie des résultats obtenus. Sont représentés, pour différents types de traitements biochimiques, une image de microscopie d'une cellule typique faisant apparaître la cartographie des valeurs de ψ mesurées, un histogramme des valeurs de ψ obtenues sur cette même cellule, et un histogramme récapitulatif des valeurs de ψ obtenues pour un échantillon d'une dizaines de cellules.

En premier lieu, ces mesures démontrent que notre méthode permet une véritable cartographie de l'ordre moléculaire de la membrane, quelle que soit sa forme géométrique et son orientation dans le plan d'observation du microscope.

Sans traitement, nous avons observé systématiquement, des valeurs de ψ de l'ordre de 120° . L'action d'un choc hypotonique, qui produit une membrane tendue, se traduit, selon toute attente, par une augmentation généralisée de l'ordre moléculaire. Un effet similaire est observé sous l'action de deux drogues déstructurant sur le cytosquelette, la cytochalasine D provoquant la dépolymérisation de l'actine, et la Latrunculine A inhibant sa polymérisation.



A l'opposé, Jasplakinolide, qui stabilise les filaments d'actine, conduit à l'apparition d'une nouvelle population désordonnée ($150^\circ < \psi < 180^\circ$), observation corrélée avec la présence de nombreux replis membranaires.

Ces résultats, même si leur portée biologique est limitée, sont la démonstration que notre méthode permet d'accéder à un niveau d'information que ne fournit pas la fluorescence dans une modalité conventionnelle.

L'apport de la fluorescence à deux photons

Récemment, les membranes lipidiques, de vésicules et de cellules similaires à celles présentées plus haut, ont pu être confrontées à la fluorescence à deux photons. Les résultats, tirés de l'article publié dans *Biophysical Journal* (Article 4 en annexe, p. 147) [Ferrand *et al.*, 2014], sont reproduits sur la Fig. 6.3.

Nous avons reporté trois systèmes, marqués comme précédemment par la sonde di-8-ANEPPQ : (a-c) la membrane extérieure d'une vésicule multilamellaire, (d-f) les membranes internes de la même vésicule, et enfin, (g-i) la membrane d'une cellule COS-7, système donc identique au cas sans traitement de la Fig. 6.2. Dans chaque cas, nous avons reproduit dans la partie gauche une image microscopie de fluorescence. Dans la partie droite, les valeurs des couples (S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$) mesurées sur les pixels d'intérêt sont indiquées. À chaque couple a ainsi été associée une couleur unique, qui est représentée sur l'image de fluorescence. Pour une meilleure figuration de ces paramètres numériques, en l'absence de modèle géométrique, les distributions correspondantes $\tilde{\rho}^{2ph}(\varphi)$ obtenues ont été superposées à l'image pour quelques pixels.

En ce qui concerne la membrane externe de la vésicule (a-c), la distribution est en moyenne perpendiculaire à la membrane. Elle est moyennement directionnelle, et présente des variations assez abruptes. S'il fallait invoquer un modèle géométrique, la Fig. 5.7, p. 57, suggère un cône plein creux, ou une double gaussienne, mais en aucun cas une distribution gaussienne simple.

Concernant les membranes internes de la même vésicule, le manque de résolution aboutit à la contribution de distributions d'orientations variées, qui se confirment par l'obtention de distributions relativement isotropes.

Enfin, concernant la membrane cellulaire, ces mesures confirment les résultats obtenus en fluorescence à un photon : les valeurs de S_2^{2ph} mesurées sont en parfait accord avec celles obtenus en microscopie à un photon ($\psi \approx 120^\circ$ mesuré sur la Fig. 6.2 correspon-daient à $S_2^{1ph} \approx 0.65$). Fait nouveau, la méthode révèle une contribution non négligeable dans la direction le long de la membrane. La comparaison avec la Fig. 5.7, p. 57, nous interdit désormais d'invoquer un modèle unidirectionnel. Nous discutons ce point dans [Ferrand *et al.*, 2014], p. 147, notamment la possibilité de la présence de fluorophores proches de la membrane qui, mal insérés, pourraient contribuer à une réponse angulaire isotrope, ou alignée le long de la membrane .

Il est remarquable ici de constater que les deux membranes présentées ici, cellule COS-7 et vésicule, s'illustrent par des valeurs S_2^{2ph} similaires, indiquant qu'elles seraient indiscernables en fluorescence à un photon. C'est le paramètre $S_4^{(s)}$ qui permet ici de le-

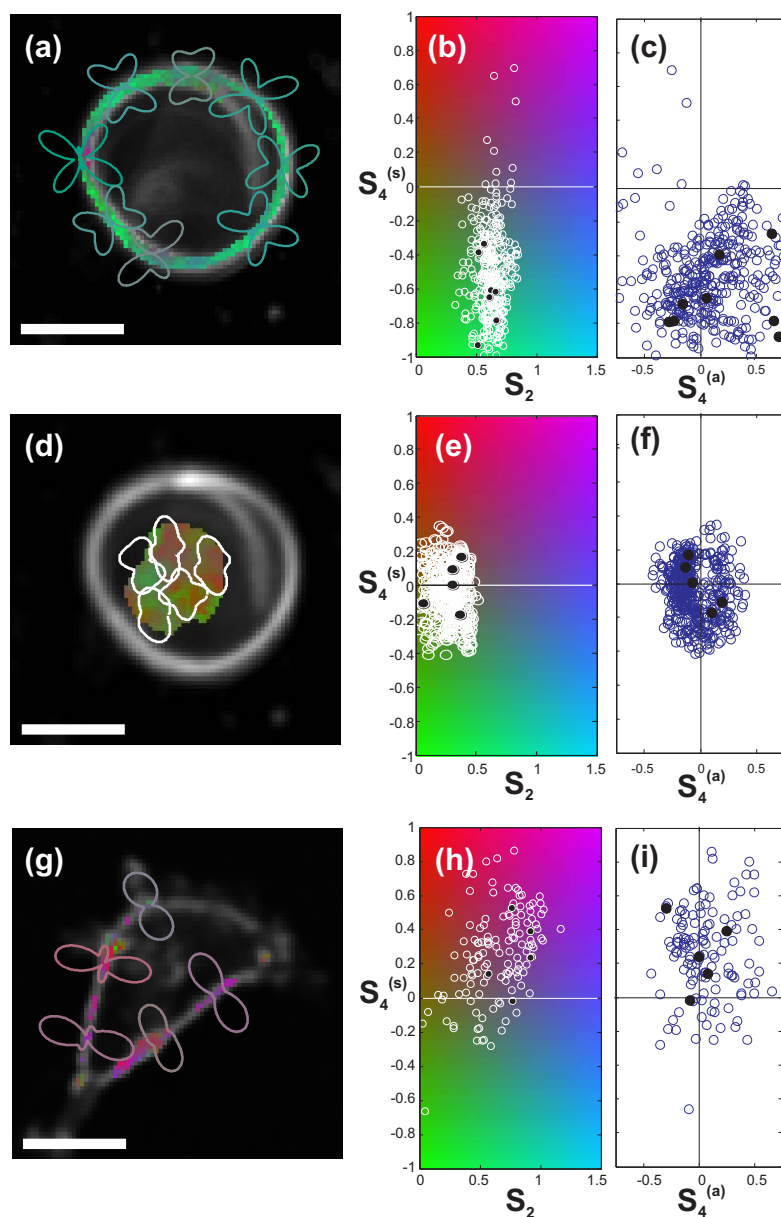


Figure 6.3 – Quantification de l'ordre orientationnel en fluorescence à deux photons. (a-c) Vésicule multilamellaire, membrane externe. (d-f) idem, membranes internes. (g-i) Membrane de Cellule COS-7, marquée di-8-ANEPPQ. Pour chaque cas : à gauche, image de fluorescence, la couleur des pixels en surimpression renseigne sur la valeur du couple (S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$) ; à droite : nuages de points montrant les valeurs de S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$ et $S_4^{(a)}$ pour les pixels d'intérêt. Barres d'échelle : 10 μm . D'après [Ferrand *et al.*, 2014].

ver l'ambiguïté, tout en révélant la forme des distributions angulaires avec précision. Ces résultats illustrent de façon emblématique la valeur ajoutée apportée par le caractère multiparamétrique des distributions telles qu'elles peuvent être révélées grâce à l'absorption biphotonique.

6.2 Polymorphisme de filaments d'amyloïdes

Les amyloïdes fournissent un cas très différent du précédent par son architecture moléculaire, mais similaire pour illustrer le besoin crucial de disposer d'une imagerie de microscopie apportant une information structurale. Il s'agit d'agrégats de protéines, qui ont la capacité de former des structures en feuillets, se pliant et s'agrégeant pour former en protostructures filamenteuses. Pour le caractère élaboré des structures d'amyloïdes et leur variété, des biologistes n'ont pas hésité à parler récemment de huitième merveille du monde [Lednev, 2014]. Structures fascinantes, mais fatales : la présence de fibres d'amyloïdes est en effet le signe caractéristique des pathologies neuro-dégénératives telles que la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou le diabète de type II.

Aujourd'hui encore, le lien entre conformation structurale des protostructures et toxicité reste à établir. Les techniques habituellement utilisées pour les études structurales, telles que résonance magnétique nucléaire, rayons X ou spectroscopie Raman, microscopie à force atomique, sont puissantes, mais lourdes à mettre en œuvre pour l'imagerie de routine, et *a fortiori* comme outil de diagnostic médical. Dans le domaine médical justement, les neurologues sont formés à interpréter des images de microscopes de fluorescence. Grâce à des sondes fluorescentes spécifiques que sont Congo Red et Thioflavine-T, et qui ne sont fluorescents qu'en présence d'agrégats, ils disposent d'un moyen facile à mettre en œuvre pour établir la présence d'amyloïdes sur des échantillons prélevés *post mortem*, mais qui malheureusement ne permet pas d'en connaître la structure moléculaire.

Pour en illustrer le potentiel, nous avons appliqué la version un photon de notre méthode à un échantillon test, composé de fibrilles d'amyloïdes, que l'on peut voir comme des faisceaux de fibres, avec des rayons de l'ordre du micromètre, clairement visibles au microscope car isolés. La Fig. 6.4 montre un exemple des résultats obtenus, qui ont été publiés dans *The Journal of Physical Chemistry B* [Duboisset *et al.*, 2013].

Ici encore, nous avons utilisé un modèle géométrique de cône. Sur chaque pixel analysé, nous avons superposé un bâtonnet coloré. L'orientation du bâtonnet indique l'orientation moyenne de la distribution obtenue, tandis que sa couleur renseigne sur la directionnalité mesurée, avec la même échelle de couleur que sur la Fig. 6.1b.

Ces mesures ont permis de confirmer que l'orientation moyenne des fluorophore était bien le long de l'axe de la fibrille. En outre, elles mettent en évidence une remarquable homogénéité de la valeur de ψ mesurée sur une fibrille complète ce qui indique que les propriétés structurales, même si l'on ne les mesure pas précisément ici, se conservent sur la longueur de la fibrille, soit environ 3 μm ici. Enfin, ces mesures nous ont permis de mettre en évidence que parmi les différentes fibrilles observées, certaines étaient manifestement structurées de façon différentes, comme en attestent par exemple les valeurs différentes de

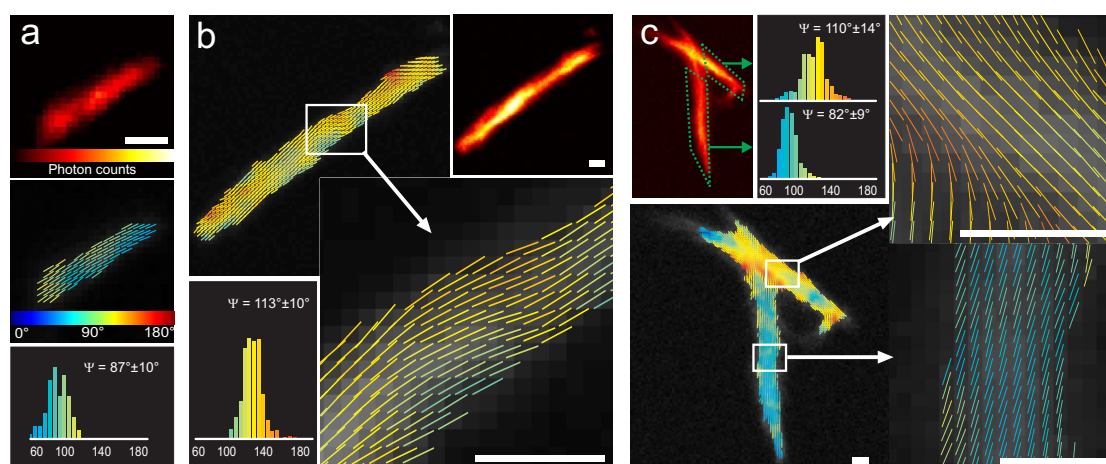


Figure 6.4 – Fibrilles d'amyloïdes marquée avec (a) Congo Red et (b,c) Thioflavine-T. L'orientation des bâtonnets indique la direction de la distribution de fluorophores, tandis que leur couleur renseigne sur l'ouverture de cône ψ . Barres d'échelle : 1 μm . D'après [Dubois et al., 2013].

ψ qui ont été mesurées par exemple entre la fibrille (b) ($\psi \approx 110^\circ$) et celle, verticale, de (c) ($\psi \approx 80^\circ$).

De façon plus générale, ces résultats montrent que de telles mesures, même si elles n'atteignent pas les performances des techniques véritablement structurales, offrent des avantages en termes de facilité de mise en œuvre, rapidité, qui peuvent être décisives pour l'étude des amyloïdes et de leurs pathologies associées.

Il est clair que les amyloïdes, avec leur grande variété de configurations structurales, constituent, en termes de méthodologie, un système exigeant pour lequel la fluorescence à deux photons aurait été particulièrement appropriée. Notre méthode n'étant pas encore mûre au moment de ces études, cela n'a pu être fait, mais des campagnes de mesures sur des échantillons d'amyloïdes calibrées sont d'ores et déjà planifiées, en collaboration Centre de Recherches en Neurosciences de Lyon.

6.3 Optimisation de la cadence de mesure

Comme je l'ai mentionné dans le chapitre 3, la cadence de mesure d'une méthode ne détermine pas simplement le confort d'utilisation ou la durée de l'expérience, mais surtout son champ d'application. Notre méthode repose sur l'acquisition d'une pile d'images. Dans nos conditions habituelles, il faut compter une centaine d'image de 150×150 pixels, avec une durée de pixel de 100 μs . Ceci correspond à une durée d'acquisition nette totale d'environ 4 minutes, portée à 5 minutes par les inévitables temps de communication instrumentaux.

De telles conditions de mesure constituent un frein considérable à l'utilisation de la

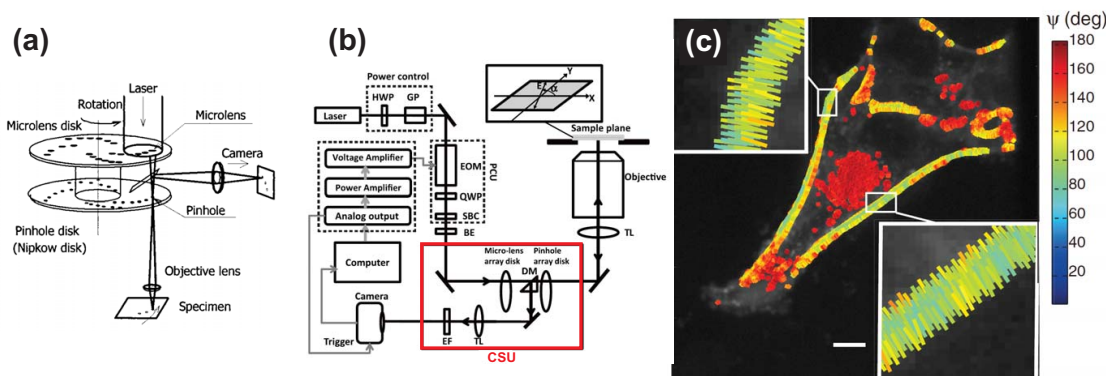


Figure 6.5 – (a) Principe du disque de Nipkow. D'après [Tanaami *et al.*, 2002]. (b) Schéma du banc optique à disque de Nipkow (le système est localisé dans le cadre marqué CSU, pour *Confocal Spinning-disk Unit*). (c) Exemple de mesure d'ordre orientationnel sur une membrane cellulaire. L'orientation des bâtonnets indique la direction de la distribution de fluorophores, tandis que leur couleur renseigne sur l'ouverture de cône ψ . Barre d'échelle : 5 μm . Adapté de [Wang *et al.*, 2013].

technique puisqu'elle est de fait limitée à des échantillons parfaitement stables, tant d'un point de vue mécanique que de leur capacité à rester fluorescents. En outre, paradoxalement, elles correspondent à des signaux plutôt pauvres en photons, puisque chaque pixel de l'image finale ne correspondra qu'à un temps d'acquisition cumulé de $100 \times 100 \mu\text{s} = 10 \text{ ms}$, ce qui est très peu.

Ceci n'est pas étonnant puisque la mesure de chaque image se fait par balayage, donc de façon séquentielle, tandis que 99% des pixels mesurés ne seront finalement pas analysés car sans intérêt, comme on peut le constater sur les Figs. 6.2 et 6.4.

Nous avons donc décliné notre méthode dans une modalité d'imagerie parallèle, en utilisant une tête confocale à disque de Nipkow. Un microscope confocal conventionnel balaie l'échantillon avec une tache lumineuse conjuguée à un détecteur ponctuel. Le disque de Nipkow est percé d'une myriade de trous. Illuminé et en rotation rapide, il projette un millier de taches lumineuse, chacun étant conjugué à un pixel de caméra, qui balaient l'échantillon, comme schématisé sur la Fig. 6.5a Il en résulte des acquisitions massivement parallèles, avec des temps réduits de plusieurs ordres de grandeur, le tout avec un rapport signal sur bruit et des propriétés de sectionnement comparables à ce qu'offre la microscopie confocale [Tanaami *et al.*, 2002]. L'instrument développé, schématisé sur la Fig. 6.5b, a été détaillé dans un article paru dans *Review of Scientific Instruments* [Wang *et al.*, 2013].

Les premiers données obtenues, telles que celles représentées sur la Fig. 6.5c, ont ainsi pu être mesurées, dans des conditions de précision similaires aux mesures confocales, avec des cadences d'acquisitions de l'ordre d'une image d'ordre moléculaire par seconde. De telles cadences, qui peuvent être largement augmentées en n'utilisant qu'une portion de capteur de caméra, permettent désormais à l'expérimentateur de visualiser l'ordre moléculaire en

Chapitre 6. Démonstration sur quelques systèmes biologiques

temps réel. Cet instrument a été installé dans les murs du Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, où il est désormais utilisé pour étudier l'ordre moléculaire des membranes cellulaire, et notamment comment ce dernier est modifié au cours des processus d'activation.

Chapitre 7

Perspectives

Depuis neuf ans, je mène mon activité de recherche dans le domaine de la microscopie pour les sciences du vivant. Dans un premier temps, je me suis concentré sur la mise en œuvre de méthodes existantes. J'ai pu ainsi me familiariser avec les concepts et instruments liés aux différentes avancées du domaine que sont les méthodes de corrélation de fluorescence, le contrôle actif de fronts d'onde, ou la microscopie non-linéaire.

J'ai par la suite consacré mon activité au développement d'une nouvelle méthode pour étudier l'ordre orientationnel, propriété résultant de l'organisation de la matière à l'échelle moléculaire. Cette méthode diffère de tous les travaux existants par le fait qu'elle repose uniquement sur le sondage du moment de transition d'absorption, ce qui la rend insensible aux effets de dépolarisation et lui confère une bonne sensibilité orientationnelle. Elle utilise en outre une polarisation tournante, ce qui lui permet d'étudier des systèmes sans condition de forme. Enfin, la description théorique rigoureuse de la fluorescence émise nous a permis d'établir un cadre conceptuel relativement simple, réduisant le problème à quelques paramètres qui permettent de quantifier précisément cet ordre orientationnel. Cette méthode a été mise en application sur des systèmes biologiques tels les membranes lipidiques ou les fibrilles d'amyloïdes. De nouvelles observables peuvent ainsi être extraites de mesures de microscopie de fluorescence, enrichissant ainsi de façon pertinente la connaissance sur le système étudié, au prix d'une complication expérimentale relativement limitée.

Je décris dans ce qui suit les perspectives que je vois à mon activité de recherche allant, à moyen terme, de la dissémination et optimisation technologique des méthodes développées à, à plus long terme, l'invention de nouveaux outils.

Disséminer

Parmi les différentes perspectives de ces travaux, la dissémination de cette méthode est une priorité. Je suis convaincu que par la valeur ajoutée qu'elle apporte à la microscopie de fluorescence, et par la relative simplicité de sa mise en œuvre expérimentale, elle dispose des atouts lui permettant de devenir une méthode établie. Il nous faut donc dans un premier temps convaincre. Aujourd'hui validée sur quelques systèmes biologiques, elle existera

véritablement le jour où elle aura véritablement permis de lever des verrous de biologie. À ce titre, les premiers résultats sont encourageants. Notre méthode a permis d'étudier le rôle joué par les septines dans les étapes initiales de division cellulaires des embryons, comme publié très récemment dans *Nature Cell Biology* par une équipe de l'institut de biologie du développement de Marseille en collaboration avec notre équipe [Mavrakakis *et al.*, 2014].

La dissémination devra affronter plusieurs obstacles. En premier lieu, comme toute nouvelle méthode, elle devra affronter un scepticisme dont on peut regretter qu'il ne s'applique plus aux méthodes plus anciennes. Le deuxième obstacle réside dans la nature peu intuitive des distributions orientationnelles et de leurs paramètres associés. Face à une image d'intensité, même en couleurs artificielles, directement intelligible sans formation particulière, la cartographie des formes de distributions orientationnelles peut, à juste titre, paraître abstraite. Enfin, le dernier obstacle est à la fois conceptuel et instrumental, et raison de la rôle-clé joué par la polarisation de la lumière. Alors même que la polarisation est exploitée largement dans de nombreux domaines de l'optique et que le monde de la microscopie est habitué à manipuler la lumière sous de nombreux aspects, force est de constater que l'utilisation de la polarisation en microscopie est réduite à la portion congrue, sans réelle maîtrise. Pour toutes ces raisons, la dissémination nécessitera un effort particulier en termes de formation auprès des utilisateurs, de représentation graphique des résultats, et de communication auprès de la communauté scientifique de différents domaines.

Optimiser les cadences de mesure

Dans le régime d'absorption à deux photons, la mesure d'une image d'ordre orientationnel exploitable prend, comme en mode confocal à un photon, quelques minutes. Il est donc indispensable d'explorer les différents moyens permettant de pousser cette cadence d'acquisition dans ses retranchements.

Comme en fluorescence à un photon, on peut penser à augmenter la parallélisme de la mesure. L'utilisation d'un disque de Nipkow est en principe envisageable à deux photons, mais son haut niveau de parallélisme nécessite de recourir à des sources laser avec des puissances de sortie de l'ordre du Watt [Shimozawaa *et al.*, 2013] pour assurer en chaque tache de focalisation la densité de puissance suffisante. En outre, cette approche rendra l'imagerie sensible à la diffusion lumineuse, contrairement à microscopie deux photons à balayage. Pour ces raisons, il est probablement plus judicieux de privilégier une solution intermédiaire, comme l'utilisation de faisceaux multiplexés [Nielsen *et al.*, 2001].

Une autre voie à explorer est le contrôle de la polarisation non pas d'une image à la suivante, mais à l'intérieur-même du pixel, comme cela a été exploité pour mesurer le dichroïsme linéaire [Steinbach *et al.*, 2009]. Un modulateur électro-optique permet de moduler la polarisation en moins d'une microseconde. Il est donc possible d'explorer plusieurs rotations de polarisation pendant la durée d'un pixel. Si le signal de fluorescence est suffisamment intense, l'utilisation d'une détection analogique et d'un amplificateur à détection synchrone permet en principe de mesurer directement les paramètres S_2^{2ph} , $S_4^{(s)}$, $S_4^{(a)}$, et φ_2 . On peut donc tabler sur l'acquisition d'une image d'ordre orientationnel de

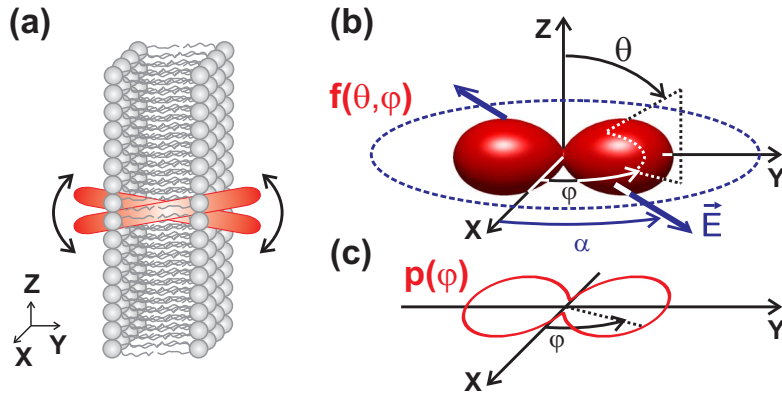


Figure 7.1 – Pour analyser une distribution donnée de façon optimale, il est souhaitable que l'axe de cette dernière soit dans le plan d'imagerie (XY), comme sur ce schéma. Pour une sonde membranaire, cela signifie qu'il faut imager la membrane de profil. Adapté de [Ferrand *et al.*, 2014].

taille conventionnelle en une poignée de secondes, voire beaucoup moins en restreignant le champ balayé.

Sonder l'ordre dans les trois directions de l'espace

Comme nous l'avons montré dans la section 5.3, et notamment en établissant l'Eq. 5.4, p. 49, notre méthode ne peut rendre compte d'une distribution tridimensionnelle quelconque $f(\theta, \varphi)$ que par ses variations azimutales $p^{nph}(\varphi)$. Cette limitation est exclusivement le fait de la géométrie du champ électrique, dont la polarisation linéaire reste limitée au plan du spécimen. Si l'on veut observer fidèlement les propriétés géométriques d'une distribution orientationnelle, il faut donc que l'axe de cette dernière soit dans le plan sondé, pour se trouver dans les conditions géométriques de la Fig. 7.1.

Dans les expériences rapportées dans le chapitre 6, nous avons pu nous placer dans de telles conditions en sélectionnant le plan équatorial de la cellule ou de la vésicule, ce qui nous a permis d'imager la membrane de profil, comme illustré sur la Fig. 7.1. Il existe cependant de nombreux cas pour lesquels un tel positionnement est irréalisable, en raison de la géométrie du spécimen. On peut citer par exemple le cas des membranes de cellules dont le profil est aplati, ou celui des filaments d'actine, qui peuvent serpenter dans les trois dimensions.

Le seul moyen d'étudier en toute généralité ces spécimens exigeants consiste donc à sonder la distribution angulaire grâce à un champ électrique pouvant prendre toutes les directions (α, β) de l'espace, comme illustré sur la Fig. 7.2. Techniquement, une polarisation arbitraire peut être obtenue au foyer d'un objectif en contrôlant la distribution spatiale du champ électrique dans la pupille. Ceci peut être fait au moyen d'un SLM [Chen et Zhan, 2010], en présentant un motif de phase calculé selon une approche si-

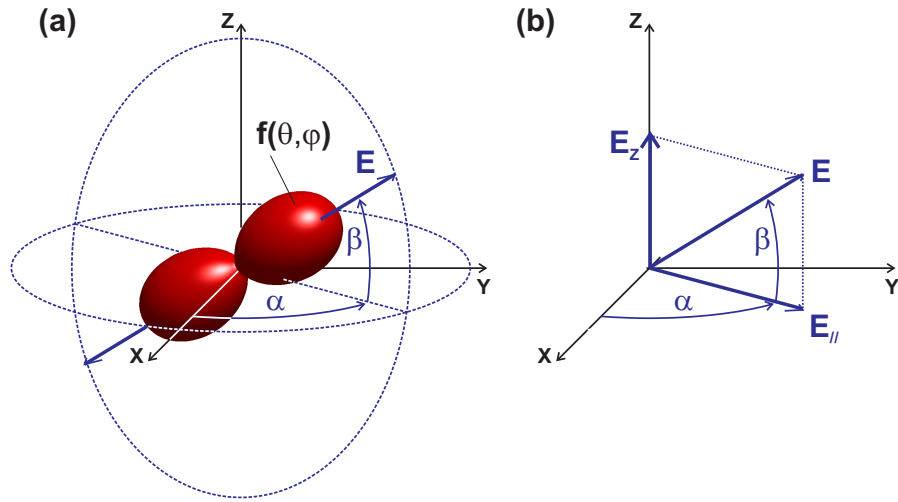


Figure 7.2 – (a) Géométrie du problème lorsque la polarisation du champ doit être contrôlée dans l'espace. A l'azimut α , on a ajouté la latitude désignée par l'angle β . Le plan d'imagerie est XY . (b) Détail de la construction du champ $\vec{E}$, à partir de $\vec{E}_{||}$ et $\vec{E}_z$.

miliaire à celle que nous avons mise en œuvre au chapitre 2. Alternativement, on peut faire interférer de façon constructive dans la pupille de l'objectif un faisceau de polarisation linéaire selon l'angle α , qui produira au foyer un champ noté ici $\vec{E}_{||}$, avec un faisceau de polarisation radiale, qui produira au foyer un champ le long de la direction Z , noté $\vec{E}_z$. Comme illustré sur la Fig. 7.2, la somme des deux champ produira au foyer un total $\vec{E}$, dont la latitude est directement $\beta = \arctan(E_z/E_{||})$.

Pour nos premières expériences, nous avons choisi cette deuxième approche. Un calcul simple montre qu'il est effectivement possible de réaliser un balayage angulaire du champ électrique selon la latitude β , dans une plage de 180 degrés. Des simulations numériques complètes, prenant en compte l'état de polarisation *au voisinage* du foyer montrent qu'une distribution orientationnelle de fluorophores sondée par ce moyen doit produire une modulation du signal de fluorescence, qu'il sera facile d'analyser.

Augmenter la résolution

La méthode telle que nous avons développée bénéficie de la résolution spatiale de la microscopie confocale, soit une centaine de nanomètres pour les directions transverses, un peu plus dans la direction longitudinale. Il est donc remarquable que malgré un facteur 100 entre la taille des structures dont on cherche à caractériser l'agencement et la longueur d'onde d'imagerie, il soit néanmoins possible d'obtenir des informations structurales quantitatives. Rapporté à des dimensions humaines, cela revient à analyser la posture moyenne d'une assemblée d'individus (sont-ils au garde à vous, allongés, en posture désordonnée ?) malgré une résolution spatiale correspondant aux dimensions d'un terrain de football, à la

longueur d'onde d'une fraction de kilomètre.

Il est possible de faire bénéficier à notre méthode d'une meilleure résolution spatiale. L'approche de la microscopie Sted (pour *stimulated emission depletion*) paraît compatible, notamment dans sa variante à deux photons [Moneron et Hell, 2009]. On pourrait donc, en principe, rajouter à nos montages un faisceau de déplétion, et ainsi bénéficier d'une meilleure résolution spatiale, sous réserve que les acquisitions successives puissent se faire sans dégradation du spécimen.

D'avantage que la résolution *spatiale*, je trouverais judicieux de mettre à profit le processus de déplétion pour améliorer la résolution *angulaire* de la méthode. Des travaux récents ont démontré que sous l'action d'un faisceau dépletant suffisamment intense, polarisé linéairement à 90 degrés du faisceau d'excitation, les fluorophores orientés différemment de la polarisation d'excitation sont empêchés d'émettre [Hafi *et al.*, 2014]. Uniquement exploité pour induire un clignotement de molécules individuelles pour des applications de superrésolution par localisation, cet effet fournit en principe un moyen de repousser les limites théoriques de notre méthode. En effet, cela reviendrait à remplacer le terme de photosélection angulaire de la forme $\cos^{2n}$ (Cf. § 5.3, p. 48, notamment l'Eq. 5.3) par un terme plus piqué. En d'autres termes, cela ouvre la porte à la lecture plus fidèle des distributions orientationnelles, grâce à un accès (en principe illimité) aux termes d'ordre élevés S_6 , S_8 , etc.

Exploiter la multimodalité

Les observables décrites dans notre méthode se réfèrent à des fluorophores. Ces derniers jouent donc le rôle de médiateurs, plus ou moins fidèles, entre l'expérimentateur et le système moléculaire étudié. Notre méthode doit donc être confrontée à d'autres méthodes de microscopie orientationnelle qui ont la capacité à sonder directement à la matière.

À court terme, je pense particulièrement aux méthodes de microscopie non-linéaire développées dans notre équipe. Nous avons notamment montré récemment, dans le cas de vésicules multilamellaires, que le mélange à quatre ondes et la diffusion Raman anti-Stokes cohérente permettaient une quantification des distributions orientationnelles, adressant spécifiquement les liaisons CC ou CH, respectivement [Bioud *et al.*, 2014]. Ces résultats sont reproduits sur la Fig. 7.3, où les quantités S_2 , φ_2 et S_4 sont définies comme pour la distribution angulaire de fluorophores (Cf. Eq. 5.5, p. 50), à ceci près que la distribution concerne ici des *liaisons chimiques*.

La confrontation, sur le même spécimen, de fluorescence à deux photons et contrastes non-linéaire doit permettre de quantifier le lien entre les angles pris par le fluorophore et ceux de son hôte moléculaire. A moyen terme, les deux méthodes utilisées simultanément fournissent un moyen de diagnostic structural plus approfondi sur les systèmes d'intérêt biologique donnant de bons contrastes en optique non-linéaire, comme c'est le cas pour l'enveloppe de myéline qui entoure la moelle épinière, par exemple [Bioud *et al.*, 2014].

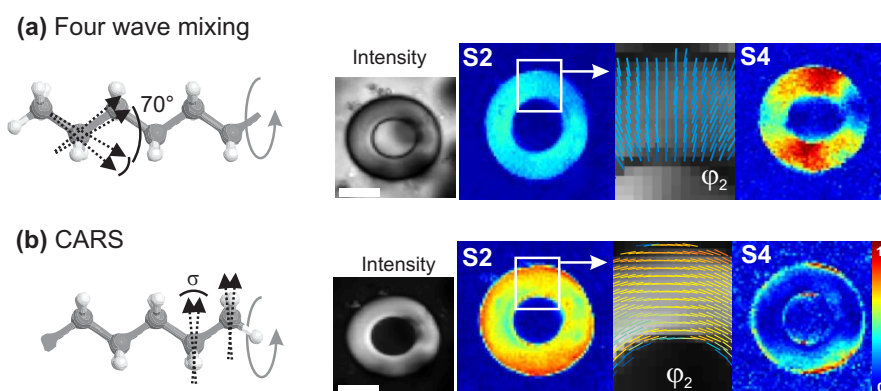


Figure 7.3 – Exemple de mesures orientationnelles en optique non-linéaire sur une vésicule multilamellaire. La mesure de FWM (a) permet de quantifier l'ordre orientationnel des liaisons CC, tandis que celle en CARS résonant (b) cible spécifiquement les liaisons CH. Adapté de [Bioud *et al.*, 2014].

Réinventer

À plus long terme, je continuerai la démarche qui a toujours motivé ma recherche, à savoir l'invention de nouveaux outils, qu'ils soient instrumentaux, méthodologiques ou conceptuels.

L'inspiration peut avoir plusieurs sources, telles qu'une question de biologie ou l'apparition de nouveaux dispositifs. Ce dernier angle d'attaque me paraît particulièrement pertinent, en raison de mes prédisposition personnelles, mais également parce que je pense qu'il y a là matière à progrès. Tout le monde s'accorde sur le fait que les sciences expérimentales sont dans une large mesure tributaires des avancées technologiques. Pourtant, en dehors des sources lasers et des détecteurs, pour lesquels nous utilisons résolument un matériel d'avant-garde, on peut constater quotidiennement le décalage parfois important qu'il existe entre les dernières innovations technologiques et celles qui sont disponibles dans nos laboratoires.

Les miroirs galvanomètres, que j'ai largement exploités dans mon travail, sont à ce titre un exemple emblématique de ce décalage : alors même qu'ils sont utilisés depuis près de quarante ans à des fins d'usinage de matériaux ou d'impression, depuis trente ans dans les microscopes confocaux commerciaux, cela ne fait que dix ans qu'on les exploite sur les bancs optiques, alors que leur rôle est stratégique pour l'imagerie par balayage. Dans une moindre mesure, on pourrait également mentionner sur les SLMs, dont la matrice de cristaux liquides équipe les vidéoprojecteurs depuis plus de dix ans. On pourrait aussi déplorer l'omniprésence sur nos bancs expérimentaux de ports de communication RS-232, un standard datant des années soixante, dont le débit est mille fois inférieur à l'USB 2 introduit il y a 15 ans.

La biophotonique dispose donc d'une importante marge de progression, en s'appro-

priant une instrumentation véritablement à l'état de l'art, que ce soit pour le contrôle de la lumière ou pour l'analyse des signaux. Je pense par exemple aux circuits programmables de type FPGA (pour *field-programmable gate array*). Il s'agit de circuits logiques reconfigurables, offrant la possibilité d'exécuter des algorithmes *en dur*, donc à des cadences de plusieurs centaines de MHz, avec la même versatilité qu'un programme informatique. De tels circuits sont présents dans nos corrélateurs, ou dans certains modèles récents de détections synchrones. Mis en œuvre dans une expérience de biophotonique, ils offrent la possibilité de concevoir des mesures *actives*, c'est-à-dire où le sondage de l'objet s'adapte en permanence à la mesure obtenue. Ce principe a été brillamment démontré récemment pour le suivi individuel de particules [Hellrieger et Gratton, 2009].

Appliquée à l'ordre orientationnel, on peut imaginer moduler la polarisation d'excitation en fonction de l'analyse polarimétrique de la fluorescence mesurée pour, par exemple, résoudre les fluctuations angulaires des fluorophores. Ceci permettrait d'accéder, pour une distribution orientationnelle donnée, à sa dynamique temporelle, et donc à une meilleure connaissance de l'interaction entre le fluorophore et son environnement (dynamique thermique, forme de potentiel énergétique).

De façon plus générale, cela posera la question de l'optimisation de la mesure. Continuerons-nous à l'avenir à acquérir des données de façon passive et prédictive, ou verrons-nous émerger des protocoles de mesure conçus pour se concentrer sur l'information pertinente, à l'instar ce que pratique notre système neuro-sensoriel ?

Bibliographie

- [Aït-Belkacem *et al.*, 2012] Aït-Belkacem, D., Guilbert, M., Roche, M., Duboisset, J., Ferrand, P., Sockalingum, G., Jeannesson, P. et Brasselet, S. (2012). Microscopic structural study of collagen aging in isolated fibrils using polarized second harmonic generation. *JBO Lett.*, 17(8):080506.
- [Alberts *et al.*, 2010] Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. et Walter, P. (2010). *Essential cell biology, third edition*. Garland Science/Taylor & Francis Group.
- [Axelrod, 1979] Axelrod, D. (1979). Carbocyanine dye orientation in red-cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.*, 26(3):557–573.
- [Benninger *et al.*, 2005] Benninger, R. K. P., Önfeld, B., Neil, M. A. A., Davies, D. M. et French, P. M. W. (2005). Fluorescence imaging of two-photon linear dichroism : cholesterol depletion disrupts molecular orientation in cell membranes. *Biophys. J.*, 88:609–622.
- [Berland *et al.*, 1996] Berland, K. M., So, P. T. C., Chen, Y., Mantulin, W. W. et Gratton, E. (1996). Scanning two-photon fluctuation correlation spectroscopy : particle counting measurements for detection of molecular aggregation. *Biophys. J.*, 71(1):410.
- [Bernchou *et al.*, 2009] Bernchou, U., Brewer, J., Midtiby, H. S., Ipsen, J. H., Bagatolli, L. A. et Simonsen, A. C. (2009). Texture of lipid bilayer domains. *J. Amer. Chem. Soc.*, 131(40):14130–14131.
- [Bewersdorf *et al.*, 2006] Bewersdorf, J., Egner, A. et Hell, S. W. (2006). 4pi microscopy. In Pawley, J. B., éditeur : *Handbook of biological confocal microscopy, 3rd edition*, chapitre 30, page 561. Springer.
- [Bioud *et al.*, 2014] Bioud, F.-Z., Gasecka, P., Ferrand, P., Rigneault, H., Duboisset, J. et Brasselet, S. (2014). Structure of molecular packing probed by polarization-resolved nonlinear four-wave mixing and coherent anti-stokes raman-scattering microscopy. *Phys. Rev. A*, 89:013836.
- [Borejdo et Burlacu, 1993] Borejdo, J. et Burlacu, S. (1993). Measuring orientation of actin filaments within a cell : orientation of actin in intestinal microvilli. *Biophys. J.*, 65:300–309.
- [Brasselet *et al.*, 2013] Brasselet, S., Ferrand, P., Kress, A., Wang, X., Ranchon, H. et Gasecka, A. (2013). Imaging molecular order in cell membranes by polarization-resolved

BIBLIOGRAPHIE

- fluorescence microscopy. In Mély, Y. et Duportail, G., éditeurs : *Fluorescent methods to study biological membranes*, Springer Series on Fluorescence, pages 311–338. Springer.
- [Brustlein *et al.*, 2011] Brustlein, S., Ferrand, P., Walther, N., Brasselet, S., Billaudeau, C., Marguet, D. et Rigneault, H. (2011). Optical parametric oscillator-based light source for coherent Raman scattering microscopy : practical overview. *J. Biomed. Opt.*, 16(2): 021106.
- [Chen et Zhan, 2010] Chen, W. et Zhan, Q. (2010). Diffraction limited focusing with controllable arbitrary three-dimensional polarization. *J. Opt.*, 12(4):045707.
- [DeMay *et al.*, 2011] DeMay, B. S., Noda, N., Gladfelter, A. S. et Oldenbourg, R. (2011). Rapid and quantitative imaging of excitation polarized fluorescence reveals ordered septin dynamics in live yeast. *Biophys. J.*, 101(4):985–994.
- [Dertinger *et al.*, 2007] Dertinger, T., Pacheco, V., von der Hocht, I., Hartmann, R., Gregor, I. et Enderlein, J. (2007). Two-focus fluorescence correlation spectroscopy : A new tool for accurate and absolute diffusion measurements. *ChemPhysChem*, 8:433–443.
- [Duboisset *et al.*, 2013] Duboisset, J., Ferrand, P., He, W., Wang, X., Rigneault, H. et Brasselet, S. (2013). Thioflavine-t and congo red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy. *J. Phys. Chem. B*, 117:784–788.
- [Ferrand, 2014] Ferrand, P. (2014). Scanning imaging : a general purpose virtual instrument for the control of high-speed data acquisition devices.
- [Ferrand *et al.*, 2014] Ferrand, P., Gasecka, P., Kress, A., Wang, X., Bioud, F.-Z., Duboisset, J. et Brasselet, S. (2014). Ultimate use of two-photon fluorescence microscopy to map orientational behavior of fluorophores. *Biophys. J.*, 106:2330.
- [Ferrand *et al.*, 2009] Ferrand, P., Pianta, M., Kress, A., Aillaud, A., Rigneault, H. et Marguet, D. (2009). A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell. *Rev. Sci. Instr.*, 80:083702.
- [Florine-Casteel, 1990] Florine-Casteel, K. (1990). Phospholipid order in gel-phase and fluid-phase cell-size liposomes measured by digitized video fluorescence polarization microscopy. *Biophys. J.*, 57(6):1199.
- [Gasecka *et al.*, 2009] Gasecka, A., Han, T.-J., Favard, C., Cho, B. R. et Brasselet, S. (2009). Quantitative imaging of molecular order in lipid membranes using two-photon fluorescence polarimetry. *Biophys. J.*, 97(10):2854–2862.
- [Hafi *et al.*, 2014] Hafi, N., Grunwald, M., van den Heuvel, L. S., Aspelmeier, T., Chen, J.-H., Zagrebelsky, M., Schuette, O. M., Steinem, C., Korte, M., Munk, A. et Walla, P. J. (2014). Fluorescence nanoscopy by polarization modulation and polarization angle narrowing. *Nat. Meth.*, 11(5):579–584.
- [Hell et Stelzer, 1992] Hell, S. et Stelzer, E. (1992). Properties of a 4pi confocal microscope. *J. Opt. Soc. Am. A*, 9:2159–2166.

BIBLIOGRAPHIE

- [Hell *et al.*, 2009] Hell, S. W., Schmidt, R. et Egner, A. (2009). Diffraction-unlimited three-dimensional optical nanoscopy with opposing lenses. *Nat. Photon.*, 3:381–387.
- [Hellriegler et Gratton, 2009] Hellriegler, C. et Gratton, E. (2009). Real-time multi-parameter spectroscopy and localization in three-dimensional single-particle tracking. *J. R. Soc. Interface*, 6:S3–S14.
- [Hooke, 1665] Hooke, R. (1665). Micrographia of some physiological description of minutes bodies made by magnifying glasses with observation and inquiries thereupon. *Roy. Soc. London*.
- [Jaffiol *et al.*, 2006] Jaffiol, R., Blancaquaert, Y., Delon, A. et Derouard, J. (2006). Spatial fluorescence cross-correlation spectroscopy. *Appl. Opt.*, 45(6):1225–1235.
- [Kolin et Wiseman, 2007] Kolin, D. L. et Wiseman, P. W. (2007). Advances in image correlation spectroscopy : Measuring number densities, aggregation states, and dynamics of fluorescently labeled macromolecules in cells. *Cell Biochem. Biophys.*, 49:141.
- [Kress *et al.*, 2011] Kress, A., Ferrand, P., Rigneault, H., Trombik, T., He, H.-T., Marguet, D. et Brasselet, S. (2011). Probing orientational behavior of MHC class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging. *Biophys. J.*, 101(2):468–476.
- [Kress *et al.*, 2013] Kress, A., Wang, X., Ranchon, H., Savatier, J., Rigneault, H., Ferrand, P. et Brasselet, S. (2013). Mapping the local organization of cell membranes using excitation-polarization-resolved confocal fluorescence microscopy. *Biophys. J.*, 105:127–136.
- [Lakowicz, 2006] Lakowicz, J. R. (2006). *Principles of fluorescence spectroscopy, third edition*. Springer.
- [Lazar *et al.*, 2011] Lazar, J., Bondar, A., Timr, S. et Firestein, S. J. (2011). Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nat. Meth.*, 8:684–690.
- [Le Moal *et al.*, 2011] Le Moal, E., Mudry, E., Chaumet, P. C., Ferrand, P. et Sentenac, A. (2011). Isotropic single-objective microscopy : theory and experiment. *J. Opt. Soc. Am. A*, 28(8):1586–1594.
- [Le Moal *et al.*, 2012] Le Moal, E., Mudry, E., Chaumet, P. C., Ferrand, P. et Sentenac, A. (2012). Two-photon fluorescence isotropic-single-objective microscopy. *Opt. Lett.*, 37(1):85–87.
- [Lednev, 2014] Lednev, I. K. (2014). Amyloid fibrils : the eighth wonder of the world in protein folding and aggregation. *Biophys. J.*, 106:1433–1435.
- [Li *et al.*, 2012] Li, S., Kuang, C., Hao, X., Gu, Z. et Liu, X. (2012). Generation of a 3D isotropic hollow focal spot for single-objective stimulated emission depletion microscopy. *J. Opt.*, 14(8):085704.
- [Mavrikakis *et al.*, 2014] Mavrikakis, M., Azou-Gros, Y., Tsai, F.-G., Alvarado, J., Bertin, A., Iv, F., Kress, A., Brasselet, S., Koenderink, G. H. et Lecuit, T. (2014). Septins promote f-actin ring formation by crosslinking actin filaments into curved bundles. *Nat. Cell Biol.*, (4):322–334.

BIBLIOGRAPHIE

- [Moneron et Hell, 2009] Moneron, G. et Hell, S. W. (2009). Two-photon excitation sted microscopy. *Opt. Express*, 17(17):14567–14573.
- [Mudry et al., 2010] Mudry, E., Le Moal, E., Ferrand, P., Chaumet, P. C. et Sentenac, A. (2010). Isotropic diffraction-limited focusing using a single objective lens. *Phys. Rev. Lett.*, 105:203903.
- [Nielsen et al., 2001] Nielsen, T., Fricke, M., Hellweb, D. et Andresen, P. (2001). High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy. *J. Microsc.*, 201:368–376.
- [Petrášek et Schwille, 2008] Petrášek, Z. et Schwille, P. (2008). Precise measurement of diffusion coefficients using scanning fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys. J.*, 94(4):1437.
- [Rocheleau et al., 2003] Rocheleau, J. V., Edidin, M. et Piston, D. W. (2003). Intrasequence GFP in class I MHC molecules, a rigid probe for fluorescence anisotropy measurements of the membrane environment. *Biophys. J.*, 84(6):4078–4086.
- [Saint-Jalm et al., 2014] Saint-Jalm, S., Andresen, E. R., Ferrand, P., Bendahmane, A., Mussot, A., Vavincq, O., Bouwmans, G., Kudlinski, A. et Rigneault, H. (2014). Fiber based ultra-short pulse delivery for nonlinear imaging using high energy solitons. *J. Biomed. Opt.*, 19:086021.
- [Schwille, 2001] Schwille, P. (2001). Fluorescence correlation spectroscopy and its potential for intracellular applications. *Cell Biochem. Biophys.*, 34(3):383.
- [Shimozawaa et al., 2013] Shimozawaa, T., Yamagatab, K., Kondoc, T., Hayashic, S., Shitamukaid, A., Konnod, D., Matsuzakid, F., Takayamae, J., Onamie, S., Nakayamaf, H., Kosugif, Y., Watanabeg, T. M., Fujitai, K. et Mimori-Kiyosuea, Y. (2013). Improving spinning disk confocal microscopy by preventing pinhole cross-talk for intravital imaging. *P. Natl. Acad. Sci. USA*, 110.
- [Solanko et al., 2013] Solanko, L. M., Honigmann, A., Midtiby, H. S., Lund, F. W., Brewer, J. R., Dekaris, V., Bittman, R., Eggeling, C. et Wuestner, D. (2013). Membrane orientation and lateral diffusion of BODIPY-cholesterol as a function of probe structure. *Biophys. J.*, 105(9):2082–2092.
- [Steinbach et al., 2009] Steinbach, G., Pomozi, I., Zsiros, O., Menczel, L. et Garab, L. (2009). Imaging anisotropy using differential polarization laser scanning confocal microscopy. *Acta Histochem.*, 111:317.
- [Tanaami et al., 2002] Tanaami, T., Otsuki, S., Tomosada, N., Kosugi, Y., Shimizu, M. et Ishida, H. (2002). High-speed 1-frame/ms scanning confocal microscope with a microlens and Nipkow disks. *Appl. Opt.*, 41(22):4704–4708.
- [Timr et al., 2014] Timr, t., Bondar, A., Cwiklik, L., Štefl, M., Hof, M., Vazdar, M., Lazar, J. et Jungwirth, P. (2014). Accurate determination of the orientational distribution of a fluorescent molecule in a phospholipid membrane. *J. Phys. Chem. B*, 118(4):855–863.
- [Van Leeuwenhoek, 1674] Van Leeuwenhoek, A. (1674). *Letter to the Royal Society, London*.

BIBLIOGRAPHIE

- [Vrabioiu et Mitchison, 2006] Vrabioiu, A. M. et Mitchison, T. J. (2006). Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature*, 443:466–469.
- [Wallrabe et Periasamy, 2005] Wallrabe, H. et Periasamy, A. (2005). Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy. *Current Opinion in Biotechnology*, 16(1):19–27.
- [Wang, 2013] Wang, X. (2013). *Confocal angle resolved linear dichroism microscopy for structural fluorescence imaging*. Thèse de doctorat, Centrale Marseille.
- [Wang et al., 2013] Wang, X., Kress, A., Brasselet, S. et Ferrand, P. (2013). High frame-rate fluorescence confocal angle-resolved linear dichroism microscopy. *Rev. Sci. Instrum.*, 84(5):053708.
- [Wawrezinieck et al., 2005] Wawrezinieck, L., Rigneault, H., Marguet, D. et Lenne, P. F. (2005). Fluorescence correlation spectroscopy diffusion laws to probe the submicron cell membrane organization. *Biophys. J.*, 89(6):4029–4042.
- [Webb, 2001] Webb, W. W. (2001). Fluorescence correlation spectroscopy : inception, biophysical experimentations, and prospectus. *Appl. Opt.*, 40(24):3969.
- [Weber, 1953] Weber, G. (1953). Rotational brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions. *Adv. Protein Chem.*, 8:415–459.
- [Widengren et Mets, 2002] Widengren, J. et Mets, U. (2002). Conceptual basis of fluorescence correlation spectroscopy and related techniques as tools in bioscience. In Zander, C., Enderlein, J. et Keller, R. A., éditeurs : *Single molecule detection in solutions, methods and applications*. Wiley.

BIBLIOGRAPHIE

Annexes

Annexe A

Curriculum vitæ détaillé

A.1 Diplômes

1994 DEUG A, Université J. Fourier Grenoble 1 mention Bien

1995 Licence de Physique, Université J. Fourier Grenoble 1, mention Bien

1996 Maîtrise de Physique, Université J. Fourier Grenoble 1, mention Bien

1997 DEA Physique de la Matière et du Rayonnement, Univ. Grenoble 1, mention Bien

1997 Magistère de physique, Université J. Fourier Grenoble 1, mention Bien

2001 Doctorat en physique, Université J. Fourier Grenoble 1, mention très honorable

A.2 Activités de recherche

1998-2001 : Thèse de doctorat Laboratoire de Spectrométrie Physique, Université Joseph Fourier Grenoble 1, CNRS UMR 5588.

Directeur de thèse : Robert Romestain

Titre : Structures guidantes à bande interdite photonique à base de silicium nanoporeux.

Mots-clés : matériaux à bande interdite photonique, BIP, silicium nanoporeux, microcavités, émission spontanée, guides d'onde, holographie.

2001-2003 : Chercheur contractuel Groupe de C.M. Sotomayor Torres, Université de Wuppertal, Allemagne.

Mots-clés : cristaux photoniques 3D, colloïdes, polymères, opales, hétérostructures, défauts, lithographie e-beam, optique guidée

2003-présent : Maître de conférences Université d'Aix-Marseille, Institut Fresnel, CNRS UMR 7249, équipe MOSAIC

Mots-clés : biophotonique, spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS), microscopie de fluorescence, instrumentation, contrôle de front d'onde, polarisation de la lumière, ordre moléculaire.

A.3 Activités de formation

A.3.1 Enseignement à la faculté

Depuis 2003, j'effectue mon service statutaire à la faculté des sciences, du L1 à la formation doctorale, dans les différents domaines de la physique. Parmi les différents enseignements dispensés, je mentionne ici ceux qui présentent une originalité particulière, par leur sujet, ou leur approche pédagogique. Les supports de cours sont disponible en téléchargement sur ma page personnelle¹.

1. www.fresnel.fr/perso/pferrand

2006-2011 : Thermodynamique L2 Math-info, L1 Sciences pour l'ingénieur.

Cours (rédaction d'un polycopié) et TD (rédaction des planches d'exercices)

Le premier module complet (cours et TD) que j'ai eu l'opportunité de mettre en place. J'ai construit ce cours en exploitant au maximum les situations de la vie courantes et le bon sens, permettant de saisir rapidement la teneur des Principes. Les mathématiques ont été introduites assez tardivement. Les retours des étudiants ont été très positifs, alors même que la physique n'était souvent pas leur discipline de prédilection.

Depuis 2008 : Sciences de la vision, sensibilité au contraste Lic Pro Optique professionnelle, formation initiale et alternance. Cours (rédaction d'un polycopié)

Les sciences de la vision sont peu enseignées en France. Elles recouvrent des domaines variés entre l'optique et la neurophysiologie, en passant par la psychologie. Le cours s'appuie sur des expériences scientifiques historiques du XXe siècle. Je sensibilise les étudiants aux protocoles expérimentaux qui diffèrent, par leur rigueur et leur lourdeur, des examens de vue qu'ils seront amenés à pratiquer professionnellement. J'y ai beaucoup appris sur nos yeux.

Depuis 2010 : Tutorat Master Europhotonics Erasmus Mundus.

Il s'agit d'un module de remise à niveau rendu nécessaire par les niveaux très variés des étudiants de ce programme international. Le programme couvre principalement les mathématiques pour la physique, l'électromagnétisme, l'optique géométrique et l'optique physique. Cet enseignement est dispensé en anglais.

A.3.2 Encadrement de stages de master

2002 (4 mois) : Malcolm MINTY -

Stage du MSc Physics of Laser communications, Essex University, Royaume-Uni

Sujet : Self assembled three- dimensional photonic crystals

Publication issues de ce travail : 1 article

2006 (6 mois) : Martina PIANTA -

Stage de Master 2 Electronic Engineering, Politecnico di Milano, Italie

Sujet : Mise en place d'un microscope confocal à balayage laser

2012 (5 mois) : Wei HE en co-direction à 50% avec Julien Duboisset

Stage de Master 2 Europhotonics Erasmus Mundus, Université Aix Marseille

Sujet : Polarization resolved microscopy in bio-molecular organization in cells and amyloid fibers

Publication issue de ce travail : 1 article

2010 (5 mois) : Hubert RANCHON en co-direction à 50% avec Sophie Brasselet

Stage de M2 recherche Nanosciences Nanocomposants Nanomesures, Université Paul Sabatier, Toulouse III

Sujet : Correction des distorsions de polarisation en microscopie de fluorescence pour la mesure d'ordres moléculaires

Publication issue de ce travail : 1 article

A.3.3 Encadrement de thèses de doctorat

2006-2008 : Martina PIANTA en co-direction à 50% avec Hervé Rigneault

Sujet : Spectroscopie de corrélation de fluorescence et Microscopie confocale pour l'analyse de la machinerie cellulaire

Thèse interrompue au bout de deux années à la suite d'une proposition de CDI dans l'industrie

Publications issues de ce travail : 2 articles

Martina est ingénieure dans l'industrie, secteur des énergies renouvelables.

2008-2011 : Alla KRESS en co-direction à 50% avec Sophie Brasselet

Sujet : Investigations de l'ordre moléculaire orientationnel de sondes lipidiques et de protéines MHC de classe I par imagerie de fluorescence résolue en polarisation

Soutenue le 29 nov 2011, actuellement post-doc au Centre d'Immunologie de Marseille Luminy

Publications issues de ce travail : 3 articles

2010-2013 : Xiao WANG en co-direction à 50% avec Sophie Brasselet

Sujet : Développement de méthodes de dichroïsme linéaire résolu en angle pour l'imagerie structurale

Soutenue le 25 sep 2013, actuellement en recherche de post-doc

Publications issues de ce travail : 4 articles + 1 en préparation

Xiao est assistant professeur, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Chine.

2013-2016 : Wei HE en co-direction à 50% avec Sophie Brasselet

Sujet : Étude des propriétés mécaniques et structurales de cellules à l'échelle submicronique en trois dimensions

A.3.4 Intervention dans des ateliers de formation continue

16-19 nov 2009 Formation Inserm : Techniques d'études dynamiques par microscopie : FRAP et FCS, applications à la biologie

9 participants, 12 heures de cours/TD/TP, Marseille.

4-10 oct 2014 Ecole thématique Mifobio (GdR 5588 - Rtmfm) : animation d'un atelier autour d'une expérience d'imagerie d'ordre moléculaire, Seignosse.

A.4 Responsabilités collectives

A.4.1 Participation à des conseils académiques

1999-2000 Membre élu doctorant, conseil de laboratoire du Laboratoire de spectrométrie physique, Université J. Fourier Grenoble

2004-2008 Membre élu, commission de spécialistes 29-30, université Paul Cézanne

2004-2008 Membre élu, conseil de département SM, université Paul Cézanne

2007-2008 Membre élu, conseil de laboratoire, institut Fresnel

2008-2011 Membre élu, conseil scientifique de l'université Paul Cézanne

2014-2016 Membre nommé, section 30 du Conseil national des universités

A.4.2 Documentation scientifique

Lors de ma thèse de doctorat, au siècle dernier, j'ai assisté aux débuts des bases de données bibliographiques et des publications accessibles via internet, qui ont depuis changé le quotidien des chercheurs. Je me suis depuis toujours tenu informé des évolutions, à la fois techniques et politiques, en la matière, pour les diffuser dans les laboratoires.

Depuis mon arrivée à l'institut Fresnel, je suis l'interface entre les chercheurs du laboratoire (qui souhaitent avoir accès au maximum de ressources) et le service de documentation de l'université (qui sait combien tout cela coûte).

Dans le cadre de la formation doctorale, je donne chaque année un cours sur la documentation, pour aider chercheurs et étudiants, à s'orienter parmi la multitude de points d'accès disponibles (au moins un par tutelle). À cette occasion, je les sensibilise aux nouveaux aspects de ce domaine en pleine mutation : les meilleurs (la rapidité des publications, la possibilité de savoir facilement qui cite son travail) comme les pires (la politique commerciale agressive des éditeurs de revues, les nouveaux schémas de publication (auteur payeur vs. lecteur payeur), les éditeurs prédateurs (la *vanity press*), l'utilisation à outrance des indicateurs bibliométriques, etc.).

Enfin, j'administre pour l'institut le portail des archives ouvertes HAL, qui permet l'extraction automatisée, équipe par équipe, de la production scientifique pour les rapports d'activité.

A.4.3 Organisation de colloques

2009 12th Carl Zeiss sponsored workshop on Fluorescence Correlation Spectroscopy and related methods, 12-16 octobre 2009, Cargese.

Membre du comité local et scientifique d'organisation

Audience internationale, 80 participants, budget 30 k€

Développement du site internet ², du portail de gestion des inscriptions et soumissions.

2011 Colloque Optique Marseille 2011 de la Société Française d'Optique, 4-7 juillet 2011, Marseille.

Membre du comité local d'organisation

Audience nationale, 700 participants, budget 140 k€

Développement du site internet ³, du portail des inscriptions et soumission, et de l'impression des recueils (1000 pages).

2. www.fresnel.fr/OM2011

3. www.fresnel.fr/FCS

A.5 Liste exhaustive de publications

A.5.1 Ouvrage

1. P. Ferrand, "Le silicium nanoporeux : microstructuration diélectrique et application aux structures photoniques avancées, vol. 27 of Annales de Physique, Les Ulis, France : EDP Sciences, 2002, ISBN 2-86883-608-9. Monographie tirée de ma thèse de doctorat

A.5.2 Chapitres d'ouvrages

1. S. Brasselet, P. Ferrand, A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, A. Gasecka, "Imaging molecular order in cell membranes by polarization resolved fluorescence microscopy", Springer Series on Fluorescence vol. 13 (Y. Mély, G. Duportail, Eds.) Springer, Berlin Heidelberg, 2013, pp. 311-337.
2. P. Ferrand, J. Wenger, and H. Rigneault, "Fluorescence Correlation Spectroscopy", in Single Molecule Analysis : Methods and Protocols (E. J. G. Peterman, G. J. L. Wuite, eds.), Springer Series Methods in Molecular Biology, Springer, New York, 2011, pp. 181-195.
3. M. Egen, R. Zentel, P. Ferrand, S. Eiden, G. Maret, and F. Caruso, "Preparation of 3D photonic crystals from opals," in Photonic crystals - Advances in Design, Fabrication, and Characterization (K. Busch, S. Lölkes, R. B. Wehrspohn, and H. Föll, eds.), Wiley, 2004.

A.5.3 Revues internationales à comité de lecture

1. J. Duboisset, P. Berto, P. Gasecka, F.-Z. Bioud, P. Ferrand, H. Rigneault, and S. Brasselet, "Molecular orientational order probed by coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) and stimulated Raman Scattering (SRS) microscopy : a spectral comparative study", Journal of Physical Chemistry B, soumis.
2. P. Ferrand, "Scanning imaging : a general purpose virtual instrument for the control of high-speed data acquisition devices", soumis.
3. P. Ghenuche, J. de Torres, P. Ferrand, J. Wenger, "Multi-focus parallel detection of fluorescent molecules at picomolar concentration with photonic nanojets arrays", Applied Physics Letters 105, 131102 (2014).
4. S. Saint-Jalm, E. R. Andresen, P. Ferrand, A. Bendahmane, A. Mussot, O. Vavincq, G. Bouwmans, A. Kudlinski, H. Rigneault, "Fiber based ultra-short pulse delivery for nonlinear imaging using high energy solitons", Journal of Biomedical Optics 19, 086021 (2014).
5. P. Ferrand, P. Gasecka, A. Kress, X. Wang, F.-Z. Bioud, J. Duboisset, S. Brasselet, "Ultimate use of two-photon fluorescence microscopy to map orientational behavior of fluorophores", Biophysical Journal 106, 2330-2339 (2014). **(Article joint en annexe p. 147)**
6. F.-Z. Bioud, P. Gasecka, P. Ferrand, H. Rigneault, J. Duboisset, S. Brasselet, "Structure of molecular packing probed by polarization-resolved nonlinear four-wave mixing and coherent anti-Stokes Raman scattering microscopy", Physical Review A 89, 013836 (2014).
7. A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Mapping the local organization of cell membranes using excitation polarization resolved confocal fluorescence microscopy", Biophysical Journal 105, 127-136 (2013). **(Article joint en annexe p. 123)**

8. X. Wang, A. Kress, S. Brasselet, P. Ferrand, "High frame-rate fluorescence confocal angle-resolved linear dichroism microscopy", *Review of Scientific Instruments* 84, 053708 (2013).
9. J. Duboisset, P. Ferrand, W. He, X. Wang, H. Rigneault, S. Brasselet, "Thioflavine-T and Congo Red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy", *Journal of Physical Chemistry B* 117, 784 (2013).
10. D. Aït-Belkacem, M. Guilbert, M. Roche, J. Duboisset, P. Ferrand, G. Sockalingum, P. Jeannesson, S. Brasselet, "Microscopic structural study of collagen aging in isolated collagen fibrils using polarized second harmonic generation", *Journal of Biomedical Optics Letters* 17, 080506 (2012).
11. E. Le Moal, E. Mudry, P. C. Chaumet, P. Ferrand, and A. Sentenac, "Two-photon fluorescence isotropic-single-objective microscopy", *Optics Letters* 37, 85 (2012).
12. A. Kress, P. Ferrand, H. Rigneault, T. Trombik, H.-T. He, D. Marguet, S. Brasselet, "Probing orientational behavior of MHC Class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging", *Biophysical Journal* 101, 468 (2011).
13. E. Le Moal, E. Mudry, P. C. Chaumet, P. Ferrand, and A. Sentenac, "Isotropic Single Objective (ISO) microscopy : Theory and Experiment", *Journal of the Optical Society of America A* 28, 1586 (2011). **(Article joint en annexe p. 113).**
14. S. Brustlein, P. Berto, R. Hostein, P. Ferrand, C. Billaudeau, and D. Marguet, A. Muir, J. Knight, H. Rigneault, "double-clad hollow core photonic crystal fibre for coherent Raman endoscope", *Optics Express* 19, 12562 (2011).
15. S. Brustlein, P. Ferrand, N. Walther, S. Brasselet, H. Rigneault, C. Billaudeau, and D. Marguet, "Optical Parametric Oscillators based light source for Coherent Raman Scattering microscopy : a practical overview", *Journal of Biomedical Optics* 16, 021106 (2011).
16. E. Mudry, E. Le Moal, P. Ferrand, P. C. Chaumet, A. Sentenac, "Isotropic diffraction-limited focusing using a single objective lens", *Physical Review Letters* 105, 203903 (2010).
17. H. Aouani, F. Deiss, J. Wenger, P. Ferrand, N. Sojic, H. Rigneault, "Optical-fiber-microsphere for remote fluorescence correlation spectroscopy", *Optics Express* 17, 18912 (2009).
18. P. Ferrand, M. Pianta, A. Kress, A. Aillaud, H. Rigneault, D. Marguet, "A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell", *Review of Scientific Instruments* 80, 083702 (2009). **(Article joint en annexe p. 105).**
19. N. Sandeau, L. Wawrezinieck, P. Ferrand, H. Giovannini, H. Rigneault, "Increasing the lateral resolution of scanning microscopes by a factor of two using 2-Image microscopy", *Journal of the European Optical Society - Rapid Publications* 4, 09040 (2009).
20. P. Ferrand, J. Wenger, A. Devilez, M. Pianta, B. Stout, N. Bonod, E. Popov, H. Rigneault., "Direct imaging of photonic nanojets", *Optics Express* 16, 6930 (2008).
21. P. Ferrand, J. Seekamp, M. Egen, R. Zentel, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Direct electron-beam lithography on opal films for deterministic defect fabrication in three-dimensional photonic crystals", *Microelectronic Engineering* 73-74, 362 (2004).
22. P. Ferrand, M. Egen, R. Zentel, J. Seekamp, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Structuring of self-assembled three-dimensional photonic crystals by electron-beam lithography", *Applied Physics Letters* 83, 5289 (2003).

23. S. G. Romanov, P. Ferrand, M. Egen, R. Zentel, J. Ahopelto, N. Gaponik, A. Eychmueller, A. L. Rogach, and C. M. Sotomayor Torres, "Exploring integration prospects of opal-based photonic crystals", *Synthetic Metals* 139, 701 (2003).
24. P. Ferrand, M. J. Minty, M. Egen, J. Ahopelto, R. Zentel, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Micromoulding of three-dimensional photonic crystals on silicon substrates", *Nanotechnology* 14, 323 (2003).
25. P. Ferrand, M. Egen, B. Grieseböck, J. Ahopelto, M. Müller, R. Zentel, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Self-assembly of three-dimensional photonic crystals on structured silicon wafers", *Applied Physics Letters* 81, 2689 (2002).
26. S. Setzu, P. Ferrand, G. Lerondel, and R. Romestain, "Photo-lithography for 2D optical microstructures in porous silicon : application to nucleation of macropores", *Applied Surface Science* 186, 588 (2002).
27. P. Ferrand, D. Loi, and R. Romestain, "Photonic band-gap guidance in high-porosity luminescent porous silicon", *Applied Physics Letters* 79, 3017 (2001).
28. P. Ferrand, S. Setzu, and R. Romestain, "Photonic band gap properties of nanoporous silicon microstructures", *European Physical Journal - Applied Physics* 16, 31 (2001).
29. P. Ferrand, R. Romestain, and J. C. Vial, "Photonic band-gap properties of a porous silicon periodic planar waveguide", *Physical Review B* 63, 115106 (2001).
30. P. Ferrand and R. Romestain, "Optical losses in porous silicon waveguides in the near-infrared : Effects of scattering", *Applied Physics Letters* 77, 3535 (2000).
31. S. Setzu, P. Ferrand, and R. Romestain, "Optical properties of multilayered porous silicon", *Materials Science & Engineering B* 69-70, 34 (2000).

A.5.4 Brevets

1. P. Ferrand, E. Le Moal, E. Mudry, A. Sentenac, "Dispositif de focalisation permettant d'obtenir une tache lumineuse isotrope", *Brevet Université Paul Cézanne* no FR2957156 (09/09/2011).
2. H. Aouani, F. Deiss, P. Ferrand, H. Rigneault, N. Sojic, J. Wenger, "Système de spectroscopie à guide d'onde pour l'analyse de particules dans un milieu", *Brevet CNRS* no FR2949560 (4/3/2011), WO2011027067 (10/3/2011)

A.5.5 Conférences invitées dans des colloques internationaux

1. X. Wang, A. Kress, J. Savatier, H. Rigneault, J. Duboisset, P. Ferrand, S. Brasselet, "Imaging molecular organization of cell membranes and proteins assemblies using polarimetric fluorescence microscopy", *CLEO Europe / EQEC 2013*, Munich, Allemagne, 12-16 Mai 2013.
2. S. Brasselet, A. Gasecka, D. Aït-Belkacem, P. Schön, F. Munhoz, S. Brustlein, H. Rigneault, P. Ferrand, "Quantifying molecular order in biological samples using polarimetric multi-modal nonlinear microscopy", *5th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques*, Engelberg, Suisse, 29 juin - 2 juillet 2010.
3. P. Ferrand, "Opal-based three-dimensional photonic crystals," série de quatre cours, *Ecole d'été "Light in Nanosize Solids"*, Bakou, Azerbaïdjan, 22-28 septembre 2004.

Chapitre A. Curriculum vitæ détaillé

4. P. Ferrand, F. Jonsson, J. Seekamp, V. Soloviev, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, J. Ahopelto, M. Egen, and R. Zentel, "Towards silicon compatible 2D and 3D photonic crystals," Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO), San Francisco, USA, 16-21 Mai 2004.
5. C. Sotomayor Torres, D. Chigrin, J. Vivas, A. Goldschmidt, S. Zankovych, P. Ferrand, and S. Romanov, "Polymer-based photonic crystals," 5th International Conference on Transparent Optical Networks ICTON 2003, Varsovie, Pologne, 29 juin - 3 juillet 2003.
6. S. G. Romanov, V. G. Solovyev, P. Ferrand, D. N. Chigrin, C. M. Sotomayor Torres, N. Gaponik, A. Eychmüller, and A. L. Rogach, "Emission modification in opal-based photonic crystals and heterostructures," 11th Int. Laser Physics Workshop 2002 (LPHYS'02), Bratislava, Slovaquie, 1-5 juillet 2002.
7. C. M. Sotomayor Torres, S. G. Romanov, V. G. Solovyev, T. Maka, D. N. Chigrin, P. Ferrand, N. Gaponik, A. L. Rogach, A. Eychenmueller, R. Zentel, B. Grieseböck, and J. Ahopelto, "Engineering of photonic crystal heterostructures from opaline films," International Quantum Electronics Conference (IQEC) 2002, Moscou, Russie, 22-27 juin 2002.
8. E. Hadji, E. Picard, J. P. Zanatta, F. Noel, and P. Ferrand, "Microcavity light emitter for gas monitoring in the 2-6 μm range : tunability and low cost integration," 4th international conference Mid Infrared Optoelectronics Materials and Devices (MIOMD), Montpellier, France, avril 2001.

A.5.6 Séminaires, conférences invitées dans des colloques nationaux, séminaires en laboratoire

1. P. Ferrand, "Un système de spectroscopie de corrélation de fluorescence avancée pour l'étude de la membrane cellulaire", séminaire externe du Laboratoire de Spectrométrie Physique, St Martin d'Hères, France, mai 2009.
2. P. Ferrand, "Introduction aux cristaux photoniques," ouverture du colloque du GdR couleur, Paris, France, 9-10 mars 2006.
3. R. Zentel, M. Egen, R. Voss, P. Ferrand, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Photonic crystals from polymer colloids," Spring meeting of the German Physical Society - Quantum optics division 2003, Hannovre, Allemagne, 24-28 mars 2003.
4. P. Ferrand, M. J. Minty, M. Egen, J. Ahopelto, R. Zentel, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Les opales : des cristaux photoniques tridimensionnels à moindre effort." séminaire, Laboratoire de Spectrométrie Physique, Saint Martin d'Hères, France, novembre 2002.
5. P. Ferrand, D. Loi, S. Setzu, and R. Romestain, "Porous silicon photonic bandgap guiding microstructures." séminaire, Institute of Materials Science, Université de Wuppertal, Allemagne, avril 2001.
6. P. Ferrand, S. Setzu, and R. Romestain, "Microstructures en silicium poreux : produire et manipuler les photons," colloque Composants optiques pour Internet, Grenoble, France, mars 2001.
7. P. Ferrand, S. Setzu, G. Lérondel, and R. Romestain, "Microstructures optiques à base de silicium nanoporeux." séminaire Alpes Optique & Photonique, Grenoble, France, janvier 2001.

8. P. Ferrand, S. Setzu, G. Léron del, R. Romestain, and J. C. Vial, "Photonic bandgap properties of porous silicon microstructures." séminaire, The Rowland Institute for Science, Cambridge, MA, USA, décembre 2000.

A.5.7 Actes de colloques

1. P. Ferrand, F. Jonsson, J. Seekamp, V. Soloviev, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, J. Ahopelto, M. Egen, and R. Zentel, "Towards siliconcompatible 2D and 3D photonic crystals," in Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO) 2004, vol. 1, (Piscataway, NJ, USA), IEEE, 2004.
2. E. Hadji, B. Cluzel, D. Sotta, M. Zelsmann, E. Picard, V. Calvo, T. Charvolin, M. Heitzmann, H. Moriceau, C. Seassal, X. Letartre, and P. Ferrand, "Silicon on insulator photonic bandgap structures for future microphotonic devices," in Photonic Crystal Materials and Nanostructures (R. M. De La Rue, P. Viktorovitch, C. M. Sotomayor Torres, and M. Midrio, eds.), vol. 5450 of Proceedings SPIE, (Strasbourg), pp. 292-299, SPIE, 2004.
3. C. Sotomayor Torres, D. Chigrin, J. Vivas, A. Goldschmidt, S. Zankovych, P. Ferrand, and S. Romanov, "Polymer-based photonic crystals," in Proceedings of 2003 5th International Conference on Transparent Optical Networks ICTON 2003 (M. Marciniak, ed.), vol. 1, (Piscataway, NJ, USA), p. 190, IEEE, 2003.
4. E. Laurent, P. Kern, I. Schanen, V. Balan, C. Vigreux, A. Pradel, S. Setzu, P. Ferrand, R. Romestain, K. Perraut, and P. Benech, "Single-mode planar optics for thermal infrared wavelengths astronomical interferometry," in Interferometry for Optical Astronomy II (W. A. Traub, ed.), vol. 4838 of Proceedings SPIE, (Waikoloa), pp. 1344-1351, SPIE, 2002.
5. S. G. Romanov, T. Maka, V. G. Solovyev, P. Ferrand, C. M. Sotomayor Torres, B. Grieseböck, M. Egen, M. Müller, R. Zentel, N. Gaponik, A. Eychmüller, A. L. Rogach, J. Manzanares-Martinez, and D. Cassagne, "Photonic crystals based on two-layer opaline heterostructure," in Materials and Devices for Optoelectronics and Microphotonics (R. B. Wehrspohn, R. Marz, S. Noda, and C. Soukoulis, eds.), vol. 722 of MRS Symposium Proceedings, (San Francisco, CA), pp. 481-486, Mater. Res. Soc Warrendale PA, USA, 2002.
6. P. Ferrand and R. Romestain, "Photonic bandgap effect in periodic porous silicon planar waveguides," in Microcrystalline and Nanocrystalline Semiconductors 2000 (P. M. Fauchet, J. M. Buriak, L. T. Canham, N. Koshida, and B. E. White, eds.), vol. 638 of MRS Symposium Proceedings, (Boston, MA), pp. F4.4.1-6, Mater. Res. Soc Warrendale PA USA.
7. G. Léron del, P. Ferrand, and R. Romestain, "Elaboration and light emission properties of low doped p-type porous silicon microcavities," in Advances in Microcrystalline and Nanocrystalline Semiconductors (R. W. Collins, P. M. Fauchet, I. Shimizu, J. C. Vial, T. Shimada, and A. P. Alivisatos, eds.), vol. 452 of MRS Symposium proceedings, (Boston, MA), pp. 711-16, Mater. Res. Soc, Pittsburgh PA, USA, 1996.

A.5.8 Communications (sans acte) dans des colloques internationaux

1. H. Wei, A. Kress, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Polarized fluorescence microscopy in 3D for structural imaging in cells at high resolution", EACR Conference Series 2014 : Goodbye flat biology : 3D models and the tumour microenvironment, Berlin, Allemagne, 2-5 novembre 2014.

2. N. K. Balla, P. Karpinski, E. Bermudez, X. Jiao, J. Duboisset, P. Ferrand, S. Blair, R. Quidant, H. Rigneault, S. Brasselet, "Characterization of gold nanostructures using polarized second harmonic microscopy", 1st MicroCOR winterschool of chemical imaging by coherent Raman and nonlinear microscopy", Les Houches, 23-28 février 2014.
3. P. Gasecka, F.-Z. Bioud, J. Duboisset, P. Ferrand, H. Rigneault, S. Brasselet, "Orientation distribution of lipids in tissues probed by polarization resolved FWM/CARS nonlinear microscopy", Les Houches, 23-28 février 2014.
4. A. Kress, J. Savatier, X. Wang, P. Ferrand, S. Brasselet, "Molecular orientational order combined with generalized polarization provides deeper insights into plasma membrane architecture of live cells", Biophysical Society 58th annual meeting, San Francisco, USA, 15-19 février 2014.
5. J. Duboisset, P. Ferrand, F.-Z. Bioud, P. Gasecka, A. Kress, J. Savatier, H. Rigneault, and S. Brasselet, "Polarization resolved fluorescence and nonlinear microscopy : A unified approach for structural bio-imaging" 1st EOS Topical Meeting on Frontiers in Optical Imaging 2013, Murten, Suisse, 16-18 septembre 2013.
6. P. Ghenuche, P. Ferrand, J. Wenger, "Metallic edge plasmonic waveguides", Summer School on Plasmonics 3, Cargese, France, 28 Juillet – 3 Août 2013.
7. A. Kress, X. Wang, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Mapping the local organization of cell membranes using excitation polarization-resolved confocal fluorescence microscopy combined with generalized polarization", 9th European Biophysics Congress (EBSA2013), Lisbonne, Portugal, 13-17 Juillet 2013.
8. P. Ghenuche, K. Saurav, P. Ferrand, J. Wenger, "Metallic edge plasmonic waveguides", SPP6 : the sixth international conference on surface plasmon photonics, Ottawa, Canada, 26-31 mai 2013.
9. J. Duboisset, F.-Z. Bioud, P. Gasecka, P. Ferrand, H. Rigneault, and S. Brasselet, "High symmetry orders probed by polarized Coherent Anti Stokes Raman Scattering and Four Wave Mixing", CLEO Europe / EQEC 2013, Munich, Allemagne, 12-16 Mai 2013.
10. P. Karpinski, A. Szukalski, L. Sznitko, J. Mysliwiec, A. Miniewicz, P. Ferrand, H. Rigneault, and S. Brasselet, "Second harmonic generation and two-photon excitation fluorescence from individual nanocrystals of pyrazoline derivatives", CLEO Europe / EQEC 2013, Munich, Allemagne, 12-16 Mai 2013.
11. P. Ferrand, J. Duboisset, X. Wang, W. He, H. Rigneault, S. Brasselet, "Polymorphism of amyloid fibrils monitored by polarization resolved microscopy", Focus on Microscopy 2013, Maastricht, Pays-bas, 24-27 Avril 2013.
12. X. Wang, A. Kress, P. Ferrand, S. Brasselet, "High frame-rate confocal polarization resolved fluorescence microscopy", Focus on Microscopy 2013, Maastricht, Pays-bas, 24-27 Avril 2013.
13. X. Chen, P. Gasecka, A. Gasecka, S. Brustlein, P. Ferrand, H. Rigneault, "Imaging molecular percutaneous absorption with coherent Raman scattering microscopy", Coherent Raman Scattering Microscopy (microCARS2012), Francfort, Allemagne, 14-16 octobre 2012.
14. J. Duboisset, Ph. Réfrégier, H. Rigneault, M. Roche, P. Ferrand, D. Ait-Belkacem, and S. Brasselet, "Generic model for the biomolecular organization probed by Second Harmonic Generation polarization microscopy", SPIE Photonic West BIOS 2012, San Francisco, USA, 21-26 Janvier 2012.

15. S. Brasselet, H. Rigneault, J. Duboisset, P. Ferrand, D. Ait-Belkacem, S. Brustlein, F.-Z. Bioud, F. Munhoz, "Multimodal polarimetric nonlinear microscopy in tissues", SPIE Photonic West BIOS 2012, San Francisco, USA, 21-26 Janvier 2012.
16. Sophie Brasselet, Patrick Ferrand, Xiao Wang, Alla Kress, Hubert Ranchon, Hervé Rigneault, "Structural imaging of cell membranes using polarimetric fluorescence microscopy", SPIE Photonic West BIOS 2012, San Francisco, USA, 21-26 Janvier 2012.
17. Alla Kress, Patrick Ferrand, Xiao Wang, Hubert Ranchon, Philippe Réfrégier, Hervé Rigneault, Sophie Brasselet, Tomasz Trombik, Hai-Tao He, Didier Marguet, "Studies on lipid order in cell membranes using fluorescence polarimetric microscopy", 12th Conference on Methods and Applications of Fluorescence, Spectroscopy, Imaging and Probes, Strasbourg, 11-14 Septembre 2011.
18. S. Brustlein, P. Berto, P. Ferrand, A. Muir, J. Knight, C. Billaudeau, D. Marguet, H. Rigneault, "Double clad hollow core fiber for coherent Raman microendoscopy", Focus on Microscopy 2011, Konstanz, Allemagne, 17-20 Avril 2011.
19. S. Brasselet, D. Ait-Belkacem, A. Gasecka, F. Munhoz, P. Ferrand, H. Rigneault, "Quantifying molecular order in biological samples using polarimetric multi-modal nonlinear microscopy", Focus on Microscopy 2011, Konstanz, Allemagne, 17-20 Avril 2011.
20. P. Ferrand, X. Wang, A. Kress, H. Ranchon, Ph. Réfrégier, H. Rigneault, S. Brasselet, "Structural investigations on cell membranes using fluorescence polarimetric microscopy", Focus on Microscopy 2011, Konstanz, Allemagne, 17-20 Avril 2011.
21. E. Le Moal, E. Mudry, P. C. Chaumet, P. Ferrand, A. Sentenac, "Isotropic focusing with a single objective lens : ISO-microscopy", Focus on Microscopy 2011, Konstanz, Allemagne, 17-20 Avril 2011.
22. E. Mudry, E. Le Moal, P. Ferrand, P. C. Chaumet, A. Sentenac, "Isotropic diffraction-limited focusing using a single lens", Optics in the Life sciences, Novel Techniques in Microscopy (NTM), Monterey, USA, 4-6 Avril 2011.
23. H. Rigneault, S. Brustlein, P. Ferrand, C. Billaudeau, D. Marguet, A. Muir, J. C. Knight, "Double-clad hollow core photonic crystal fibre for coherent Raman endoscope : imaging chemical bonds without labelling", 9th thematic symposium on Advanced Multimodality Endoscopic Instruments in the Detection, Diagnosis, Therapy, and Follow-Up of Diseases, Marseille, France, 13-14 Janvier 2011.
24. A. Kress, H. Ranchon, P. Ferrand, H. Rigneault, S. Brasselet, T. Trombik, H.-T. He, D. Marguet, "Probing orientational order of MHC Class I Protein and Lipids in Cell Membranes by Fluorescence Polarisation-resolved microscopy Imaging", Biophysical Society 55th Annual Meeting, Baltimore, USA, 5-9 Mars 2011.
25. D. Ait-Belkacem, P. Ferrand, M. Roche, S. Brasselet, "Polarimetric nonlinear microscopy in collagen", 5th EOS Topical Meeting on Advanced Imaging Techniques, Engelberg, Suisse, 29 juin - 2 juillet 2010.
26. A. Kress, H. Ranchon, P. Ferrand, H. Rigneault, S. Brasselet, T. Trombik, H.-T. He, D. Marguet, "Orientational behavior of rigidly labeled MHC Class I molecules in living cells", AMARIS'10 - International conference Advances in Molecular Nonlinear Optics, Cachan, France, 24 - 28 mai 2010.
27. H. Aouani, F. Deiss, P. Ferrand, N. Sojic, J. Wenger, H. Rigneault, "Portable FCS setup with latex microspheres", 12th Carl Zeiss sponsored workshop on FCS and related methods, Cargèse, France, Oct 2009.

28. P. Ferrand, M. Pianta, A. Kress, H. Rigneault, H.T. He, D. Marguet, "A dual spot laser scanning FCS system", 12th Carl Zeiss sponsored workshop on FCS and related methods, Cargèse, France, Oct 2009.
29. A. Kress, P. Ferrand, S. Brasselet, H. Rigneault, H. T. He, D. Marguet, "Observation of rotational diffusion of GFP-tagged MHC molecule in living cells with polarized FCS", 12th Carl Zeiss sponsored workshop on FCS and related methods, Cargèse, France, Oct 2009.
30. P. Ferrand, J. Wenger, A. Devilez, M. Pianta, B. Stout, N. Bonod, E. Popov, H. Rigneault, "Direct observation of photonic nanojets", European Optical Society Annual meeting 2008, Paris, Sep 2008.
31. P. Ferrand, M. Pianta, C. Favard, H. T. He, D. Marguet, H. Rigneault, "Development of a dual spot fluorescence system for studies of cell membrane", European Optical Society Annual Meeting 2008, Paris, Sep 2008.
32. F. Jonsson, P. Ferrand, J. Seekamp, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Functionalized photonic crystals from opals," International symposium on photonic and electromagnetic crystal structures (PECS V), Kyoto, Japon, 7-11 mars 2004.
33. P. Ferrand, J. Seekamp, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, M. Egen, R. Zentel, and J. Ahopelto, "Micro-engineering of self-assembled three-dimensional photonic crystals," communication orale, Micro and Nano Engineering 2003 (MNE 2003), Cambridge, GB, 22-25 septembre 2003.
34. P. Ferrand, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, M. Egen, R. Zentel, and J. Ahopelto, "Functionalisation of opal photonic crystals," Photonic Structures, Institute of Physics, Londres, GB, 17 février 2003.
35. S. G. Romanov, P. Ferrand, C. M. Solovyev, V. G. Sotomayor Torres, N. Gaponik, A. Eychmüller, A. Rogach, M. Egen, R. Zentel, and J. Ahopelto, "Functionalisation of thin opal films," Optical Probes 2003, Venise, Italie, 9-14 février 2003.
36. P. Ferrand, J. Seekamp, V. G. Solovyev, D. N. Chigrin, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, M. Egen, R. Zentel, N. Gaponik, A. Rogach, A. Eychmüller, and J. Ahopelto, "Opal-based photonic crystals for optoelectronic circuits," communication par affiche, International workshop on photonic and electromagnetic crystal structures (PECS IV), Los Angeles, CA, USA, 28-31 octobre 2002.
37. S. G. Romanov, V. G. Solovyev, P. Ferrand, D. N. Chigrin, C. M. Sotomayor Torres, N. Gaponik, A. Eychmüller, and A. L. Rogach, "Heterostructured opals as photonic crystals," International Workshop on Nanostructures for Electronics and Optics (NEOP), Dresde, Allemagne, juillet 2002.
38. P. Ferrand, M. Egen, B. Griesbeck, J. Ahopelto, M. Müller, R. Zentel, J. Seekamp, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Self-assembly of three-dimensional photonic crystals on structured silicon wafers," 10th MEL-ARI/NID workshop, Helsinki, Finlande, 1-3 juillet 2002.
39. P. Ferrand, D. Loi, and R. Romestain, "Porous silicon photonic bandgap microstructures probed by white light and spontaneous emission," EOS Topical Meeting Electromagnetic Optics 2, Paris, France, 26-30 août 2001.
40. P. Ferrand, S. Setzu, and R. Romestain, "Porous silicon as a photonic material," International Summerschool QED phenomena and applications of microcavities and photonic crystals, Cargèse, France, août 1998.

A.5.9 Communications (sans acte) dans des colloques nationaux

1. S. Brasselet, P. Gasecka, A. Kress, J. Duboisset, P. Ferrand, J. Savatier, "Structural imaging in cells and tissues by polarized fluorescence and nonlinear microscopy", 11e journée scientifique "Biologistes, chimistes, physiciens", Marseille, 1er décembre 2014.
2. P. Ferrand, J. Duboisset, P. Gasecka, A. Kress, X. Wang, F.-Z. Bioud, S. Brasselet, "Precise quantification of fluorophores orientational distribution by two-photon fluorescence microscopy", école thématique Mifobio (GdR 5588 - Rtmfm), Seignosse, 4-10 octobre 2014.
3. P. Gasecka, F. Z. Bioud, H. Rigneault, P. Ferrand, J. Duboisset, S. Brasselet, "Polarized fluorescence and nonlinear microscopy : probing lipids organization in cell membranes and biological tissues", 9e journées d'imagerie optique non conventionnelle, GdR Ondes et ISIS, Paris, 19-20 mars 2014.
4. P. Ferrand, P. Gasecka, A. Kress, J. Duboisset, S. Brasselet, "Détermination de distributions orientationnelles de fluorophores par microscopie de fluorescence à deux photons, Journée Electromagnétisme Polarisation Optique statistique, Marseille, 19 november 2013.
5. A. Kress, X. Wang, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Imaging lipid order in cell membranes using polarimetric fluorescence microscopy", Journées Scientifiques "Autour du contrôle des ondes pour des applications en biologie", Institut Fresnel 15 et 16 octobre 2013.
6. A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Mapping the local organization of cell membranes using angle-resolved linear dichroism fluorescence microscopy", Ecole thématique "Régulation et dynamique des processus membranaires", Porquerolles, 27-30 mai 2013.
7. J. Duboisset, F. Z. Bioud, P. Gasecka, P. Ferrand, H. Rigneault, S. Brasselet, "Light symmetry orders probed by polarized coherent Anti Stokes Raman Scattering and Four Wave Mixing", Journées de l'imagerie non conventionnelle, Paris, 19-20 mars 2013.
8. A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Imaging lipid order in cell membranes using polarimetric fluorescence microscopy", journées inter-GdR "imagerie-vivant : Nouvelles méthodologies en imagerie du vivant", Lyon, 11-13 décembre 2012.
9. A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Probing molecular order of lipid reporters di-8-ANEPPQ in cell plasma membrane by fluorescence polarimetry imaging", 8e journée scientifique "Biologistes, chimistes, physiciens, une communauté marseillaise", Marseille, 5 décembre 2011.
10. D. Aït-Belkacem, S. Asenov, C. Valades Cruz, P. Ferrand, J. Duboisset, M. Roche, S. Brasselet, "Microscopie non-linéaire à deux photons résolue en polarisation dans les tissus", Assemblée générale du GdR ONDES : Interférences d'ondes, Nice, 24-26 octobre 2011.
11. X. Wang, A. Kress, H. Ranchon, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Molecular order imaging in cell membranes by polarimetric fluorescence microscopy", Assemblée générale du GdR ONDES : Interférences d'ondes, Nice, 24-26 octobre 2011.
12. X. Wang, A. Kress, H. Ranchon, H. Rigneault, P. Ferrand et S. Brasselet, "Molecular order imaging in cell membranes by polarimetric fluorescence microscopy", Optique Marseille 2011 - Horizons de l'Optique, Marseille, 4-7 juillet 2011.

Chapitre A. Curriculum vitæ détaillé

13. E. Le Moal, E. Mudry, P. Chaumet, P. Ferrand et A. Sentenac, " ISO-microscopie : résolution isotrope en microscopie optique", Optique Marseille 2011 - Horizons de l'Optique, Marseille, 4-7 juillet 2011.
14. D. Aït-Belkacem, S. Asenov, C.A. Valades Cruz, P. Ferrand, J. Duboisset, M. Roche et S. Brasselet, " Microscopie non-linéaire à deux photons résolue en polarisation dans les tissus", Optique Marseille 2011 - Horizons de l'Optique, Marseille, 4-7 juillet 2011.
15. A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, P. Ferrand, S. Brasselet, H. Rigneault, T. Trombik, H. T. He, and D. Marguet, " Probing Orientational Behavior of Lipids in Cell Membranes by Fluorescence Polarisation-resolved Imaging", 7ème journée scientifique " Biologistes, chimistes, physiciens, une communauté marseillaise", Marseille, 6 décembre 2010.
16. A. Kress, P. Ferrand, S. Brasselet, H. Rigneault, T. Trombik, H. T. He, D. Marguet, " Probing MHC Class I Protein and Lipid Order in Cell Membranes by Fluorescence Polarization - resolved imaging", Ecole thématique interdisciplinaire en Microscopie Fonctionnelle en Biologie (MIFOBIO), Seignosse, Septembre 2010.
17. D. Aït-Belkacem, M. Roche, C. A. Valadès, P. Schoen, S. Brustlein, P. Ferrand, S. Brasselet, " Polarimetric nonlinear microscopy in collagen", Journées thématiques du GdR Ondes " Manipulation spatiale et temporelle des ondes pour l'imagerie", Marseille, 6-7 Mai 2010.
18. S. Brustlein, P. Ferrand, S. Brasselet et H. Rigneault, " Imagerie multiphoton pour le diagnostic in vivo", Journées thématiques du GdR Ondes " Manipulation spatiale et temporelle des ondes pour l'imagerie", Marseille, 6-7 Mai 2010.
19. A. Kress, P. Ferrand, S. Brasselet, D. Marguet, and Hervé Rigneault, " Orientational behavior of rigidly labeled MHC Class I molecules in living cells", Journées thématiques du GdR Ondes " Manipulation spatiale et temporelle des ondes pour l'imagerie", Marseille, 6-7 Mai 2010.
20. A. Kress, P. Ferrand, S. Brasselet, H. Rigneault, H. T. He, and D. Marguet, " Observation of rotational diffusion of GFP-tagged MHC molecule in living cells with polarized FCS", Ecole pré-doctorale " Interactions lumière-matière : du nanomètre au millimètre", Les Houches, 30 août - 11 sept 2009.
21. P. Ferrand, M. Pianta, P.-F. Lenne, H. Rigneault, D. Marguet, H.T. He, " Spectroscopie de corrélation de fluorescence à deux volumes pour l'étude de la signalisation cellulaire" Colloque " OPTIQUE Grenoble 2007", Grenoble, Juil 2007.
22. P. Ferrand, M. Pianta, P.-F. Lenne, H. Rigneault, D. Marguet, H.-T. He, " Spectroscopie de corrélation de fluorescence à deux volumes", Journée de rencontre du GDR2588 " microscopie fonctionnelle du vivant", Marseille, Mai 2007.
23. M. Pianta, P. Ferrand, P.-F. Lenne, H. Rigneault, H.-T. He, D. Marguet, " Two-volume fluorescence correlation spectroscopy for in-situ studies of cell signaling events", Journées du GdR CellTiss, Arles, Nov 2007.
24. P. Ferrand, M. Pianta, P.-F. Lenne, H. Rigneault, D. Marguet, and H.-T. He, " Dual spot fluorescence correlation spectroscopy for in situ study of cell membrane dynamics during signal transduction events," Journée SFO Photonique et Sciences du Vivant, Paris, France, 30 novembre 2006.
25. P. Ferrand, M. Egen, J. Seekamp, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, R. Zentel, and J. Ahopelto, " Mikro-engineering von selbst anordnenden dreidimensionalen photonischen Kristallen," 3. Materialwissenschaftliche Forum, Wuppertal, Allemagne, novembre 2003.

26. M. Egen, B. Grieseböck, R. Voss, P. Ferrand, M. Müller, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, and R. Zentel, "Polymers and light : Photonic crystals from polymer colloids," Spring meeting of the German Physical Society - Condensed matter division 2003, Dresde, Allemagne, 24-28 mars 2003.
27. P. Ferrand, J. Seekamp, V. G. Solovyev, D. N. Chigrin, S. G. Romanov, C. M. Sotomayor Torres, M. Egen, R. Zentel, N. Gaponik, A. Rogach, A. Eychmüller, and J. Ahopelto, "Cristaux photoniques à base d'opales pour l'optoélectronique," réunion annuelle du GdR Ondes - Groupe Thématique 2, Orsay, France, 26-27 novembre 2002.
28. P. Ferrand and R. Romestain, "Structures guidantes à bande interdite photonique à base de silicium poreux pour le proche infrarouge," réunion annuelle du GdR Microcavités et cristaux photoniques, Lyon, France, décembre 2000.
29. P. Ferrand and R. Romestain, "Vers des structures photoniques 3D à base de silicium poreux," 7èmes Journées de la Matière Condensée - SFP, Poitiers, France, août 2000.
30. P. Ferrand, S. Setzu, and R. Romestain, "Modification du spectre d'émission en fonction de l'angle dans des microcavités en silicium poreux," réunion annuelle du GdR Microcavités et cristaux photoniques, Orsay, France, décembre 1998.

A.5.10 Autres communications

1. J. Wenger, H. Aouani, M. Milutinovic, F. Deiss, P. Ferrand, N. Sojic, H. Rigneault, "Sonde à fibre optique pour la spectroscopie de corrélation de fluorescence : l'analyse des dynamiques de fluorescence devient portable", *Spectra Analyse* 275, pp. 43-47 (2010).
2. P. Ferrand, "LabVIEW contrôle un système de microscopie multimodale rapide pour la biologie cellulaire", Note d'application ⁴, National Instruments, décembre 2008.
3. P. Ferrand, M. J. Minty, M. Egen, J. Ahopelto, R. Zentel, S. G. Romanov, and C. M. Sotomayor Torres, "Micromoulding of three-dimensional photonic crystals on silicon crystals," Society of Manufacturing Engineers (SME) Technical Paper, 2003.
4. P. Ferrand, M. Egen, B. Grieseböck, J. Ahopelto, S. G. Romanov, M. Müller, R. Zentel, and C. M. Sotomayor Torres, "Self-assembly of threedimensional photonc crystals on structured silicon substrates," *Phantoms Newsletter* 9, p. 10, 2002.

4. sine.ni.com/cs/app/doc/p/id/cs-11787

Annexe B

Recueil d'articles

Un nombre volontairement réduit de publications est reproduit dans les pages qui suivent. Leur lecture apportera un éclairage plus pointu sur certaines des activités décrites dans ce mémoire. L'ensemble de mes publications est disponible en téléchargement sur ma page personnelle¹.

1. P. Ferrand, M. Pianta, A. Kress, A. Aillaud, H. Rigneault, D. Marguet, "A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell", *Review of Scientific Instruments* 80, p. 083702 (2009)p. 105
2. E. Le Moal, E. Mudry, P. C. Chaumet, P. Ferrand, and A. Sentenac, "Isotropic Single Objective (ISO) microscopy : Theory and Experiment", *Journal of the Optical Society of America A* 28, pp. 1586-1594 (2011)p. 113
3. A. Kress, X. Wang, H. Ranchon, J. Savatier, H. Rigneault, P. Ferrand, S. Brasselet, "Mapping the local organization of cell membranes using excitation polarization resolved confocal fluorescence microscopy", *Biophysical Journal* 105, pp. 127-136 (2013)p. 123
4. P. Ferrand, P. Gasecka, A. Kess, F. Z. Bioud, X. Wang, J. Duboisset, S. Brasselet, "Ultimate use of two-photon fluorescence microscopy to map orientational behavior of fluorophores", *Biophysical Journal* 106, pp. 2330-2339 (2014)p. 147

1. www.fresnel.fr/perso/pferrand

A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell

Patrick Ferrand,^{1,a)} Martina Pianta,¹ Alla Kress,¹ Alexandre Aillaud,¹ Hervé Rigneault,¹ and Didier Marguet²

¹*Institut Fresnel, Aix-Marseille Université, Campus de St Jérôme, F-13013 Marseille, France;*

Institut Fresnel, Ecole Centrale Marseille, Campus de St Jérôme, F-13013 Marseille, France;

and Institut Fresnel, CNRS, Campus de St Jérôme, F-13013 Marseille, France

²*CIML, Aix-Marseille Université, Parc scientifique de Luminy, Case 906, F-13288 Marseille, France;*

CIML, INSERM, Parc scientifique de Luminy, Case 906, F-13288 Marseille, France; and CIML, CNRS,

Parc scientifique de Luminy, Case 906, F-13288 Marseille, France

(Received 16 June 2009; accepted 26 July 2009; published online 20 August 2009)

A fluorescence correlation spectroscopy system based on two independent measurement volumes is presented. The optical setup and data acquisition hardware are detailed, as well as a complete protocol to control the location, size, and shape of the measurement volumes. A method that allows to monitor independently the excitation and collection efficiency distribution is proposed. Finally, a few examples of measurements that exploit the two spots in static and/or scanning schemes are reported. © 2009 American Institute of Physics. [DOI: 10.1063/1.3205447]

I. INTRODUCTION

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a technique based on the analysis of the fluctuations of fluorescence that permits to quantify a wide range of phenomena such as photophysical, photochemical, interaction, diffusion, and transport properties of fluorescently labeled molecules.¹ Benefitting from the dramatic progress of bright fluorescent molecules and high sensitivity detectors, this technique can now be performed within the confocal volume of high numerical aperture (NA) microscope objectives. The spatial resolution, the intrinsic steady-state regime, as well as the capability to record a huge number of events make it now a routine tool for cell biology.²

However, the original FCS technique is limited by the fact the dynamic system under study is exclusively analyzed in terms of temporal fluctuations at a single location, at a spatial scale related to the measurement volume, while a much more complete description would require investigations in the spatio-temporal domain. As a consequence, various phenomena of similar timescale taking place within the same specimen cannot be efficiently discriminated without a strong *a priori* knowledge of the system. For instance, FCS measurements of translational diffusion performed under photobleaching conditions may actually monitor the survival time of the fluorophores instead of their diffusion time.³

In order to overcome this lack of spatial information, several FCS-based techniques have been proposed. The analysis can be performed by cross-correlating signals recorded at two distant locations; this approach suits the best to transport phenomena⁴ but it can also successfully be extended to the measurement of absolute diffusion, although the time gating that is required in order to overcome the crosstalk between the two overlapping volumes makes it

more difficult to implement.⁵ The two observation volumes can also be simply realized by splitting the detected fluorescence onto two shifted detectors⁶ but this causes the two resulting measurement volumes to be slightly deformed. A more versatile scheme has been proposed using an array detector but it is still limited by a finite readout speed.⁷ Another approach allowing to achieve a better spatial description of a system is to perform FCS measurements at various spatial scales by changing the observation volumes.⁸ It has been shown that this approach allows to discriminate between possible diffusion regimes of molecular species in cell membranes and even to quantify submicron structures.⁹

Another class of methods derived from FCS consists in scanning the observation spot in a repetitive fashion in the sample, and therefore collecting sequentially fluorescence information from many locations, which improves the statistical accuracy of the measurement and reduces photobleaching.¹⁰ Line or circle scans are used in so-called scanning FCS (sFCS) experiments, while image scans produce image frames that are analyzed using image correlation spectroscopy (ICS) techniques. Although sFCS and ICS are based on the same principle, they address different time scales. The sFCS can analyze dynamics in a wide range down to a fraction of a millisecond.¹¹ It was shown recently that this method allows to measure absolute diffusion coefficient in biological systems,¹² and even to discriminate different dynamic processes of comparable time scale.¹³ Except for raster ICS, which allows to analyze fast dynamics by exploiting the time taken by the raster scan,¹⁴ ICS and its variants¹⁵ suit better to slowly diffusing systems. All these methods can be, in principle, easily implemented on any laser scanning confocal microscopy system.

In this article, we describe a FCS system that is based on two custom laser scanning confocal microscopes sharing the same objective, and creating within the specimen two fully independent diffraction-limited measurement spots. Each

^{a)}Electronic mail: patrick.ferrand@fresnel.fr.

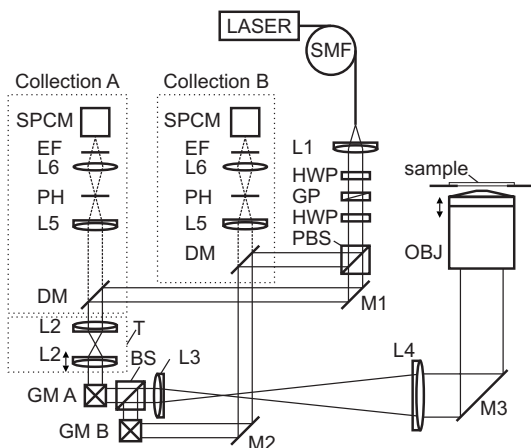


FIG. 1. Schematics of the dual spot FCS system. Abbreviations: SMF, single mode fiber; L1–L6, achromatic doublets (L1=25 mm, L2=30 mm, L3=100 mm, L4=300 mm, L5=150 mm, L6=50 mm); HWP, half-wave plate; GP, Glan polarizer; PBS, polarizing beamsplitter; M1–M3, mirrors; DM, dichroic mirror; T, telescope; GM A (and B, respectively), galvanometric mirror set for channel A (and B, respectively); OBJ, water immersion microscope objective; PH, pinhole; EF, emission filter; SPCM, single photon counting module.

spot can operate either in a static mode at an arbitrary location or in a scanning mode, along an arbitrary periodic trajectory that can be one or several image frames, circles, lines, or any other closed loop, while the signals of fluorescence are recorded by two dedicated confocal detection channels. The instrument has been designed in order to offer a high level of flexibility. The operating modes include dual spot twin measurements (i.e., simultaneous measurements performed in the same mode at two locations), dual spot cross analysis, as well as hybrid measurements that assign a different measurement mode to each spot.

The article is organized as follows. Section II details the optical setup and hardware. Section III describes briefly the theoretical background of confocal microscopy and FCS measurements. Section IV addresses the protocol of calibration of the system. Finally, Sec. V reports examples of measurements exploiting the versatility and the dual spot nature of the system.

II. DESCRIPTION OF THE SETUP

A. Optical bench

The two observation volumes in our system are produced by using two identical custom laser scanning confocal microscopy systems sharing the same objective. Although this is likely the most complex technical approach for generating two measurement spots, we believe that it provides the highest level of versatility without sacrificing the optical quality of the spots.

The optical setup is presented in Fig. 1. Emission from a continuous wave 491-nm diode-pumped solid state laser (Caylps, Cobolt) is coupled into a single mode fiber. The purpose of the single mode fiber is to allow a convenient coupling for other laser sources for future development of the system. Light exiting the fiber is collimated by an achromatic doublet and attenuated using a half-wave plate placed in

front of a Glan polarizer. The beam is divided into two excitation arms by a polarizing beam splitter. A second half-wave plate located before the beam splitter controls the power ratio between the two arms. The two excitation beams follow paths of equal distance. They are first reflected by a dichroic mirror (XF2037–500DRLP, Omega Optical) and then sent on a couple of galvanometric scanning mirrors (6200H, Cambridge Technology). The two excitation beams are combined by a nonpolarizing beam splitter and introduced into the side port of the microscope stand (Axiovert 200M, Carl Zeiss). A scanning telescope images the scanners with a magnification of 3 onto the rear aperture of the infinity-corrected water immersion microscope objective (C-Apochromat 40 $\times$, focal length 4.1 mm, NA=1.2, UV-VIS-NIR, Carl Zeiss). Two independent excitation spots, that we denote as A and B, are created within the sample, each one at a location controlled by its dedicated scanning system.

Fluorescence emitted at each spot location is collected by the same objective, follows the same path back through its corresponding scanner, in a so-called descanned scheme, and is sent through the dichroic mirror of the corresponding channel. The two detection benches are identically constituted of a 75 μ m diameter pinhole (i.e., 1.2 Airy units with our total magnification of 120) placed at the focus of a tube lens. Another lens images (with a magnification of unity) the pinhole onto the 175 μ m diameter active area of a single photon counting module (SPCM-AQR-14, PerkinElmer Optoelectronics).

This setup creates two identical excitation spots with their dedicated confocal detection, while the descanned detection scheme keeps the conjugation unaffected when the spots are moved. As illustrated in Fig. 1, an additional telescope (denoted T) of magnification -1 has been inserted on channel A. By displacing one lens with respect to the other along the optical axis, it is possible to modify slightly the divergence of excitation beam A, and therefore to change the plane in which spot A is focused. Note that the conjugation between the spot and the pinhole is not affected because the divergence induced on the excitation is compensated on the detection beam. A procedure for calibrating the axial displacement of the focus and assessing the spot quality in this configuration will be presented in Sec. IV.

B. Data acquisition

A diagram of the data acquisition hardware is presented in Fig. 2. A high-speed voltage analog output PCI board (NI 6731, National Instruments) generates static or waveform voltages on two pairs of channels, each one commanding one dual-axis analog driver (Micromax 67320, Cambridge Technology) that controls one set of scanning mirrors. The TTL pulses generated by the two single photon counting modules are recorded by a PCI counting board (NI 6602, National Instruments). The synchronization between scanning and data acquisition is obtained by triggering the counters by a digital “start” signal generated by the analog output board when voltage generation starts. Since both PCI cards use direct memory access, the data are transferred through a buffer, ensuring high-speed operation. For FCS measurements, both photocounting signals are also sent to a multiple

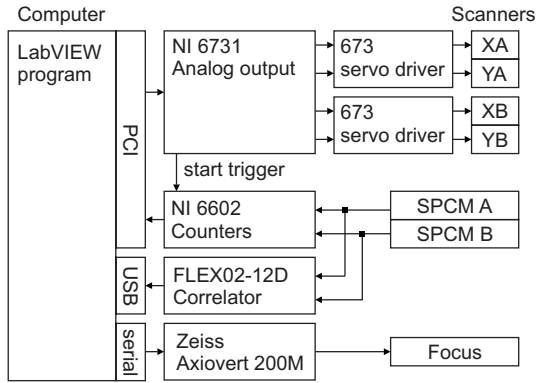


FIG. 2. Diagram of the acquisition hardware.

tau digital correlator (Flex02–12D, Correlator.com) that builds up in real time the temporal auto and cross correlations, and can optionally deliver photon counting histories for offline software correlation analysis. The focus of the microscope stand is motorized.

The whole system is connected to a personal computer and controlled by a program developed in house in a LABVIEW (National Instruments) environment. A unique graphic user interface provides a control over the scanning parameters, the photon counts acquisition and processing, the correlator, and the microscope stand parameters (focus, ports, objective turret, filter turret, shutters, etc.).

C. Sample preparation

FCS measurements in solution were carried out using a Rhodamine 6G (diffusion coefficient $D=280 \mu\text{m}^2$ at room temperature¹⁶) solution, with concentrations ranging from 100 nM up to 1 μM . The excitation power, measured by a powermeter inserted before the sideport of the microscope stand (between L4 and M3, see Fig. 1) was 300 μW , a value that was checked to be low enough to prevent any effect of saturation or photobleaching.

Point spread function (PSF) measurement were carried out using 100 nm diameter yellow-green fluorescent microspheres (FluoSpheres 505/515, Molecular Probes), that have been dispersed on a cleaned microscope cover slip. Typical excitation power, measured as previously, was 5 μW .

Measurement on cells have been performed at room temperature on COS-7 cells, the green fluorescent protein-tagged Thyl protein of which has been transiently expressed using the protocol detailed in Ref. 9.

III. THEORY

A. PSFs

The response of a confocal fluorescence microscope is described by a three-dimensional (3D) PSF, that we denote as PSF_{conf} , which takes into account two contributions: (i) the spatial distribution of the excitation intensity within the specimen, described by the excitation PSF, that we denote PSF_{exc} , (ii) the collection efficiency, described by the intensity collection PSF, denoted PSF_{coll} , with¹⁷

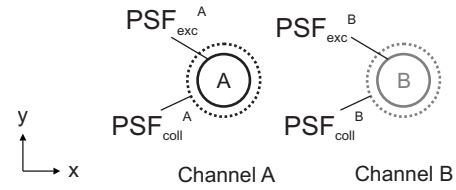


FIG. 3. Schematic view of the two measurement spots, with the corresponding lateral extents of the excitation (solid line) and collection (dashed line) PSFs. In this example, the two spots are addressing different locations.

$$\text{PSF}_{\text{conf}}(r) = \text{PSF}_{\text{exc}}(r) \cdot \text{PSF}_{\text{coll}}(r) = (\text{PSF}_{\text{exc}} \cdot \text{PSF}_{\text{coll}})(r).$$

With these definitions, the intensity $I(r)$ recorded on an specimen $S(r)$ is given by

$$\begin{aligned} I(r) &= \int S(R) \cdot \text{PSF}_{\text{conf}}(r-R) d^3R = (S \otimes \text{PSF}_{\text{conf}})(r) \\ &= [S \otimes (\text{PSF}_{\text{exc}} \cdot \text{PSF}_{\text{coll}})](r). \end{aligned} \quad (1)$$

Since our system is made of two independent channels, each of them will therefore be described by its own set of PSFs. A schematic view of the PSFs involved in our system is presented in Fig. 3, where only the spatial extent of the excitation and collection PSFs are represented in the xy plane for a better clarity. This kind of representation constitutes a powerful way to figure out the respective roles of the two spots, their possible interaction, and more generally all degrees of freedom of the system. Note that the correct pinhole alignment performed on each channel before each campaign of measurement ensures that $\text{PSF}_{\text{exc}}^A$ and $\text{PSF}_{\text{coll}}^A$ (and the same for PSFs of channel B) are centered with respect to each other, as illustrated in Fig. 3, keeping in mind that these properties are conserved during the scanning due to the descanned detection scheme.

B. FCS

The technique of FCS is based on the analysis of the fluctuation of the fluorescence intensity $F(t)$, by means of its temporal autocorrelation function $G(\tau)$, defined as

$$G(\tau) = \frac{\langle F(t)F(t+\tau) \rangle}{\langle F \rangle^2},$$

where the brackets $\langle \rangle$ indicate a temporal average. Since the PSF of the system can be reasonably described by a Gaussian distribution¹⁸

$$\text{PSF}_{\text{conf}}(r) = I_0 \exp \left[-2 \left(\frac{x^2}{\omega_x^2} + \frac{y^2}{\omega_y^2} + \frac{z^2}{\omega_z^2} \right) \right], \quad (2)$$

it has been shown that the autocorrelation function for free diffusing fluorescent molecules can be written as¹⁹

$$\begin{aligned} G(\tau) &= 1 + \frac{1}{N} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_{xy}^2} \right)^{-1} \left(1 + \frac{4D\tau}{w_z^2} \right)^{-1/2} \\ &\quad \times \left[1 + n_T \exp \left(-\frac{\tau}{\tau_T} \right) \right], \end{aligned} \quad (3)$$

where D is the translational diffusion coefficient, N is the average number of molecules in the sample volume, n_T is the triplet fraction, τ_T is the triplet lifetime, and $w_{xy} = w_x = w_y$. By

fitting experimental data with the expression of Eq. (3), it is possible either to measure the diffusion coefficient if w_{xy} and w_z are known, or to measure w_{xy} and w_z from a solution of known diffusion coefficient D .

IV. CALIBRATIONS

A. Distances within the sample plane

The conversion factor between the command voltage and the transverse displacement of the spot in the sample has been calibrated for each of the two scanners by recording the image of calibrated micrometers (Graticules, Ltd). The total area that can be covered by scanning is limited in our microscope stand by the side port accessible diameter. With our objective, it is typically $200 \times 200 \mu\text{m}^2$.

B. Scanning speed

Since the main purpose of the system is FCS measurements, highly sensitive detectors have been chosen, which operate in photon counting mode. The count rate is therefore limited to a few 10^6 counts/s, i.e., a few counts per microsecond. Thus, as far as imaging is concerned, the main limitation in terms of acquisition rate is not the velocity of the scanning system itself (that can reach dwell time down to the microsecond) but the dynamics of photon counts within the image, that need a sufficient dwell time and should provide a contrast with an acceptable signal-to-noise ratio. In practice, the minimum pixel dwell time is typically $100 \mu\text{s}$, a value that can be obtained either by one single scan, or by the accumulation of several frames.

Images are obtained by raster scanning, i.e., all lines from an image are recorded sequentially, the spot being scanned for each line in the same direction. For extremely fast scanning conditions (dwell time smaller than $50 \mu\text{s}$), the mechanical inertia of the scanners causes the beam displacement to be delayed with respect to the signal acquisition. In these conditions, photon counts that are attributed to one pixel may actually come from an earlier location, and the final image appears therefore slightly shifted along one direction, as illustrated in Fig. 4. Fortunately, no deformation has been noticed, so that distance measurements are unaffected by this effect.

C. Transverse channel matching

Since the two spots are independently controlled by their own scanners, their location is given in their own set of coordinates. For all measurements that will involve two spots, it is crucial that these two coordinate systems match perfectly. A first coarse alignment is performed by placing the two scanning systems symmetrically with respect to the beam splitter (denoted BS in Fig. 1). Then, a finer calibration is realized by cross imaging, using a homogeneous solution of Rhodamine 6G ($1 \mu\text{M}$, typically). Spot A is on, static, and located for instance at $(x_A=0, y_A=0)$ while channel B, with laser excitation off, is performing a raster scan. The maximum of fluorescence is collected by channel B when the centers of $\text{PSF}_{\text{coll}}^B$ and $\text{PSF}_{\text{exc}}^A$ match, which allows to measure the location of spot A in the system of coordinates of B. By tilting scanner B, it is possible to move spot A to $(x_B$

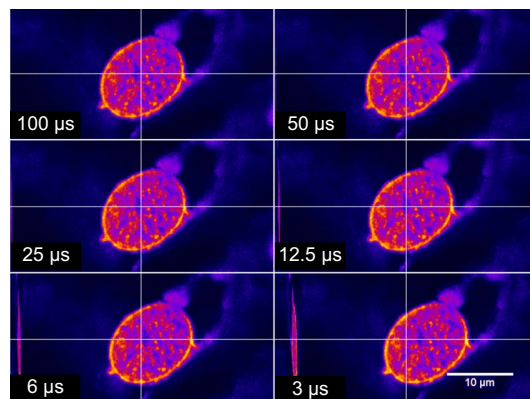


FIG. 4. (Color online) Comparison of several images of a fixed sample acquired with different pixel dwell times (indicated in the corner of each image). In order to compare images of similar signal-to-noise ratio, an appropriate number of accumulations was set, keeping constant the total dwell time per pixel at a value of $100 \mu\text{s}$ (one accumulation at $100 \mu\text{s}$, two accumulations for $50 \mu\text{s}$, etc.). For the shortest dwell times, the image shift is clearly visible. In addition the narrow left part of the image shows the signal that has been recorded when the spot on its way back, between successive line scans.

$=0, y_B=0$), and therefore to ensure that $(x_A=x_B, y_A=y_B)$, as illustrated in Fig. 5(a), with a typical accuracy of 20 nm . Without any further alignment, a quick check can be realized by operating vice versa, as illustrated in Fig. 5(b). Finally, it was checked that the channel matching occurs for all spot locations within the scanning field.

D. Axial distance between spots

As discussed in Sec. II, the scanning plane of spot A can be moved backward or forward with respect to spot B by simply acting on a telescope (denoted T in Fig. 1). Figure 6(a) illustrates the telescope system, where the shift to the nominal position is denoted d . The resulting axial distance

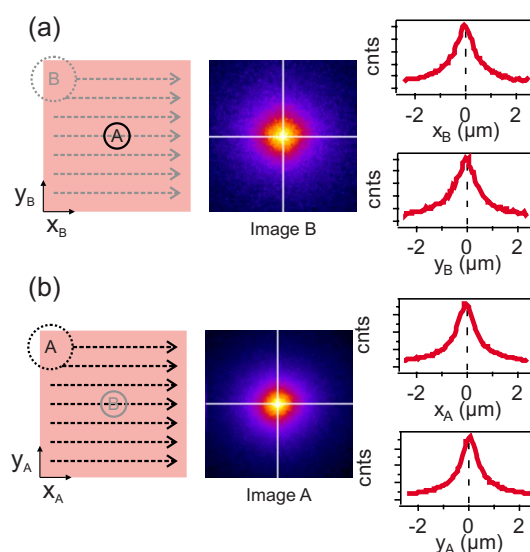


FIG. 5. (Color online) Calibration of channel matching by cross imaging in a solution of Rhodamine 6G. (a) Left, schematic of the mode of operation, with PSF extents as defined in Fig. 3; center, image recorded on channel B; right, cross section of the image along axis plotted in white. Left axis is in arbitrary unit, minimum is zero. (b) Same procedure, vice versa.

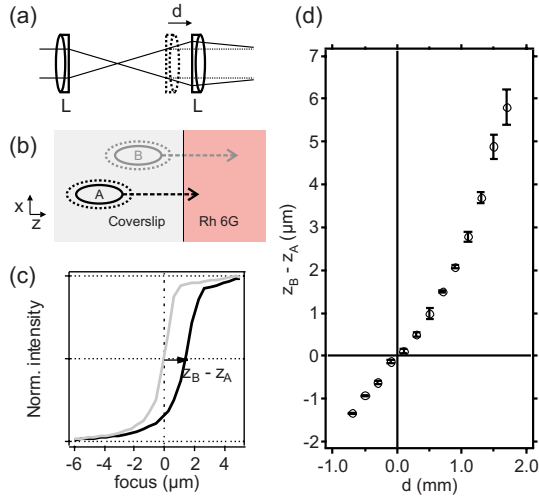


FIG. 6. (Color online) (a) Schematic of the telescope T inserted in channel A and allowing to modify the plane of focusing of spot A. The distance d is defined as the shift to the nominal distance between the two lenses. (b) Schematic view of the spots focused in different planes in the case $d > 0$ and laterally shifted. (c) Example of intensity profiles recorded by z scan. (d) Values of $z_B - z_A$ measured vs d .

can be monitored by performing a scan with the two spots through the interface between a coverslip and a fluorescent solution, as illustrated in Fig. 6(b). Note that the two spots have been laterally split apart by $5 \mu\text{m}$ in order to prevent from unwanted crosstalk. The signal recorded on both channels shows the same typical smooth step shape represented in Fig. 6(c), where the half value of maximum intensity is obtained when the center of the spot is exactly at the interface. The axial distance $z_B - z_A$ can be therefore measured as the distance between the two half maxima, with an accuracy of 100 nm . The relationship between $z_B - z_A$ and d is plotted in Fig. 6(d). It shows that an axial shift up to $6 \mu\text{m}$ can be reached with this system. The issue of the spot quality in off-plane configuration will be addressed in Sec. IV G.

E. Direct independent measurement of excitation and collection PSFs

The spatial resolution of a confocal microscope system is usually assessed by recording the image of a subwavelength-isolated fluorescent microsphere that can therefore be considered as a point source. By replacing the specimen function S in Eq. (1) by a Dirac distribution δ , the intensity recorded by channel A is indeed given by

$$I^A(r_A) = \int \delta(R) \cdot \text{PSF}_{\text{conf}}^A(r_A - R) d^3R = \text{PSF}_{\text{conf}}^A(r_A).$$

The shape of the intensity distribution is a good indicator of the overall alignment of channel A, while its spatial extents w_{xy} and w_z are directly related to the spatial resolution. A sketch of the measurement procedure, an example of recorded intensity distribution, and the corresponding cross section are represented in Fig. 7(a). In addition, during this measurement, if the collection volume of channel B is overlapping the microsphere, with laser off [see sketch of Fig. 7(b)], the intensity that is recorded by channel B while A is scanning (laser on) can be written as

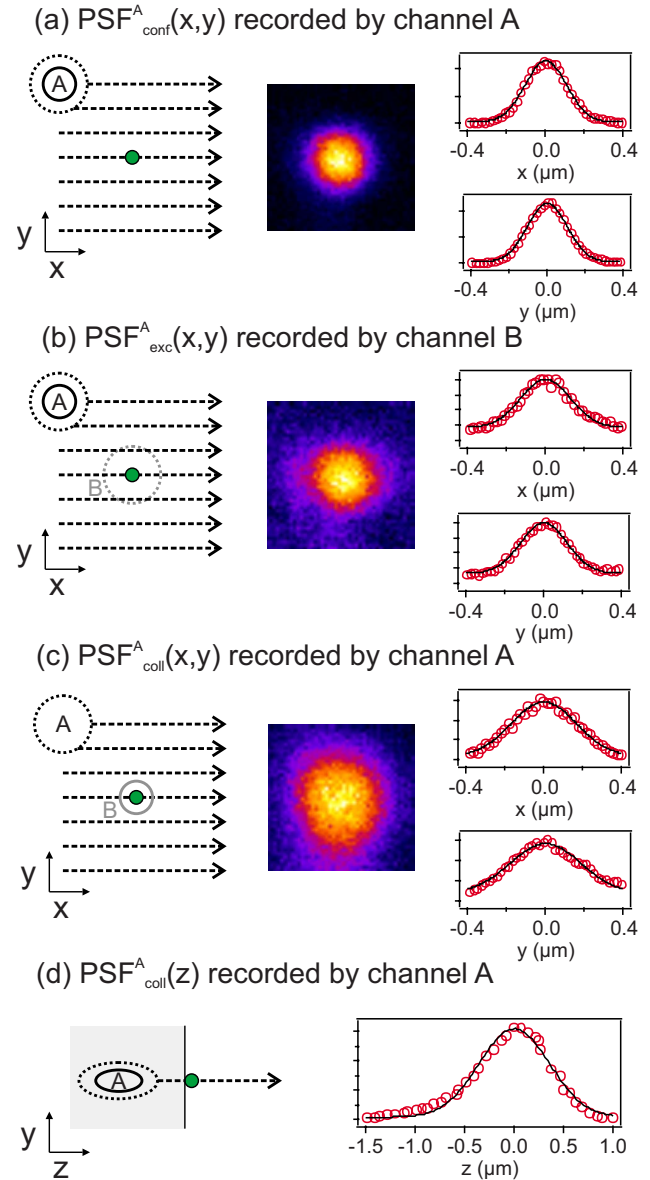


FIG. 7. (Color online) [(a)–(c)] Left: Measurement protocol, the green circle is the fluorescent microsphere. Center: recorded intensity distribution. Right: cross section (circles) and best fit (solid line) according to Eq. (2). (d) Measurement protocol for $\text{PSF}_{\text{conf}}^A(z)$ and resulting intensity distribution, with best fit.

$$\begin{aligned} I^B(r_A) &= \int \delta(R) \cdot \text{PSF}_{\text{exc}}^A(r_A - R) \cdot \text{PSF}_{\text{coll}}^B(r_0) d^3R \\ &= \text{PSF}_{\text{coll}}^B(r_0) \cdot \text{PSF}_{\text{exc}}^A(r_A) \propto \text{PSF}_{\text{exc}}^A(r_A). \end{aligned}$$

The intensity recorded by channel B is therefore proportional $\text{PSF}_{\text{exc}}^A$. Finally, if the excitation is delivered to the sphere by spot B (static, laser on), scanning with channel A [laser off, see sketch of Fig. 7(c)] will provide an intensity distribution proportional to $\text{PSF}_{\text{coll}}^A(r_A)$.

Since the measurement schemes of Figs. 7(a) and 7(b) can be performed simultaneously, only two measurements (b and c) are needed to provide independently all three PSFs involved in one channel. The characterization of the second channel will be performed in an identical way by reversing the role played by the two channels. Figure 7 summarized

TABLE I. Summary of all PSF widths measured for both channels, as defined by Eq. (1). Values are given in nm.

	Channel A			Channel B		
	w_x	w_y	w_z	w_x	w_y	w_z
PSF _{exc}	256	235	N/A	267	250	N/A
PSF _{coll}	345	392	N/A	354	351	N/A
PSF _{conf}	211	206	709	223	219	788
PSF _{conf} calculated ^a	206	202		213	204	
PSF _{conf} (FCS)	180		902	190		952

^aUsing the widths of PSF_{exc} and PSF_{coll} and the property that the product of two Gaussian distributions of widths w_1 and w_2 is Gaussian, with $w = \frac{w_1 w_2}{\sqrt{w_1^2 + w_2^2}}$.

the protocols and results obtained for channel A, intensity cross sections along x and y axes, as well as the best fit (solid line) using Eq. (2). Although this later assumption of a 3D Gaussian distribution is only an approximation in the case of confocal PSFs,¹⁸ it describes reasonably the present data, especially in the transverse direction. The corresponding widths for all PSFs for channels A and B (raw data not shown) are summarized in Table I. These values show that the two channels possess very similar features, close to the diffraction limit of the microscope objective.

These values have been compared to those obtained by FCS performed in a solution of Rhodamine 6G, as described in the experimental section. The obtained autocorrelation function for channel A is plotted in Fig. 8, as well as the best fit using Eq. (3). The corresponding values of w_{xy} for both channels have been reported in Table I. The obtained values of the spatial extend are in the same range as the ones obtained by imaging. In spite of the slight difference that could be explained by the uncertainty on the diffusion coefficient of the solution, FCS measurement remains a valid method to assess the overall size of the confocal volume. Moreover, unlike single microsphere imaging, this method can be performed in a few seconds, and can be easily automated, as it will be illustrated below.

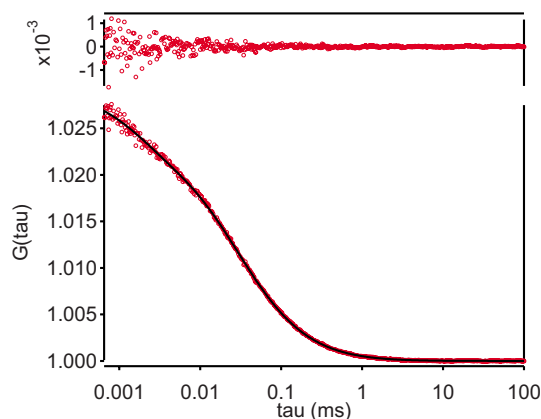


FIG. 8. (Color online) Example of FCS measurement by channel A performed in a solution of Rhodamine 6G. Autocorrelation data have been averaged over 10 measurements of duration 10 s. Data are plotted with circles, while the best fit using Eq. (3) is plotted with a solid line. The residues are plotted in the top graph. The corresponding fitting parameters are $N=42$, $w_{xy}=180$ nm, $w_z=902$ nm, $n_T=0.24$, and $\tau_T=1.6$ μ s.

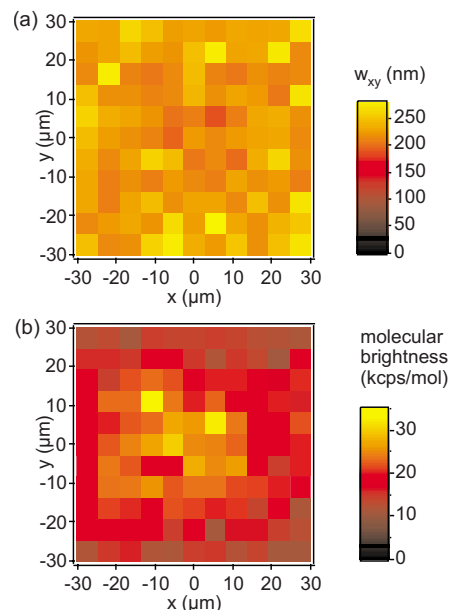


FIG. 9. (Color online) Color maps showing how the performances of the confocal system depend on the spot location within the scanning range. (a) Map of the values of the lateral width w_{xy}^A of PSF_{conf}^A. (b) Map of the molecular brightness for channel A.

F. Off-axis PSF

In order that the system performs FCS measurement at arbitrary locations, it is important that the shape and size of the confocal volume are not affected when the spot is focused out of the optical axis of the objective. The measurement of the confocal volume using FCS analysis of a solution of Rhodamine 6G reported above has been extended over a large number of discrete points within a scanning range of 60×60 μ m² around the center. Autocorrelation functions recorded at each point were fitted according to Eq. (3). The corresponding values of lateral extend w_{xy} are plotted as a color map in Fig. 9(a). They show a slight variation over the scanning range, the extreme values being found only far from the center. A more pronounced behavior was observed for the average number of molecule N (data not shown). The resulting map of molecular brightness, given by the ratio of the intensity to N , is reported in Fig. 9(b). The drop by a factor of 3 at the corners of the scanning field can be explained by the increased value of N and to a lesser extent by the degradation of the microscope objective transmission in off-axis conditions.

Measurements performed on channel B (data not shown) show a similar behavior. This confirms the ability of the system to carry out dual spot measurements at the spatial scale of a cell.

G. Off-plane PSF

The same strategy was used to characterize the confocal volume of channel A when its plane of focus is changed by acting on the variable telescope. The values of the lateral width w_{xy}^A and of the molecular brightness are plotted for different axial distances between spots in Fig. 10. Note that the measurements performed for $z_B - z_A < 0$, i. e., spot B being the closest to the microscope objective, gave rise to data

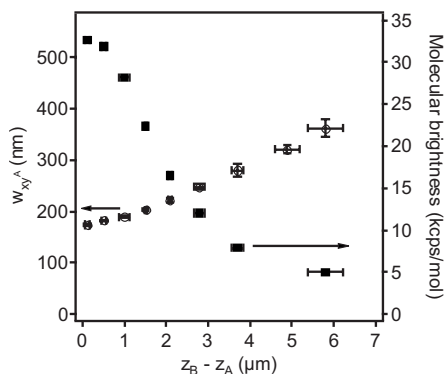


FIG. 10. Plot of dependence of lateral width w_{xy}^A (left axis) and molecular brightness (right axis) when spot A is moved axially with respect to the nominal focal plane.

that cannot be fitted properly. This was also the case to a lesser extent for $z_B - z_A > 4 \mu\text{m}$. This is probably due to a strong deformation of the spot, which makes the assumption of a three-dimensional Gaussian shape no longer valid.

V. EXAMPLES OF MEASUREMENTS

The main original feature of this system is its fully independent dual spot nature. Although the presented configuration includes photon counting and temporal correlation analysis, it can of course be extended by implementing dedicated modules, such as lifetime analysis, polarization-resolved excitation and/or collection, etc.²⁰ However, care has to be taken in order to prevent from unwanted crosstalk between channels. Indeed, as it was extensively exploited in Sec. IV, the two channels can interact in case of spatial overlap because no discrimination was possible using two channel of identical spectral features under a continuous wave excitation. In case spatial overlap cannot be avoided, an additional discrimination scheme should be implemented.

Although biophysical investigations are much beyond the scope of this instrumental article, a couple of measurements are described in this section. They have been performed on living cells and illustrate well the versatility of the setup.

A. Simultaneous imaging

Because laser scanning confocal imaging relies on a sequential acquisition scheme, high definition imaging with a high repetition rate can only be performed on a restricted observation area, eliminating therefore any possibility of control of the sample in its entire scale. Because the two scanning channels of our system are independent, two confocal acquisition can be performed simultaneously at two different locations in a sample, with identical or different magnification. As illustrated in Fig. 11, one small area on a sample can be imaged with relatively high definition and frame rate, while the other channel allow to image simultaneously the entire cell (at the same frame rate but a lower definition), enabling therefore to control the entire cell, and to monitor any drift or perturbing event.

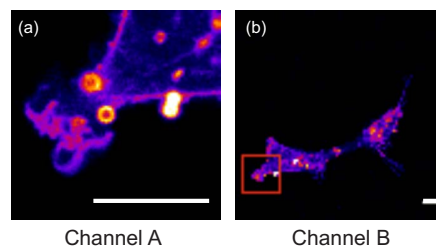


FIG. 11. (Color online) Example of simultaneous imaging. These two images have been acquired simultaneously on the COS7 (Thy1-GFP) living cell with the same frame rate, channel A (a) offering a high definition imaging of a limited area (a), while channel B provides a simultaneous low-definition overview of the sample (b). The red square on image B indicates the area scanned by channel A. Scale bars are $10 \mu\text{m}$.

B. Simultaneous imaging and FCS analysis

The issue of the overall control of the sample is even more relevant in the case of a FCS experiment. Indeed, since this later technique relies on the hypothesis of stationarity, any perturbation such as mechanical drift, or passage of unwanted aggregates, may disturb the acquisition and produce erroneous measurements. Figure 12 is an example of measurement performed on a living cell. First, an image of the cell is recorded [Fig. 12(a)]. Then, channel A is dedicated to a static FCS measurement [Fig. 12(b)], while channel B performs simultaneously a continuous image acquisition on an area slightly apart [Fig. 12(c)]. Therefore, FCS data are supported by the additional information of the image sequence that can help to select measurements that are in good agreement with the FCS hypotheses.

C. Dual spot scanning FCS

Finally, a measurement protocol involving on a genuine dual spot analysis is presented in Fig. 13. As illustrated in the inset of Fig. 13(a), the two measurement volumes are scanned in a periodic fashion with the same angular velocity on the same circular orbit located on the cell membrane, spot A following B with a delay of a quarter of an orbit. An orbit radius of $0.5 \mu\text{m}$ was chosen, as well as a rotation frequency of 1 kHz. The four temporal correlations (G_{AA} , G_{BB} , G_{AB} , and G_{BA}) are plotted in Figs. 13(b) and 13(c).

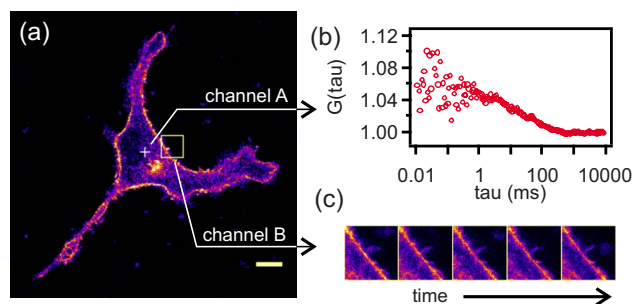


FIG. 12. (Color online) (a) Overview of the COS7 (Thy1-GFP) cell recorded by confocal imaging. Scale bar is $10 \mu\text{m}$. The FCS measurement was then performed by channel A at the location indicated by a cross, while a sequence of control images was recorded by channel B at the location indicated by a square. (b) Autocorrelation curve recorded by channel A. (c) Extract of the sequence of images recorded by channel B.

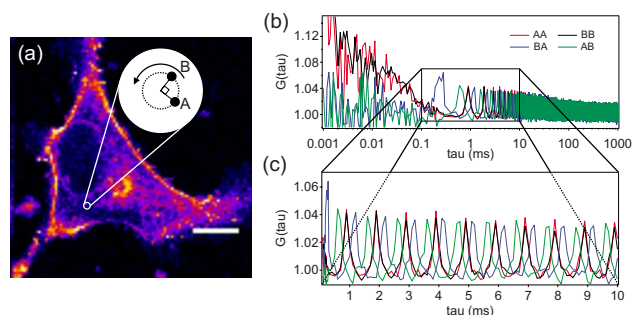


FIG. 13. (Color online) (a) Overview of the COS7 (Thy1-GFP) cell under study. Scale bar is 10 μm . The scanning orbit is indicated by a circle. (b) Correlation data. Correlation $G_{AB} = \frac{\langle I_A(t)I_B(t+\tau) \rangle}{\langle I_A \rangle^{1/2} \langle I_B \rangle^{1/2}}$ is denoted as AB, and so on. Note that correlation values for $\tau < 0.3$ ms are given by the hardware correlator, while the ones for larger delays have been software computed offline. (c) Same as (b) but plotted within a restricted range in a linear time scale.

As it has been detailed in the literature,¹¹ the temporal correlations measured in sFCS present, in addition to the usual decay due to translational diffusion, a modulation with a period given by the scanning frequency, i. e., 1 ms in the present case. The peaks of correlation are obtained for delays that bring to correspondence photon counts acquired at the same point of the orbit. For the two autocorrelations G_{AA} and G_{BB} , this happens for $\tau = 1, 2, 3$ ms, and so on, as it is clearly visible in Fig. 13(c). Because spot A is following spot B, the first peak of G_{BA} corresponds to a quarter of an orbit, i. e., is obtained at $\tau = 0.25$ ms, the following peaks occurring at $\tau = 1.25, 2.25$ ms, etc. Finally, peaks for correlation G_{AB} are measured at $\tau = 0.75, 1.75$ ms, etc.

Obtaining sFCS data for short delays is a challenging issue in a single spot geometry because the shortest delay is directly given by the fastest scanning period, which is usually limited by mechanical response of the scanning system.¹³ Without modifying the scanning features, the dual spot scheme that we propose allows to address correlation delays that are significantly shorter. Therefore we believe that this approach can provide more accurate measurements. In the present example, although the scanning period is limited to 1 ms, sFCS cross correlation data have been obtained for delays down to 0.25 ms. Given a scanning period, the limitation for the short delays is now constituted by the crosstalk between the two channels. The full potential of dual spot scanning FCS will be addressed in a dedicated article.

VI. CONCLUSION

A versatile dual spot FCS system has been presented. A complete calibration protocol has been detailed, which allow to control accurately the location, size, and shape of the two measurement volumes. A method for separating the contribution of excitation and collection volume has been proposed. The spot quality appeared to be compatible with FCS measurements in a wide transverse area, and in a few microns apart the nominal focus plane. The versatility of the setup was illustrated by measurements carried out on living cells using two spots in scanning and/or static measurement modes.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was funded by the French Agence Nationale de la Recherche under Contract No. ANR-05-BLAN-0337-02 and by Région Provence Alpes Côte d'Azur. The authors are grateful to Emmanuel Schaub for his advice for setting up the scanning system.

- ¹W. W. Webb, *Appl. Opt.* **40**, 3969 (2001).
- ²P. Schille, *Cell Biochem. Biophys.* **34**, 383 (2001).
- ³C. Eggeling, J. Widengren, R. Rigler, and C. A. M. Seidel, *Anal. Chem.* **70**, 2651 (1998).
- ⁴M. Brinkmeier, K. Dorre, J. Stephan, and M. Eigen, *Anal. Chem.* **71**, 609 (1999).
- ⁵T. Dertinger, V. Pacheco, I. von der Hocht, R. Hartmann, I. Gregor, and J. Enderlein, *ChemPhysChem* **8**, 433 (2007).
- ⁶R. Jaffiol, Y. Blancaquart, A. Delon, and J. Derouard, *Appl. Opt.* **45**, 1225 (2006).
- ⁷M. Burkhardt and P. Schille, *Opt. Express* **14**, 5013 (2006).
- ⁸L. Wawrezinieck, H. Rigneault, D. Marguet, and P. F. Lenne, *Biophys. J.* **89**, 4029 (2005).
- ⁹P. F. Lenne, L. Wawrezinieck, F. Conchonaud, O. Wurtz, A. Boned, X. J. Guo, H. Rigneault, H. T. He, and D. Marguet, *EMBO J.* **25**, 3245 (2006).
- ¹⁰M. Weissman, H. Schindler, and G. Feher, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2776 (1976).
- ¹¹K. M. Berland, P. T. C. So, Y. Chen, W. W. Mantulin, and E. Gratton, *Biophys. J.* **71**, 410 (1996).
- ¹²Z. Petrášek and P. Schille, *Biophys. J.* **94**, 1437 (2008).
- ¹³Z. Petrášek, C. Hoegge, A. Mashaghi, T. Ohrt, A. Hyman, and P. Schille, *Biophys. J.* **95**, 5476 (2008).
- ¹⁴M. A. Digman, C. M. Brown, P. Sengupta, P. W. Wiseman, A. R. Horwitz, and E. Gratton, *Biophys. J.* **89**, 1317 (2005).
- ¹⁵D. L. Kolin and P. W. Wiseman, *Cell Biochem. Biophys.* **49**, 141 (2007).
- ¹⁶D. Magde, E. L. Elson, and W. W. Webb, *Biopolymers* **13**, 29 (1974).
- ¹⁷J. E. N. Jonkman and E. H. K. Stelzer, *Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications and Advances*, edited by A. Diaspro (Wiley-Liss, New York, 2002), Chap. 5, p. 101.
- ¹⁸R. Rigler, U. Mets, J. Widengren, and P. Kask, *Eur. Biophys. J.* **22**, 169 (1993).
- ¹⁹J. Widengren, R. Rigler, and U. Mets, *J. Fluoresc.* **4**, 255 (1994).
- ²⁰P. Ferrand, J. Wenger, A. Devilez, M. Pianta, B. Stout, N. Bonod, E. Popov, and H. Rigneault, *Opt. Express* **16**, 6930 (2008).

Isotropic single-objective microscopy: theory and experiment

Eric Le Moal, Emeric Mudry, Patrick C. Chaumet, Patrick Ferrand, and Anne Sentenac*

*Institut Fresnel, CNRS, Aix-Marseille Université, Ecole Centrale Marseille,
Campus de St Jérôme, 13013 Marseille, France*

**Corresponding author: anne.sentenac@fresnel.fr*

Received March 25, 2011; revised May 31, 2011; accepted June 1, 2011;
posted June 10, 2011 (Doc. ID 144816); published July 11, 2011

Isotropic single-objective (ISO) microscopy is a recently proposed imaging technique that can theoretically exhibit the same axial and transverse resolutions as 4Pi microscopy while using a classical single-objective confocal microscope. This achievement is obtained by placing the sample on a mirror and shaping the illumination beam so that the interference of the incident and mirror-reflected fields yields a quasi-spherical spot. In this work, we model the image formation in the ISO fluorescence microscope and simulate its point spread function. Then, we describe the experimental implementation and discuss its practical difficulties. © 2011 Optical Society of America

OCIS codes: 180.1790, 180.2520, 180.6900.

1. INTRODUCTION

Sharp focusing of light beams is the keystone of numerous applications in crucial technological fields, including far-field optical microscopy [1], optical writing and reading for high-density data storage [2,3], and trapping and manipulation of nanoparticles [4–6]. Objective lenses of high numerical aperture with high-order aberration corrections have been developed to reduce the dimensions of the focal spot down to the diffraction limit. Still, optical focusing systems based on a single-lens geometry cannot focus light into ideally spherical volumes because the illumination comes only from one side of the focal point. As a result, the focal spot is elongated along the lens optical axis, with an axial dimension about threefold larger than the transverse ones, at best. Such a pronounced anisotropy constitutes a serious drawback for any three-dimensional (3D) application in the above-mentioned fields of technology. This fundamental issue has motivated the study of many different approaches, among which are, notably, the use of pupil filters to control the amplitude and/or the phase distribution of the input field [7–11] and (or together with) the use of peculiar polarization modes [12–14]. These approaches allow engineering, to a certain extent, the spatial field distribution at the focus; however, they bring about only modest improvement concerning the axial dimension of the focal spot [15].

In the specific field of 3D fluorescence imaging in biology, the resolution issue has been addressed through sophisticated approaches relying on nonlinear excitation processes and optical focusing systems based on a multiple-lens geometry [16,17]. In 4Pi microscopy, the sample is sandwiched between two opposing lenses having the same optical axes and front focal planes. Focusing light through both lenses in a coherent way yields an interference pattern that exhibits a quasi-spherical intensity peak surrounded by some sidelobes [18–20]. The 4Pi focusing (and detection) scheme has brought about a spectacular improvement in the axial resolution of 3D

fluorescence imaging [21–23] but it requires a careful alignment of the lenses and turns out to be quite sensitive to mechanical drifts.

Inspired by a work on mirror-assisted optical diffraction tomography with isotropic resolution [24], we recently demonstrated the principle of an isotropic single-objective (ISO) focusing scheme in which light can be focused into a quasi-spherical spot thanks to one microscope objective lens, a mirror, and a specially shaped incident beam [25]. In a simplified view, the ISO focusing setup is equivalent to the 4Pi setup in which the role of the second lens is played by the image of the first one in a mirror.

In this paper, we detail the concept of ISO microscopy and describe the numerical technique that permits us to simulate with the least approximations possible the point spread function (PSF) of a realistic ISO fluorescence microscope. Then, we show how an ISO fluorescence microscope can be built out of a conventional confocal microscope and display experimental PSFs. We point out the main features that can hamper the performances of the microscope and give some hints to overcome them.

2. PRINCIPLES OF ISO FOCUSING AND SIMULATIONS

The principles of ISO focusing were described in [25]. Here we recall its main idea for completeness and detail the simulation technique.

A. Time-Reversal Focusing Theory

To focus light into a spherical spot, the illumination should ideally reach the focal point from every possible direction. To approach this spherical illumination with a single-objective lens, we place a mirror near the focal plane and engineer the incident wavefront so that part of the incident and mirror-reflected fields converge toward the focal point.

Hereafter, the sample space (after the objective lens) is described by a Cartesian set of coordinates (x, y, z) with the origin placed at the focal point of the lens and the z axis corresponding to its optical axis. In this part, for simplicity, the mirror plane is set at the $z = 0$ plane, which corresponds to the focal plane. To describe the incident beam, it is convenient to introduce the polar and azimuthal angles (θ, ϕ) associated to the unit vectors $\mathbf{u}$ defined by $\mathbf{u} = \cos\theta\hat{z} + \sin\theta\cos\phi\hat{x} + \sin\theta\sin\phi\hat{y}$, $\mathbf{u}_\phi = \hat{z} \times \mathbf{u}$, and $\mathbf{u}_\theta = \mathbf{u} \times \mathbf{u}_\phi$. The incident field on the mirror is cast as a sum of monochromatic plane waves [see Fig. 1(a)], propagating in the $\mathbf{u}$ direction with complex amplitude vector $\mathbf{e}(\mathbf{u})$:

$$\mathbf{E}_{\text{inc}}(\mathbf{r}) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\theta_{\text{max}}}^{\theta_{\text{max}}} d\theta \sin\theta \mathbf{e}_i(\mathbf{u}) \exp(ik_0\mathbf{u} \cdot \mathbf{r}), \quad (1)$$

where $k_0 = 2\pi/\lambda$ is the wavenumber in the sample space and θ_{max} is the maximum angle that can be reached in the sample space with the chosen numerical aperture of the objective. Because of the transverse nature of the plane waves, $\mathbf{e}_i(\mathbf{u})$ can be decomposed on the $(\mathbf{u}_\theta, \mathbf{u}_\phi)$ basis. Assuming the mirror to be perfectly conducting, the reflected beam reads

$$\mathbf{E}_{\text{refl}}(\mathbf{r}) = \int_0^{2\pi} d\phi \int_{-\theta_{\text{max}}}^{\theta_{\text{max}}} d\theta \sin\theta \mathbf{e}_r(\mathbf{u}) e^{ik_0[\mathbf{u} - 2(\mathbf{u} \cdot \hat{z})\hat{z}] \cdot \mathbf{r}}, \quad (2)$$

where $\mathbf{e}_r(\mathbf{u}) = -\mathbf{e}_i(\mathbf{u}) + 2[\mathbf{e}_i(\mathbf{u}) \cdot \hat{z}]\hat{z}$ and $\cdot$ stands for the scalar product.

The shaping of the incident beam is performed following the time-reversal focusing theory depicted in [26] and illustrated in Fig. 1. To focus light at the point $\mathbf{r}_0 = z_0\hat{z}$, $\mathbf{e}_i(\mathbf{u})$ should ideally be equal to the complex conjugate of $\mathbf{e}_p(-\mathbf{u})$, the complex amplitude vector of the plane wave emitted in the $-\mathbf{u}$ direction by a dipole source $\mathbf{p}$ placed at $\mathbf{r}_0$. The radiation of the dipole in front of the mirror is equivalent to that of two dipoles in free space, symmetrically positioned with respect to the mirror plane at z_0 and $-z_0$, with the same z component and opposite (x, y) components. As a result, one finds for $\mathbf{p}$ parallel to the mirror

$$\mathbf{e}_i^{\text{ideal}}(\mathbf{u}) \propto \sin(z_0 k_0 \cos\theta) [\mathbf{p} - (\mathbf{p} \cdot \mathbf{u})\mathbf{u}], \quad (3)$$

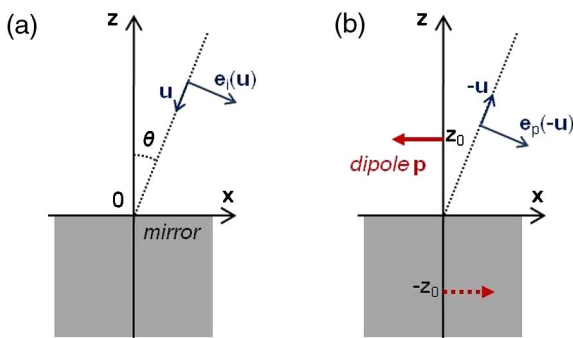


Fig. 1. (Color online) Illustration of the ISO focusing concept, based on the time-reversal theory. (a) The incident field is made of a sum of plane waves propagating along $\mathbf{u}$ with complex vector amplitude $\mathbf{e}_i(\mathbf{u})$. (b) The field radiated by a dipole placed at $z_0\hat{z}$ before the mirror can be decomposed as a sum of plane waves propagating along $-\mathbf{u}$ with complex vector amplitude $\mathbf{e}_p(-\mathbf{u})$. To focus at point $z_0\hat{z}$, the time-reversal focusing theory states that $\mathbf{e}_i(\mathbf{u})$ should ideally be equal to the conjugate of $\mathbf{e}_p(-\mathbf{u})$.

and the same expression with $\sin(z_0 k_0 \cos\theta)$ replaced by $\cos(z_0 k_0 \cos\theta)$ for a dipole normal to the mirror. Note that the incident beam $\mathbf{E}_{\text{inc}}$ defined by Eq. (1) with $\mathbf{e}_i$ given by Eq. (3) focuses at two points along the optical axis, at z_0 and $-z_0$. The shape of the two spots is elongated along the optical axis in the same way as that of the standard spot obtained by focusing a plane wave through one objective lens. The quasi-isotropic spot is obtained through the interference between the incident and the mirror-reflected beams.

More precisely, if $\theta_{\text{max}} = \pi/2$, the time-reversal theory states that the total field, $\mathbf{E}_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0) = \mathbf{E}_{\text{inc}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0) + \mathbf{E}_{\text{refl}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$ with $\mathbf{e}_i$ satisfying Eq. (3), is proportional to the imaginary part of the electric field radiated by the dipole placed at $\mathbf{r}_0$ before the mirror [26]. Now, because of the rapid decay of the reflected field (namely the field emitted by the image dipole), the field radiated by the dipole before the mirror is quite similar to the field radiated by the same dipole in free space. Its intensity distribution has a quasi-spherical shape with radius at half-maximum about $\lambda/2$. Hence, the time-reversal beam shaping appears as a very efficient way of obtaining an isotropic light spot that can be moved with respect to the mirror, without distortion, just by changing z_0 in Eq. (3).

B. Simulation of the PSF of the ISO Microscope

Considering a realistic objective lens, θ_{max} is inevitably smaller than $\pi/2$. Moreover, it is generally difficult to shape simultaneously the phase, amplitude, and polarization of the incident waves to obtain a field satisfying Eq. (3). Hence, to investigate the achievable performances of the ISO focusing and imaging concept, we have performed simulations of the illumination and global PSF of the ISO microscope accounting for these constraints.

In our experimental configuration, a spatial light modulator (SLM) that only modifies the phase of the field is placed at (or conjugated to) the rear focal plane of a microscope objective lens. The first difficulty is to relate the field leaving the SLM plane to the plane waves that illuminate the mirror.

To indicate points and vectors in the (x, y) SLM plane, we introduce the cylindrical set of coordinates (ρ, ψ) associated to the local basis $(\mathbf{u}_\rho = \cos\psi\hat{x} + \sin\psi\hat{y}, \mathbf{u}_\psi = -\sin\psi\hat{x} + \cos\psi\hat{y})$. Under Abbe's sine condition, a point (ρ, ψ) of the rear focal plane (where the SLM is placed) corresponds to a plane wave propagating in the sample space along the $\mathbf{u}$ direction defined by the polar and azimuthal angles (θ, ϕ) that satisfy ϕ equal to ψ and

$$\sin\theta = (\sin\theta_{\text{max}})\rho/R, \quad (4)$$

where R is the radius of the aperture at the rear side of the objective lens. More precisely, provided that we can neglect the various reflections on the optical components, the electric field $\mathbf{E}(\rho, \psi)$ collinear to $[\mathbf{u}_\psi, \mathbf{u}_\rho]$ leaving the SLM plane at point (ρ, ψ) is transformed into a plane wave propagating along $\mathbf{u}$ that is polarized along $\mathbf{u}_\psi[-\mathbf{u}_\theta]$ with a damped modulus $E(\rho, \psi)\sqrt{\cos\theta}$, where $\sqrt{\cos\theta}$ is the so-called aplanatic factor. Hence, the complex amplitude vectors of the incident plane waves in the sample space that are generated by any field $\mathbf{E}(\rho, \psi)$ leaving the SLM read

$$\mathbf{e}_i(\mathbf{u}) = \sqrt{\cos\theta} \{ [\mathbf{E}(\rho, \psi) \cdot \mathbf{u}_\phi] \mathbf{u}_\psi - [\mathbf{E}(\rho, \psi) \cdot \mathbf{u}_\rho] \mathbf{u}_\theta \}. \quad (5)$$

Equation (5) gives the field in an aberration-free system satisfying the sine condition. Other apodization factors could be used (to account, for example, for the Fresnel transmission coefficients of the lens), but they were shown to have a limited impact on the size of the PSF [27]. The field leaving the SLM, $\mathbf{E}(\rho, \psi)$, can be written as $\mathbf{E}(\rho, \psi) = \mathbf{E}_0(\rho, \psi) \exp[i f(\rho, \psi)]$, where $\mathbf{E}_0(\rho, \psi)$ is the incident field on the SLM and $f(\rho, \psi)$ is the phase modulation applied by the SLM. In our setup, the SLM is illuminated by a collimated beam that is linearly polarized along the x axis, which corresponds to the working axis of the SLM. Hence, $\mathbf{E}_0$ is a constant. The pattern displayed on the SLM is given by the phase of Eq. (3):

$$f(\rho, \psi) = \frac{\pi}{2} \text{sign}[\sin(z_0 k_0 \cos \theta)], \quad (6)$$

where θ is related to ρ through Eq. (4). Introducing Eq. (6) into Eq. (5) and comparing the latter to Eq. (3) with $\mathbf{p} = \hat{\mathbf{x}}$, one observes that the phase of $\mathbf{e}_i$ coincides with that obtained for $\mathbf{e}_i^{\text{ideal}}$. On the other hand, the modulus and polarization differ, especially for large θ and for propagation directions outside the (x, z) or (y, z) planes, but the consequences on the focusing are negligible [28].

Once the complex vector amplitudes of the plane waves forming the incident beam are well defined, we calculate the reflected beam with Eq. (2). The total field $\mathbf{E}_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0) = \mathbf{E}_{\text{inc}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0) + \mathbf{E}_{\text{refl}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$ depends on the chosen focal point $\mathbf{r}_0$ via the phase pattern displayed on the SLM, Eq. (6). Yet we have checked numerically that, except when $\mathbf{r}_0$ is close to the mirror (typically for distances smaller than half the wavelength), the spot shape does not vary when $\mathbf{r}_0$ is changed. In other words, the illumination PSF, $\text{PSF}_{\text{ill}}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \propto |\mathbf{E}_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)|^2$ can be assumed to be homogeneous within the sample space.

Now, to perform a complete modeling of the experiment, one needs to simulate the image of a pointlike fluorescent source placed at $\mathbf{r}$ in the sample space. In our setup, we use a confocal detection scheme. The fluorescence light is modified by the SLM and polarized along the x axis in the same way as the incident light before being sent, through a pinhole, onto a detector. We assume that the intensity recorded by the detector is proportional to $\int_S d\mathbf{v} |\mathbf{E}(\mathbf{v}) \cdot \hat{\mathbf{x}}|^2$, where S is the pinhole transmission area and $\mathbf{E}(\mathbf{v})$ is the field radiated at point $\mathbf{v}$ by the fluorescent dipole $\mathbf{p}_{\text{fluor}}$ placed at $\mathbf{r}$ in the sample space for a given focal point $\mathbf{r}_0$ set on the SLM.

The calculation of $\mathbf{E}(\mathbf{v}) \cdot \hat{\mathbf{x}}$ is easily done by invoking the reciprocity theorem [29]. We consider a virtual monochromatic dipole $\mathbf{p}_{\text{virtual}}$, oriented along the x axis, placed at the center of the pinhole and radiating at the same wavelength as the fluorescent dipole, λ' , which is slightly different from the wavelength of the illumination λ . It generates a plane wave normal to the SLM plane and creates, in the sample space, the field $\mathbf{E}'_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$. If $\mathbf{p}_{\text{virtual}}$ is shifted by $\mathbf{v}$ in the pinhole plane, it creates the field $\mathbf{E}'_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0 + \mathbf{v})$ in the sample space (for simplicity, we overlook the magnification factors between the pinhole and the sample space). The reciprocity theorem states that $\mathbf{E}(\mathbf{v}) \cdot \mathbf{p}_{\text{virtual}} = \mathbf{p}_{\text{fluor}} \cdot \mathbf{E}'_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0 + \mathbf{v})$. Now, the fluorescent dipole amplitude is proportional to the field at point $\mathbf{r}$ created by the incident laser field $\mathbf{E}_{\text{tot}}^{\lambda}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$. Finally, the intensity recorded by the detector can be written as

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0) \propto \text{PSF}_{\text{ill}}^{\lambda}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \text{PSF}_{\text{det}}^{\lambda'}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0), \quad (7)$$

where $\text{PSF}_{\text{det}}^{\lambda'}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) = \int_S d\mathbf{v} \text{PSF}_{\text{ill}}^{\lambda'}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0 - \mathbf{v})$. We note that $I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$ depends solely on $\mathbf{r} - \mathbf{r}_0$. We then introduce the global PSF of the microscope, $\text{PSF}(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \propto I(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)$, which, in the ideal case of a point detector and a perfectly coherent fluorescent source emitting at the same wavelength as the excitation light, is equal to $\text{PSF}_{\text{ill}}^2$. This ideal configuration is equivalent to a 4Pi microscope of type C with a point detector [30]. Unfortunately, the fluorophore emits at a longer wavelength than the excitation wavelength and, more important, the coherence length of the emitted light is about $3 \mu\text{m}$, which is generally smaller than the distance between the fluorescent source and the mirror. As a result, the fluorescent light directly emitted toward the objective lens does not interfere with the emitted light that is reflected by the mirror before being collected. In this case, $|\mathbf{E}'_{\text{tot}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)|^2 = |\mathbf{E}'_{\text{inc}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)|^2 + |\mathbf{E}'_{\text{refl}}(\mathbf{r}, \mathbf{r}_0)|^2$ and the detection PSF is very similar to that of a conventional confocal microscope. This configuration corresponds to a 4Pi A-type microscope [30]. Note that, by placing a filter (with typically a 10 nm bandpass) in front of the pinhole, one could increase the coherence length of the fluorescence light so that the direct and reflected beams interfere. In this case, the detection PSF would be similar to the illumination PSF and the configuration would correspond to a 4pi-C microscope.

Figure 2 shows the global PSF of the ISO microscope, calculated for a quasi-ideal objective with $\sin \theta_{\text{max}} = 0.99$ and a more realistic one with $\sin \theta_{\text{max}} = 0.80$. In these calculations, we use the parameters of the experimental setup: wavelength $\lambda = 491 \text{ nm}$ and pinhole diameter in the focal plane 1.22λ . Light is focused in vacuum and the objective lens is assumed to be ideally unaberrated. The validity of our numerical technique was checked by comparing its results for a standard confocal microscope to the semianalytical expressions given in [31]. The SLM is modeled as a 1000×1000 pixel array, with a constant phase value on each pixel. To account for possible errors stemming from the SLM pixelization, the propagation directions of the plane waves forming the incident beam are not discretized in the Cartesian SLM basis but in the spherical basis (θ, ϕ) , 500 in θ and 180 in ϕ . The SLM pattern is tuned to focus light at $z_0 = 20\lambda$ from the mirror and the incident polarization is collinear to the x axis. The fact that the emission

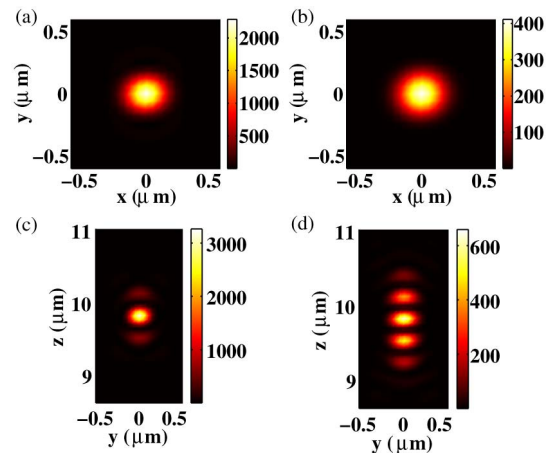


Fig. 2. (Color online) Global PSF of an ISO microscope, simulated for two different objectives in air: (a) and (c) ideal objective with $\text{NA} = \sin \theta_{\text{max}} = 0.99$; (b) and (d) realistic objective, $\text{NA} = \sin \theta_{\text{max}} = 0.80$. These images correspond to slices taken in the (a), (b) transverse and (c), (d) axial planes.

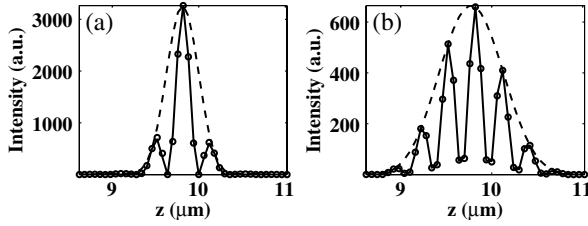


Fig. 3. Axial profiles taken from the PSF of an ISO microscope (solid curve) and a conventional confocal microscope (dashed curve), simulated for different NA in vacuum. (a) $NA = 0.99$. (b) $NA = 0.80$. For comparison purposes, the PSF of the conventional confocal microscope has been plotted after modulation by $\cos^2[\beta k_0(z - z_0)]$ (circles). The observed dissymmetry stems from the phase mask discretization induced by the SLM.

wavelength differs from the excitation one is not taken into account for these simulations.

The global PSF obtained for $NA = 0.99$ is quasi-isotropic with diameter of about $\lambda/3$. For $NA = 0.8$, the central peak of the PSF is also quasi-isotropic, but it is plagued by sidelobes of higher relative intensity (60% to 80% of the main lobe) than that observed for $NA = 0.99$ (about 20%).

Remarkably, we observe that, along the optical axis, the global PSF_{tot} of the ISO microscope is perfectly fitted by the global PSF_{tot} of the conventional confocal microscope (with same numerical aperture) times $\cos^2[\beta k_0(z - z_0)]$. The parameter β depends on the numerical aperture of the objective (0.70 for $NA = 0.99$ and 1.02 for $NA = 0.80$); see Fig. 3. This behavior is easily understood if one approximates the ISO spot by the interference of two counterpropagative Gaussian beams with superimposed waists. The parameter β indicates that, along the optical axis, the phase of the field forming the beams does not vary along z as $k_0 z$. Indeed, there exists a phase delay, known as the Gouy phase (which depends on the beam waist and thus on the numerical aperture of the objective), that modifies the period of the interference pattern. This property gives an interesting self-consistent way to verify that the ISO microscope is correctly tuned as it relates the ISO

PSF to the standard confocal one obtained with the same objective. In the following, we will use this approach rather than a direct comparison between theory and experiment to assess the accuracy of our mounting. Indeed, we noticed that comparing theoretical results to experimental ones was particularly difficult as the claimed numerical aperture and apodization functions of the objective were not those observed experimentally [32].

C. Discussion of the Phase Pattern

In the absence of the mirror, the incident beam described in Eqs. (1) and (3) focuses at two points, located at z_0 and $-z_0$ along the optical axis. Therefore, an alternative approach to time-reversal focusing could consist in splitting the SLM in two and displaying two Fresnel lenses focusing at different points. The phase pattern of each Fresnel lens is then $f(\rho, \psi) = k_0 z_0 \cos \theta$ for the first one and $f(\rho, \psi) = -k_0 z_0 \cos \theta - \pi$ for the second one. The $-\pi$ added to this second formula is necessary to obtain the correct phase match between these two focuses. The advantage of the Fresnel lens mask is that it can generate spots that are as close to each other as possible, whereas the time-reversal mask becomes very approximate when z_0 decreases below a given value. In fact, as z_0 tends to 0, the number of sign changes in the function $\sin(z_0 k_0 n \cos \theta)$ tends to 0, too, and therefore the phase modulation becomes increasingly less efficient to substitute for an ideal amplitude modulation in the time-reversal approach. The disadvantage of the Fresnel lens mask is that it requires splitting the SLM in two areas so that only part of the $\mathbf{u}$ directions focus at z_0 ($-z_0$). In Fig. 4, we give an example of the phase masks that are displayed on the SLM following the time-reversal technique or the Fresnel lens approach with different templates for splitting the SLM. All three masks shown in Fig. 4 were designed for focusing light at $z_0 = 1 \mu\text{m}$ (with $\lambda = 491 \text{ nm}$). The simulations of the global PSF obtained with these different masks were very similar (not shown).

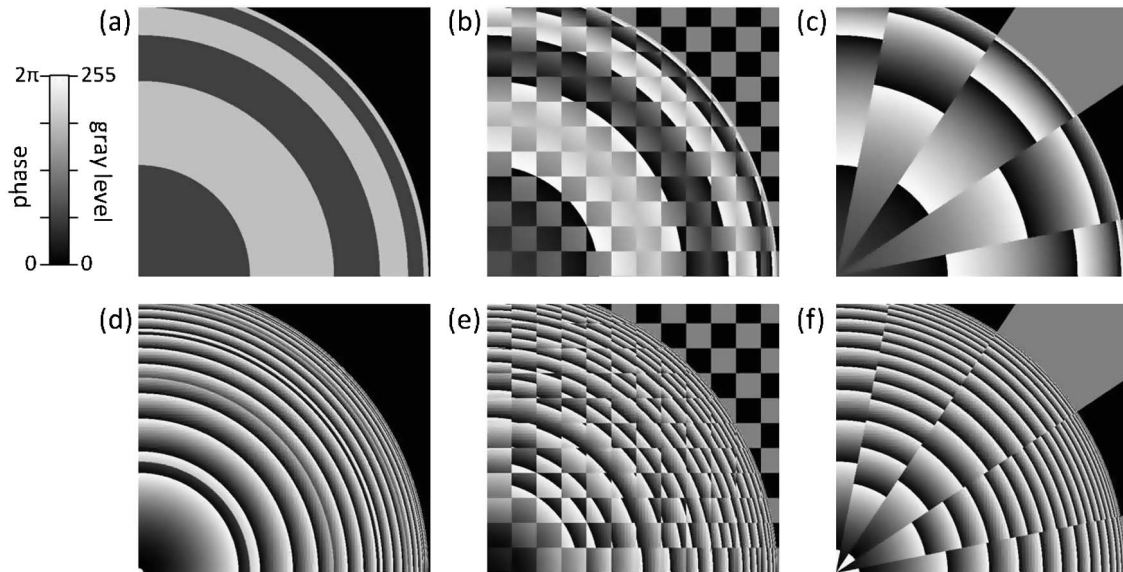


Fig. 4. Examples of phase masks for ISO focusing. For symmetry reasons, only the top right quarter of the masks are shown (bottom left corner is the center of symmetry). Mask designs are based on (a) and (d) the principle of time-reversal focusing and (b), (c), (e), and (f) combinations of Fresnel phase plates following (b), (e) a checkerboard of 50×50 pixel squares and (c), (f) a pie chart of 16 slices. These masks were generated for two different configurations in which the mirror is placed (a)–(c) in the genuine focal plane of the objective lens and (d)–(f) at $d = 6 \mu\text{m}$ above it. In the latter case, the term $k_0 d \cos \theta$ has been added to all the phase patterns given in the text.

We now turn to the experimental measurement of the global PSF of the ISO microscope. In our experimental setup, we have used both the time-reversal and Fresnel lens techniques for engineering the incident beam.

3. EXPERIMENTAL RESULTS

A. Description of the Setup

The experimental configuration of the microscope exhibits the same features as those presented in Section 2. Basically, the ISO microscope consists of a conventional home-built confocal microscope that has been modified to allow the wavefront shaping of the incident and detected light; see Fig. 5. More precisely, a phase-only SLM (Pluto-VIS, Holoeye) functioning in reflection was introduced between a dichroic mirror (z488/633, Chroma) and a water-immersion objective lens (Plan Apo VC 60 $\times$, NA = 1.2, Nikon). The SLM plane was optically conjugated to the rear focal plane of the lens using a telescope. Hence, each pixel of the SLM corresponded to one direction in the observation region as assumed in Section 2. Excitation was supplied by a continuous wave 491 nm laser. The fluorescence light collected in epigeometry was “descanned” by the SLM in order to keep the optical conjugation between the pinhole and the probed region. It was spectrally filtered (FF01-525/39-25, Semrock, center wavelength 525 nm, bandwidth 39 nm at 90% transmittance or 45 nm at 50% transmittance, corresponding to a coherence length of about 3 μ m in vacuum) and spatially filtered with a 30 μ m pinhole (i.e., 1 Airy diameter) placed in front of a photon counter (PD1C0C, Micro Photon Devices). Both excitation and fluorescence lights were horizontally polarized (along the x axis) so as to be parallel to the working axis of the SLM. Typical excitation power and acquisition dwell time were 10 μ W and 1 ms/pixel, respectively.

The sample consisted in a suspension of isolated 100 nm spheres (FluoSpheres yellow/green, Invitrogen) in a 1 wt. %

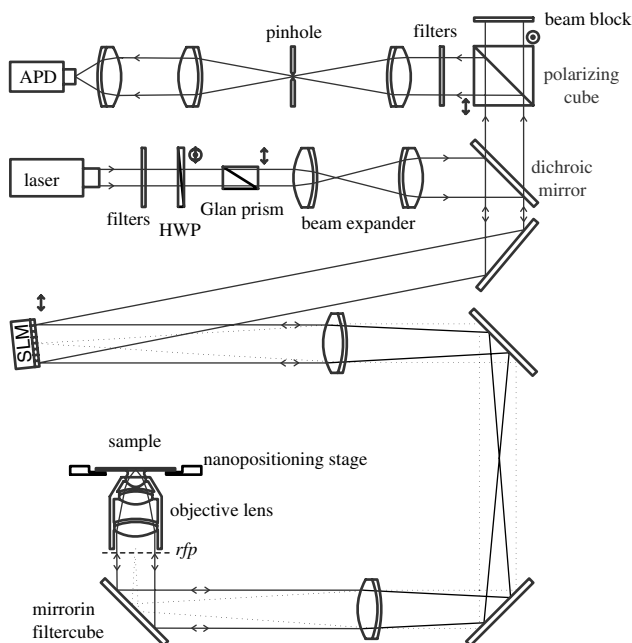


Fig. 5. Schematic of the microscope setup. APD, avalanche photodiode; HWP, half-wave plate; SLM, phase-only spatial light modulator; rfp, rear focal plane. Lenses are achromatic doublets. See details in text.

agarose gel film (typical thickness of 5 to 10 μ m) and was sandwiched between an Ag coated mirror and a conventional 150 μ m coverslip. The mirror was placed a few micrometers away from the focal plane of the microscope objective lens on a nanopositioning stage (NanoLP100, Mad City Labs). In our configuration, axial scanning was performed by changing the SLM pattern, while transverse scanning was done by translating the mirror in the (x, y) plane with the stage.

B. Global PSF of the ISO Microscope

To estimate the global PSF of the ISO microscope, we measured 3D images of isolated beads in the sample and assumed that the latter were small enough to be considered pointlike sources. Although a more precise assessment of the PSF would require 3D deconvolution of the image by the bead volume, we found by numerical simulations that the actual bead size (100 nm) only slightly affects the fringe contrast. Different patterns were displayed on the SLM to engineer the wavefront. The best results were obtained for the time-reversal mask [see Fig. 6(a)] and the Fresnel mask with a 16 slice pie-chart template [see Fig. 6(b)]. We observed that the performance of the checkerboard templates decreased with the square size (from 50 $\times$ 50 pixels to 1 $\times$ 1 pixel). The influence of the templates on the experimental image, which is not retrieved with the simulations, points out the practical limits of the SLM and, in particular, its failure to generate important phase changes at high spatial frequency; see Appendix A for more details.

To check the performance of the ISO setup, we compared the image of a bead obtained in the ISO configuration to that of a bead measured in the conventional confocal geometry

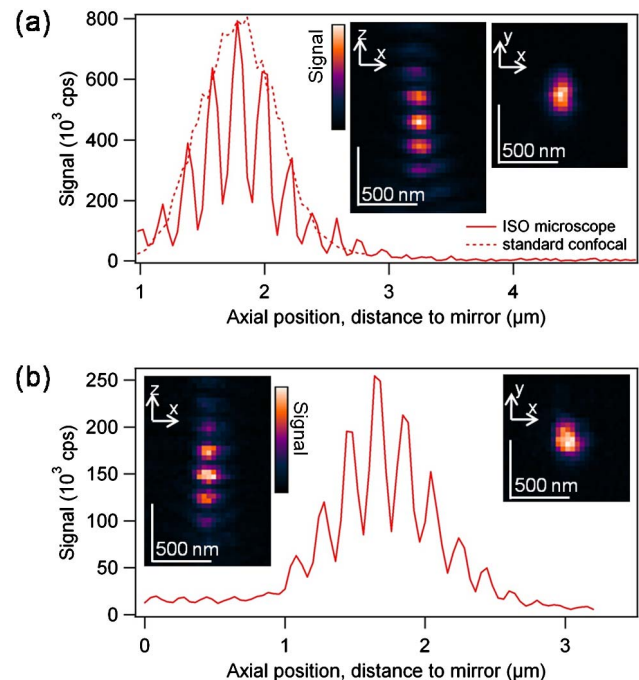


Fig. 6. (Color online) Profile intensity along the z axis of the images of isolated 100 nm fluorescent beads, measured by ISO microscopy. Vertical and horizontal slices of these images are shown in insets. Phase mask designs were based on (a) time-reversal and (b) combinations of Fresnel phase plates with respect to a pie chart of 16 slices; see Fig. 4. Note that the image of the bead was recorded by transverse scanning with the nanopositioning stage and axial scanning of the sample with the SLM.

(i.e., without the mirror and the SLM); see Fig. 6(a). Similar to the simulated PSF shown in Section 2, we observed that the experimental ISO PSF is close to the experimental PSF of the conventional confocal microscope, modulated by $\cos^2[\beta k_0(z - z_0)]$. We thus obtain a quasi-isotropic central peak, flanked by high sidelobes that reflect the less than perfect focusing achievement of the conventional confocal microscope.

We then checked the homogeneity of the global PSF, by studying the images of beads located at various distances from the mirror (Fig. 7). We observed that, as expected, the profiles exhibit the same features whatever the distance of the bead to the mirror and the positions of the fringes change with the location of the beads.

These experimental results suggest that we have achieved the finest ISO PSF possible with such a confocal microscope. It is worth noting that, even for experiments requiring 15 to 20 min long measurements, we observed no drift of the setup; namely, the ISO PSF was preserved all along. We now describe the preliminary studies that were necessary to tune properly the ISO setup and obtain these results.

C. Tuning an ISO Microscope, Cautions, and Preliminary Studies

Basically, the ISO setup requires checking three important steps: the confocal detection, the engineering of the wavefront, and the mirror positioning.

1. Confocal Detection

We have seen in Section 2 that ISO microscopy requires that both incident excitation light and collected fluorescence light be treated by the SLM; otherwise, it would not be compatible with a confocal detection scheme. Now, fluorescence light has a slightly longer wavelength than that of the excitation light, for which the phase masks were designed. Because of this chromatism issue, we expect the optimal position of the pinhole to slightly change when going through the phase mask

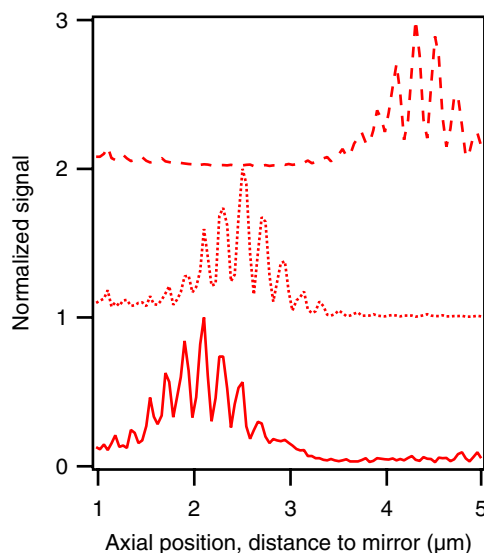


Fig. 7. (Color online) Intensity profiles taken along the axial direction of 3D images of 100 nm fluorescent beads, measured by ISO microscopy using time-reversal phase masks. Bead-to-mirror distances are estimated, on the basis of the position of the brightest fringe in the interference patterns, to 2.1 μm (solid curve), 2.5 μm (dotted curve), and 4.3 μm (dashed curve).

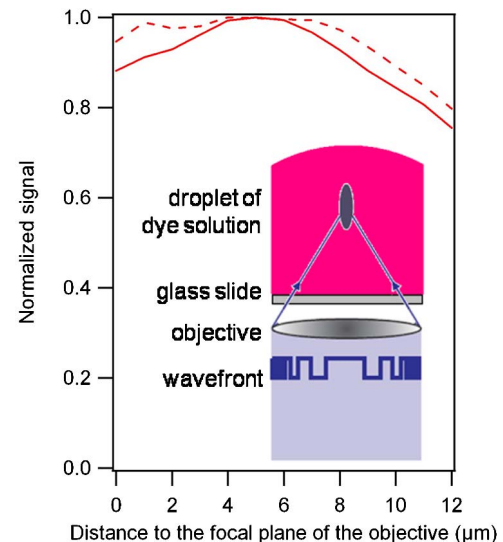


Fig. 8. (Color online) Relative variation of the fluorescent signal as a function of the phase masks displayed on the SLM, measured by focusing light in a droplet of fluorescent dye solution (Rhodamine 6G). Fresnel-lens phase masks were used to focus light in a single spot 0 to 12 μm before the genuine focal plane of the objective lens. Spatial filtering at detection was performed with pinholes of diameter 30 μm (solid curve) and 50 μm (dashed curve). These curves reveal the dependence of the detection sensitivity on the SLM display.

series. Therefore, we evaluated the detection efficiency of the microscope for each of the phase masks, by focusing light in a droplet of fluorescent dye solution (Rhodamine 6G, $10^{-6} \text{ mol l}^{-1}$), as schematized in Fig. 8. The position of the pinhole was optimized while focusing light 6 μm before the focal plane. We observed that the detection efficiency decays slowly as the focus is moved away by displaying different masks on the SLM. Loss of efficiency is observed down to about 20% at the extremes. Unsurprisingly, we found that the decay depends on the size of the pinhole; larger pinholes yield smaller losses. A pinhole of diameter 30 μm (i.e., 1 Airy diameter) appeared to be a fair trade-off between the optical sectioning and a relatively constant efficiency of detection over a sufficiently wide scanning range along the optical axis.

2. Engineering the Wavefront of the Incident Beam

In a simplified view, ISO focusing consists in forming two spots along the optical axis, one at the focal position and the other at its virtual image behind the mirror. Hence, at least one of them forms out of the genuine focal plane of the objective lens. Now, for achieving an interference pattern of optimal contrast, the two spots should have a similar field distribution and be accurately positioned. Hence, it is necessary to check that focusing out of the focal plane does not deteriorate the spots. We tested the ability of our water-immersion microscope objective to focus light up to 12 μm before its focal plane by displaying a Fresnel lens with varying focal length on the SLM. This was done by recording images of beads scattered in an agarose gel film deposited on a standard glass slide. Axial slices of these images are shown in Figs. 9(a) and 9(b). Spot radii at $1/e^2$ (see Fig. 9) were then evaluated by fitting axial and transverse profiles taken from the image with a Gaussian function. Axial and transverse widths were found almost constant (to within 0.03 μm), which indicates that focusing out of the focal plane by wavefront shaping with simple

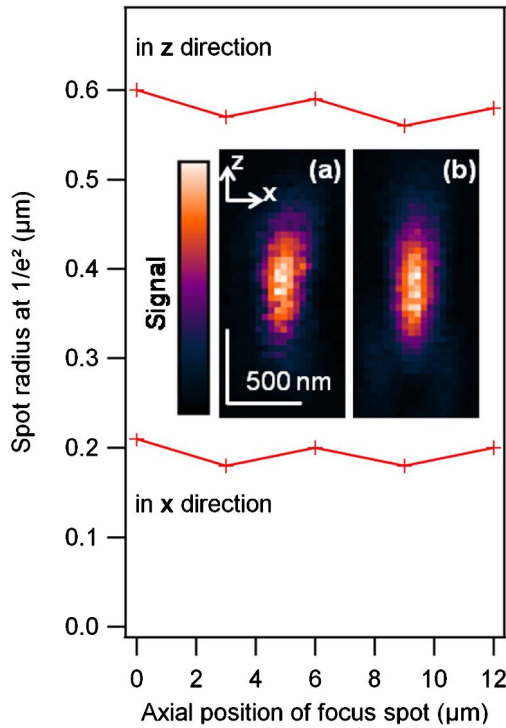


Fig. 9. (Color online) Spot radii at $1/e^2$, evaluated by fitting (with a Gaussian curve) axial and transverse profiles taken from fluorescence images of a 100 nm bead, measured while controlling the actual plane where light focuses using the SLM. Insert: axial slices of two of these images, measured while focusing (a) in the genuine focal plane of the lens and (b) in a plane located $12\text{ }\mu\text{m}$ before it.

Fresnel phase masks introduces only negligible aberrations, within $12\text{ }\mu\text{m}$ (at least) before the focal plane of the objective.

We decided to place the mirror at $d = 6\text{ }\mu\text{m}$ before the genuine focal plane of the objective in order to minimize the influence of the incident light that is unaffected by the SLM, which then focuses behind the mirror. The phase masks were then designed to generate two spots at equidistant locations with respect to a plane that lays at $d = 6\text{ }\mu\text{m}$ before the genuine focal plane (see Fig. 4) and their axial range was limited to $6\text{ }\mu\text{m}$ above and below this plane to remain within the checked aberration-free domain. Hence, in all the experiments, the samples were axially scanned over a layer of $6\text{ }\mu\text{m}$ before the mirror only.

The phase mask building also required some cautions. In order to apply the time-reversal formulas or to arrange a combination of Fresnel lenses in a mask, one needs to associate the pixels of the SLM [defined by their coordinates (ρ, ψ)] to the propagation directions $\mathbf{u}$ after the objective lens. The main difficulty is to determine the radius R of the pupil image on the SLM as introduced in Eq. (4). First, an approximate value of R can be calculated from the specifications of the objective lens (numerical aperture and radius of the pupil) and the magnification ratio brought by the telescope between the SLM and the objective lens. Then, this value of R can be refined through a simple calibration method that consists in measuring the 3D image of a fluorescent bead (in the absence of the mirror) while displaying on the SLM a phase mask for ISO focusing. In that case, axial scanning is performed with the stage. The phase mask is designed to generate a spot at a given distance z_0 to the mirror and yields two spots separated by $2z_0$ along the optical axis in the absence of the mirror. The image

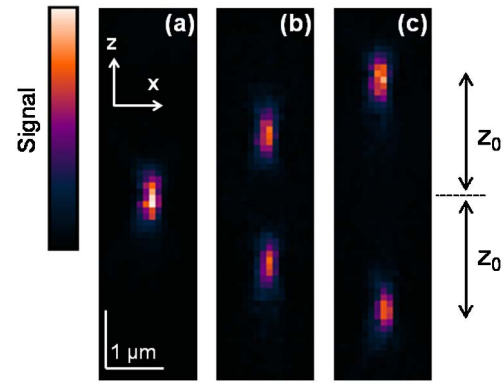


Fig. 10. (Color online) Fluorescence images (axial slices) of a 100 nm bead, measured with time-reversal phase masks that yield pairs of spots separated by (a) 0, (b) 2, and (c) $4\text{ }\mu\text{m}$ along the optical axis in the absence of the mirror.

reveals the positions of the two spots and the radius R is optimized until the distance between the two spots actually corresponds to two times the targeted z_0 . Figures 10(b) and 10(c) show vertical slices in an axial plane of the bead image, measured with phase masks designed with the time-reversal approach for $z_0 = 1$ and $2\text{ }\mu\text{m}$. After calibration, the image reveals pairs of spots that are separated by $2z_0 = 2$ and $4\text{ }\mu\text{m}$ along the optical axis, as expected.

3. Placing the Mirror

Once the two twin spots are created, we axially scan the mirror through focus and measure the detected signal strength. This technique permits one to localize the two spots with

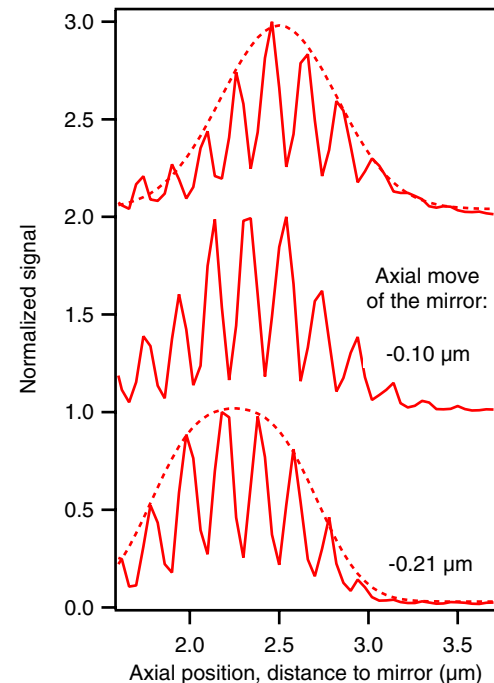


Fig. 11. (Color online) Three intensity profiles, taken in the axial direction from fluorescence images of a single 100 nm bead, for different positions of the mirror. In the middle and bottom profiles, the mirror position differs by 0.10 and $0.21\text{ }\mu\text{m}$ from that of the top profile, respectively. Top and bottom profiles are fitted with envelope curves (dashed curve) corresponding to (top) a Gaussian function of radius $0.65\text{ }\mu\text{m}$ at $1/e^2$ and (bottom) a sum of two identical Gaussian functions of same radius $0.65\text{ }\mu\text{m}$ but of different centers.

accuracy. The mirror is then placed at equidistance of the spots with the stage. A slight tilt of the mirror, if any, can be very accurately corrected by translating the center of the phase mask on the SLM. Namely, its translation by one pixel in either the x or y directions (i.e., by $8\mu\text{m}$) equates in first approximation to a tilt correction by about 0.1° . The accurate positioning of the mirror is crucial as it governs the overlapping of the spots.

To investigate the sensitivity of the ISO PSF to possible mispositioning or drifts of the mirror, we measured the image of a bead for different positions of the mirror. As shown in Fig. 11, the alteration of the PSF is obvious for shifts of $0.10\mu\text{m}$ or larger. Thus, mechanical drifts above 100nm are expected to significantly deteriorate the PSF. Now, we found that, although we did not use any additional stabilizing system, measurements of 15 to 20 min could be conducted without seeing any deterioration of the PSF. Hence, we believe that the stability of the mirror position within 100nm over the experiment time is not an issue.

4. CONCLUSION

We presented a novel epifluorescence confocal microscopy technique, called ISO microscopy, in which the sample is laid on a mirror and scanned by a quasi-isotropic spot that is formed through the interference of the direct and mirror-reflected field of a specially shaped illumination beam. We have shown theoretically and experimentally that the PSF of this system is similar to that of a 4pi-A microscope. It displays a quasi-isotropic spot of diameter about $\lambda/2$ surrounded by high sidelobes. To diminish the amplitude of the latter and make the system convenient for imaging, a microscope objective with an acceptance solid angle of about 74° should be used [33]. Other areas of improvements are the development of a 4pi-C equivalent ISO scheme or the use of two-photon excitation.

APPENDIX A: CORRECTION AND CALIBRATION OF THE SPATIAL LIGHT MODULATOR

The technology of our SLM (liquid crystals on silicon chip) has the disadvantage that it makes displays of relatively poor surface flatness, which may degrade the incident wavefront and alter the ability of the microscope to focus light. Therefore, we did a complete diagnosis of these aberrations by analyzing the reflection of coherent light by the SLM using a wavefront sensor (SID-4 HR, Phasics) mounted on the microscope at the position of the rear focal plane of the objective lens. We found that the curvature of the SLM mainly introduced defocus and astigmatism, as well as spherical aberrations to a lower extent. We compensated for defocus and astigmatism by finely adjusting the axial and lateral positions of the lenses in the setup. This was achieved while keeping all optical planes conjugated and it allowed us to reach wavefront RMS flatness lower than 0.1 times the wavelength of light. The remaining spherical aberrations were minimized by finely adjusting the objective correction collar while monitoring the aspect of the focal spot on a reflective interface of the sample. As an alternative to compensate for the SLM curvature, we also exploited the wavefront analysis to calculate a "correction map" that can be added to any phase mask on the SLM. However, the first option (i.e., handling the "physical" lenses of the

setup) has the advantage over the second one that the confocal microscope can still be operated in conventional mode (i.e., without wavefront shaping) simply by switching off the SLM.

We configured the SLM to have a linear relationship between the signal sent to its driving unit and the phase shift actually experienced by the reflected light. For this purpose, we measured the phase characteristic of the SLM in an interferometric setup. Then we inverted it to obtain a new data lookup table for the driving unit, in order to have a linear phase response within a well-defined $0-2\pi$ phase range at the wavelength of our excitation source (491nm). We also modified the addressing scheme of the SLM. This addressing is digital, which means that the phase levels are created by pulse width modulation. Because of the low addressing rate and limited viscosity of the liquid crystal molecules, the actual phase levels exhibit a certain flicker that is reminiscent from the addressing sequences. Nevertheless, the flicker can be reduced by shortening the pulse sequences and addressing them more often within one frame. Therefore, we switched from the default configuration, designed for 1216 different phase levels, to a custom one with 192 phase levels. This naturally reduces the number of distinguishable phase levels that can be created, which might not suit all applications.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr. Sheppard and Pr. Heintzmann for many fruitful discussions and encouragement. This work was partially funded by the French Agence Nationale de la Recherche under contract ANR-08-NANO-P053-36.

REFERENCES

1. M. Martínez-Corral and G. Saavedra, "The resolution challenge in 3D optical microscopy," *Prog. Opt.* **53**, 1–67 (2009).
2. A. S. van de Nes, J. J. M. Braat, and S. F. Pereira, "High-density optical data storage," *Rep. Prog. Phys.* **69**, 2323–2363 (2006).
3. E. Walker, A. Dvornikov, K. Coblentz, S. Esener, and P. Rentzepis, "Toward terabyte two-photon 3D disk," *Opt. Express* **15**, 12264–12276 (2007).
4. P. C. Chaumet, B. Pouligny, R. Dimova, and N. Sojic, "Optical tweezers in interaction with an apertureless probe," *J. Appl. Phys.* **102**, 024915 (2007).
5. C. Selhuber-Unkel, I. Zins, O. Schubert, C. Sonnichsen, and L. Oddershede, "Quantitative optical trapping of single gold nanorods," *Nano Lett.* **8**, 2998–3003 (2008).
6. M. Dienerowitz, M. Mazilu, and K. Dholakia, "Optical manipulation of nanoparticles: a review," *J. Nanophotonics* **2**, 021875 (2008).
7. C. J. R. Sheppard and Z. S. Hegedus, "Axial behavior of pupil-plane filters," *J. Opt. Soc. Am. A* **5**, 643–647 (1988).
8. M. Martínez-Corral, P. Andrés, C. J. Zapata-Rodriguez, and M. Kowalczyk, "Three-dimensional superresolution by annular binary filters," *Opt. Commun.* **165**, 267–278 (1999).
9. M. Martínez-Corral, M. T. Caballero, E. H. K. Stelzer, and J. Swoger, "Tailoring the axial shape of the point spread function using the Toraldo concept," *Opt. Express* **10**, 98–103 (2002).
10. G. Boyer, "New class of axially apodizing filters for confocal scanning microscopy," *J. Opt. Soc. Am. A* **19**, 584–589 (2002).
11. M. Martínez-Corral, C. Ibanez-Lopez, G. Saavedra, and M. T. Caballero, "Axial gain in resolution in optical sectioning fluorescence microscopy by shaded-ring filters," *Opt. Express* **11**, 1740–1745 (2003).
12. R. Dorn, S. Quabis, and G. Leuchs, "Sharper focus for a radially polarized light beam," *Phys. Rev. Lett.* **91**, 233901 (2003).

13. N. Lindlein, S. Quabis, U. Peschel, and G. Leuchs, "High numerical aperture imaging with different polarization patterns," *Opt. Express* **15**, 5827–5842 (2007).
14. W. Chen and Q. Zhan, "Diffraction limited focusing with controllable arbitrary three-dimensional polarization," *J. Opt.* **12**, 045707 (2010).
15. B. J. Davis, W. C. Karl, A. K. Swan, M. S. Unlu, and B. B. Goldberg, "Capabilities and limitations of pupil-plane filters for superresolution and image enhancement," *Opt. Express* **12**, 4150–4156 (2004).
16. L. Melton, "Imaging: the big picture," *Nature* **437**, 775–779 (2005).
17. S. W. Hell, "Microscopy and its focal switch," *Nat. Methods* **6**, 24–32 (2009).
18. S. W. Hell and E. Stelzer, "Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope," *J. Opt. Soc. Am. A* **9**, 2159–2166 (1992).
19. M. Nagorni and S. W. Hell, "Coherent use of opposing lenses for axial resolution increase in fluorescence microscopy. I. Comparative study of concepts," *J. Opt. Soc. Am. A* **18**, 36–48 (2001).
20. J. Bewersdorf, R. Schmidt, and S. W. Hell, "Comparison of I5M and 4Pi-microscopy," *J. Microsc.* **222**, 105–117 (2006).
21. H. Gugel, J. Bewersdorf, S. Jakobs, J. Engelhardt, R. Storz, and S. W. Hell, "Cooperative 4Pi excitation and detection yields sevenfold sharper optical sections in live cell microscopy," *Biophys. J.* **87**, 4146–4152 (2004).
22. M. Nagorni and S. W. Hell, "4Pi-confocal microscopy provides three-dimensional images of the microtubule network with 100- to 150 nm resolution," *J. Struct. Biol.* **123**, 236–247 (1998).
23. J. Bewersdorf, B. T. Bennett, and K. L. Knight, "H2AX chromatin structures and their response to DNA damage revealed by 4Pi microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 18137–18142 (2006).
24. E. Mudry, P. C. Chaumet, K. Belkebir, G. Maire, and A. Sentenac, "Mirror-assisted optical diffraction tomography with isotropic resolution," *Opt. Lett.* **35**, 1857–1859 (2010).
25. E. Mudry, E. Le Moal, P. Ferrand, P. C. Chaumet, and A. Sentenac, "Isotropic diffraction-limited focusing using a single objective lens," *Phys. Rev. Lett.* **105**, 203903 (2010).
26. R. Carminati, R. Pierrat, J. de Rosny, and M. Fink, "Theory of the time reversal cavity for electromagnetic fields," *Opt. Lett.* **32**, 3107–3109 (2007).
27. C. J. R. Sheppard and K. J. Larkin, "Effect of numerical aperture on interference fringe spacing interferometry," *Appl. Opt.* **34**, 4731–4734 (1995).
28. C. J. R. Sheppard and P. Torok, "Electromagnetic field in the focal region of an electric dipole wave," *Optik* **104**, 175–177 (1997).
29. J.-J. Greffet and R. Carminati, "Image formation in near-field optics," *Prog. Surf. Sci.* **56**, 133–237 (1997).
30. M. Schrader, M. Kozubek, S. W. Hell, and T. Wilson, "Optical transfer functions of 4Pi confocal microscopes: theory and experiment," *Opt. Lett.* **22**, 436–438 (1997).
31. P. Torok and C. J. R. Sheppard, "The role of pinhole size in high-aperture two and three-photon microscopy," in *Confocal and Two-Photon Microscopy*, A. Diaspro, ed. (Wiley-Liss, 2001).
32. H. J. Matthews, D. K. Hamilton, and C. J. R. Sheppard, "Aberration measurement by confocal interferometry," *J. Mod. Opt.* **36**, 233–250 (1989).
33. M. Lang, T. Muller, J. Engelhardt, and S. W. Hell, "4Pi microscopy of type A with 1-photon excitation in biological fluorescence imaging," *Opt. Express* **15**, 2459–2467 (2007).

Mapping the Local Organization of Cell Membranes Using Excitation-Polarization-Resolved Confocal Fluorescence Microscopy

Alla Kress, Xiao Wang, Hubert Ranchon, Julien Savatier, Hervé Rigneault, Patrick Ferrand, and Sophie Brasselet*
Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel, UMR 7249, F-13013 Marseille, France

ABSTRACT Fluorescence anisotropy and linear dichroism imaging have been widely used for imaging biomolecular orientational distributions in protein aggregates, fibrillar structures of cells, and cell membranes. However, these techniques do not give access to complete orientational order information in a whole image, because their use is limited to parts of the sample where the average orientation of molecules is known a priori. Fluorescence anisotropy is also highly sensitive to depolarization mechanisms such as those induced by fluorescence energy transfer. A fully excitation-polarization-resolved fluorescence microscopy imaging that relies on the use of a tunable incident polarization and a nonpolarized detection is able to circumvent these limitations. We have developed such a technique in confocal epifluorescence microscopy, giving access to new regions of study in the complex and heterogeneous molecular organization of cell membranes. Using this technique, we demonstrate morphological changes at the subdiffraction scale in labeled COS-7 cell membranes whose cytoskeleton is perturbed. Molecular orientational order is also seen to be affected by cholesterol depletion, reflecting the strong interplay between lipid-packing regions and their nearby cytoskeleton. This noninvasive optical technique can reveal local organization in cell membranes when used as a complement to existing methods such as generalized polarization.

INTRODUCTION

Investigating biological processes using the polarization of light is a well developed approach for studying the structural organization of proteins and lipids. In cell biology, such organization is the direct signature of molecular interaction mechanisms that play a determining role in biological functions such as cell shape maintenance and motility (1), vesicular trafficking (2), or signaling (3). In fluorescence, the orientational organization of molecules comes into play, because they are preferentially excited when their absorption transition dipole is parallel to the incident polarization direction. This property has been exploited in fluorescence anisotropy for decades (4) by comparing the fluorescence signals recorded along analysis directions parallel and perpendicular to the incident polarization. Fluorescence anisotropy and its equivalent scheme, linear dichroism (which considers two orthogonal excitation polarizations), have been primarily developed for studies in solution, giving access to information on the orientational dynamics of proteins and, consequently, on their structure and conformation. The application of these methodologies to imaging, initiated in isotropic media such as for the mapping of cell cytoplasm viscosity (5), have been focused more recently on biomolecular assemblies exhibiting a degree of orientational order. Fluorescence anisotropy and linear dichroism have helped to solve important questions, giving evidence of glycoprotein's confinement in cell membranes to nanometer-scale lipid domains (6), septin filament conformation in cell division (7), cytoskeleton actin organization (8,9), α -synuclein

aggregation in fibrils involved in neurodegenerative diseases (10), membrane receptor conformational changes upon cell activation (11), and plasma membrane morphology specificities (2,12).

These techniques suffer from some limitations, however. First, they are not adapted to ordered samples, given that they rely on a preferential photoselection (or emission) direction imposed by the incident excitation polarization (or analyzer). They are consequently unable to provide complete information on how the molecular assembly is oriented (defined by its average orientation) and how it is angularly ordered (defined by the molecular orientational order). Since only one of these two parameters is accessible, a measure of molecular orientational order requires working with samples of controlled geometry, where the averaged orientation can be known a priori. This explains the wide range of studies in membranes of round shapes such as red blood cells (13), giant unilamellar vesicles (14), cell blebs (15), or round cells (16). Another way to adapt anisotropy or linear dichroism to oriented structures is to address only particular regions of the sample where the molecules lie on average along or perpendicular to the incident polarization direction, such as horizontal or vertical parts of a membrane in the cell contour image (11,12,17). Although both workarounds have allowed new findings, their limitations considerably reduce the range of exploration, making it impossible to grasp the full complexity of molecular organization in heterogeneous samples. Finally, fluorescence anisotropy can be easily biased by depolarizing mechanisms such as energy transfer between neighbor molecules or the existence of an angle between absorption and emission transition dipoles in the excited molecule. Although depolarization induced by fluorescence resonance

Submitted October 31, 2012, and accepted for publication May 21, 2013.

*Correspondence: sophie.brasselet@fresnel.fr

Editor: Lukas Tamm.

© 2013 by the Biophysical Society
0006-3495/13/07/0127/10 \$2.00



<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2013.05.043>

energy transfer between molecules (homo-FRET) has been advantageously used to image changes in protein clustering (18,19) or actin polymerization in cells (20), it is detrimental when trying to quantify molecular structural organization. This mechanism can indeed introduce erroneous interpretations of the data if they are not studied separately (17,21).

Recently, new techniques, based on tuning of the excitation polarization, have been proposed to circumvent these limitations by exploiting the full potential of polarized fluorescence imaging, (21–24). Such techniques, which can be considered as more universal linear dichroism methods, allow retrieval of complete information on both molecular orientational order and average orientation in a nonambiguous manner in a whole image of the investigated samples, not just in particular regions. One method (21) was based on two-photon excitation-polarization tuning, allowing sample sectioning with polarized detection, which, because it is sensitive to depolarization mechanisms (such as homo-FRET), can suffer from a low level of signals. A second scheme (22,23) removed the polarized detection to circumvent these effects, and improved the time resolution using wide-field illumination. To avoid polarization distortion issues, however, this scheme was implemented in the forward-direction detection mode, which is not appropriate for many samples, leads to faster photobleaching, and does not yield depth sections (24). In this work, we implement an excitation-polarization-resolved technique in an epiconfocal sectioning mode, which is appropriate for the vast majority of biological systems. We discuss the temporal resolution limit of this method and its ability to work in 3D orientational directions. In addition, we develop a data analysis tool that provides considerable improvement in signal processing time and precision compared to previous approaches (21), allowing the monitoring of molecular orientational order and orientation dynamics over time-scales of seconds. This method is appropriate for the measurement of phenomena averaged in space over the diffraction-limit size of an optical microscope and in time over a timescale of seconds.

We demonstrate the benefits of this configuration in molecular orientational order imaging along cell-membrane equatorial contours labeled with lipid probes. We show in particular that the subdiffraction-scale local morphological features of a cell membrane can be quantified *in vivo*, whereas until now these characteristics have been measured by indirect or invasive methods (25–27). Studies of cells affected by pharmacological treatments that induce cytoskeleton perturbation or cholesterol depletion show a significant change of their molecular orientational order. The observed effects corroborate previous findings based on membrane stiffness measurements (28) and generalized polarization (GP), which measures lipid packing by the spectral sensitivity of lipid probes to local polarity (29–31). The new piece of information on subdiffraction-

scale morphological features can complement investigations of lipid packing and avoid biased interpretations in existing methods such as fluorescence correlation spectroscopy (FCS).

MATERIALS AND METHODS

Cells preparation

All experiments were carried out on fibroblastlike COS-7 cells (American Type Culture Collection (ATCC) No. CRL-1657, Manassas, VA). COS-7 cells were grown in an incubator at 37°C in Lab-Tek chambers (Nunc, Rochester, NY) in DMEM medium (Gibco, Saint Aubin, France) completed by 10% FBS and 1% sodium pyruvate. Cells were washed and kept in Hanks buffered salt solution containing 10 mM HEPES (HBSS/HEPES), pH 7.4, at 37°C, for the duration of the imaging process. Cells were labeled with di-8-ANEPPQ directly before measurements and after the pharmacological treatments. For labeling, cells were washed and incubated in insertion buffer (NaCl 130 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 10 mM, glucose 5 mM, and HEPES 10 mM) with 1 μ M di-8-ANEPPQ (dissolved by absolute ethanol to 1 mM for preservation and usage) for 2 min at room temperature. After incubation, cells were washed again and kept in HBSS/HEPES at 37°C throughout the imaging process. Cells were labeled with DiI_{C18} directly before measurements and after the pharmacological treatments. For labeling, cells were washed and incubated in HBSS/HEPES with 1 μ M DiI_{C18} (dissolved by absolute ethanol to 1 mM for preservation and usage) for 2 min at room temperature. After incubation, cells were washed again and kept in HBSS/HEPES at 37°C for the whole imaging process. The concentration of the dyes used did not affect cell shape for the duration of the measurements. For pharmacological treatments that alter cytoskeleton fibers, cells were washed in HBSS/HEPES and incubated at 37°C with 1 μ M latrunculin A (5 min), 10 μ M cytochalasin D (30 min), or 0.5 μ M jaspilakolide (5 min). Cells were then washed with HBSS/HEPES and labeled and kept in HBSS/HEPES with 10-fold-diluted reagent for the duration of the imaging process. For pharmacological treatments that deplete cholesterol content, cells were washed in HBSS/HEPES and incubated at 37°C in serum-free medium with either 2.5 μ M or 100 μ M methyl- β -cyclodextrin (MBCD) (5 min). For treatment with cholesterol oxidase, cells were first starved with serum-free medium for 1 h at 37°C. Either 1 or 5 units of cholesterol oxidase stock solution was added per 1 ml serum-free medium, and the mixture was then incubated for 2 h. Cells were then washed with HBSS/HEPES and kept in HBSS/HEPES for the entire imaging process. Finally, to induce hypotonic shock, cells were swollen in a solution of 80% H₂O and 20% HBSS/HEPES and imaged after 15 min.

Excitation-polarization-resolved fluorescence imaging set-up

Measurements were carried out on a custom confocal microscope system, adapted to allow full control of the polarization state of the excitation beam (Fig. S1 in the Supporting Material). Excitation is provided by a polarized continuous-wave laser (Calypso, Cobolt, Solona, Sweden) emitting at 491 nm that delivers linearly polarized light whose angle of polarization, α , is sequentially rotated by a half-wave plate (WPH05M-488, Thorlabs, Newton, NJ) mounted on a motorized rotation stage (PR50CC, Newport, Irvine, CA). After reflection on a dichroic mirror (XF2037-500DRLP, Omega Optical, Brattleboro, VT), the excitation light is focused onto the sample by a water-immersion objective lens (C-Apochromat 40 $\times$ UV-VIS-NIR, NA 1.2, Carl Zeiss, Jena, Germany). Emitted fluorescence is collected by the same lens in an epigeometry, passes through the dichroic mirror, an emission filter (HQ540/80M-2P, Chroma, Bellows Falls, VT), and a 75- μ m-diameter (1.25 Airy unit) confocal pinhole. The

fluorescence is detected by a single-photon counting module (SPCM-AQR-14, Perkin Elmer, Waltham, MA). Measurements are performed at 37°C. The typical excitation power at the entrance of the objective lens is 10 μ W. Imaging is performed by scanning the excitation/observation volume in the sample using a set of two galvanometric mirrors placed between the dichroic mirror and the objective lens. The transverse size of the observation volume, characterized previously (32), is ~ 200 nm.

Polarization distortion effects in both excitation and collection arms have been characterized at the focal spot of the objective and in the detection path of the microscope. The polarization state of light was measured at different places in the optical set-up, both in the excitation and emission paths, for different incident polarization angles, α , between 0° and 180°. Indeed, several optical elements in the optical path can act as polarizing elements because of their possible optical anisotropy properties (diattenuation, γ , and retardance, δ). Using a polarization-state analysis based on the rotating quarter-wave plate method (33,34), we were able to model the excitation path as a series of effective polarizing elements whose optical axis orientation is denoted by θ . In particular, the reflection on the dichroic mirror introduces a notable retardance close to $\pi/2$ that could be partially compensated by inserting a quarter-wave plate (WPQ05M-488, Thorlabs) in the excitation path. The remaining effective polarizing elements were completely characterized and modeled (with parameters θ , γ , and δ , summarized in Table S1) to be accounted for in the data analysis. We dealt in the same way with the collection path where weak polarization distortions could be observed (Table S1). All measured polarization distortions were introduced in the theoretical model developed for polarization-resolved analysis (details are given in the Supporting Material). Note that these distortions are seen to be achromatic over the detection spectral range of the measurement, as ascertained by constant excitation-polarization-resolved data obtained in homogeneous samples (solution, giant unilamellar vesicles (GUVs)) in different detection spectral regions. Measurements consist of recording a stack of 90 images, obtained by varying the angle α_k between $\alpha_1 = 0^\circ$ (with respect to the horizontal axis of the sample) and $\alpha_{90} = 178^\circ$ by steps of 2° . Typically, 150×150 -pixel images were recorded with 100- μ s pixel dwell time, yielding to an acquisition duration of ~ 5 min, including instrument communication delays.

Theoretical model and data processing

The polarization-resolved steady-state fluorescence intensity is modeled using a formalism similar to that previously developed for two-photon fluorescence (21), except that here the signal is not analyzed and is therefore insensitive to depolarization processes at the emission. This model is based on the expression of the polarization dependence of the excitation photoselection of an ensemble of molecules, whose angular extent is defined by a molecular angular distribution function. The steady-state fluorescence intensity emitted by an ensemble of dipoles whose orientation is contained within an angular distribution function, $f_\psi(\theta, \varphi)$, is written as

$$I_{\rho,\psi,\eta}(\alpha) = \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi d\theta \sin \theta |\vec{\mu}(\theta, \varphi, \rho, \eta) \cdot \vec{E}(\alpha)|^2 \times f_\psi(\theta, \varphi) J(\theta, \varphi, \rho, \eta), \quad (1)$$

where the square modulus represents the excitation probability for an absorption transition dipole, $\vec{\mu}$, to be excited by an electric field, $\vec{E}$, with a linear state of polarization along an angle α with respect to the x axis in the sample plane. In this model, a complete expression of $\vec{E}$ is introduced, including all polarization distortions measured in the set-up (see Supporting Material). (θ, φ) defines the orientation of $\vec{\mu}$ in the local frame of the membrane (x, y, z) (Fig. S2 A). (ρ, η) defines the orientation of the distribution function in the macroscopic laboratory frame (X, Y, Z) (Fig. S2 C). The function J represents the detection probability of fluorescence and takes into account the numerical aperture of the objective lens (13). Following

the methodology introduced by Axelrod (13), this function is recalculated to account for the polarization distortions occurring in the detection path of the microscope (see Supporting Material; note that we confirmed that the efficiency of the detector used in this study is not dependent on the detected polarization).

The normalized function, $f_\psi(\theta, \varphi)$, describes the dipole orientation distribution that is modeled by a full cone of aperture ψ whose symmetry axis is oriented at angle ρ with respect to the x axis, and an out-of-plane angle η . Depending on the lipid probe structure, the function $f_\psi(\theta, \varphi)$ can take different forms. In the case of a lipid probe whose dipoles lie along the membrane lipid molecules (such as di-8-ANEPPQ) (Fig. S2 A), the angular distribution in the frame of the membrane is written as

$$f_\psi(\theta, \varphi) = \begin{cases} \frac{1}{4\pi \sin^2(\psi/4)} & \text{if } \theta \leq \psi/2 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}. \quad (2)$$

In the case of a lipid probe whose dipoles lie perpendicular to the membrane lipid molecules (such as DiI_{C18}, 1,1'-diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) (Fig. S2 B), the angular distribution in the frame of the membrane is written as

$$f_\psi(\theta, \varphi) = \begin{cases} \frac{1}{4\pi \sin(\psi/2)} & \text{if } (\pi - \psi)/2 \leq \theta \leq (\pi + \psi)/2 \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases}. \quad (3)$$

Whatever the shape of the distribution function, one can show that the dependence on α in Eq. 1 can be written as a finite Fourier series

$$I_{\rho,\psi,\eta}(\alpha) = I_0 [1 + A_{\rho,\psi,\eta} \cos(2\alpha) + B_{\rho,\psi,\eta} \sin(2\alpha)], \quad (4)$$

with

$$A_{\rho,\psi,\eta} = \frac{2}{I_0 \pi} \int_0^\pi d\alpha I_{\rho,\psi,\eta}(\alpha) \cos(2\alpha) \\ B_{\rho,\psi,\eta} = \frac{2}{I_0 \pi} \int_0^\pi d\alpha I_{\rho,\psi,\eta}(\alpha) \sin(2\alpha), \quad (5)$$

and $I_0 = 1/\pi \int_0^\pi d\alpha I_{\rho,\psi,\eta}(\alpha)$. Moreover, if η is assumed to be zero, any set (ρ, ψ) gives a unique set $(A_{\rho,\psi}, B_{\rho,\psi})$. Conversely, knowing A and B allows us to retrieve (ρ, ψ) unambiguously (as shown in simulations; Fig. S3). The assumption $\eta = 0^\circ$ supposes that the information is measured close to the equatorial plane of the cell membranes in which the fluorophore orientation lies close to the sample plane. This treatment is valid until the cell curvature becomes large ($n \sim 45^\circ$) (see below).

In practice, the selection of the relevant pixels to be analyzed is performed on the basis of the total fluorescence image obtained by summing for each pixel photon counts obtained for all angles α_k . First, to ensure good precision (see discussion below), only pixels with >5000 counts are considered. Pixels corresponding to the membrane signal are manually selected by the operator using a polygon selection tool. For each selected pixel, the photon counts, $I_{exp}(\alpha_k)$, are added to those of the neighbor pixels, yielding a binning of 3×3 pixels. Then, for each pixel, experimental coefficients A_{exp} and B_{exp} are computed using

$$A_{exp} = \frac{2}{I_0 N} \sum_{k=1}^N I_{exp}(\alpha_k) \cos(2\alpha_k)$$

$$B_{exp} = \frac{2}{I_0 N} \sum_{k=1}^N I_{exp}(\alpha_k) \sin(2\alpha_k), \quad (6)$$

where $I_0 = 1/N \sum_{k=1}^N I_{exp}(\alpha_k)$. The corresponding (ρ, ψ) angles are retrieved by finding within a set $(A_{\rho, \psi}, B_{\rho, \psi})$ (where ρ and ψ have been sampled every degree) the angle closest to (A_{exp}, B_{exp}) , i.e., the one that minimizes the quantity $(A_{\rho, \psi} - A_{exp})^2 + (B_{\rho, \psi} - B_{exp})^2$. The validity of the obtained (ρ, ψ) angles is assessed by calculating the normalized chi-square value,

$$\chi^2 = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{[I_{exp}(\alpha_k) - I_{theory}(\alpha_k)]^2}{\sigma_k^2}, \quad (7)$$

where $I_{theory}(\alpha_k) = I_0[1 + A_{\rho, \psi} \cos(2\alpha_k) + B_{\rho, \psi} \sin(2\alpha_k)]$ and the variance σ_k^2 is assumed to be equal to the photon counts $I_{theory}(\alpha_k)$, in agreement with Poisson statistics of low photon counts. Data corresponding to $\chi^2 > 5$ are discarded (Fig. S4). Thanks to this procedure, measurements that are affected by instabilities such as by sample drift, membrane local motion, photobleaching, etc., and therefore differ from theory by more than what is expected from photon shot noise, are systematically rejected.

The retrieved ψ and ρ data are shown as histograms for single cells, for ~12 cells (~4000 pixels), and by bar graphs with average values indicating the mean $\pm$ SE over all pixels. Statistical significance was determined and P values were calculated with an analysis of variance one-way Tukey HSD test. This representation specifically allows evaluation of heterogeneities from cell to cell as well as within the whole investigated population. Note that for all data analysis related to membrane behaviors, a careful inspection of the total fluorescence image of the cell ensures that statistics are made on cell membrane parts that are clearly isolated and not part of an accumulation of membranes of size above the diffraction limit.

Sensitivity to out-of plane orientations

Measurements and simulations have been performed to investigate the range of validity of the model and results developed below, in the case of excitation-polarization-resolved fluorescence data recorded at a different plane of the membrane than the equatorial plane for which $\eta = 0^\circ$. Measurements of (ρ, ψ) were performed on a COS-7 cell membrane contour at different heights, Z , above the sample surface (cell adherence plane) (Fig. S5). As expected, ψ is overestimated when η increases, since the cone projection in the sample plane tends toward a more isotropic distribution function when this cone is tilted out of the sample plane. The bias on ψ is nevertheless seen to remain quite low for a few-micrometers range of variation of Z around the equatorial plane of the cell membrane, showing that the cell membrane 3D shape is well adapted to a robust measurement of ψ . In theory, the bias on ψ increases with respect to η in a nonlinear way (Fig. S5), which explains why increasing η leads to a low bias on ψ for relatively low values of η ($< 20^\circ$). For a case where $\psi = 120^\circ$, the bias is seen to be within a 10% range when η reaches 45° . This shows that for experiments allowing such a bias, data far above the equatorial plane of the membrane can be measured. In a more constraining situation where only a few degrees of error are accepted for the measurements of ψ , out-of-plane tilt angles of $\eta < 30^\circ$ are still allowed.

Modeling the cell membrane spatial profile

The change of aperture of the cone distribution of di-8-ANEPPQ molecules in COS-7 cell membranes upon different cell treatments can be directly related to a modification of the spatial profile of the cell membrane contour. To model this effect in a simple way and retrieve an order of magnitude of the cell membrane shape modification, we assume that the value of ψ_0 measured in cells under hypotonic shock is that of a flat membrane

($\psi_0 = 100^\circ$, averaged over 12 cells). We assume that nontreated cells exhibit a lateral 1D profile of sinusoidal shape with amplitude A : $P(x) = A \times \cos(x \times (n \times \pi/d))$, with $d = 100$ nm the half lateral size of the focal spot, n the number of period folds within this spot lateral size. The whole cone aperture induced by this curvature is $\Delta\psi = 2 \arctan(A \times (n \times \pi/d))$. The measured cone aperture is therefore $\psi = \Delta\psi + \psi_0$, where $\psi_0 = 100^\circ$ is the cone aperture value in a flat cell membrane. Finally, to deduce a cell membrane lateral 1D profile from a measured ψ value, we use the function

$$P_{deduced}(x, \psi) = \left[\tan\left(\frac{\psi - \psi_0}{2}\right) \times \frac{d}{n \times \pi} \right] \times \cos\left(x \times \frac{n \times \pi}{d}\right) \quad (8)$$

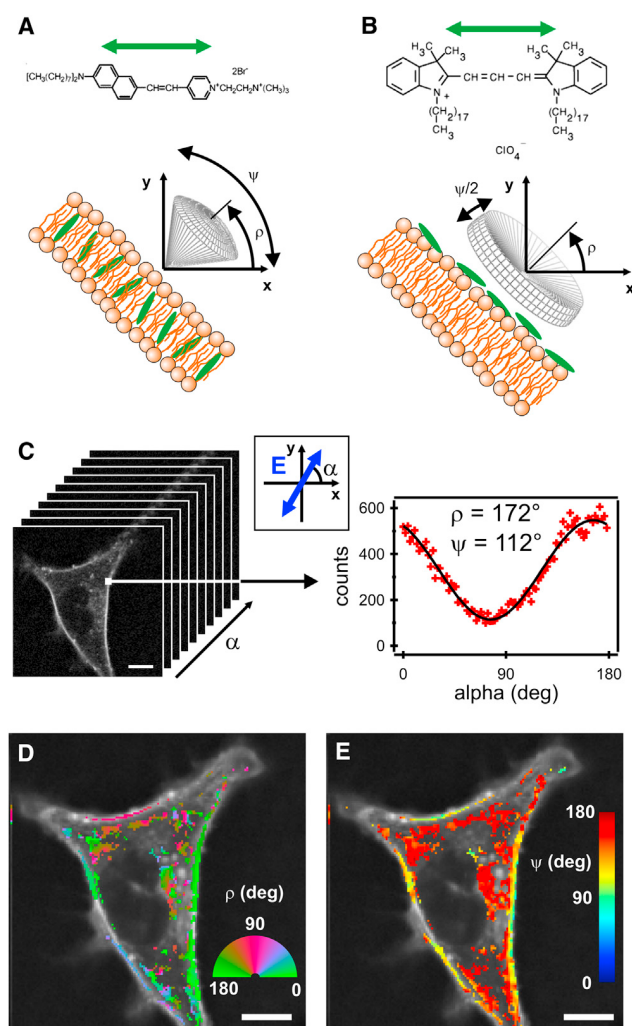
The first term in brackets is the amplitude of the membrane profile, which depends on the number of periods of the sinusoid profile that is assumed within the focal spot size. Assuming one period of membrane profile sinusoid in the focal spot size ($n = 1$), its amplitude is seen to reach a maximum of 30 nm in the case of $\psi = 150^\circ$, which is the higher averaged value observed in cells treated with jasplakinolide. The minimum measurable amplitude is of the order of 2 nm, assuming a detection limit of $\psi = 5^\circ$. These values are upper limits, since they are decreased in situations where the profile contains more periods in the focal spot, according to Eq. 8.

RESULTS

We quantify orientational order by the extent of angular freedom experienced by a molecule, using an angle called ψ (Fig. 1, A and B), which defines the rotational hindrance imposed by local molecular interactions in cell membranes or protein assemblies. The average orientation of this angular distribution is defined by the angles ρ (in the sample plane) (Fig. 1, A and B) and η (tilt angle out of the sample plane) (Fig. S2). Since fluorescence imaging primarily addresses processes that occur in the sample plane, we concentrate on orientational distributions in this plane where only ρ is relevant ($\eta \sim 0^\circ$). The most general case of 3D orientations is discussed below. Whereas the molecular orientational order, ψ , is intrinsic to the sample and contains biologically relevant information, the angle ρ depends on its global orientation and needs to be decoupled from ψ . The purpose of excitation-polarization-resolved fluorescence imaging is to provide simultaneously information on both ψ and ρ angles in each pixel of a fluorescence image.

Principle of excitation-polarization-resolved fluorescence microscopy

The principle of the technique relies on the tuning of the excitation photoselection. Several images of a sample are recorded for a minimum of three linear, regularly spaced input polarization directions in the sample plane, ranging between 0° (along the horizontal axis of the image) and 180° (Fig. S1). The choice of number of input polarizations is purely governed by the precision chosen for the orientational parameter determination, which indeed depends on the total number of photons recorded for a given pixel (Fig. S6). In this study, we represent a static picture of the



The details of the set-up are described in the [Materials and Methods](#) section. Implementing several input polariza-

Sensitivity to local membrane morphology

The molecular orientational order of lipid probes in cell membranes exhibits a much different behavior (Fig. 1 E). Live (37°C) COS-7 fibroblastlike cell membranes labeled with di-8-ANEPPQ show a very heterogeneous molecular orientational order around the cell contour on its equatorial plane, with a visible isotropic behavior in the cell cytoplasm. Next to the membrane, a clear disorder is also visible, which we attribute to internalized lipid probes, internal membrane regions, or vesicles. The average angular

aperture ψ around the cell membrane is quite large ($\psi \sim 120^\circ$), which confirms previous observations in two-photon microscopy obtained with a less direct analysis (21). The ψ image also shows that the distribution of ψ values is much larger than the expected precision of the measurement (a few degrees). Although the disordered parts of the cell membrane show high ψ values of $\sim 150^\circ$ (Fig. 2 A), its most ordered parts reach $\psi \sim 100^\circ$ (Fig. 2 B). This behavior can most likely be attributed to the characteristic membrane morphology, which is much more perturbed than in a GUV membrane, which is tense by nature. The cell membrane, in particular, undergoes strong perturbations due to the interaction of membrane proteins with the cytoskeleton and with the substrate, but also due to trafficking and its intrinsic molecular heterogeneity. We observed furthermore that regions of high molecular disorder are correlated with high intensity (Fig. 2, A and B), which is compatible with folded parts of the membrane where molecules accumulate at a scale below the diffraction limit of the microscope, or other types of lipid accumulation at the proximity of the plasma membrane, such as in internal membranes or submicrometer-scale vesicles. Since this technique is insensitive to potential homo-FRET between molecules, the retrieved information is relevant even in regions where molecules are highly concentrated, which is likely to occur in wrinkled parts of the cell membrane. The ψ image can ultimately be used to quantify the membrane fold sizes, which might be reached if wrinkles were the primary origin of molecular disorder. For this purpose, we modeled the membrane profile using a sinusoidal shape

in one dimension (see Materials and Methods). Supposing that the membrane is locally flat when ψ is lowest ($\psi = 100^\circ$), we deduce that its amplitude reaches 10 nm for $\psi = 120^\circ$, and 30 nm for highly disordered regions ($\psi \sim 150^\circ$) (Fig. 2 C). In this model, one period of sinusoidal profile is assumed within the 200-nm-diameter length of the focal volume (see Materials and Methods); therefore, these values have to be considered as higher limits. The order of magnitude of the wrinkle amplitude obtained in this study is consistent with previous estimations of the membrane profile extent obtained using invasive or indirect methods (2,25–27). Note that this simplified curved-membrane model includes effects that cannot be discriminated in this measurement. First, the membrane shape fluctuations are highly dynamic; therefore, the retrieved membrane profile is an average over a time much larger than the timescale of the fluctuations. Second, the measurement reflects the behavior of molecules distributed within a whole focal volume of 200-nm lateral size, within which other phenomena are likely to occur: internalization, membrane trafficking, vesicle formation, etc. Nevertheless, this averaged quantity, similar to those obtained from other techniques dedicated to membranes (in particular, FCS and GP analyses) is representative of an overall morphological behavior that can be precisely measured when the cell nature or environment is affected.

To explore the efficiency of this technique in reporting membrane morphological changes, we investigated how molecular orientational order responded to different drugs affecting the actin network of the cells (Fig. 3). Single cells

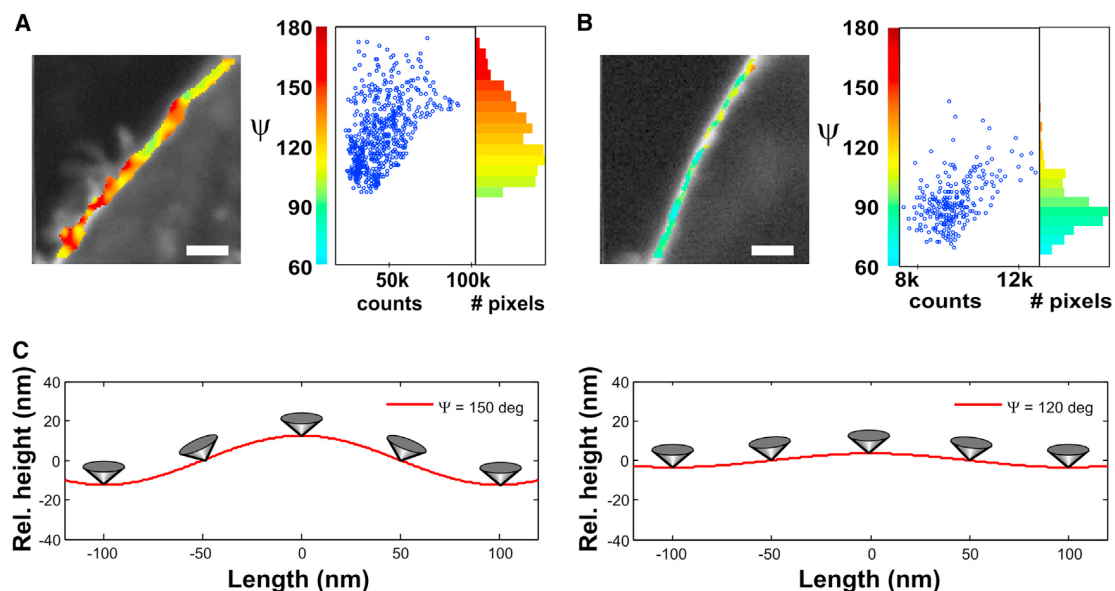


FIGURE 2 Zoomed areas of ψ images in COS-7 cell labeled with di-8-ANEPPQ. (A) Heterogeneous disordered region. (B) Ordered region. Scale bars, 2 μm . The histograms of ψ are shown together with the correlation plot between intensity (total number of photons summed over all incident polarization angles) and ψ in the zoomed region. (C) Simulated 1D profile (cell-membrane relative height) of the lateral dimension of the cell membrane, assuming a sinusoidal shape, for measured cone apertures of $\psi = 150^\circ$ (left) and $\psi = 120^\circ$ (right) (see text). The change of orientation of the cone along the membrane is illustrated. The lateral extent of the profile is shown within the focal spot size of 200 nm.

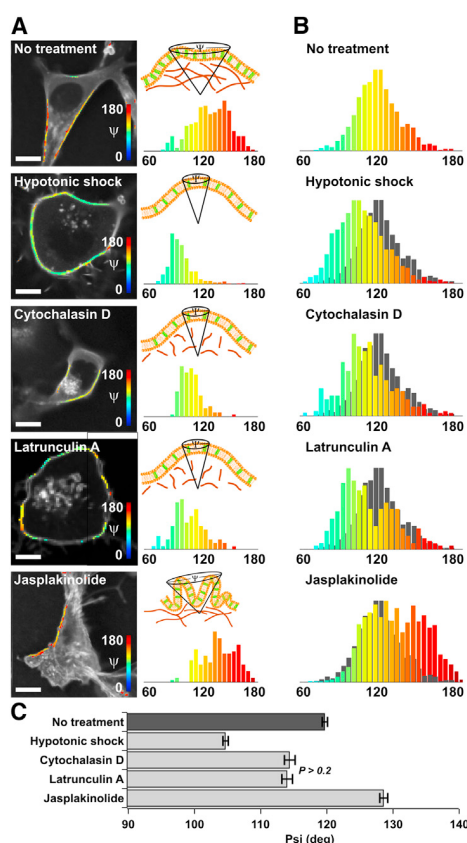


FIGURE 3 Effect of actin perturbation on molecular order in COS-7 cells labeled with di-8-ANEPPQ. (A) ψ maps (superimposed on the fluorescence intensity image) and corresponding histograms for a typical cell under conditions of (top to bottom) no treatment, and treatment with hypotonic shock, cytochalasin D, latrunculin A, and jasplakinolide. A schematic representation of the membrane local morphology is shown. (B) Histograms of the measured ψ values for 12 cells from each treatment group (gray represents the reference histogram with no treatment). (C) Mean $\pm$ SE values for each treatment. All cases show significant differences ($P < 10^{-5}$) except for cytochalasin D and latrunculin A. Scale bars, 10 μ m.

are illustrated in Fig. 3 A, and distributions of ψ over 12 cells are reported in Fig. 3 B. The ψ distributions of single cells visibly resemble those obtained from a population of cells, which shows that heterogeneities are intrinsic to a single sample. Mechanical disruption of the cytoskeleton by a hypotonic shock leads to an increase of molecular orientational order, an effect that is also observed using cytochalasin D, a drug that provokes actin depolymerization. Latrunculin A, an actin polymerization inhibitor, leads to a somewhat similar effect, with additional heterogeneities. jasplakinolide, which stabilizes actin filaments, provokes a new population of high disorder at $\psi \sim 150^\circ$, which seems to be correlated with the visible additional membrane wrinkles around its contour, but also with invisible features occurring at the subdiffraction scale. Interestingly, DiI_{C18} undergoes similar molecular orientational order changes under cytoskeleton perturbations, except in the case of cytochalasin D, whose cell membrane exhibits unexpected

patches, which we attribute to damage from interactions with the lipid probe (Fig. S9).

Modification of lipid orientational order upon cholesterol depletion

Lipid orientational behavior is also governed by the membrane molecular content, which drives lipid packing (14). To explore the contribution of molecular orientational order to lipid organization when local polarity changes, we induced cholesterol depletion in the COS-7 cell membrane using cholesterol oxidase, which specifically converts cholesterol into cholestenone, and methyl- β -cyclodextrin (MBCD), which removes cholesterol from the membrane. Under low concentrations, both treatments induce a shift of the whole population toward a slightly higher molecular orientational order (Figs. 4 and S10), which indicates either a local morphology change or an increased rigidity of the local environment surrounding the lipid probes. At higher concentration, the behavior is reversed and orientational

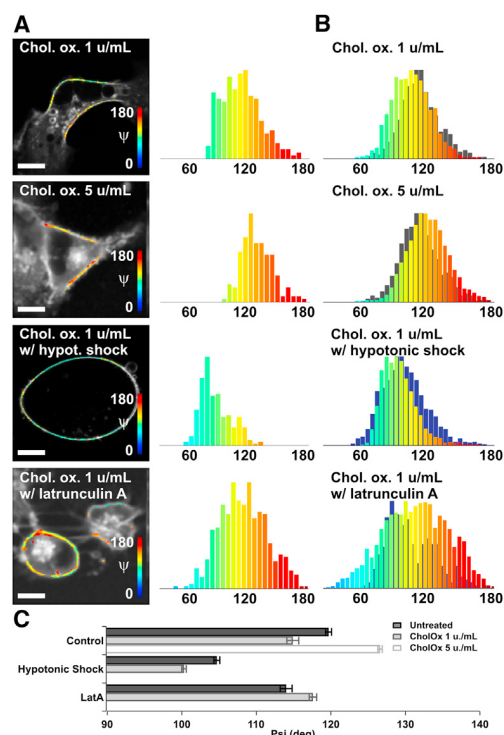


FIGURE 4 Effect of cholesterol depletion on molecular order in COS-7 cells labeled with di-8-ANEPPQ using cholesterol oxidase (Chol. ox.) and combined treatments. (A) ψ maps superimposed on the fluorescence intensity image and corresponding histograms for a typical cell for treatment conditions (top to bottom) Chol. ox. at 1 μ M and 5 μ M and at 1 μ M combined with hypotonic shock and latrunculin A. (B) Histograms of the measured ψ values of 12 cells for the respective treatment groups in A (gray, reference histogram with no cholesterol depletion; blue, reference histogram with hypotonic shock or latrunculin A). (C) Mean $\pm$ SE values represented for each treatment. All cases show significant differences ($P < 10^{-5}$). Scale bars, 10 μ m.

disorder is clearly appearing, even though the apparent macroscopic morphology of the cell does not change. This indicates that under high depletion conditions (which are known to induce a strong lipid disorder), lipid probes also tend to undergo more orientational freedom.

Treatments combining cholesterol depletion with actin cytoskeleton perturbation were also performed to measure possible correlations between lipid packing and the nature of cytoskeleton filaments in close interaction with the membrane. When the treatments are applied in cells whose wrinkles are removed due to a preliminary hypotonic shock, a shift to even higher orientational order is visible, as if lipid packing orientational order could be probed with higher sensitivity thanks to membrane smoothing (Fig. 4). When cholesterol depletion is performed on a cell deprived of polymerized cytoskeleton (latrunculin A), the change of orientational order is slightly reversed and highly heterogeneous, indicating that an intact cytoskeleton filament is required to produce a reaction of lipid-packing ordering to cholesterol depletion. Note that these combined treatments lead to similar results for cholesterol oxidase and methyl- β -cyclodextrin.

DISCUSSION

We implemented an excitation-polarization-resolved fluorescence technique that can quantify molecular orientational order along the whole contour of a cell membrane, offering the possibility of studying orientational behavior of lipids under conditions that can lead to heterogeneous populations of cells.

We show in particular that in unperturbed cells, the orientational order value, ψ , can be used as a direct signature of the local membrane morphology, able to report membrane accumulations (folds, attached internal membranes, or vesicles) of smaller scale than the diffraction limit. These accumulations are seen as regions richer in lipid probes and angularly more disoriented. ψ is, moreover, a sensitive signature to slight modifications of the local membrane morphology, given that a change of a few degrees (corresponding to the precision of the measurements; see Fig. S6) is the signature of changes of the membrane profile amplitude of ~ 2 nm (see Materials and Methods). In particular, these wrinkles are globally removed by treatments affecting the actin cytoskeleton and locally enhanced when cells are treated with jasplakinolide (Fig. 3), which is known to induce confined regions with a high content of disordered polymeric actin (35). In this study, we demonstrate that these regions essentially occur at a subdiffraction scale, and we show a method of quantifying their spatial amplitude in a noninvasive way. This determination is an important piece of information that could, for instance, allow investigation into the role of topology effects in measurement methodologies potentially affected by them, such as FCS.

This mechanical interpretation supposes that there is no strong influence of a lower-scale lipid packing (driving lipid orientational freedom at the molecular scale) on the retrieved molecular orientational order. We implemented a measurement of lipid packing using GP, which exploits the spectral sensitivity of lipid probes to local polarity and is able to inform on the presence of lipid ordered domains in the membrane (36). GP measurements were performed on di-8-ANEPPQ in the same set-up, using the same methodology as in Owen et al. (36) (see Supporting Material). di-8-ANEPPQ exhibits a molecular structure similar to that of the well-known styryl-like lipid order probe di-4-ANEPPDHQ (36), and it is expected to reflect lipid ordered phases in its blue side emission (~ 540 nm), whereas its presence in lipid disordered phases would enhance its red side emission (~ 675 nm). In untreated cells, no significant difference in ψ values was observable between these two spectral channels, showing that if distinct lipid phases were present in the cell, the dye experienced similar orientational disorder in these domains. This is most probably due to the fact that the morphological complexity of the cell membrane prevails over all other possibly weaker molecular-scale disorder effects.

Forcing the membrane lipid packing to undergo stronger changes, however, revealed the sensitivity of orientational order to lipid packing. Measurements were performed under different conditions of cholesterol depletion, which is known to strongly modify lipid packing properties in cell membranes. Under relatively low depletion concentration, a slightly higher orientational order appears (Fig. 4), which corroborates previous observations of increased membrane stiffness (28), decreased lateral mobility of membrane proteins (37), and increased degree of lipid packing (30). For the cell membranes investigated in this work, a GP increase was detectable for both cholesterol oxidase and MBCD, clearly correlating with the increase in orientational order (Fig. S11). When cholesterol depletion was brought to a much higher level, a GP decrease was observed, correlating with a decrease in orientational order (Fig. S11). This decrease in lipid packing under a high dose of cholesterol depletion is also consistent with previous observations in cell membranes (29). Overall, these observations show the strong relationship between lipid packing and orientational order when cholesterol content is affected in cells, emphasizing the connection between local mechanical constraint and polarity.

It has been shown, however, that actin-filament attachment sites are strongly interrelated with the presence of lipid ordered domains (28,37), recognized as high packing sites with decreased fluidity (31). The mechanical property of the membrane therefore rather depends on both the organization of the submembrane cytoskeleton (and its attachment to the membrane) and on the physical properties of the lipid membrane itself. This statement is confirmed by our measurement of combined cytoskeleton disruption (using

latrunculin A) and cholesterol depletion, which cancels the order effect and leads to a highly heterogeneous response. This indicates that the absence of polymerized actin in the proximity of the membrane hampers the action of lipid packing. This is in agreement with previous findings in similar conditions (38), reporting a faster lipid motion due to the absence of diffusion barriers (39) and an abrogation of the stiffening effect (28). Actin filaments attached to the membrane thus favor the existence of ordered lipid domains, which is directly visible in lipid packing and orientational order properties at the molecular scale. Finally, experiments performed on a disrupted cytoskeleton (hypotonic shock) in combination with cholesterol depletion show the opposite behavior with an increased order. Hypotonic shock probably preserves the stabilizing function of the cytoskeleton, which therefore maintains a strengthening effect on the membrane. Under such conditions, the membrane morphology is also smoothened, which probably makes the measured quantity more sensitive to lipid packing changes.

Overall, this technique appears to be capable of providing unique complementary information on subresolution-scale morphological features in cell membranes. However, to achieve a finer measurement of orientational freedom at the molecular scale in lipid domains would necessitate combining excitation-polarization-resolved fluorescence with lipid packing measurement in the membrane, and to account for the inevitable role of the cytoskeleton.

CONCLUSION

We have developed an excitation-polarization-resolved fluorescence microscopy technique based on an epiconfocal configuration that is able to circumvent the limitations of fluorescence anisotropy and linear dichroism schemes. This scheme allows the quantification of molecular orientational order in cell membranes of arbitrary shapes and shows its relation to local subdiffraction-scale morphology, local lipid environment, and membrane stiffness. These properties can be probed locally in a noninvasive way, which yields new (to our knowledge) perspectives on the architecture of biomolecular assembly. This technique can be exploited in a large variety of biological processes, addressing heterogeneous behaviors (such as proteins clustering in signalization sites, local perturbations induced by cell mechanics under stress, trafficking, or migration) and giving structural insight into biomolecular assemblies (such as insoluble fibril formation in cells or tissues).

SUPPORTING MATERIAL

Eleven figures, one table, and supporting results are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(13\)00630-9](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(13)00630-9).

The authors thank P. Réfrégier, J. Duboisset (Institut Fresnel, Marseille, France), as well as D. Marguet, H. T. He (Centre d'Immunologie de Marseille Luminy, Marseille, France), for helpful discussions and advice.

This work was supported by the Centre National de Recherche Scientifique, Agence Nationale de la Recherche grants ANR 2010 BLAN 150902 (ReceptORIENT), 121402 (NanoDIGICODE), 18818 (RADORDER), and ANR-10-INBS-04-01 (France-BioImaging Infrastructure network), Conseil Regional Provence Alpes Côte d'Azur, and the China Scholarship Council.

REFERENCES

- Cheresh, D. A., J. Leng, and R. L. Klemke. 1999. Regulation of cell contraction and membrane ruffling by distinct signals in migratory cells. *J. Cell Biol.* 146:1107–1116.
- Anantharam, A., B. Onoa, ..., D. Axelrod. 2010. Localized topological changes of the plasma membrane upon exocytosis visualized by polarized TIRFM. *J. Cell Biol.* 188:415–428.
- Fooksman, D. R., G. K. Grönvall, ..., M. Edidin. 2006. Clustering class I MHC modulates sensitivity of T cell recognition. *J. Immunol.* 176:6673–6680.
- Weber, G. 1953. Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions. *Adv. Protein Chem.* 8:415–459.
- Dix, J. A., and A. S. Verkman. 1990. Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by ratio imaging. Application to cytoplasmic viscosity. *Biophys. J.* 57:231–240.
- Varma, R., and S. Mayor. 1998. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. *Nature.* 394:798–801.
- Vrabioiu, A. M., and T. J. Mitchison. 2006. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature.* 443:466–469.
- Borejdo, J., and S. Burlacu. 1993. Measuring orientation of actin filaments within a cell: orientation of actin in intestinal microvilli. *Biophys. J.* 65:300–309.
- Gould, T. J., M. S. Gunewardene, ..., S. T. Hess. 2008. Nanoscale imaging of molecular positions and anisotropies. *Nat. Methods.* 5: 1027–1030.
- Roberti, M. J., T. M. Jovin, and E. Jares-Erijman. 2011. Confocal fluorescence anisotropy and FRAP imaging of α -synuclein amyloid aggregates in living cells. *PLoS ONE.* 6:e23338.
- Lazar, J., A. Bondar, ..., S. J. Firestein. 2011. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nat. Methods.* 8:684–690.
- Benninger, R. K. P., B. Vanherberghen, ..., B. Önfelt. 2009. Live cell linear dichroism imaging reveals extensive membrane ruffling within the docking structure of natural killer cell immune synapses. *Biophys. J.* 96:L13–L15.
- Axelrod, D. 1979. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.* 26: 557–573.
- Florine-Casteel, K. 1990. Phospholipid order in gel- and fluid-phase cell-size liposomes measured by digitized video fluorescence polarization microscopy. *Biophys. J.* 57:1199–1215.
- Rocheleau, J. V., M. Edidin, and D. W. Piston. 2003. Intrasequence GFP in class I MHC molecules, a rigid probe for fluorescence anisotropy measurements of the membrane environment. *Biophys. J.* 84:4078–4086.
- Benninger, R. K. P., B. Önfelt, ..., P. M. W. French. 2005. Fluorescence imaging of two-photon linear dichroism: cholesterol depletion disrupts molecular orientation in cell membranes. *Biophys. J.* 88:609–622.
- Kress, A., P. Ferrand, ..., S. Brasselet. 2011. Probing orientational behavior of MHC class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging. *Biophys. J.* 101: 468–476.
- Pentcheva, T., and M. Edidin. 2001. Clustering of peptide-loaded MHC class I molecules for endoplasmic reticulum export imaged by fluorescence resonance energy transfer. *J. Immunol.* 166:6625–6632.

19. Chan, F. T. S., C. F. Kaminski, and G. S. Kaminski Schierle. 2011. HomoFRET fluorescence anisotropy imaging as a tool to study molecular self-assembly in live cells. *ChemPhysChem*. 12:500–509.
20. Vishwasrao, H. D., P. Trifilieff, and E. R. Kandel. 2012. In vivo imaging of the actin polymerization state with two-photon fluorescence anisotropy. *Biophys. J.* 102:1204–1214.
21. Gasecka, A., T. J. Han, ..., S. Brasselet. 2009. Quantitative imaging of molecular order in lipid membranes using two-photon fluorescence polarimetry. *Biophys. J.* 97:2854–2862.
22. DeMay, B. S., N. Noda, ..., R. Oldenbourg. 2011. Rapid and quantitative imaging of excitation polarized fluorescence reveals ordered septin dynamics in live yeast. *Biophys. J.* 101:985–994.
23. DeMay, B. S., X. Bai, ..., A. S. Gladfelter. 2011. Septin filaments exhibit a dynamic, paired organization that is conserved from yeast to mammals. *J. Cell Biol.* 193:1065–1081.
24. Lesoine, J. F., J. Y. Lee, ..., J. Hwang. 2012. Quantitative scheme for full-field polarization rotating fluorescence microscopy using a liquid crystal variable retarder. *Rev. Sci. Instrum.* 85:053705.
25. Sund, S. E., J. A. Swanson, and D. Axelrod. 1999. Cell membrane orientation visualized by polarized total internal reflection fluorescence. *Biophys. J.* 77:2266–2283.
26. van Rheenen, J., and K. Jalink. 2002. Agonist-induced PIP₂ hydrolysis inhibits cortical actin dynamics: regulation at a global but not at a micrometer scale. *Mol. Biol. Cell.* 13:3257–3267.
27. Adler, J., A. I. Shevchuk, ..., I. Parmryd. 2010. Plasma membrane topography and interpretation of single-particle tracks. *Nat. Methods.* 7:170–171.
28. Byfield, F. J., H. Aranda-Espinoza, ..., I. Levitan. 2004. Cholesterol depletion increases membrane stiffness of aortic endothelial cells. *Biophys. J.* 87:3336–3343.
29. Gaus, K., E. Gratton, ..., W. Jessup. 2003. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:15554–15559.
30. Mahammad, S. S., J. J. Dinic, ..., I. Parmryd. 2010. Limited cholesterol depletion causes aggregation of plasma membrane lipid rafts inducing T cell activation. *Biochim. Biophys. Acta.* 1801:625–634.
31. Dinic, J., P. Ashrafzadeh, and I. Parmryd. 2013. Actin filaments attachment at the plasma membrane in live cells cause the formation of ordered lipid domains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1828:1102–1111.
32. Ferrand, P., M. Pianta, ..., D. Marguet. 2009. A versatile dual spot laser scanning confocal microscopy system for advanced fluorescence correlation spectroscopy analysis in living cell. *Rev. Sci. Instrum.* 80:083702.
33. Collett, E. 1993. Polarized Light: Fundamentals and Applications. CRC Press, Boca Raton, FL.
34. Wang, X., A. Kress, ..., P. Ferrand. 2013. High frame-rate confocal polarization resolved fluorescence microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 84:053708.
35. Bubbs, M. R., I. Spector, ..., K. M. Fosen. 2000. Effects of jasplakinolide on the kinetics of actin polymerization. An explanation for certain in vivo observations. *J. Biol. Chem.* 275:5163–5170.
36. Owen, D. M., C. Rentero, ..., K. Gaus. 2012. Quantitative imaging of membrane lipid order in cells and organisms. *Nat. Protoc.* 7:24–35.
37. Kwik, J., S. Boyle, ..., M. Edidin. 2003. Membrane cholesterol, lateral mobility, and the phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent organization of cell actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100:13964–13969.
38. Sun, M., N. Northup, ..., G. Forgacs. 2007. The effect of cellular cholesterol on membrane-cytoskeleton adhesion. *J. Cell Sci.* 120:2223–2231.
39. Lenne, P.-F., L. Wawrezinieck, ..., D. Marguet. 2006. Dynamic molecular confinement in the plasma membrane by microdomains and the cytoskeleton meshwork. *EMBO J.* 25:3245–3256.

Supporting Material

Mapping the local organization of cell membranes using excitation polarization resolved fluorescence microscopy

Alla Kress et al.

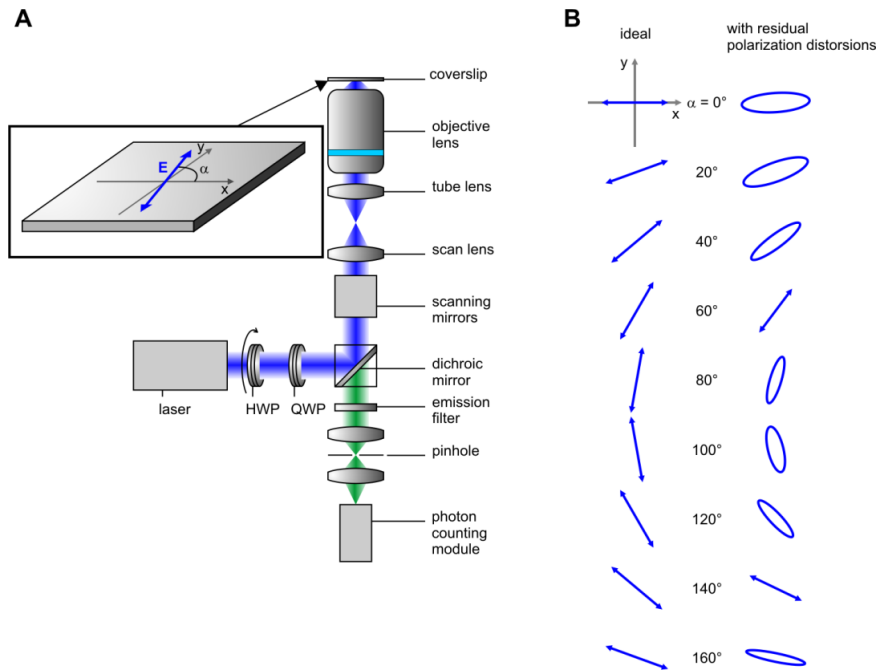


Figure S1. Polarization resolved fluorescence set-up, polarization distortion characterization and correction. (A) Scheme of the experimental setup. A half waveplate (HWP) mounted on a rotating stage allows to rotate sequentially the polarization state of the electric field in the sample plane. The quarter wave plate (QWP) is used to compensate the large amount of elliptical distortion brought by the dichroic mirror in the excitation path. (B) Left, ideal linearly polarized field. Right, residual polarization distortions after compensation by the QWP.

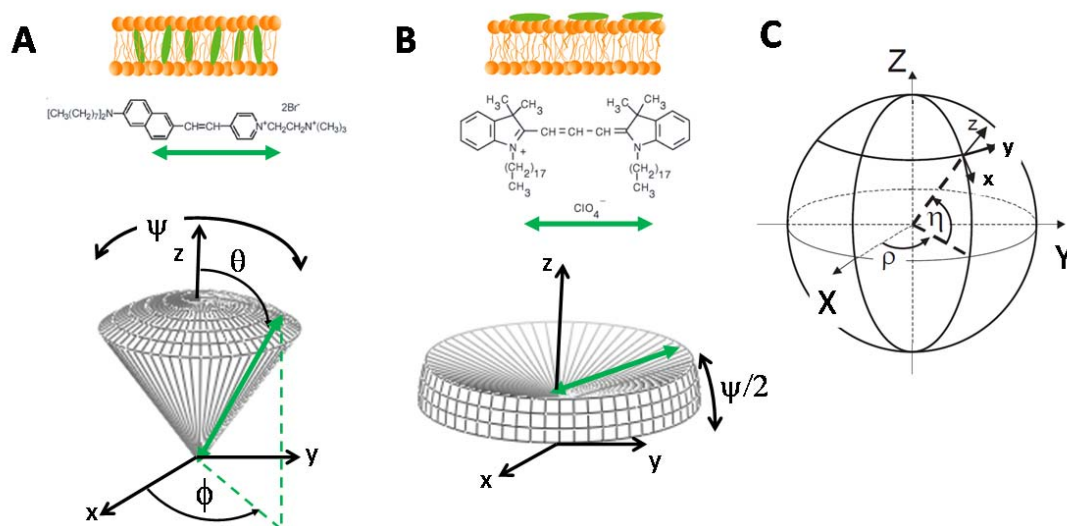


Figure S2. Definition of the orientation distribution function and angles used in the model. (A) di-8-ANEPPQ lipid probe orientation in the membrane leaflets (the green arrow represents the direction of its absorption transition dipole moment with respect to the molecule), orientation (θ, ϕ) of the molecules in the cone microscopic frame (x, y, z) . (B) DiIC₁₈ orientation along the membrane contour. (C) 3D orientation (ρ, η) of the distribution function in the (X, Y, Z) macroscopic frame. (X, Y) defines the sample plane in which the incident polarization lies, Z is the propagation direction.

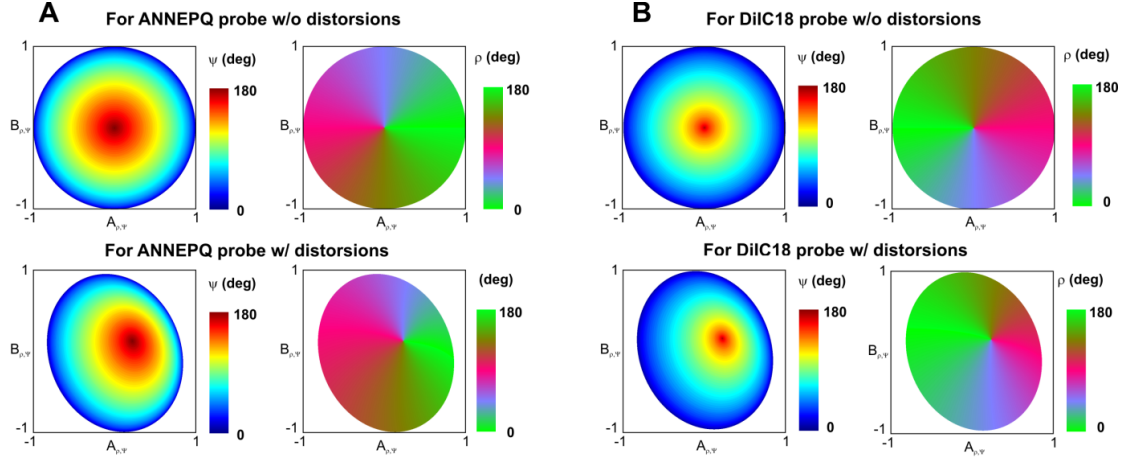


Figure S3. Reference maps for data processing. Simulated colormaps illustrating the unambiguous relationship between the coefficients (A, B) (coordinates) and the values (ρ, ψ) (color scale, angles are in degrees). (A) for the di-8-ANEPPQ lipid probe; (B) for the DiIC₁₈ lipid probe. Top: ideal optical system with no polarization distortions; bottom: with the polarization distortions of the system used in this work. This graphic representation shows that for any couple of values (A,B), there is a unique solution (ρ, ψ) (a direct read-out on the graphs leads to a unique color-value for ψ and a unique color-value for ρ). This solution can be found by minimizing differences between experimental (A,B) values and computed (A,B) values which are directly related to an expected (ρ, ψ) set of data.

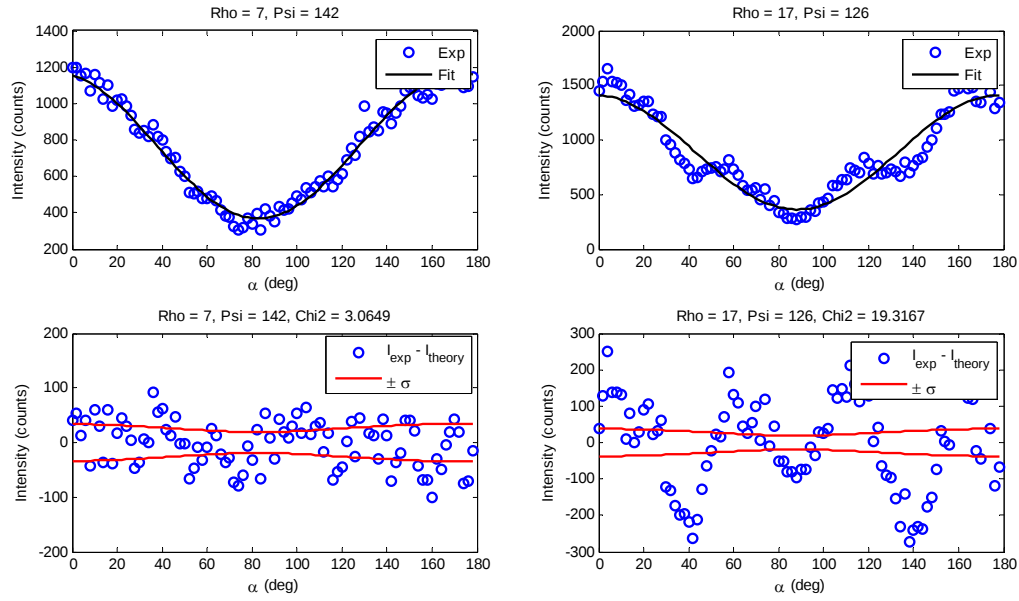


Figure S4. Illustration of the data filtering procedure. Raw data are plotted with blue circles. The fitting theoretical curve is displayed in black. Below: corresponding plot of the residuals $I_{\text{exp}} - I_{\text{theory}}$. The range $\pm$ the standard deviations is represented by red curves. Left: in this case, $\chi^2 = 3.1$ is below the rejection threshold. The retrieved values are $\psi = 142^\circ \pm 1^\circ$, $\rho = 7^\circ \pm 1^\circ$. Right: in this case, the measurement is affected by intensity fluctuations. The fit leads to $\chi^2 = 9$, which is above the rejection threshold. This dataset is discarded. Note that both cases (left and right) pass the “number of photon” test, since their total intensity is above the 5000 photons threshold. The difference between the two data is in their fit quality (χ^2 value), introduced to remove the data containing artifacts that would lead to a biased psi (fluctuations of the membrane, motion of the sample, defocusing, bleaching...).

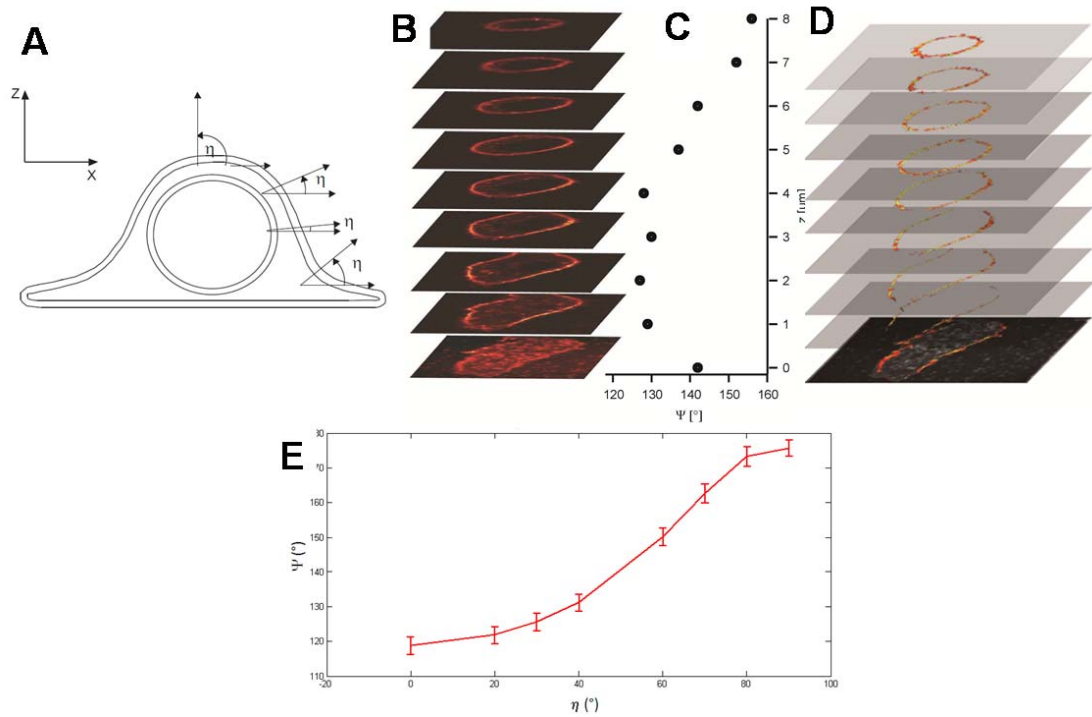


Fig. S5. Polarization resolved fluorescence measurements and simulations, out of the membrane equatorial plane. (A) definition of the out-of plane η angle in a cell membrane. (B) Fluorescence images of a COS-7 cell at different Z values above the sample adherence plane. (C) Average ψ value on the cell membrane contour, measured for each plane represented in (A). (D) Corresponding ψ images. (E) Simulation of biased ψ values from the modeled situation: $\psi = 120^\circ$, $\rho = 20^\circ$, for an increasing η from 0° to 90° . The data were generated using 5000 total number of photons. The error bars represent the standard deviation obtained from a set of 1000 simulated experiments generated with Poisson noise. ψ values are seen to vary only slightly for $\eta < 45^\circ$. The main reason for this is that the molecular-optical field coupling occurs in the sample plane; therefore the intensity of the fluorescence light becomes negligible if the molecules are out of plane, which makes the technique highly selective for in-plane processes. The information retrieved is consequently robust to out-of-plane orientations until tilt angles up to 45° (Fig. S9).

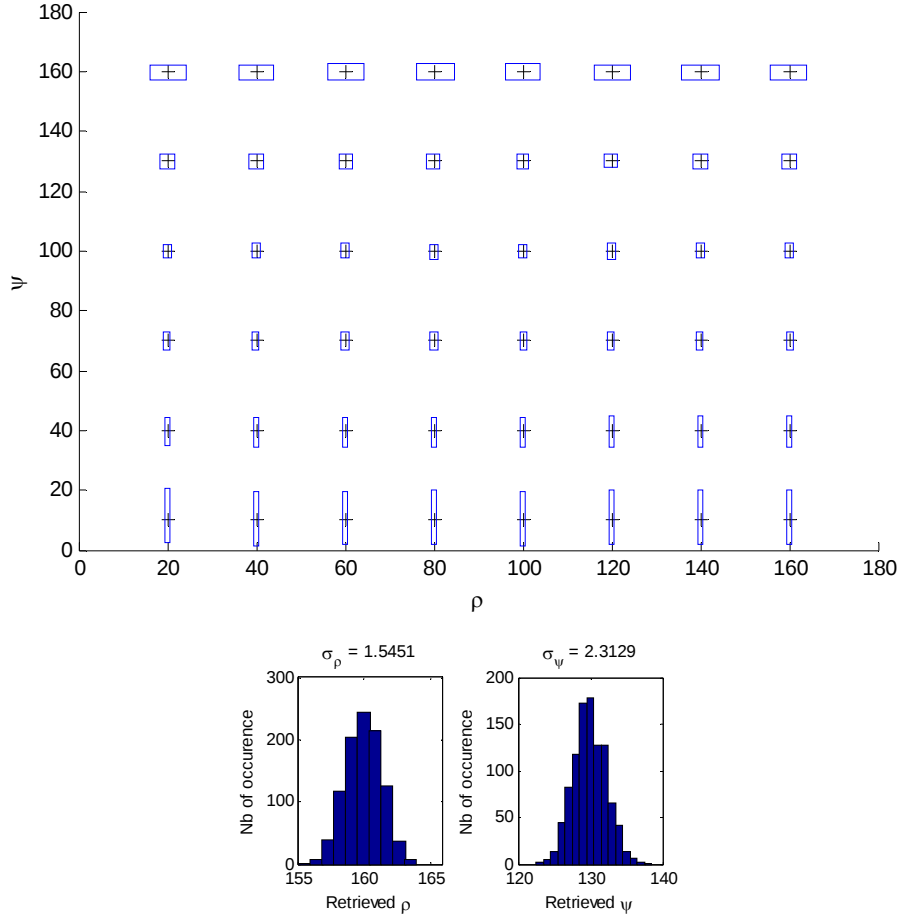


Fig. S6. Precision analysis. The precision of this method for measuring ρ and ψ has been assessed by means of Monte Carlo simulations. For a given set (ρ, ψ) , the theoretical dependence on α_k given by Eq. 1 has been simulated for a total intensity $I_0 = 5000$ counts. Using a Poisson random number generator, 1000 different artificial datasets have been generated, and processed by the method described above, allowing to measure the average values and standard deviations of the retrieved ρ and ψ values. These simulations have been performed for several starting sets (ρ, ψ) , and are summarized in this figure. Black crosses indicate the starting values (ρ, ψ) . The result is summarized by a rectangle whose center is located at the average of the retrieved values (ρ, ψ) . The full width (and height) of the rectangle corresponds to twice the standard deviation on ρ (on ψ , respectively). They show that in the range of ψ that is covered by this work, namely between 60° and 180° , the precision on ψ is better than 3° for this threshold intensity of 5000 counts. Moreover, this precision is getting better for higher intensities, since we have checked that it varies as $1/\sqrt{I_0}$. Histograms illustrate the retrieved values (ρ, ψ) for the case $\rho = 160^\circ$, $\psi = 130^\circ$, with the corresponding standard deviations.

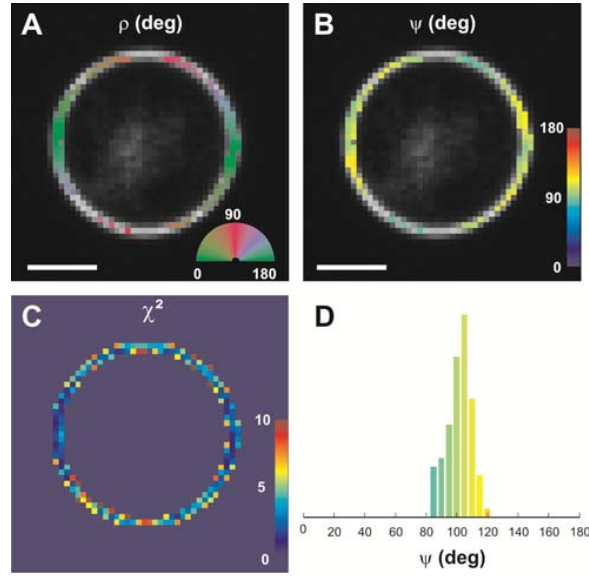


Fig. S7. Validation of the method in a homogeneous sample: Giant Unilamellar Vesicles. DOPC (1,2-dioleoyl-sn-3-phosphatidylcholine) Giant Unilamellar Vesicles (GUVs) were labeled with di-8-ANEPPQ. The GUVs were prepared by electroformation with a molecular ratio of lipid probes to DOPC lipids of 1:1000. Such sample should lead to a homogeneous distribution of molecular order (ψ) around a perfectly spherical membrane. (A) ρ -image superimposed with the fluorescence intensity image. (B) ψ -image. For all the GUVs measured (about 10), ψ is constant along the whole membrane contour with a value $\psi \sim 95^\circ$, with a standard deviation of 4° which is close to the value expected from a shot noise limited measurement. (C) image of the error factor χ^2 , showing possibly discarded pixels for which $\chi^2 > 5$. (D) Resulting histogram of ψ .

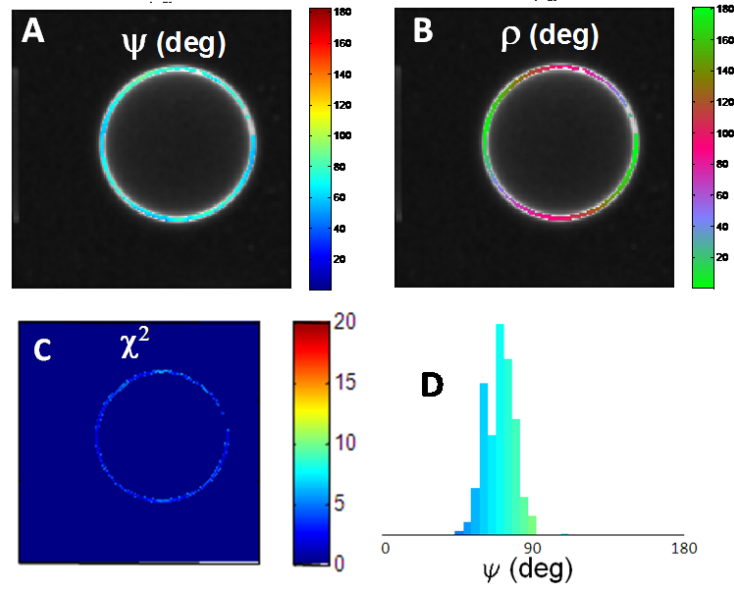


Fig. S8. Giant Unilamellar Vesicle labelled with DiI. DOPC GUVs were labeled with DiIC₁₈ using the same conditions as for Fig. S7. For all the GUVs measured (10), a mean value of $\psi \sim 70^\circ$ is obtained with a standard deviation of 6° . (C) image of the error factor χ^2 . (D) Resulting histogram of ψ . The data analysis uses here the model represented in Fig S2B.

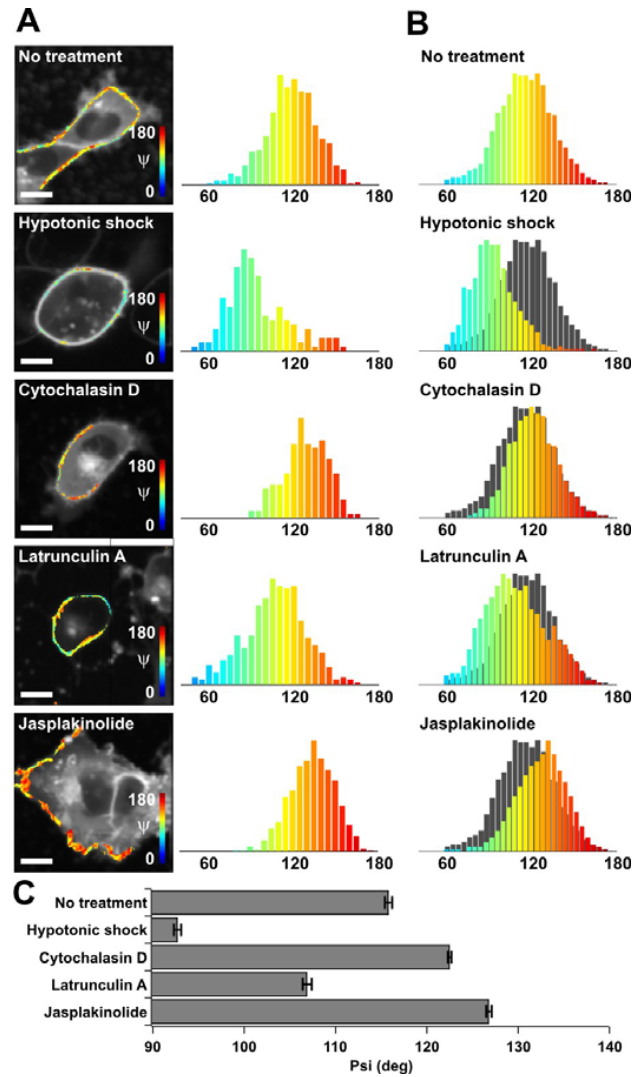


Fig. S9. Molecular order effect of actin perturbation in COS-7 cells labelled with DiIC₁₈. (A) ψ maps (superimposed to the fluorescence intensity image) and corresponding histograms for a typical cell, from top to bottom: no treatment, Hypotonic shock, Cytochalasin D, Latrunculin A, Jasplakinolide. (B) Histograms of the measured ψ values on 12 cells for each treatment (in grey: reference histogram with no treatment). (C) Average and SEM values represented for each treatment. All cases show significant differences ($P < 10^{-5}$). Scale bars: 10 μ m. The intensity fluorescence image in the case of Cytochalasin D shows visible patches along the membrane contour that can explain the higher disorder obtained in this case, *a priori* not expected.

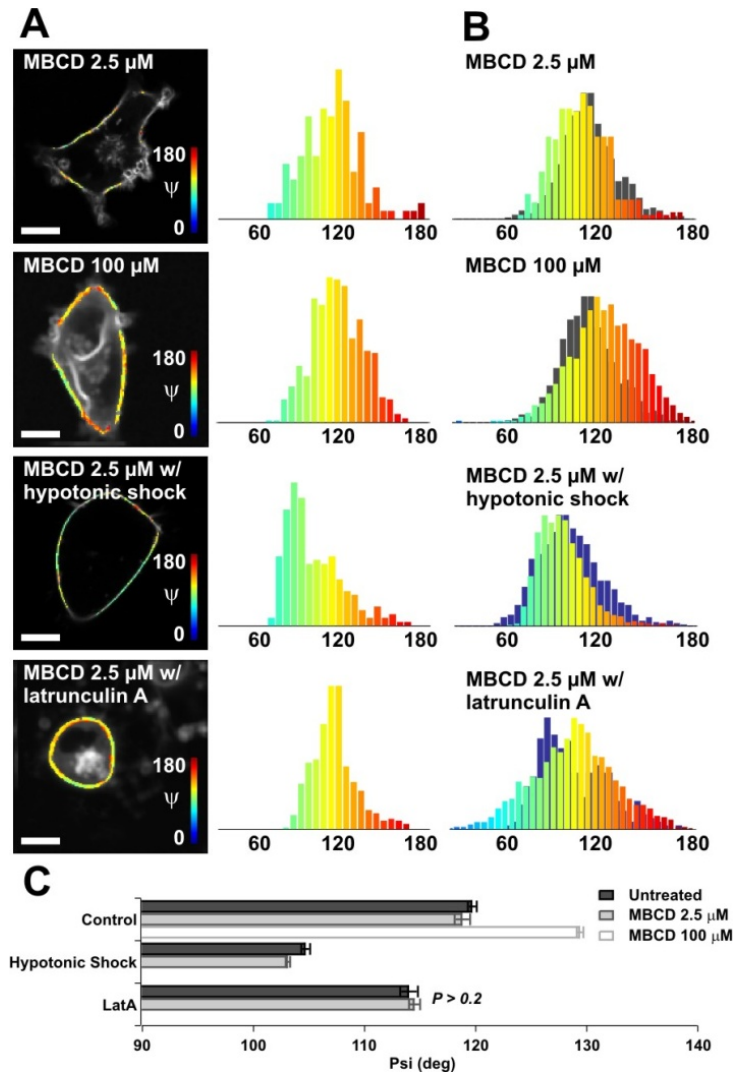


Fig. S10. Molecular order effect of cholesterol depletion in COS-7 cells labelled with di-8-ANEPPQ using methyl- β -cyclodextrin (MBCD) and combined treatments. (A) ψ maps (superimposed to the fluorescence intensity image) and corresponding histograms for a typical cell, from top to bottom: MBCD at 2.5 μ M, 100 μ M, and 2.5 μ M combined with hypotonic shock and latrunculin A (Lat A). (B) Histograms of the measured ψ values on 12 cells for each treatment (in grey: reference histogram with no cholesterol depletion, in blue: reference histogram (with hypotonic shock or Latrunculin A). (C) Average and SEM values represented for each treatment. All cases show significant differences ($P < 10^{-5}$) except for Lat A. Scale bars: 10 μ m.

Generalized Polarization (GP) results on di-8-ANEPPQ.

di-8-ANEPPQ is a styryl dye structurally and spectrally very similar to di-4-ANEPPDHQ (36), a lipid probe which undergoes strong spectral sensitivity to local polarity in the membrane. Such sensitivity was probed for di-8-ANEPPQ using a two-color simultaneous detection at 540nm and 675nm, similarly as for di-4-ANEPPDHQ (28aa). A simultaneous two-color detection imaging in conjunction with excitation polarization tuning was implemented using a dichroic mirror (BS605, Semrock) used for separation of the two wavelengths channels, one centered at 540nm and the other centered at 675nm (H675/100, Semrock), directed towards two avalanche photodiodes. The detection dichroic was seen to not induce any additional dichroism effect, the GP factor being homogeneous in DOPC GUVs and solutions. The generalized polarization factor (GP) is defined by a ratiometric comparison of the two color detected channels:

$$GP = \frac{I_{540} - I_{675}}{I_{540} + I_{675}}$$

The GP factor is measured only in pixels of the cells that have passed the selection for the orientational order ψ determination (see Fig. S4). For these pixels, an averaged GP is deduced from the accumulation of GP values over 10 cells (about 4000 pixels). The GP of all cells are compared to the one from untreated cells, set at value 0 for easier visualization (Fig. S10). Note that at the scale of an isolated cell, no strong correlation between GP and ψ at the pixel level is visible, which prevents any conclusion of clear interpretation of ψ as a lipid packing probe. This is most probably due to morphology effects which bring additional sources of disorder, but also to the relatively low efficiency of di-4-ANEPPDHQ as a lipid order probe (the shifts observed in GP upon cholesterol depletion are indeed not high as compared to values given for di-4-ANEPPDHQ in the literature (36)).

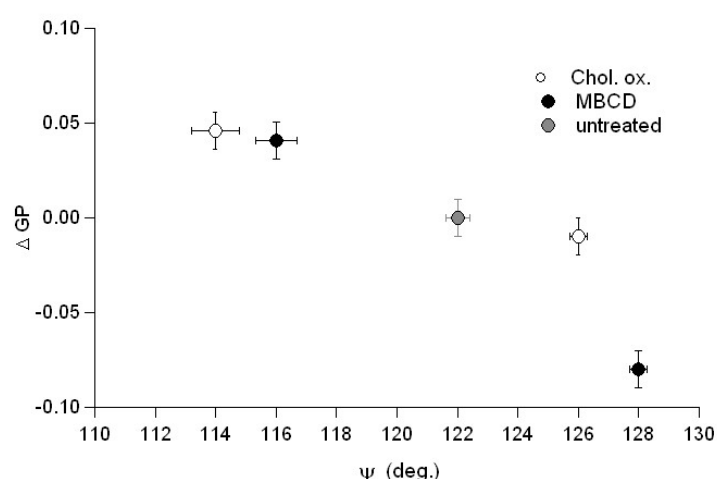


Fig. S11. Generalized Polarization (GP) results on di-8-ANEPPQ in cholesterol depleted cells.

Combined measurements of averaged ψ and GP for pixel populations taken over 10 cells. The psi

values are similar for both color channels. GP values are shown relative to untreated cells for which $GP = 0$. Data are shown for chol. ox treatments (white markers) at low (1 u/mL, low ψ value) and high concentration (5 u/mL, high ψ value), and for MBCD treatments (black markers) at low (2.5 μ M, low ψ value) and high concentration (100 μ M, high ψ value). The value obtained for untreated cells is shown for comparison (grey marker). Bars are SEM values over about 3000 pixels. The overall trend is a clear correlation between increasing GP values and decreasing ψ values.

Polarization distortions

Optical path	Element No	Orientation θ (°)	Diattenuation γ	Retardance δ (°)
Excitation	1	-16	0.28	22
	2	39	0.24	-20.5
Collection	3	79	0.20	140
	4	80	0	12
	5	127	0.2	12

Table S1. Summary of the characteristics of polarization distortions in the optical setup. The polarization distortions are modelled by introducing virtual distorting optical elements characterized by their orientation, diattenuation and retardance. The angle θ is the orientation of the fast axis of one optical element with respect to the horizontal axis X. The diattenuation ($1 - \gamma$) is the amplitude factor of the field along its slow axis. The retardance δ is the phase shift of the field introduced along its slow axis. All these elements are obtained by fitting the characteristic curves obtained by applying the quarter wave plate technique in the optical path of the set-up, for different angles α of the incident linear polarization. For the excitation path, two elements were necessary to reproduce the measured distortions. For the detection path, three elements were necessary.

Accounting for polarization distortions in the model

The steady state fluorescence intensity emitted by an ensemble of dipoles which orientation is contained within an angular distribution function $f_\psi(\theta, \varphi)$ is written as:

$$I_{\rho,\psi,\eta}(\alpha) = \int_0^{2\pi} d\varphi \int_0^\pi d\theta \sin \theta |\vec{\mu}(\theta, \varphi, \rho, \eta) \cdot \vec{E}(\alpha)|^2 f_\psi(\theta, \varphi) J(\theta, \varphi, \rho, \eta)$$

Two types of polarization distortions should be accounted for in this equation:

Excitation path distortions

To account for the distortions undergone by the excitation field $\vec{E}$, we replace the non distorted field (expressed here in the laboratory frame)

$$E(\alpha) = E_0 \begin{pmatrix} \cos \alpha \\ \sin \alpha \\ 0 \end{pmatrix}$$

Where E_0 is the field amplitude, by:

$$E(\alpha) = E_0 M_{exc} \cdot \begin{pmatrix} \cos \alpha \\ \sin \alpha \\ 0 \end{pmatrix}$$

Where M is the matrix product $M_{exc} = M_1(\gamma_1, \delta_1, \theta_1) \cdot M_2(\gamma_2, \delta_2, \theta_2)$, which accounts for the distortion parameters $(\gamma_i, \delta_i, \theta_i)$ summarized in Table S1 for the equivalent optical elements $i=1,2$ acting as polarization distortion sources (phase plates) in the excitation path, with:

$$M_i(\gamma_i, \delta_i, \theta_i) = \begin{pmatrix} \cos \theta_i & -\sin \theta_i & 0 \\ \sin \theta_i & \cos \theta_i & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & (1 - \gamma_i)e^{i\delta_i} & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \cos \theta_i & \sin \theta_i & 0 \\ -\sin \theta_i & \cos \theta_i & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$$

Detection path distortions

In the detection path, the function $J(\theta, \varphi, \rho, \eta)$ is the quantity affected by polarization distortions since it contains the information on how the radiation of emission dipoles is modified by optical elements acting as phase plates. Following the same methodology and notations introduced in (13), this function is re-calculated to account for the polarization distortions occurring in the detection

path of the microscope. After calculating how emission dipoles' radiation fields are affected by the equivalent phase plates summarized in Table S1, it is found that $J(\theta, \varphi, \rho, \eta) = J_X(\theta, \varphi, \rho, \eta) + J_Y(\theta, \varphi, \rho, \eta)$ is the sum of two polarized analysis X (horizontal) and Y (vertical) fluorescence emission components, which can be expressed as follows:

$$J_X(\theta, \varphi, \rho, \eta) = (|M_{11}|^2 K_c + |M_{12}|^2 K_b) \mu_X^2 + (|M_{11}|^2 K_b + |M_{12}|^2 K_c) \mu_Y^2 + (|M_{11}|^2 + |M_{12}|^2) K_a \mu_Z^2 + K (M_{11} M_{12}^* + M_{11}^* M_{12}) \mu_X \mu_Y$$

$$J_Y(\theta, \varphi, \rho, \eta) = (|M_{21}|^2 K_c + |M_{22}|^2 K_b) \mu_X^2 + (|M_{21}|^2 K_b + |M_{22}|^2 K_c) \mu_Y^2 + (|M_{21}|^2 + |M_{22}|^2) K_a \mu_Z^2 + K (M_{21} M_{22}^* + M_{21}^* M_{22}) \mu_X \mu_Y$$

where (K_a, K_b, K_c) are polarization coupling factors which depend on the numerical aperture of the objective ($n \cdot \sin \sigma_0$) as defined in (13), and K an additional parameter representative of an additional emission polarization cross talk due to collection path distortions: $K = -\frac{1}{6}(\cos^3 \sigma_0 + 3 \cos^2 \sigma_0 + 3 \cos \sigma_0 - 7)$. M_{mn} are the matrix elements of the product $M = M_3(\gamma_3, \delta_3, \theta_3) \cdot M_4(\gamma_4, \delta_4, \theta_4) \cdot M_5(\gamma_5, \delta_5, \theta_5)$, which depends on the distortion parameters $(\gamma_i, \delta_i, \theta_i)$ summarized in Table S1 for all optical elements $i=3,4,5$ acting as polarization distortion sources in the detection path.

Ultimate Use of Two-Photon Fluorescence Microscopy to Map Orientational Behavior of Fluorophores

Patrick Ferrand,* Paulina Gasecka, Alla Kress, Xiao Wang, Fatma-Zohra Bioud, Julien Duboisset, and Sophie Brasselet

Aix-Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, Institut Fresnel UMR 7249, Marseille, France

ABSTRACT The orientational distribution of fluorophores is an important reporter of the structure and function of their molecular environment. Although this distribution affects the fluorescence signal under polarized-light excitation, its retrieval is limited to a small number of parameters. Because of this limitation, the need for a geometrical model (cone, Gaussian, etc.) to effect such retrieval is often invoked. In this work, using a symmetry decomposition of the distribution function of the fluorescent molecules, we show that polarized two-photon fluorescence based on tunable linear dichroism allows for the retrieval of this distribution with reasonable fidelity and without invoking either an a priori knowledge of the system to be investigated or a geometrical model. We establish the optimal level of detail to which any distribution can be retrieved using this technique. As applied to artificial lipid vesicles and cell membranes, the ability of this method to identify and quantify specific structural properties that complement the more traditional molecular-order information is demonstrated. In particular, we analyze situations that give access to the sharpness of the angular constraint, and to the evidence of an isotropic population of fluorophores within the focal volume encompassing the membrane. Moreover, this technique has the potential to address complex situations such as the distribution of a tethered membrane protein label in an ordered environment.

INTRODUCTION

Fluorescence microscopy is able to explore complex cellular processes in isolated cells and tissues, with a high potential to image dynamical processes at a nanoscale spatial resolution. The complementary use of light polarization in fluorescence imaging, introduced decades ago to measure molecular orientational behaviors (1), is an evolving field, mostly due to its apparent complexity in terms of technical implementation as well as data analysis and interpretation.

Technically, polarized microscopy schemes were initially proposed based on the use of two states of polarization, either on the excitation path (linear dichroism) (2,3), on the detection path (fluorescence anisotropy) (1,4,5), or on both excitation and detection paths (6–8). These schemes are, however, limited in their imaging capability; indeed, two directions of excitation polarization impose a geometry that does not give access to all possible orientations in an ordered sample, whereas analyzing the fluorescence light polarization along a given direction is very sensitive to depolarization mechanisms such as energy transfer (9) or scattering of the emitted light in turbid media (10). One way to overcome these limitations that is compatible with microscopy imaging is to vary the excitation polarization state in a tunable linear dichroism scheme, with no analyzer in the detection path. However, implementation of such a technique necessitates ensuring a fine control of the polarization at the focal spot of the objective lens (11–13), which is possible only if polarization distortions are characterized

and compensated for (14,15). This scheme shows the possibility of imaging molecular order based on one-photon, two-photon, and three-photon fluorescence processes in molecular assemblies such as lipid probes in living cells (12), receptor proteins in cell membranes (16,17), protein aggregates in amyloid fibrils (18), and protein crystals (19).

In addition to this technical specificity, the interpretation of polarized fluorescence signals requires modeling the associated physical process, including molecular orientational behaviors. Polarized excitation implies coupling between excitation dipoles that fluctuate in orientation (Fig. 1 *a*) and a tunable incident polarization. Although this process is dynamic in time and is spatially distributed, the result of the measurement is an average over the integration time and the spatial scale of the focal volume, leading to a steady-state-like observation. Individual orientations and positions thus cannot be resolved in ensemble measurements, and the measured quantity is rather an angular distribution, $f(\theta, \varphi)$, representing the statistical occurrence of molecules at given orientation angles, as illustrated in Fig. 1 *b*. To date, interpreting polarized fluorescence data has been based primarily on a priori known models of this angular distribution, invoking quite simple molecular-disorder mechanisms. For instance, lipid probes in cell membranes have been supposed to follow a Gaussian or Cone-like angular constraint, both of which encompass interactions with their local environment (11,12,20–22) as well as sub-resolution-scale membrane morphological features (12) (Fig. 1, *b* and *c*). In this context, the ability of polarized fluorescence microscopy to probe changes in lipid membrane composition (as induced, for example, by cholesterol depletion (12,20)), cytoskeleton degradation,

Submitted February 11, 2014, and accepted for publication April 8, 2014.

*Correspondence: patrick.ferrand@fresnel.fr

Editor: Paul Wiseman.

© 2014 by the Biophysical Society
0006-3495/14/06/2330/10 \$2.00

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2014.04.011>



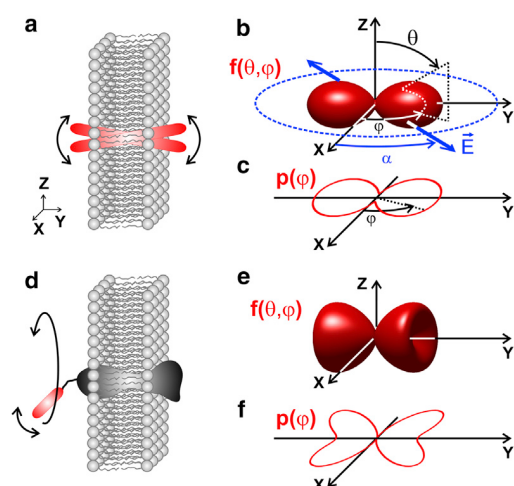


FIGURE 1 (a) Orientational freedom of a single fluorescent probe in a membrane. (b) Space- and time-averaging in an ensemble of probes are described by a 3D distribution, $f(\theta, \phi)$, of single dipoles oriented with angles (θ, ϕ) , as probed by the electric field. (c) Corresponding 2D effective angular distribution, $p(\phi)$, given by Eq. 4. (d) A single fluorescent dipole linked to a membrane protein with a given angular constraint in the membrane. (e) Corresponding ensemble averaging orientation in a 3D distribution. (f) 2D effective distribution. To see this figure in color, go online.

and modification of the membrane tension (12) has been demonstrated. Although quantitative results can be depicted, the models invoked here are based on a priori knowledge about molecular statistical disorder behavior. Lipid probe orientations can be addressed by quite simple models, but the case of labeled proteins in cell membranes, where the angular constraint is governed by the orientational freedom of the link between the label and the protein, possible protein conformational changes, orientational constraints undergone by the protein inside the membrane, and the orientational disorder imposed by the membrane local morphology, is a more complex issue. Fig. 1, *d–f*, displays an example of such a case, where it is clear that there are more unknown parameters compared to the lipid-probe case depicted in Fig. 1, *a–c*. Until now, such a situation has been treated using both excitation/detection polarization paths as mentioned above (7) or pure linear dichroism, which provides only qualitative information (3).

It becomes clear from these examples that a precise investigation of biomolecular organization using the orientation of fluorophores as a reporter requires that the orientational constraint model reproduce a realistic situation with the highest fidelity. However, investigating complex systems such as that represented in Fig. 1 *d* necessitates the introduction of an increasing number of unknown parameters and an increasing level of angular detail, not all of which is accessible using polarized fluorescence techniques. Mathematically, a high level of detail corresponds to high angular frequencies and therefore to high orders of symmetry in the angular description of the distribution function $f(\theta, \phi)$. In distributions that exhibit cylindrical symmetry, only the

θ -dependence is relevant, and it is generally represented by Legendre-polynomial-averaged quantities (6,7,23–25). It is known that compared to linear optical processes, high-order nonlinear excitation processes, which benefit from more refined angular photoselections (26,27), give access to a higher order of symmetry (27–29). The use of polarized two-photon (11,20,28,30) or three-photon excitation fluorescence (19) has benefited from this approach. However, it has not yet been possible to take full advantage of the interpretation of high symmetry orders in fluorescence imaging, because such interpretation is restricted to simple angular distribution models (11,20,22). In addition, the few existing works that have aimed at exploiting this information to provide a finer degree of analysis of the orientational behavior of fluorophores have been performed at the scale of the sample (cuvette or membrane) (6,7,23–25,28), a scale at which it is not possible to investigate complex samples. Nevertheless, these analyses have contributed to the discovery of the coexistence of two orientational populations (parallel and perpendicular to the membrane) of the 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene (DPH) fluorescent probe in lipid vesicles (24,25).

The aim of this work is to provide high-order symmetry information in fluorescence imaging, where all locations of a sample can be explored at a diffraction-limited scale. We develop a theoretical framework of polarized two-photon fluorescence based on tunable linear dichroism, using a symmetry decomposition of the distribution function of the fluorescent probes that relies on circular angular functions. This decomposition makes it possible to avoid assumptions based on a priori knowledge about the molecular disorder distribution, particularly distributions that are not of cylindrical symmetry. Using this approach, it is also possible to establish the optimal level of detail at which any angular distribution can be retrieved using two-photon tunable linear dichroism. We show mathematically that a minimum of five polarization measurements is needed to reach this optimal level. We propose a data-processing method that provides an accurate picture of the orientational distribution up to the fourth-order symmetry at each pixel of the image. We show that the obtained symmetry parameters can be related to physical properties of molecular angular distribution functions, such as angular width (disorder), steepness (sharpness of the angular constraint potential), and shape (hollow versus filled angular spread). This method can be easily implemented on any two-photon microscope system and is based on simple arithmetic operations.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

Multilamellar vesicles (MLVs) were made from 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine lipid (DPPC) (31) mixed with a 1 mM solution of di-8-ANEPPQ in absolute ethanol to obtain a 1% w/w of di-8-ANEPPQ. Thin films were hydrated in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for 1 h above

the main phase-transition temperature (45°C), leading to formation of 1- to 30- μm MLVs. The sample was placed between two spaced coverslips.

Experiments in cells were carried out on fibroblastlike COS-7 cells (CRL-1657, American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA). COS-7 cells were grown in an incubator at 37°C in Lab-Tek chambers (Nunc, Rochester, NY) in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Saint Aubin, France) completed by 10% fetal bovine serum and 1% sodium pyruvate. Cells were washed and kept in Hanks buffered salt solution containing 10 mM HEPES (HBSS/HEPES), pH 7.4, at 37°C, for the duration of the imaging process. They were labeled with di-8-ANEPPQ directly before measurements. For labeling, cells were washed and incubated in insertion buffer (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 5 mM glucose, and 10 mM HEPES) with 1 μM di-8-ANEPPQ for 2 min at room temperature. After incubation, cells were washed again and kept in HBSS/HEPES at 37°C throughout the imaging process.

Two-photon microscope

The polarization-resolved two-photon tunable linear dichroism setup is based on an inverted two-photon excitation fluorescence microscope. A Ti:Sapphire laser beam (wavelength 900 nm, pulse duration 150 fs, repetition rate 80 MHz, Coherent, Inc., Santa Clara, CA) is reflected on a dichroic mirror (650DCXP, Chroma, Rockingham, VT) and focused onto the sample by a high-NA objective lens (CFI Apo Lambda S LWD, 40 $\times$, NA 1.15, water immersion, Nikon, Tochigi, Japan), reaching a lateral optical resolution of ~ 300 nm with an average power of ~ 5 mW. Fluorescence images are obtained by scanning the focused beam in the sample plane using galvanometric mirrors (6200H, Cambridge Technology, Lexington, MA), with a typical dwell time of 100 μs /pixel. The fluorescence light is collected in the backward direction by the same objective lens, spectrally filtered (HQ540/80M-2P, Chroma, Bellows Falls, VT), and recorded by a photon-counting module (MP-973, PerkinElmer Optoelectronics, Santa Clara, CA). For polarization-resolved measurements, the linear incident polarization is rotated in the sample plane using a half-wave plate (AHWPM05M-980, Thorlabs, Newton, NJ) mounted in a rotation stage (PR50CC, Newport, Irvine, CA) placed just before the objective lens. Images are recorded for each linear incident polarization angle, α , scanned in regular steps between 0° and 180° relative to the horizontal sample direction, x . The linearity of the incident polarization state, as well as the polarization distortions occurring in the detection path, are ascertained by a control measurement according to a methodology developed by Kress, Wang, and colleagues (12,13). Since the rotating half-wave plate is placed after the reflection dichroic mirror, negligible distortion is measured in the excitation path. Since detection is unpolarized, the only parameter relevant here, diattenuation, is negligible in the detection path.

Data processing and display

Raw data, consisting of image stacks of photon counts (where the third dimension corresponds to the angle α), were processed using a program written in Matlab. Background signal, although very weak, was systematically measured in a dark area of the image and subtracted from the data set. In the case of weak signals, photon counts were summed up with the eight-neighbor pixels. Then, numerical values of parameters S_2 , φ_2 , $S_4^{(s)}$, and $S_4^{(a)}$ (see definitions in the Theory section) were directly computed at every pixel of interest by applying Eqs. 10–16. Data points were subsequently filtered, following the same approach as described in Kress et al. (12). In the results presented here, the criteria were 1), a total number of photons, $I_0 = \sum_{i=1}^N I(\alpha_i)$, larger than 5000, to ensure a reasonable precision on the retrieved parameters (12); 2), a normalized χ -square value < 3 , a value that was found to discard data affected by signal instabilities such as sample drift, photobleaching, etc. For selected points, displayed filtered-out distribution, $\tilde{p}(\varphi)$, was calculated as $\tilde{p}(\varphi) = 1 + S_2 \cos[2(\varphi - \varphi_2)] + S_4^{(s)} \cos[4(\varphi - \varphi_2)] + S_4^{(a)} \sin[4(\varphi - \varphi_2)]$. Maps of the total intensity, I_0 ,

the symmetry order parameters, and the χ -square values are provided in the [Supporting Material](#) for all investigated samples.

Numerical simulations

The numerical data set (see Results) was generated using a cone model of aperture ψ for the effective distribution function (see definition in the Theory section), defined as

$$p(\varphi) = \begin{cases} 1, & \text{if } |\varphi| \leq \psi/2 \\ 0, & \text{else,} \end{cases} \quad (1)$$

where $-\pi < \varphi < \pi$, and $\varphi = 0$ corresponds to the direction locally perpendicular to the membrane. The fluorescence intensity $I(\alpha)$ was calculated at every pixel of the membrane by means of Eq. 3, scaled in agreement with the desired value of I_0 , and an artificial photon-counting noise was added using a Poisson random number generator.

THEORY

Fluorescence response from an ensemble of dipoles under polarized excitation

In the model, the excitation light, $\vec{E}$, is assumed to be linearly polarized in the sample plane, oriented by an angle α with respect to the horizontal x axis, as illustrated in [Fig. 1 c](#). The polarization dependence of the collected two-photon fluorescence intensity in a steady-state regime can be written as (11)

$$I(\alpha) \propto \int_0^\pi d\theta \sin \theta \int_0^{2\pi} d\varphi |\vec{\mu}(\theta, \varphi) \cdot \vec{E}(\alpha)|^4 f(\theta, \varphi) J(\theta), \quad (2)$$

where the $\propto$ sign encompasses intensity factors and collection efficiency. $f(\theta, \varphi)$ is the averaged orientational distribution function of fluorophores, defined by their 3D orientation (θ, φ) in the macroscopic sample frame. $\vec{\mu} = \mu(\sin \theta \cos \varphi, \sin \theta \sin \varphi, \cos \theta)$ is the absorption dipole vector of the fluorophores, θ is their angle with respect to the z axis perpendicular to the sample plane, and φ is the angle of their (x, y) sample-plane projection with respect to the x axis. The factor $J(\theta)$ is the detection probability of fluorescence that takes into account the out-of-plane orientation, θ , of the dipole and the numerical aperture of the objective lens, as introduced in Axelrod (1) and further adapted in Kress et al. (12) for unpolarized detection. We assume here that the incident polarization lies in the sample plane with $\vec{E} = (\cos \alpha, \sin \alpha, 0)$. Note that a high-NA focusing does not maintain linear polarization over the entire focal volume, with a contribution of longitudinal polarization of $\sim 40\%$ relative to the in-plane component appearing in its border (32). This contribution is, however, negligible here, since the excitation-field amplitude is brought to the fourth power in Eq. 2.

Due to the in-plane nature of the excitation field, only in-plane components of the $\vec{\mu}$ vector will contribute to

Eq. 2, leading to a separation of the variables θ and φ in the dot product. We therefore define an effective 2D distribution function, $p(\varphi)$, so that Eq. 2 can be written as

$$I(\alpha) \propto \int_0^{2\pi} |\vec{\mu}^{2D}(\varphi) \cdot \vec{E}(\alpha)|^4 p(\varphi) d\varphi \quad (3)$$

$$\propto \int_0^{2\pi} \cos^4(\varphi - \alpha) p(\varphi) d\varphi,$$

with $\vec{\mu}^{2D}(\varphi) = \mu(\cos \varphi, \sin \varphi, 0)$ and

$$p(\varphi) = \int_0^\pi f(\theta, \varphi) \sin^5(\theta) J(\theta) d\theta. \quad (4)$$

The effective distribution function $p(\varphi)$ is not a sample-plane projection of the 3D function $f(\theta, \varphi)$, nor of its 2D section. As is apparent in Eq. 4, it is an integrated function over all out-of-plane contributions, weighted by the photo-excitation effect, and it strongly emphasizes responses from fluorophores lying in the sample plane, as illustrated in Fig. 1, *c* and *f*. For functions with a cylindrical symmetry axis lying in that plane, the shape of $p(\varphi)$ describes well the angular constraint behavior undergone by the fluorophores, making it a valuable reporter of molecular order.

Symmetry decomposition of the effective distribution function

The angular distribution function $p(\varphi)$ is intrinsically periodic with a period of 2π . Without loss of generality, it can therefore be expanded as an infinite circular decomposition resembling an infinite Fourier series,

$$p(\varphi) = p_0 \left[1 + \sum_{n=1}^{+\infty} S_n \cos[n(\varphi - \varphi_n)] \right], \quad (5)$$

that is characterized by an infinite set of parameters S_n and φ_n . The parameter S_n , which denotes a molecular order parameter of n th symmetry or n th symmetry order, characterizes the amplitude of this symmetry order in the effective distribution function. The angle φ_n refers to its orientation in the sample plane.

Inserting Eq. 5 into Eq. 3, using orthogonality properties of cosine functions, allows us to write $I(\alpha)$ as

$$I(\alpha) \propto 1 + \frac{2S_2}{3} \cos[2(\alpha - \varphi_2)] + \frac{S_4}{6} \cos[4(\alpha - \varphi_4)]. \quad (6)$$

This equation establishes that the two-photon fluorescence intensity is exclusively sensitive to the second and fourth symmetry orders of the effective distribution, $p(\varphi)$. To illustrate how these parameters are related to $p(\varphi)$, Fig. 2 shows various cases of arbitrary distributions $p(\varphi)$ together with the angular features carried by the second and fourth symmetry orders. It appears clearly that the second symmetry order carries mainly information about the directionality of the distribution, quantified by the value of S_2 and its over-

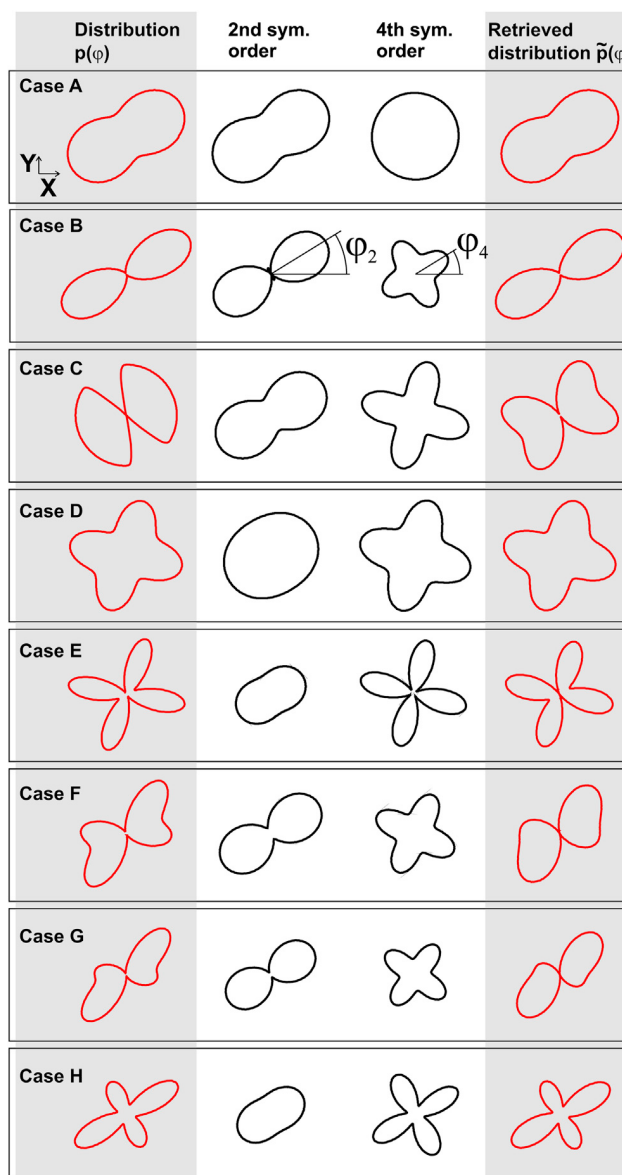


FIGURE 2 Several examples of effective orientation distributions, $p(\varphi)$ (first column), angular features carried by the second and fourth symmetry orders (second and third columns, respectively), and filtered-out angular distribution, $\tilde{p}(\varphi)$, as seen by two-photon fluorescence (fourth column). To see this figure in color, go online.

all orientation angle, φ_2 . The fourth symmetry order, quantified by S_4 , because of its fourfold symmetry, oriented along the direction φ_4 , reveals an additional level of detail about the shape of the distribution, either the peaked nature of the distribution (Fig. 2 B), its abrupt variations (Fig. 2, C and E), or its asymmetry (Fig. 2, F and G). The right column in Fig. 2 shows how these distributions are filtered out by two-photon fluorescence, by plotting the filtered-out distribution $\tilde{p}(\varphi)$, obtained from $p(\varphi)$ by limiting the sum of Eq. 5 to the terms $n = 2$ and $n = 4$ only. In most of the cases, $\tilde{p}(\varphi)$ reproduces the main features of $p(\varphi)$ with high fidelity,

meaning that limiting the distribution function to its second and fourth symmetry orders brings already a high level of information about its shape. This decomposition of the distribution function allows us in particular to manipulate characteristic parameters (symmetry orders and orientations) without needing to invoke a priori known shapes of molecular angular constraint.

Note that one-photon fluorescence, governed by a photo-excitation term, $|\vec{\mu}(\theta, \varphi) \cdot \vec{E}(\alpha)|^2$ in Eq. 2, is only sensitive to the second symmetry order ($n = 2$), so that angular distributions are only seen through this single symmetry order. As illustrated in the second column of Fig. 2, the second symmetry order provides a limited level of information, which can lead to strong ambiguities between possible retrieved distributions, for example, in Fig. 2, *A* versus *C*, *F* versus *G*, or *D* versus *E*.

Retrieval of symmetry order parameters

According to Eq. 6, retrieving orientational distribution information by means of two-photon fluorescence can be reduced to the determination of four parameters, namely, S_2 , φ_2 , S_4 , and φ_4 . Fourier algebra provides an elegant way to solve this problem without invoking complex fitting procedures. Using the periodicity of $I(\alpha)$, we write it as a Fourier series,

$$I(\alpha) \propto 1 + \sum_{k=1}^{+\infty} [A_k \cos(k\alpha) + B_k \sin(k\alpha)], \quad (7)$$

where nonzero terms are only for $k = 2$ and $k = 4$, in agreement with Eq. 6. If the measurement is performed at N discrete angles regularly spaced, $\alpha_1 = 0, \dots, \alpha_i = (i-1)\pi/N, \dots, \alpha_N = (N-1)\pi/N$ (in radians), the Fourier coefficients of the measured signal are given by

$$A_k = \frac{2}{I_0} \sum_{i=1}^N I(\alpha_i) \cos(k\alpha_i) \quad (8)$$

$$B_k = \frac{2}{I_0} \sum_{i=1}^N I(\alpha_i) \sin(k\alpha_i), \quad (9)$$

where $I_0 = \sum_{i=1}^N I(\alpha_i)$, so that the distribution parameters are directly obtained using

$$S_2 = \frac{3}{2} \sqrt{A_2^2 + B_2^2}, \quad (10)$$

$$S_4 = 6 \sqrt{A_4^2 + B_4^2}, \quad (11)$$

$$\varphi_2 = \frac{1}{2} \arctan(B_2, A_2), \quad (12)$$

$$\varphi_4 = \frac{1}{4} \arctan(B_4, A_4), \quad (13)$$

where arctan denotes here the four-quadrant inverse tangent function. One can show mathematically that Eqs. 8 and 9, which use a discrete sum to compute Fourier coefficients instead of continuous integrals, are valid for $N \geq 5$ in our specific case, where we only consider $k = 2$ and $k = 4$.

Equations 10–13 show that the order parameters S_2 , S_4 , φ_2 , and φ_4 can be independently obtained from the measured intensity, $I(\alpha_i)$. They play distinct roles in the description of the angular distribution, as discussed above. In particular, the second order governs the directionality of this function. This can be emphasized by writing Eq. 6 so that all angular dependences are written relative to φ_2 ,

$$I(\alpha) \propto 1 + \frac{2}{3} S_2 \cos[2(\alpha - \varphi_2)] + \frac{1}{6} S_4^{(s)} \cos[4(\alpha - \varphi_2)] + \frac{1}{6} S_4^{(a)} \sin[4(\alpha - \varphi_2)], \quad (14)$$

with

$$S_4^{(s)} = S_4 \cos[4(\varphi_4 - \varphi_2)], \quad (15)$$

$$S_4^{(a)} = S_4 \sin[4(\varphi_4 - \varphi_2)]. \quad (16)$$

It is clear in Eq. 14 that 1), the angle φ_2 , which reports on the main orientation of the distribution, introduces an angular shift of the response; and 2), the three remaining parameters, S_2 , $S_4^{(s)}$ (where superscript *s* denotes symmetric), and $S_4^{(a)}$ (where superscript *a* denotes antisymmetric) describe the shape of the distribution independent of its orientation φ_2 in the sample plane. Fig. 3 depicts the values of these parameters, plotted for each case of Fig. 2, showing their distinct roles. $S_4^{(a)}$ is nonvanishing only for asymmetric distributions (e.g., Fig. 2, cases *F* and *G*). In the case of a symmetric distribution, $(\varphi_4 - \varphi_2)$ is indeed either 0 or 45° , leading to $S_4^{(a)} = 0$. In contrast to previously used decompositions based on Legendre polynomials, the circular decomposition of the effective distribution function therefore provides information on the magnitude of its symmetry orders

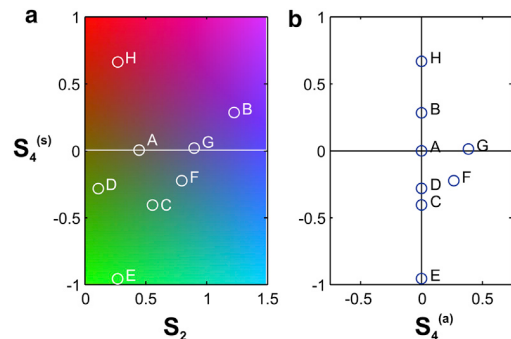


FIGURE 3 Plot of the values of S_2 , $S_4^{(s)}$, and $S_4^{(a)}$ for each distribution case in Fig. 2. (a) Plot projected in the $(S_2, S_4^{(s)})$ plane. (b) Plot projected in the $(S_4^{(a)}, S_4^{(s)})$ plane. To see this figure in color, go online.

(S_2 , $S_4^{(s)}$), on its global orientation, φ_2 , but also on its departure from cylindrical symmetry (magnitude of $S_4^{(a)}$), which is useful information in the case of strongly distorted orientational mechanisms. In the examples given in Fig. 2, only cases F and G exhibit this property, with a more pronounced departure to symmetry for G, as emphasized by its stronger $S_4^{(a)}$ component.

RESULTS

Numerical simulations

To quantify its precision, the method proposed here was tested on a simulated data set, mimicking a spherical membrane, in which a fluorescent probe was inserted along the lipid direction. The effective distribution function of the probe in the membrane was modeled using a cone of angular aperture $\psi = 100^\circ$ (see Materials and Methods) pointing in a direction perpendicular to the membrane, with a total intensity of $I_0 = 5000$ photons on the membrane, values that are consistent with experimental results reported here.

The results are depicted in Figs. 4 and S1. In Fig. 4 *a*, processed pixels are displayed using the same colorscale as in Fig. 4 *b*, where there is a unique color associated with every set of values (S_2 , $S_4^{(s)}$). Predictably, it shows values distributed homogeneously over the contour of the membrane. Polar plots of the corresponding filtered-out distributions $\tilde{p}(\varphi)$ are superimposed as illustrations for a few points. In agreement with the model that was chosen, they show a clear directionality perpendicular to the membrane contour.

The distributions of the obtained values of S_2 , $S_4^{(s)}$, and $S_4^{(a)}$ are summarized in Fig. 4, *b* and *c*. The mean values were found to be $\langle S_2 \rangle = 1.13$, $\langle S_4^{(s)} \rangle = -0.20$, and $\langle S_4^{(a)} \rangle = 0$. The spread of the values, which shows the ultimate uncertainty of the method, was quantified through their standard deviation. It was found that $SD(S_2) = 0.03$, $SD(S_4^{(s)}) = 0.12$, and $SD(S_4^{(a)}) = 0.12$. Additional simulations, which are not displayed here, show that these standard deviation values 1), are the same irrespective of the effective

distribution, $p(\varphi)$, that was chosen to generate the data set; and 2), only depend on the total intensity, I_0 , and scale according to $1/\sqrt{I_0}$.

One can see that the uncertainty for $S_4^{(s)}$ and $S_4^{(a)}$ is systematically four times larger than that on S_2 , which is a direct consequence of the factors in Eqs. 10 and 11. Nevertheless, the overall level of precision accessible by the method under a reasonable number of photon counts make it sensitive enough to identify specific responses on physical samples, as demonstrated in the next sections.

Molecular order in lipid membranes

Measured values of S_2 , $S_4^{(s)}$, and $S_4^{(a)}$ for the case of the di-8-ANEPPQ lipid probe embedded in artificial multilamellar DPPC vesicles (MLVs) and COS 7 cell membranes are depicted in Fig. 5, using the same format as in Fig. 4. Raw data are supplied in the Supporting Material. Measurements were performed in the equatorial plane of the membrane 3D contour, where the distribution is expected to lie in the sample plane. In all cases, the asymmetric contribution was found to be negligible, with $\langle S_4^{(a)} \rangle \sim 0$, clear evidence for symmetric distributions, as expected from the membrane geometry.

In the case of artificial membranes made of MLVs, very similar observations could be made from one MLV to the other. The distribution of the lipid probe fluorophores on the outer part of the multilayer structure (Fig. 5, *a–c*, and S2) is shown to exhibit a high degree of order ($\langle S_2 \rangle = 0.62$) together with a relatively high fourth-order contribution ($\langle S_4^{(s)} \rangle = -0.52$). The resulting filtered-out effective distribution is depicted for several points along the membrane contour (Fig. 5 *a*). The filtered-out distribution function, $\tilde{p}(\varphi)$, represented for several points of the membrane shows typical representations of a hollow distribution that narrows in its central part, similar to Fig. 2, *case C*. Possible geometric models compatible with these features will be discussed in the next section. The inner part of the multilayer assembly (Figs. 5, *d* and *e*, and S3) exhibits an unambiguously different order, with the symmetry

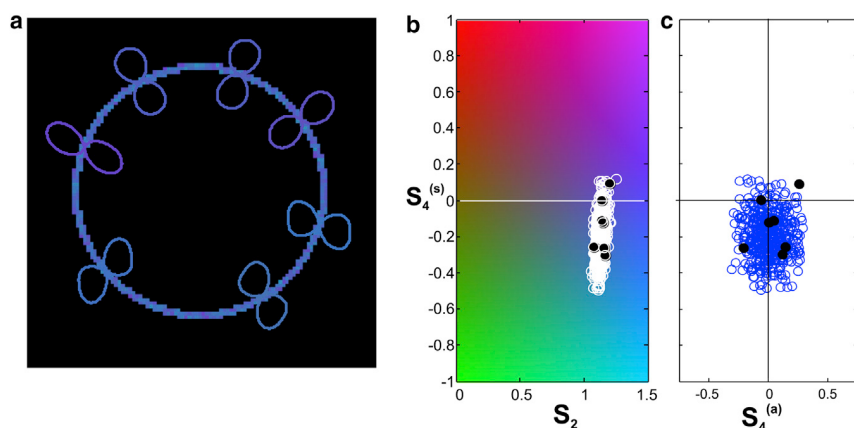


FIGURE 4 (*a*) Results on simulated data. The color at each pixel indicates the value of S_2 and $S_4^{(s)}$, based on the same colorscale as in *b*. The retrieved, $\tilde{p}(\varphi)$, is shown for a few selected points. (*b*) Distribution of (S_2 , $S_4^{(s)}$) values. (*c*) Distribution of ($S_4^{(a)}$, $S_4^{(s)}$) values. To see this figure in color, go online.

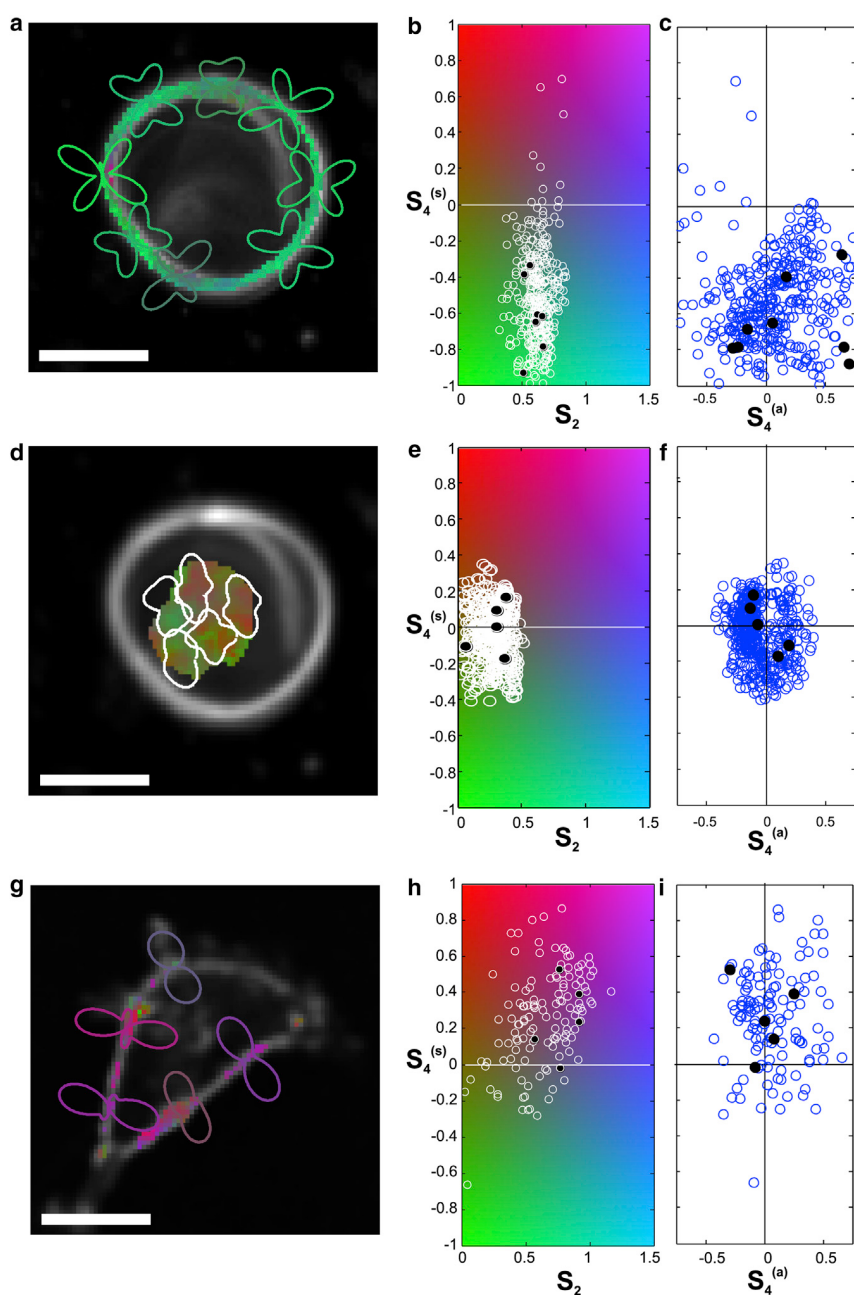


FIGURE 5 (a) Results on the outer part of an MLV made of DPPC doped with the di-8-ANEPPQ lipid probe. The color at each pixel indicates the values of S_2 and $S_4^{(s)}$, based on the same colorscale as in *b*. The retrieved distribution, $\tilde{p}(\varphi)$, is shown for a few selected points. (b) Distribution of $(S_2, S_4^{(s)})$ values. (c) Distribution of $(S_4^{(a)}, S_4^{(s)})$ values. (d–f) Same analysis as described in *c–e* in the central area of the MLV. (g–i) Same analysis as in *c–e* on a COS 7 cell doped with di-8-ANEPPQ. Scale bars, 10 μm . To see this figure in color, go online.

order parameters ($\langle S_2 \rangle = 0.28$ and $\langle S_4^{(s)} \rangle \sim 0$) showing a weaker directionality and a loss of orientational order, as expected from the higher degree of orientational averaging due to the high diversity of membrane curvatures encountered in the center of the MLV.

Interestingly, the values measured on the cell membranes show dramatically different features (Figs. 5, *g–i*, and *S4*). Although the second order parameter ($\langle S_2 \rangle = 0.64$) exhibits values quite similar to those in the outer part of the MLV membrane, the fourth order parameter differs strongly, with a positive value ($\langle S_4^{(s)} \rangle = 0.26$). The corresponding distribution function, $\tilde{p}(\varphi)$, shows a strong directionality perpendicular to the membrane contour. The observation

reported in Fig. 5, *g–i*, is representative of all observed cells, with some slight variations due to visible cell-to-cell heterogeneities.

Note that the depicted information is obtained here for all pixels of the image; therefore, no particular care must be taken with respect to the membrane direction or shape, in contrast to methods based on linear dichroism or anisotropy. In addition, each pixel contains a set of four different parameters that can provide refined information on the angular distribution function undergone by the fluorescent molecules. This set of parameters contains all accessible information and makes it possible to avoid oversimplification of the model or erroneous distributions.

DISCUSSION

Even though the method described here does not require the use of any model of angular distribution, three commonly applied geometrical models are investigated to provide a comprehensive geometrical picture and a basis of comparison with previous studies. Since we consider only symmetric distributions, $S_4^{(a)} = 0$. Three models are considered, all characterized by their angular aperture, ψ : 1), a cone model, as defined by Eq. 1; 2), a Gaussian model, defined by

$$p(\varphi) = \exp(-2\varphi^2/\psi^2); \quad (17)$$

and 3), a double Gaussian model (two Gaussian lobes of width σ , angularly distant from ψ) defined by

$$p(\varphi) = \exp[-2(\varphi - \psi/2)^2/\sigma^2] + \exp[-2(\varphi + \psi/2)^2/\sigma^2], \quad (18)$$

where $-\pi < \varphi < \pi$. The first two cases are more representative of molecules embedded in a disordered medium, such as lipid probes in a membrane, whereas the third case would be more suited for a membrane protein label, for instance (Fig. 1 d). For all cases, we computed the values of S_2 and $S_4^{(s)}$ using, in agreement with Eqs. 5 and 15 (where φ_2 was set to 0),

$$S_2 = \frac{2}{p_0} \int_{-\pi}^{\pi} p(\varphi) \cos(2\varphi) d\varphi,$$

$$S_4^{(s)} = \frac{2}{p_0} \int_{-\pi}^{\pi} p(\varphi) \cos(4\varphi) d\varphi,$$

with $p_0 = \int_{-\pi}^{\pi} p(\varphi) d\varphi$.

The values of S_2 and $S_4^{(s)}$ obtained for different angular apertures ψ are plotted for the cone and Gaussian models in Fig. 6 a, and for the double Gaussian model, for two different values of σ , in Fig. 6 b. As expected, for all models, when the angular aperture, ψ , increases, the value of S_2 decreases, consistent with loss of directionality and angular constraint. Of more interest, the value of $S_4^{(s)}$ clearly exhibits different behavior depending on the model used. Starting from high positive values for all models when $\psi = 0$, $S_4^{(s)}$ decreases regularly down to zero for the Gaussian model when ψ increases (Fig. 6 a, red). For the cone model, $S_4^{(s)}$ changes its sign, becoming negative for $\psi > 90^\circ$, with an extreme negative value of $S_4^{(s)} = -0.43$ for $\psi = 130^\circ$, and then tends back toward 0 for higher ψ (Fig. 6 a, black). This analysis shows that closed distributions within a given angular aperture (from the sharp cone to the smoother Gaussian function) will be confined within a given range for $S_4^{(s)}$ which cannot be < -0.43 . The way to increase this range is to create a higher degree of fourth-order symmetry in the distribution, which is provided in hollow angular shapes exhibiting two peaks, such as in the double Gaussian function

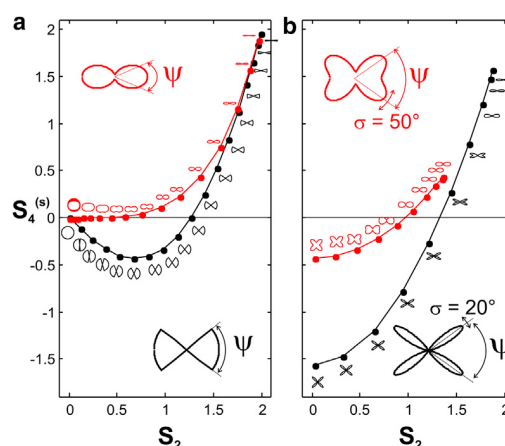


FIGURE 6 Values of S_2 and $S_4^{(s)}$ for different geometrical models of angular distributions, for different values of the angular aperture ψ . The corresponding distribution, $p(\varphi)$, is plotted for information near each data point. (Insets) Shapes of the geometrical models showing the angles. (a) Cone (black) and Gaussian (red) models. ψ varies from 0° to 180° in steps of 10° . (b) Double Gaussian, for $\sigma = 20^\circ$ (black) and $\sigma = 50^\circ$ (red). ψ varies from 0° to 90° in steps of 10° . To see this figure in color, go online.

(Fig. 6 b). For the two double Gaussian models, which are more sophisticated, involving two parameters, ψ and σ , one can still observe a clear trend: when ψ increases, $S_4^{(s)}$ decreases regularly down to negative values, reaching its lower extreme at an aperture of $\psi = 90^\circ$, corresponding to distributions having a pure fourfold symmetry, without directionality ($S_2 = 0$). It appears that the value of σ determines the amplitude with which $S_4^{(s)}$ varies as a function of ψ . Although only two cases of σ are plotted here, other values would produce similar curves, vertically shifted according to the value of σ .

This confirms the major role played by fourth-order symmetry information, and its ability, together with the second order, to waive ambiguities of the inferred geometric models for the angular distribution function. For instance, due to their clear negative value, the experimental values of $S_4^{(s)}$ measured on the external membrane of the MLV make it unrealistic to invoke a Gaussian model to describe the distribution function. What is required instead is a steeper model, such as a cone with $\psi \sim 140^\circ$ or a double Gaussian with $\psi \sim 65^\circ$ and $\sigma \sim 40^\circ$, the two models that exhibit quite similar polar plots for the distribution function. Similar to these observations, strong and negative fourth-order values have been observed in DPPC lipid membrane vesicles doped with the lipid probe 1-(4-(trimethylamino)phenyl)-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH) (24). The observations in that study are consistent with the fact that both di-8-ANEPPQ and TMA-DPH possess the ability to interact strongly with their nearby lipids present, most probably in the outer membrane leaflet, thus leading to quite strong interactions that differ from a pure harmonic force potential. Note that this observation encompasses both local molecular-scale interaction and mesoscopic-scale behaviors, where the local membrane

morphology perturbation, at the subdiffraction scale, might lead to a higher disorder. This is illustrated in the central part of the MLV where the morphology disorder within the excitation focal volume surpasses the molecular-scale constraint, thus leading to a much higher disorder.

In contrast to the observations in artificial lipid membranes, the results obtained on cell membranes indicate a strong directionality of the distribution. Although the angular aperture of the distribution function is very similar in both cases, the fourth-order symmetry observed in cells is positive and of smaller amplitude. This value can be explained neither by a close distribution function of cone/Gaussian shape nor by a hollow function. One possible explanation for this high positive value is the presence of an isotropic population in the excitation focal volume that shifts the $(S_2 > 0, S_4^{(s)} > 0)$ region of Fig. 6 toward lower, still positive values. Such a population can occur if some of the fluorophores do not insert properly into the membrane, or are embedded in completely disordered parts of the membrane (occurring, for example, by vesiculation, endocytosis, etc.). This population would still contribute to the fluorescence signal by an isotropic response. Although the method described here does not in principle allow isolation of such an isotropic contribution, we derive below a basic expression showing that its effect on the retrieved parameters S_2 , $S_4^{(s)}$, and $S_4^{(a)}$ makes it possible to quantify the presence of an isotropic population in some cases. For an oriented species that coexists, in a fraction η , with an isotropic species, in a fraction $(1 - \eta)$, the angular distribution of Eq. 5 must be generalized as

$$p^{\text{mix}}(\varphi) = p_0 \left[\eta \left[1 + \sum_{n=1}^{+\infty} S_n \cos[n(\varphi - \varphi_n)] \right] + (1 - \eta) \right], \quad (19)$$

where symmetry order parameters S_n and φ_n refer to the pure oriented species. Eq. 19 can be easily simplified as

$$p^{\text{mix}}(\varphi) = p_0 \left[1 + \sum_{n=1}^{+\infty} S_n^{\text{mix}} \cos[n(\varphi - \varphi_n)] \right], \quad (20)$$

where the parameters S_n^{mix} , defined by $S_n^{\text{mix}} = \eta S_n$ refer now to the mixture. The distribution $p(\varphi)$ can be replaced by $p^{\text{mix}}(\varphi)$ in all mathematical derivations, so that the method will return S_2^{mix} , $S_4^{(s),\text{mix}}$, and $S_4^{(a),\text{mix}}$, which are the parameters of the purely oriented system scaled by a factor η . Therefore, if the fraction η has been quantified by another means, the method still allows access to the parameters of the purely oriented system. Alternatively, in the case of a known oriented species, the method allows quantification of the fraction η . In the case of COS 7 cell membranes, presented here, the measured value suggests for instance, that the observed distribution contains a Gaussian (or cone) distribution, together with an isotropic distribution, in frac-

tion 50:50. Removing this population would lead to angular apertures of $\sim 80^\circ$. This is much smaller than the $\sim 140^\circ$ aperture that a measurement of only S_2 would give, invoking Gaussian or cone models, as previously reported (12,20). However, this value is compatible with measurements of molecular order, S_2 , in membranes under tension, obtained by one-photon fluorescence (12). The apparent high disorder values generally measured in cell membranes using pure second-order information is therefore most likely attributable to additional disordered populations hampering a clear view of the real distribution function, as expected from the complex membrane morphology, dynamics, and heterogeneity that take place at a subdiffraction scale.

CONCLUSION

It has been shown here that a polarized fluorescence method based on tunable linear dichroism and symmetry decomposition of the angular distribution function of fluorophores can report on refined orientational mechanisms taking place in membranes. Analysis of the accessible second- and fourth-order information, demonstrated for two-photon microscopy, provides a more sophisticated and precise approach. This complements traditional methods, which rely either on the use of a distribution model or on the measurement of pure angular disorder. This method can be applied to any sample containing molecular orientation specificity that can be related to a biological function, such as complex systems related to protein conformational changes in cell membranes of complex shape.

SUPPORTING MATERIAL

Four figures are available at [http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495\(14\)00394-4](http://www.biophysj.org/biophysj/supplemental/S0006-3495(14)00394-4).

The authors thank J. Savatier for his precious help on biological samples, as well as Ph. Réfrégier for inspiring input.

This work was supported by contracts ANR-2010-BLAN-150902 (ReceptORIENT), ANR-10-INBS-04-01 (France-BioImaging), ANR-11-INSB-0006 (France Life Imaging), ANR-11-IDEX-0001-02 (A*Midex Foundation) and Conseil Régional Provence Alpes Côte d'Azur. X.W. received a scholarship from the China Scholarship Council. F.-Z.B. received a scholarship from the Erasmus Mundus Doctorate Program Europhotonics (grant no. 159224-1-2009-1-FR-ERA MUNDUS-EMJD).

REFERENCES

1. Axelrod, D. 1979. Carbocyanine dye orientation in red cell membrane studied by microscopic fluorescence polarization. *Biophys. J.* 26:557–573.
2. Steinbach, G., I. Pomozi, ..., G. Garab. 2011. Confocal fluorescence detected linear dichroism imaging of isolated human amyloid fibrils. Role of supercoiling. *J. Fluoresc.* 21:983–989.
3. Lazar, J., A. Bondar, ..., S. J. Firestein. 2011. Two-photon polarization microscopy reveals protein structure and function. *Nat. Methods.* 8:684–690.

4. Dix, J. A., and A. S. Verkman. 1990. Mapping of fluorescence anisotropy in living cells by ratio imaging. Application to cytoplasmic viscosity. *Biophys. J.* 57:231–240.
5. Borejdo, J., and S. Burlacu. 1993. Measuring orientation of actin filaments within a cell: orientation of actin in intestinal microvilli. *Biophys. J.* 65:300–309.
6. Adler, M., and T. R. Tritton. 1988. Fluorescence depolarization measurements on oriented membranes. *Biophys. J.* 53:989–1005.
7. Dale, R. E., S. C. Hopkins, ..., Y. E. Goldman. 1999. Model-independent analysis of the orientation of fluorescent probes with restricted mobility in muscle fibers. *Biophys. J.* 76:1606–1618.
8. Vrabioiu, A. M., and T. J. Mitchison. 2006. Structural insights into yeast septin organization from polarized fluorescence microscopy. *Nature*. 443:466–469.
9. Weber, G. 1954. Dependence of polarization of the fluorescence on the concentration. *Trans. Faraday Soc.* 50:552–555.
10. Lentz, B. R., B. M. Moore, and D. A. Barrow. 1979. Light-scattering effects in the measurement of membrane microviscosity with diphenylhexatriene. *Biophys. J.* 25:489–494.
11. Gasecka, A., T.-J. Han, ..., S. Brasselet. 2009. Quantitative imaging of molecular order in lipid membranes using two-photon fluorescence polarimetry. *Biophys. J.* 97:2854–2862.
12. Kress, A., X. Wang, ..., S. Brasselet. 2013. Mapping the local organization of cell membranes using excitation-polarization-resolved confocal fluorescence microscopy. *Biophys. J.* 105:127–136.
13. Wang, X., A. Kress, ..., P. Ferrand. 2013. High frame-rate fluorescence confocal angle-resolved linear dichroism microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* 84:053708.
14. Schön, P., F. Munhoz, ..., S. Brasselet. 2008. Polarization distortion effects in polarimetric two-photon microscopy. *Opt. Express*. 16:20891–20901.
15. Brasselet, S., D. Ait-Bekacem, ..., S. Brasselet. 2010. Influence of birefringence on polarization resolved nonlinear microscopy and collagen SHG structural imaging. *Opt. Express*. 18:14859–14870.
16. DeMay, B. S., N. Noda, ..., R. Oldenbourg. 2011. Rapid and quantitative imaging of excitation polarized fluorescence reveals ordered septin dynamics in live yeast. *Biophys. J.* 101:985–994.
17. Kress, A., P. Ferrand, ..., S. Brasselet. 2011. Probing orientational behavior of MHC class I protein and lipid probes in cell membranes by fluorescence polarization-resolved imaging. *Biophys. J.* 101:468–476.
18. Duboisset, J., P. Ferrand, ..., S. Brasselet. 2013. Thioflavine-T and Congo Red reveal the polymorphism of insulin amyloid fibrils when probed by polarization-resolved fluorescence microscopy. *J. Phys. Chem. B.* 117:784–788.
19. Gasecka, A., P. Tauc, ..., S. Brasselet. 2012. Investigation of molecular and protein crystals by three photon polarization resolved microscopy. *Phys. Rev. Lett.* 108:263901.
20. Benninger, R. K. P., B. Onfelt, ..., P. M. W. French. 2005. Fluorescence imaging of two-photon linear dichroism: cholesterol depletion disrupts molecular orientation in cell membranes. *Biophys. J.* 88:609–622.
21. Haluska, C. K., A. P. Schröder, ..., C. M. Marques. 2008. Combining fluorescence lifetime and polarization microscopy to discriminate phase separated domains in giant unilamellar vesicles. *Biophys. J.* 95:5737–5747.
22. Solanko, L. M., A. Honigsmann, ..., D. Wüstner. 2013. Membrane orientation and lateral diffusion of BODIPY-cholesterol as a function of probe structure. *Biophys. J.* 105:2082–2092.
23. Van Der Meer, B. W., R. P. H. Kooyman, and Y. K. Levine. 1982. A theory of fluorescence depolarization in macroscopically ordered membrane systems. *Chem. Phys.* 66:39–50.
24. Pottel, H., W. Herreman, ..., M. Ameloot. 1986. On the significance of the fourth-rank orientational order parameter of fluorophores in membranes. *Chem. Phys.* 102:37–44.
25. Mitchell, D. C., and B. J. Litman. 1998. Effect of cholesterol on molecular order and dynamics in highly polyunsaturated phospholipid bilayers. *Biophys. J.* 75:896–908.
26. Callis, P. R. 2002. The theory of two-photon-induced fluorescence anisotropy. In *Topics in Fluorescence Spectroscopy*. J. R. Lakowicz, editor. Springer, New York, pp. 1–42.
27. Brasselet, S., P. Ferrand, ..., A. Gasecka. 2013. Imaging molecular order in cell membranes by polarization-resolved fluorescence microscopy. In *Fluorescent Methods to Study Biological Membranes*. Y. Mély and G. Duportail, editors. Springer, New York, pp. 311–338.
28. Chen, S. Y., and B. W. Van Der Meer. 1993. Theory of two-photon induced fluorescence anisotropy decay in membranes. *Biophys. J.* 64:1567–1575.
29. Bidault, S., S. Brasselet, and J. Zyss. 2004. Coherent control of the optical nonlinear and luminescence anisotropies in molecular thin films by multiphoton excitations. *Opt. Lett.* 29:1242–1244.
30. Reeve, J. E., A. D. Corbett, ..., H. L. Anderson. 2012. Probing the orientational distribution of dyes in membranes through multiphoton microscopy. *Biophys. J.* 103:907–917.
31. Bangham, A., M. Hill, and N. Miller. 1974. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. In *Methods in Membrane Biology*. E. D. Korn, editor. Springer, New York, pp. 1–68.
32. Richards, B., and E. Wolf. 1959. Electromagnetic diffraction in optical systems. II. Structure of the image field in an aplanatic system. *Proc. R. Soc. Lond. A Math. Phys. Sci.* 253:358–379.

