



HAL
open science

Développement de la microscopie par auto-interférences pour l'imagerie super-résolue tridimensionnelle au sein de tissus biologiques épais.

Jeanne Linarès-Loyez

► **To cite this version:**

Jeanne Linarès-Loyez. Développement de la microscopie par auto-interférences pour l'imagerie super-résolue tridimensionnelle au sein de tissus biologiques épais.. Optique / photonique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0167 . tel-02375911

HAL Id: tel-02375911

<https://theses.hal.science/tel-02375911>

Submitted on 22 Nov 2019

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

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

THÈSE

présentée à

l'Université de Bordeaux

École doctorale des sciences physiques et de l'ingénieur

par Jeanne Linarès-Loyez

pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité “Lasers, Matière et Nanosciences”

soutenue le 1^{er} octobre 2019

**Développement de la microscopie par auto-interférences
pour l'imagerie super-résolue tridimensionnelle au sein de
tissus biologiques épais**

Membres du jury :

M. MONNERET Serge,	Directeur de Recherche CNRS	Président du jury
Mme. LÉVÊQUE-FORT Sandrine,	Directrice de Recherche EPFL	Rapporteuse
M. LASSER Théo,	Professeur Émérite CNRS	Rapporteur
Mme. GRAUBY-HEYWANG Christine,	Maître de conférence Univ. de Bordeaux	Examinatrice
M. BON Pierre,	Chargé de Recherche CNRS	Co-encadrant
M. COGNET Laurent,	Directeur de Recherche CNRS	Directeur de thèse

Développement de la microscopie par auto-interférences pour l'imagerie super-résolue tridimensionnelle au sein de tissus biologiques épais

Le travail de cette thèse a été consacré au développement d'une nouvelle technique SELFI (pour *self-interferences*, auto-interférences en anglais). Cette méthode permet d'obtenir une localisation tridimensionnelle d'émetteurs fluorescents individuels. Nous avons démontré que cela permet l'imagerie super-résolue en 3D et le suivi 3D de molécules uniques en profondeur dans des échantillons biologiques denses et complexes. La technique SELFI se base sur l'utilisation des interférences auto-référencées (également appelées "auto-interférences") pour remonter à la localisation 3D d'un émetteur en une seule mesure. Ces interférences sont générées via l'utilisation d'un réseau de diffraction placé en sortie du microscope de fluorescence : le signal de fluorescence diffracte sur le réseau et les ordres interfèrent, après une courte propagation, sur le détecteur. Les interférences ainsi formées sont décodées numériquement pour remonter à la localisation 3D d'une molécule fluorescente au sein de l'échantillon. Une molécule unique peut ainsi être localisée avec une précision d'une dizaine de nanomètre, et cela jusqu'à une profondeur d'au moins $50\mu m$ au sein d'un échantillon biologique vivant épais (par exemple un tissu biologique).

En combinant la méthode SELFI à différentes techniques de super-résolution (PALM, dSTORM et uPAINT), nous montrons que cette méthode de localisation tridimensionnelle permet de retrouver la hiérarchie et l'organisation de protéines dans des objets biologiques. En effectuant du SELFI-PALM, nous avons pu observer différentes protéines des points focaux d'adhésion (talin-C terminale et paxiline) et retrouver les différences de hauteur attendues, et ceux sur des échantillons de cellules vivantes. Ces résultats confirment la résolution accessible avec la technique SELFI (environ 25nm) même pour un faible nombre de photons collectés (environ 500 photons par molécule).

Nous mettons en évidence la robustesse de la technique SELFI en reconstruisant des images de super-résolution 3D de structures denses en profondeur dans des échantillons tissulaires complexes. En effectuant du SELFI-dSTORM, nous avons observé le réseau d'actine sur des cellules cultivées en surface de la lamelle dans un premier temps, et à différentes profondeurs (25 et 50 microns) au sein de tissus artificiels dans un second temps.

Du suivi 3D de particule unique a aussi été effectué au sein de tissus biologiques vivants. Nous avons observé la diffusion libre de quantum dots à différentes profondeurs (jusqu'à 50 microns, limité par l'objectif utilisé) dans des tranches vivantes de cerveau.

Nous avons appliqué la technique SELFIE à la détection de récepteurs postsynaptiques NMDA. Cela nous a permis d'observer, sur des échantillons de neurones en culture primaire mais aussi au sein de tranches de cerveaux de rats, une différence d'organisation entre les deux sous-unités GluN2A et GluN2B de ce récepteur au glutamate.

Enfin, nous avons démontré l'importance de suivre l'évolution de l'environnement des échantillons biologiques vivants lors des acquisitions permettant la détection de molécules individuelles. Grâce à l'utilisation additionnelle et simultanée de l'imagerie de phase quantitative, nous avons pu étudier la dynamique de la membrane cellulaire durant l'activation par un facteur de croissance. L'analyse corrélative entre les images de phase quantitative en lumière blanche et les détections de molécules fluorescentes uniques permet d'obtenir de nouvelles informations pertinentes sur l'échantillon étudié.

Mots clefs : Microscopie de fluorescence, microscopie de super-resolution, microscopie 3D, phase, interférences, super-localisation, détection de molécules uniques, suivi de molécules uniques, neurophotonique

Self-interferences microscopy for tridimensional super-resolution microscopy in thick biological samples

The work of this thesis was devoted to the development of a new technique SELFI (for self-interferences). This method unlocks the three-dimensional localization of individual fluorescent emitters. We have demonstrated that this allows 3D super-resolved imaging and 3D tracking of single molecules deep into dense and complex biological samples. The SELFI technique is based on the use of self-referenced interference to go back to the 3D location of an emitter in a single measurement. These interferences are generated using a diffraction grating placed at the exit of the fluorescence microscope : the fluorescence signal diffracts on the grating and, after a short propagation, the orders interfere on the detector. The formed interferences are digitally decoded to extract the 3D location of a fluorescent molecule within the sample. A single molecule can thus be localized with a precision of approximately ten nanometers up to a depth of at least $50\mu m$ in a thick living biological sample (for example a biological tissue).

By combining the SELFI method with different super-resolution techniques (PALM, dSTORM and uPAINT), we show that this three-dimensional localization method grants the access to the hierarchy and organization of proteins in biological objects. By performing SELFI-PALM, we observed different proteins of the adhesion focal points (talin C-terminal and paxilin) and found the expected elevation differences, and those within living cell samples. These results confirm the resolution capability of the SELFI technique (about 25 nm) even for a small number of photons collected (about 500 photons per molecule).

We highlight the robustness of the SELFI technique by reconstructing 3D super-resolution images of dense structures at depth in complex tissue samples. By performing SELFI-dSTORM, we observed the actin network in cells grown on the surface of the coverslip at first, and at different depths (25 and 50 microns) within artificial tissues in a second time.

3D single particle tracking has also been performed in living biological tissues. We observed the free diffusion of quantum dots at different depths (up to 50 microns) in living brain slices.

We applied the SELFI technique to the detection of NMDA postsynaptic receptors. We observed, in primary culture of neurons but also within slices of rat brains, a difference in organization between the two subunits GluN2A and GluN2B of this glutamate receptor. Finally, we show the importance of following the evolution of the living biological sample environment during the acquisition of images leading to detections of single molecules.

Thanks to the additional and simultaneous use of quantitative phase imaging, we were able to study cell membrane dynamics during the activation by a growth factor. The correlative analysis between white light quantitative phase images and single fluorescent molecule detections provides new relevant information on the sample under study.

Key words : Fluorescent microscopy, super-resolution microscopy, 3D microscopy, phase, interferences, super-localization, single molecule detection, single particle tracking, neurophotonic

Cette thèse a été effectuée au sein du Laboratoire Photonique, Numérique et Nanosciences (LP2N), UMR 5298 :

Institut d'Optique d'Aquitaine

Rue François Mitterrand

33400 Talence

05 57 01 71 00

<http://www.lp2n.fr>

"La vie est une chance, saisis-la"

Mère Teresa

Remerciements

Je tiens à remercier Serge Monneret d'avoir présidé l'ensemble du jury lors de ma soutenance. Merci à Théo Lasser et à Sandrine Lévêque-Fort d'avoir rapporté ce manuscrit, et merci à Christine Grauby-Heywang d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. J'ai vraiment apprécié la discussion scientifique que nous avons eu lors de ma soutenance et je vous en remercie.

Je voudrais également remercier Philippe Bouyer pour m'avoir accueilli au laboratoire du LP2N pour ces trois années de thèse, et merci à Brahim Lounis de m'avoir accueilli dans l'équipe nanophotonique. Merci également à Philippe Tamarat pour ses conseils en tant que représentant de l'école doctorale.

Merci à mon directeur de thèse : Laurent Cognet. Merci Laurent pour tes conseils, tes astuces et toutes tes idées pour aller toujours plus loin. Merci pour ta patience et ta rigueur scientifique qui m'ont appris à tirer un maximum de chacun des résultats (bons, mauvais ou inattendus).

Et bien sûr, un grand merci à Pierre Bon d'avoir eu la patience de m'encadrer au jour le jour durant ces trois années (qui auraient pu être la suite du tournage de La Chèvre. . .). Merci Pierre pour ton optimisme à toute épreuve face aux surprises de la vie de laboratoire. Franchement bravo d'avoir réussi à faire de moi une (presque) experte de Labview. Pierre et Laurent, vous avez réussi à interférer constructivement dans mon travail, malgré parfois une incohérence certaine, pour que je donne le meilleur de moi-même. Merci pour votre amour de la science, avec vous on ne peut pas s'ennuyer au labo !

Je voudrais remercier nos collaborateurs de l'IINS, sans qui mon travail n'aurait pas de sens. Merci à Grégory Giannone et Olivier Rossier avec qui nous avons réalisé le SELFI-PALM. Merci aussi aux neurobiologistes Laurent Groc et Joana Ferreira avec qui nous avons réalisé du SELFI-dSTORM sur neurones et tranches de cerveaux. Merci Joana pour toutes ces heures (je ne les compte pas!) de manip passées dans le noir à papoter

devant les merveilleux films de guirlandes de Noël.

Merci au personnel du LP2N, particulièrement à Valentina qui nous accueille tous les jours avec son sourire, Stéphanie qui nous aide gentiment pour tous nos papiers administratifs, Fabien qui gère les sous et Philippe de l'atelier mécanique qui nous aide à optimiser nos manip.

Un immense merci à l'équipe qui a évolué et qui m'a vu évoluer pendant ces trois ans. Merci à ma grande sœur de thèse Noémie, merci pour tes conseils, ton expérience et tes petites blagues (faites exprès ou non). T'es une fille super chouette et super drôle, et je suis fier de t'avoir succédé auprès de Laurent. Merci Camille d'avoir partagé mon bureau, j'ai regretté nos pauses thé à rallonge durant lesquelles nos discussions passionnantes n'en finissaient pas. Merci Chiara pour toutes nos discussions, merci pour ton soutien, merci pour ta fraîcheur et merci pour ta simplicité. Thanks Amit for always having the smile, it was a pleasure to share your office and hearing from you the life of a new dad. See you soon in India! Merci Artur-sans-h pour ta bonne humeur contagieuse et les babaganouches. Merci Antony d'avoir rejoint ce groupe, merci d'avoir pris soin de moi pour éviter que je ne me recasse le cou au ski, j'espère que tu trouveras une autre âme innocente à charier. Merci Alberto d'avoir partagé ma salle de manip lors de mes dernières acquisitions de SELFI-uPAINT. Et merci Karen de prendre la suite de cette thèse : bon courage et amuse toi bien !

A cette litanie de merci je ne peux pas oublier Nelson pour notre entre-aide entre doctorant, Gaëlle R. pour ses bons conseils et ses jeux de mots que j'adore, Jean-Baptiste T. pour ses petites blagues, Etienne G. pour le chou-fleur dopé au jus de composte, Kévin Alessandri et Maxime Feyeux pour leurs précieuses capsules, Naveen for your smile and the wonderfull time we had skiing together, William pour son calme et son enthousiasme à toute épreuve, and Sidd for joining us to the wonderfull club of LP2N PhD students and for the thoughtfull discussions we had on the « terRRasse ».

Je remercie aussi tous les membres permanents, postdocs et doctorants du laboratoire que j'ai pu croiser durant mes trois ans de thèse. Et à toi que j'oublie : pardon et merci !

Je voudrais finir ces remerciements par quelques mercis spéciaux :
Merci à ma sœurette de thèse et coach sportif Antonine. Avec toi j'ai pu partager tout ce que nous avons vécu ces dernières années, avec toi j'ai appris à regarder les choses autrement, avec toi j'ai grimpé ma première falaise, avec toi j'ai pique-niqué sous les

eucalyptus, avec toi j'ai commencé le yoga. Merci pour ton sourire, ta détermination et ton élan pour vivre.

Merci à mon deuxième coach sportif Amaël. Merci pour tous les échanges que nous avons eus à la cafète, en salle de culture, à la piscine, autour d'un jeu, à l'escalade, au supermarché, ... Bravo pour ton acharnement et ta persévérance à faire une thèse en bio!

Merci à ma famille pour m'avoir soutenu tout au long de cette thèse et avoir essayé de comprendre un peu mon charabia de photons, interférences et récepteurs synaptiques.

Merci Papoum et Françoise pour m'avoir offert un toit quand je suis arrivée à Bordeaux.

Merci Cousin Gabriel pour ton enthousiasme à propos de mon Jeannoscope.

Merci à mon historienne de sœur d'avoir eu la patience de relire l'entièreté de ce manuscrit et d'y relever que je me suis shootée pendant 3 ans aux ondes qui planent d'illumination tout en étant attaquée par les bandits de la bande de Cramèr-Rao.

Enfin, un grand merci à Julien, mon époux chéri, mon soutien de tous les temps, qui a suivi de près l'évolution de cette thèse. Une grande part de mon nouveau titre de docteur te reviens.



Table des matières

Introduction	1
1 Imagerie de super résolution en 3D par interférences auto-référencées	15
1.1 Super-localisation par interférences auto-référencées	16
1.1.1 Mise en évidence d'une complémentarité entre l'intensité et la phase	16
1.1.2 Formation d'interférences auto-référencées	19
1.1.3 Extraction des gradients après échantillonnage du signal par le détecteur	30
1.2 Précision de localisation	34
1.2.1 Précision de pointé pour la super-localisation et rapport signal à bruit	34
1.2.2 Calcul théorique de la précision de localisation	37
1.2.3 Précision de localisation obtenue expérimentalement	42
1.3 Comparaison avec la technique de la mise en forme de PSF par astigmatisme	45
1.3.1 Calcul de la CRLB pour la méthode de localisation 3D basée sur de la mise en forme de PSF par astigmatisme	46
1.3.2 Comparaison expérimentale	47
1.4 Image de super-résolution et stabilisation du microscope	49
1.4.1 Définition de la résolution d'une image	49
1.4.2 Deuxième modalité du montage : imagerie de phase quantitative par transmission	51
1.4.3 Utilisation de l'imagerie de phase quantitative pour faire une mise au point automatique sur l'échantillon	57
2 Microscopie de super-résolution 3D dans des échantillons biologiques statiques	63
2.1 Super-localisation au sein d'un échantillon biologique connu	65

2.1.1	Structure moléculaire simplifiée des points focaux d'adhésion des cellules : un outil métrologique biologique	66
2.1.2	Résultats de l'imagerie statique SELFI-PALM	70
2.2	Super-résolution à haute densité de molécules	74
2.2.1	SELFI-dSTORM sur un échantillon biologique fin	75
2.2.2	SELFI-dSTORM dans un échantillon biologique épais, dense et homogène	78
2.2.3	Imagerie de super-résolution 3D d'un marquage endogène moins dense dans un échantillon biologique épais	84
2.3	Application à la détection de récepteurs neuronaux	86
2.3.1	SELFI-dSTORM sur des neurones en culture	86
2.3.2	SELFI-dSTORM dans des tranches de cerveau	90
2.3.3	Quantification de l'organisation des récepteurs NMDA grâce à la localisation 3D	94
3	Suivi de molécules uniques 3D au sein d'échantillons biologiques vivants	101
3.1	Suivi de la diffusion de nanoparticules uniques insérées dans l'espace extracellulaire du cerveau	102
3.1.1	Déplacement quadratique moyen pour un mouvement brownien	102
3.1.2	Suivi de molécules uniques dans un gel d'agarose	104
3.1.3	Suivi 3D de quantum dots uniques en profondeur dans une tranche de cerveau vivante	106
3.2	Imagerie quantitative multimodale simultanée	109
3.2.1	SELFI-uPAINT dans un échantillon vivant	110
3.2.2	Complémentarité lumière blanche et fluorescence	114
3.2.3	Étude morphologique cellulaire par changement de référentiel	119
3.2.4	Analyse corrélative des détections de super-localisation et des images de phase quantitative	124
	Conclusion & Perspectives	131
	ANNEXE A : Calcul de l'interférogramme 2D	I
	ANNEXE B : Calcul des dérivées de la PSF obtenue avec la lentille cylindrique	V
	ANNEXE C : Formation d'une image de phase quantitative grâce à l'interféromètre SID4	VII

ANNEXES D : Protocoles expérimentaux

IX

Introduction

Contexte

La microscopie de fluorescence permet d'obtenir des informations spécifiques dans un échantillon biologique, spécificité qui est difficile à obtenir en microscopie par transmission. Longtemps, la microscopie de fluorescence a été limitée par la diffraction. Cette limite a pu être dépassée, il y a 25 ans, avec la possibilité de faire des images de super-résolution grâce à l'émission stimulée [1] et à la détection de molécules uniques [2]. Dans les années 2000 d'autres techniques de super-résolution basées sur la localisation de molécules uniques [3] [4] [5] [6] ont été rapportées. Ces travaux sur la nanoscopie ont valu à W.E. Moerner, Eric Betzig et Stefan Hell le prix Nobel de chimie en 2014. Depuis, de nombreuses méthodes de super-résolution ont été développées, permettant ainsi d'accéder à de nouvelles informations [7] [8] [9]. Nous pouvons regrouper toutes ces techniques en différentes catégories : l'émission de fluorescence hautement localisée, l'illumination structurée, la fluctuation de fluorescence et la microscopie de localisation de molécules uniques. La plupart de ces procédés sont basées sur la présence d'une opération non-linéaire lors d'au moins une étape du processus complet permettant d'obtenir une image.

Super-résolution 2D

Émission de fluorescence hautement localisée : STED et RESOLFT

Une manière de s'affranchir de la limite de diffraction est d'utiliser un contrôle local de la capacité de fluorescence d'une molécule. L'émission de fluorescence d'une molécule peut

[1] Hell, *Opt. Lett.*, 1994

[2] van Oijen, *Chemical Physics Letters*, 1998

[3] Rust, *Nature Methods*, 2006

[4] Betzig, *Science*, 2006

[5] Hess, *Biophysical Journal*, 2006

[6] Sharonov, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006

[7] Huang, *Annual Review of Biochemistry*, 2009

[8] Godin, *Biophysical Journal*, 2014

[9] Liu, *Molecular Cell*, 2015

être contrôlée en la faisant passer d'un état brillant à un état sombre en l'illuminant par un faisceau d'excitation puis par un faisceau de déplétion. Une approche élégante pour faire cela est basée sur l'émission stimulée de fluorescence utilisant un faisceau laser en forme de donut, à très forte puissance : la déplétion par émission stimulée (*Stimulated Emission Depletion - STED*)[1]. Une généralisation de cette méthode, basée sur la photoconversion réversible d'une molécule, utilise une plus faible puissance laser : *reversible saturable optical fluorescence transitions (RESOLFT)* [10]. Plus récemment, en sondant les minima d'intensité de fluorescence dans l'échantillon, la technique MINIFLUX (*Minimal Photon Fluxes*) [11] a montré qu'il est possible de localiser un émetteur fluorescent avec une précision de seulement $1nm$. Ces techniques permettant d'obtenir de très grandes précisions de localisation nécessitent de scanner l'échantillon dans son ensemble.

Illumination structurée

Une image ayant une résolution deux fois meilleure qu'une image acquise avec un microscope confocal peut être obtenue en illuminant l'échantillon de manière structurée. Contrairement au STED, c'est une technique de microscopie en champ large. Différentes formes d'illumination existent : de la simple grille sinusoïdale dont les fréquences sont connues [12], au speckle, qui permet de générer une illumination aléatoire [13]. L'acquisition de plusieurs images et un algorithme adapté permettent de retrouver les fréquences spatiales, jusqu'à $1/160nm$, présentes dans l'échantillon. On peut également utiliser un phénomène de saturation de la fluorescence [14] pour obtenir une résolution limitée uniquement par la robustesse des sondes fluorescentes.

Fluctuation de la fluorescence

Le principe de la technique SOFI (*super-resolution optical fluctuation imaging*) est l'analyse des fluctuations temporelles de la fluorescence [15]. En chacun des pixels du détecteur, une corrélation temporelle de la fluorescence collectée est effectuée. Cela permet de reconnaître la fluorescence émise par chacun des émetteurs présents dans l'échantillon et de reconstituer ainsi une image dont la résolution est d'une dizaine de nanomètres. Une analyse plus approfondie de la fluctuation de fluorescence permet de prendre en compte

[10] Hofmann, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005

[11] Balzarotti, *Science*, 2017

[12] Gustafsson, *Journal of Microscopy*, 2000

[13] Mudry, *Nature Photonics* 2012

[14] Gustafsson, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005

[15] Dertinger, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009

la brillance, la durée de vie et la concentration des fluorophores : *balanced super-resolution optical fluctuation imaging, (bSOFI)* [16].

Localisation de molécules uniques

La microscopie de localisation de molécules uniques, qui est aussi une microscopie en champ large, consiste à déterminer la position de chaque molécule fluorescente détectée de façon individuelle. C'est cette technique qui va être exploitée dans le cadre de ma thèse. La microscopie de *super-localisation* repose sur un *a priori* fort : une fonction d'étalement du point collectée dans le plan image correspond à un unique émetteur fluorescent. Partant de ce principe, la fonction d'étalement du point, *Point Spread Function (PSF)* en anglais, peut être approximée par une fonction gaussienne dont le centre correspond à la position exacte de l'émetteur unique. La figure 1(a) illustre ce principe qui permet de dépasser la limite de diffraction.

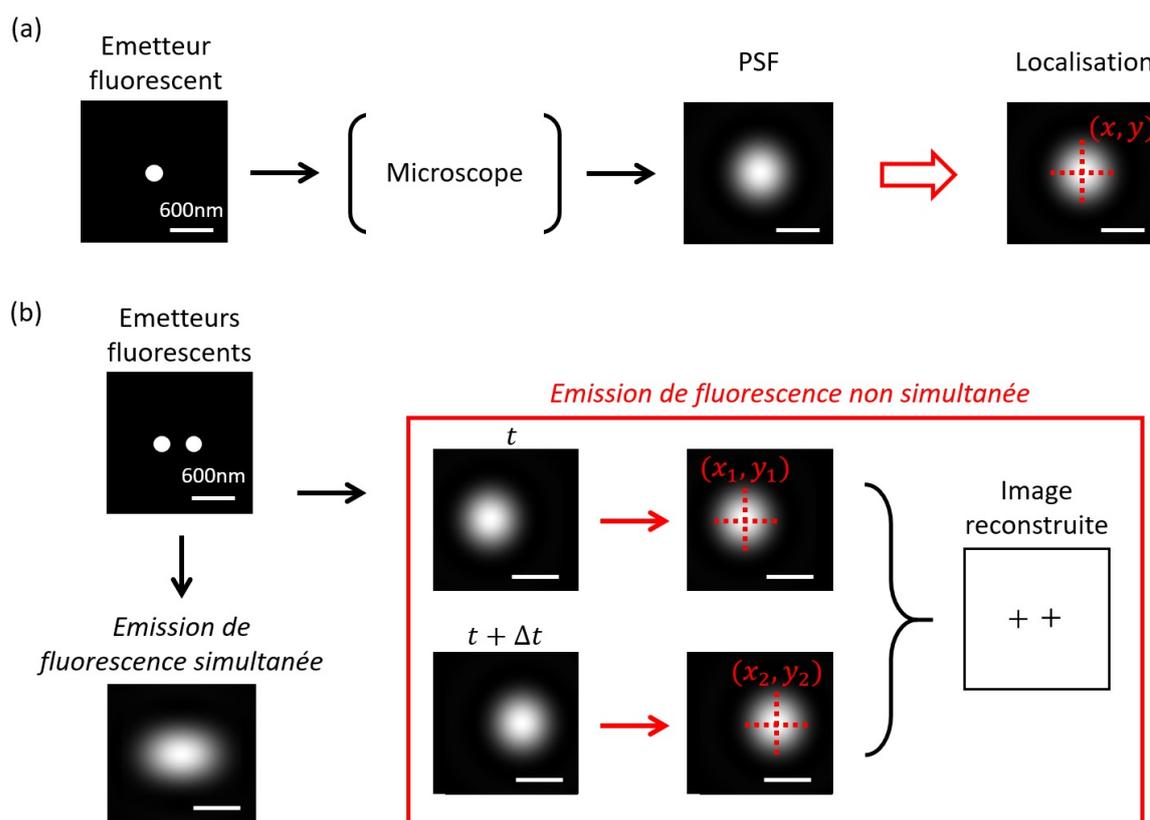


Figure 1 : Schéma de principe de la microscopie de localisation de molécules uniques : (a) pour un émetteur unique de longueur d'onde $\lambda_{em} = 700nm$; (b) pour deux émetteurs uniques ne respectant pas le critère de Rayleigh

[16] Geissbuehler, *Optical Nanoscopy*, 2012

La précision avec laquelle est donnée la position peut atteindre quelques nanomètres en fonction du nombre de photons collectés sur le détecteur [17]. Une image de super-résolution peut être reconstituée à partir d'un ensemble de localisations de molécules uniques. Cependant, cela nécessite un temps de calcul post-acquisition, contrairement au STED. Pour pouvoir tenir compte de l'*a priori* qu'une PSF correspond à un seul émetteur fluorescent dans un échantillon en comportant plusieurs dans le volume d'une PSF, il est pertinent de séparer spectralement [2] [18] ou temporellement [3] leurs émissions de fluorescence. Comme l'illustre la figure 1(b) pour deux nanoparticules ne respectant pas le critère de Rayleigh, si l'une émet avant l'autre tel qu'elles se retrouvent sur des images distinctes de caméra, alors nous pouvons les localiser séparément. Il existe plusieurs manières de séparer temporellement l'émission de fluorescence de molécules spatialement trop proches : le STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [3] et le dSTORM (*direct STORM*) [19] qui consistent à faire émettre chaque molécule de manière aléatoire, le PALM (*Photoactivated Localisation Microscopy*) [4] et le FPALM (*Fluorescence Photoactivation Localisation Microscopy*) [5] basés sur la photoconversion de certaines molécules fluorescentes ainsi que le PAINT (*Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography*) [6], le uPAINT (*universal PAINT*) [20] et le DNA-PAINT [21] permettant de faire l'image d'une molécule dès qu'elle s'accroche à l'échantillon.

Dans cette thèse nous nous plaçons dans le cadre de la microscopie de localisation de molécules uniques. Nous détaillerons au fur et à mesure de ce manuscrit les moyens utilisés pour séparer temporellement les molécules.

-
- [17] Bobroff, *Review of Scientific Instruments*, 1986
 - [2] van Oijen, *Chemical Physics Letters*, 1998
 - [18] Schultz, *Biophysical Journal*, 1998
 - [3] Rust, *Nature Methods*, 2006
 - [19] van de Linde, *Nature Protocols*, 2011
 - [4] Betzig, *Science*, 2006
 - [5] Hess, *Biophysical Journal*, 2006
 - [6] Sharonov, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006
 - [20] Giannone, *Biophysical Journal*, 2010
 - [21] Jungmann, *Nano Lett.*, 2010

Super-résolution 3D

Dans le contexte de la localisation de molécules uniques, de nombreuses techniques ont été développées récemment afin d'accéder non seulement à la position latérale d'une nanoparticule, mais aussi à sa position axiale dans l'échantillon.

La figure 2 présente les images d'un émetteur fluorescent, de longueur d'onde d'émission $\lambda_{em} = 700nm$, faites par un microscope d'ouverture numérique $NA = 1.3$, dans différents plans. Ces images sont la fonction d'étalement du point (PSF) pour différents plans de la profondeur de champ du microscope. Dans un plan d'imagerie la PSF peut être approximée par une fonction gaussienne qui nous donne accès à la position latérale de l'émetteur. Cependant, la position axiale ne peut pas s'obtenir aussi facilement pour deux raisons principales : (i) pour un microscope sans aberration la PSF est totalement symétrique le long de l'axe optique par rapport au plan de focalisation, et (ii) la largeur de la PSF varie très peu dans les plans proches du plan de focalisation.

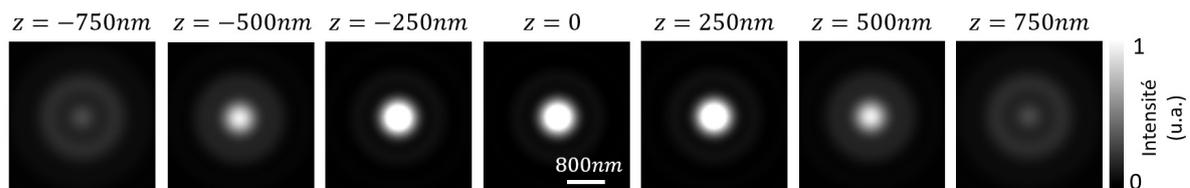


Figure 2 : Simulation des PSF obtenues dans différents plans pour un émetteur fluorescent de longueur d'onde d'émission $\lambda_{em} = 700nm$ au travers d'un microscope d'ouverture numérique $NA = 1.3$

Ces dernières années des techniques de microscopie ont été développées pour obtenir la localisation tridimensionnelle de molécules uniques dans des échantillons biologiques. Nous allons détailler ces techniques et comprendre leurs avantages et leurs limitations. Un tableau récapitulatif se trouve en figure 8.

Mise en forme de la PSF

Une manière de s'affranchir de la symétrie de la PSF le long de l'axe optique est d'introduire des aberrations sur le chemin optique et ainsi donner une forme spécifique à la PSF dans chaque plan d'imagerie. Pour cela, une méthode peu coûteuse consiste à placer une lentille cylindrique sur le chemin optique et à utiliser l'astigmatisme ainsi introduit pour différencier chaque plan axial [22] [23]. La figure 3(a) illustre cette méthode qui permet d'obtenir une précision de localisation latérale de $\sigma_{xy} = 10nm$ et axiale de $\sigma_z = 20nm$

[22] Kao, *Biophysical Journal*, 1994

[23] Huang, *Science*, 2008

pour 1000 photons détectés. D'autres techniques utilisent un modulateur spatial de lumière (*Spatial Light Modulator* SLM, en anglais), placé dans le plan de Fourier en sortie du microscope, pour moduler la phase du faisceau de fluorescence. Ainsi, le faisceau peut former une double hélice [24] [Fig3(b)] et peut être courbé [25].

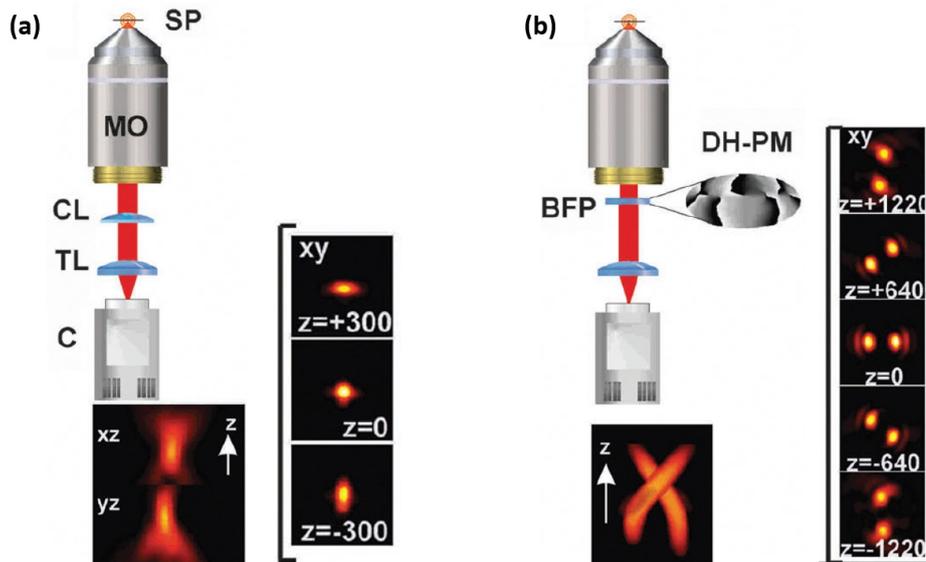


Figure 3 : (a) Montage optique de la technique de mise en forme de la PSF par ajout d'une lentille cylindrique en sortie de microscope : la position axiale est encodée dans l'astigmatisme ainsi ajouté dans la PSF. (b) Montage optique de la technique de mise en forme de la PSF en double hélice : un masque de phase (DH-PM) est placé dans le plan de Fourier en sortie du microscope (BFP) pour donner sa forme à la PSF (Figure extraite de Hajj, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014 [26])

Selon la même idée, une technique plus récente utilise un algorithme basé sur les polynômes de Zernike pour moduler la phase du faisceau fluorescent par un miroir déformable [27]. Cela permet de mieux tenir compte des paramètres expérimentaux et d'obtenir une précision de localisation plus isotrope : $\sigma_{xy} = 7nm$ et $\sigma_z = 10nm$ pour 4600 photons détectés. Il faut cependant tenir compte d'un élargissement de la PSF lorsqu'elle est déformée, cela divise le nombre de photons reçus par le détecteur sur plus de pixels et nécessite de travailler avec des échantillons ayant une faible densité de marquage. De plus, ces techniques de mise en forme de la PSF ont une forte sensibilité vis à vis des aberrations présentes dans les échantillons.

[24] Pavani, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009

[25] Jia, *Nature Photonics*, 2014

[27] Aristov, *Nature Communication*, 2018

Multiplan

Une solution pour obtenir une localisation 3D de l'émetteur sans ambiguïté consiste à l'imager dans plusieurs plans de mise au point : on exploite ainsi la variation de la PSF suivant Z en levant l'indétermination due à la symétrie de la PSF par rapport au plan de mise au point. Une manière simple pour réaliser cela consiste à séparer le faisceau de fluorescence en deux et de collecter la fluorescence sur deux caméras conjuguées à deux plans différents de l'échantillon [28] [29]. Ces deux plans doivent être séparés de $0.5\mu\text{m}$ à $1\mu\text{m}$ de manière à ce qu'une particule soit hors du plan focal pour au moins l'un des deux plans imagés. En utilisant une succession de séparateurs de faisceaux, il est possible d'imager simultanément 8 plans et d'obtenir une profondeur de champ de $3.5\mu\text{m}$ [30]. D'autres techniques, utilisant un réseau de diffraction, permettent de faire l'image de plusieurs plans simultanément [31] [32]. La figure 4 illustre le principe du multiplan pour l'imagerie de super-résolution 3D.

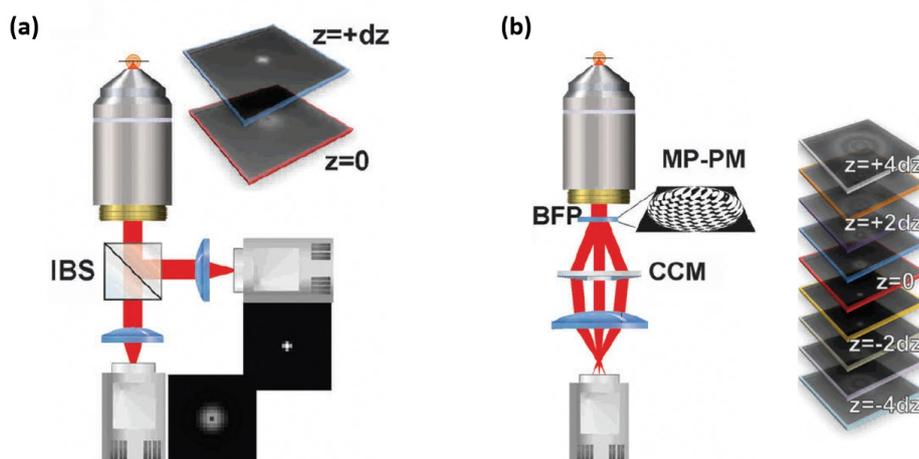


Figure 4 : (a) Montage optique de la microscopie biplan : un cube (intensity beam splitter, IBS) sépare le faisceau de fluorescence en deux de manière à ce qu'une PSF soit échantillonnée sur deux plans. (b) Montage optique de la microscopie multiplan : un masque de phase (MP-PM) est placé dans le plan de Fourier en sortie du microscope (BFP) pour séparer le faisceau de fluorescence, les aberrations chromatiques sont corrigées par le module prisme CCM, et tous les plans sont imagés sur la même caméra (Figure extraite de Hajj, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014 [26])

-
- [28] Prabhat, *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 2004
 - [29] Ram, *Biophysical Journal*, 2008
 - [30] Geissbuehler, *Nature Communications* 2014
 - [31] Dalgrano, *Optics Express*, 2010
 - [32] Abrahamsson, *Nature Methods*, 2012

La précision de localisation axiale obtenue est de $\sigma_z = 15nm$ pour 1000 photons émis [33]. L'utilisation de plusieurs plans d'imagerie permet d'augmenter la profondeur de champ. Cependant, cette technique nécessite de travailler avec des émetteurs brillants car le nombre de photons émis est divisé par le nombre de plans d'imagerie.

Angle super critique

Selon les lois de Snell-Descartes, lorsque l'indice du verre est supérieur à l'indice du milieu d'imagerie ($n_v > n_m$), l'émission de fluorescence est transmise par l'objectif de microscope dans un cône de fluorescence limité par l'angle critique $\theta_C = \arcsin(n_m/n_v)$. La fluorescence collectée dans ce cône est appelée la fluorescence sous l'angle critique (*Under-critical Angle Fluorescence*, UAF, en anglais). Si l'émetteur fluorescent se trouve à une distance d de la lamelle inférieure à la longueur d'onde d'émission $d < \lambda_{em}$, alors on observe l'émission de fluorescence super-critique (*Super-critical Angle Fluorescence*, SAF, en anglais) car l'onde évanescente devient propagative et elle est collectée par l'objectif. La distance du fluorophore à la lamelle peut alors être connue en mesurant ces émissions UAF ou SAF [34].

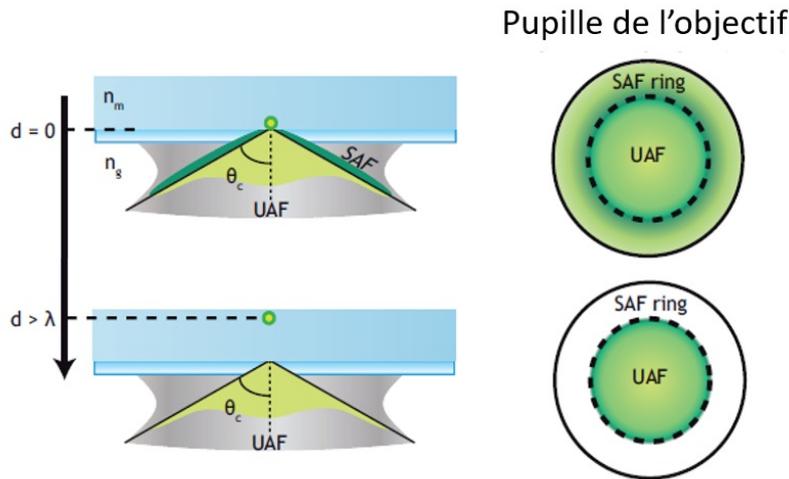


Figure 5 : Principe de la collection de la fluorescence super-critique : pour un émetteur situé à une distance d de la lamelle, tel que $0 < d < \lambda_{em}$, la partie évanescente de la fluorescence est collectée par l'objectif au delà de l'angle critique θ_C . Schéma extrait de Bourg, *Nature Photonics*, 2015 [34]

Cette méthode, illustrée en figure 5, permet de localiser en 3D une molécule unique avec une précision de localisation axiale inférieure à $40nm$, pour un rapport signal à bruit de 7 et une distance $d < 0.5\lambda_{em}$. La position axiale retrouvée est une position absolue par

[33] Badieirostami, *Applied Physics Letters*, 2010

[34] Bourg, *Nature Photonics*, 2015

rapport à la lamelle de microscope. Comme elle est basée sur l'émission super-critique de fluorescence, cette technique est applicable pour des molécules présentes dans le premier micron au-dessus de la lamelle. C'est la seule technique à fournir une mesure absolue.

Méthodes interférométriques

La localisation axiale d'une molécule unique peut être retrouvée en faisant interférer le faisceau de fluorescence avec lui-même. C'est le principe sur lequel repose cette thèse, mais c'est aussi le principe du iPALM (*interferometric Photoactivated Localisation Microscopy*) [35] dans une réalisation totalement différente. Le montage optique du iPALM comporte deux objectifs en configuration 4Pi [36], de manière à ce qu'ils collectent la fluorescence émise par une même molécule.

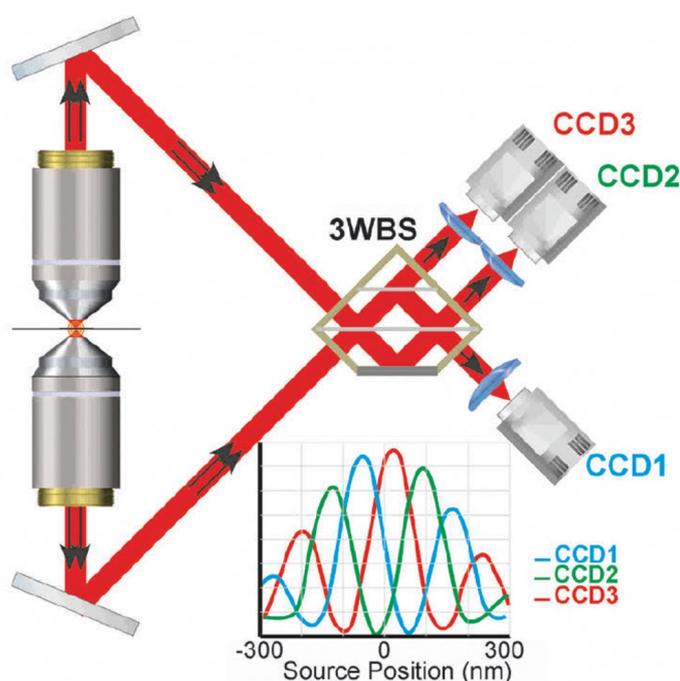


Figure 6 : Schéma de la configuration iPALM : le prisme 3WBS, three-way beam splitter, fait interférer les deux faisceaux fluorescents collectés par les objectifs sur trois caméras, puis ces signaux sont comparés à une calibration pour extraire la localisation axiale d'une molécule unique (Figure extraite de Hajj, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2014 [26])

Comme illustré en figure 6, en utilisant un séparateur de faisceaux spécifique, les deux faisceaux de fluorescence collectés par les deux objectifs sont recombinaison de manière à interférer de trois manières différentes sur trois détecteurs. La position axiale d'une molécule est déterminée en fonction des amplitudes des interférences collectées sur chacune

[35] Shtengel, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009

[36] Hell, *Optics Communications*, 1992

des caméras. Le iPALM permet de localiser avec une précision inférieure à $10nm$ une molécule émettant 1500 photons. Cette très grande précision est principalement due à l'utilisation de deux objectifs qui permettent de collecter les photons émis dans un angle solide de 4π . Cependant, cette technique est limitée par la profondeur de champ qui est de $225nm$.

Une amélioration du iPALM utilise la polarisation de la fluorescence. Cette technique, nommée 4Pi-SMS (*4Pi-single marker switching*)[37], étend la profondeur de champ à $1\mu m$ et est utilisable pour faire l'imagerie d'échantillon vivant.

Dans ce contexte où de nombreuses techniques ont déjà été développées afin d'accéder à la localisation axiale de molécules uniques, il est important de comprendre les enjeux actuels de la microscopie de super-localisation 3D.

Enjeux

La nanoscopie, comme nous venons de le voir au travers de toutes ces techniques, permet d'accéder à la localisation précise de molécules dans des échantillons biologiques, vivants ou non. Ces recherches, largement utilisées en biologie cellulaire [38] [39] [40] [41], ont permis d'explorer les mécanismes cellulaires à l'échelle moléculaire. Ces mécanismes complexes sont cependant étudiés sur des échantillons de cellules individuelles ou bien sur les premières couches cellulaires d'un échantillon tissulaire. Or il est pertinent, pour s'apparenter à l'*in vivo*, de prendre en compte les cellules dans leur environnement réel, c'est à dire au sein d'une structure tridimensionnelle telle qu'un organe ou qu'un organoïde [42] [43].

Des études faites sur des organes entiers sont apparues dans les années 2010 grâce au développement de procédés chimiques pour la clarification [44] ou bien pour la microscopie par expansion [45]. Récemment, une carte cellulaire d'un cerveau entier a été obtenue grâce à une combinaison de clarification et de microscopie par expansion [46]. Ces tra-

[37] Aquino, *Nature Methods*, 2011

[38] York, *Nature Methods*, 2011

[39] Gahlmann, *Nature Review Microbiology*, 2013

[40] Sahl, *Current Opinion in Structural Biology*, 2013

[41] Maglione, *Nature Neuroscience*, 2013

[42] Eiraku, *Current Opinion in Neurobiology*, 2012

[43] Clevers *Cell*, 2016

[44] Dodt, *Nature Methods*, 2007

[45] Chen, *Science*, 2015

[46] Murakami, *Nature Neuroscience*, 2018

vaux permettent d'accéder à une carte d'un organe entier à l'échelle moléculaire mais sont incompatibles avec l'imagerie d'échantillons vivants.

Cependant, pour conserver une compatibilité avec le vivant, la microscopie de super-résolution est difficile à mettre en œuvre au sein d'échantillons tissulaires. En effet, la complexité du tissu biologique empêche une bonne transmission du signal de fluorescence, signal limité par la photophysique de la molécule fluorescente. Un échantillon biologique épais et dense n'est pas transparent vis à vis du signal de fluorescence. Comme l'illustre la figure 7, des altérations du signal sont dues à l'absorption, à la diffusion et à la présence d'aberrations dans l'échantillon.

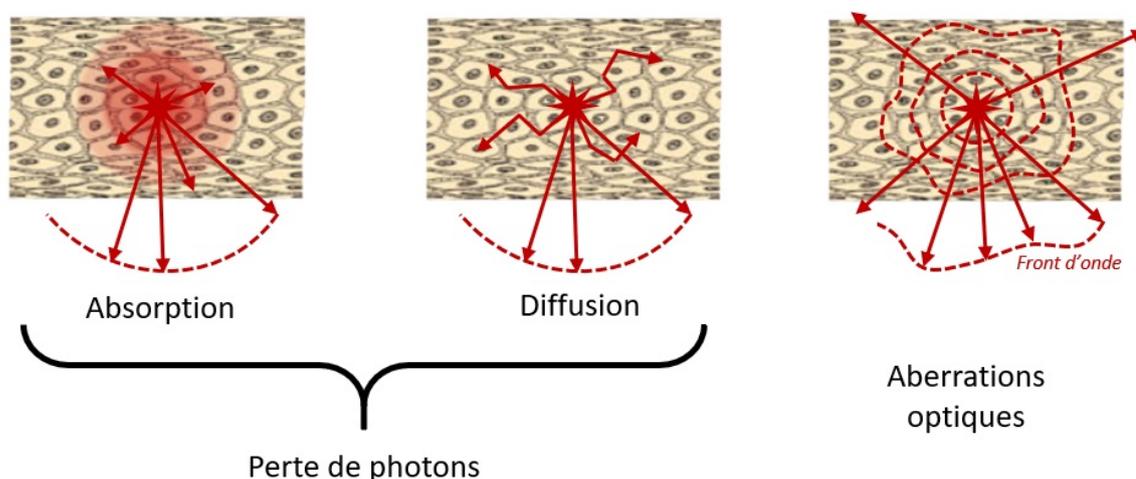


Figure 7 : Illustration de la perte de signal dans un échantillon biologique épais

Ces phénomènes physiques limitent les techniques de super-résolution 3D actuelles. Le nombre de photons étant limité, il devient complexe d'utiliser la microscopie multi-plan qui sépare les photons sur les différents plans d'imagerie. Et les aberrations présentes dans l'échantillon rendent difficile l'utilisation des techniques de mise en forme de la PSF pour localiser des molécules en profondeur dans le tissu : la présence de ces aberrations vient altérer la mise en forme déterministe nécessaire. De plus la PSF est élargie lors de sa déformation, ce qui étale spatialement les photons sur le détecteur. Si ces techniques permettent d'obtenir une très bonne résolution sur $5\mu m$ de profondeur [27], elles n'ont pas été utilisées, jusqu'à présent, au delà de $10\mu m$ au sein d'un tissu sans avoir recours à des techniques basées sur la confocalité [47] ou l'optique adaptative.

[27] Aristov, *Nature Communication*, 2018

[47] Park, *Neuroscience*, 2018

Dans cette thèse, nous avons développé une nouvelle technique de super-localisation 3D permettant de répondre au besoin de localiser en 3D des molécules uniques en profondeur dans des tissus biologiques intacts. Cette technique, basée sur l'interférence du signal de fluorescence avec lui-même, est nommée SELFI (*Self Interferences*).

Technique 3D	Précision de localisation axiale (pour 1000 photons)	Avantages	Inconvénients pour aller en profondeur dans l'échantillon
Mise en forme de la PSF	20nm	Bonne précision de localisation Relativement simple à mettre en œuvre	Sensibilité importante aux aberrations optiques non-contrôlées Étalement de la PSF
Multiplan	15nm	Augmentation de la profondeur de champ	Division du budget photon
Super-critique	<40nm	Obtention d'une localisation axiale absolue par rapport à la lamelle	Valable uniquement en champ proche
iPALM	<10nm	Très grande précision de localisation	Montage ne permettant pas d'aller au-delà d' $1\mu\text{m}$ dans l'échantillon

Figure 8 : Tableau récapitulatif des techniques de super-résolution 3D existantes avec leurs avantages et leurs limitations

Organisation du manuscrit

Ce manuscrit est composé de trois chapitres.

Dans le premier chapitre, le principe et le fonctionnement de la technique SELFI seront décrits. Nous verrons comment le phénomène des interférences peut être utilisé pour mesurer la position tridimensionnelle d'une molécule unique. En nous appuyant sur la théorie et sur l'expérience, nous montrerons que cette méthode est robuste et qu'elle permet de localiser, avec une précision inférieure à 40nm , un émetteur fluorescent présent à une profondeur de $50\mu\text{m}$ de profondeur dans un échantillon complexe.

Le deuxième chapitre est consacré à l'étude d'échantillons biologiques statiques. Nous observerons que la méthode SELFI peut être combinée à différentes méthodes permettant de se placer dans un régime de détection de molécules individuelles (dSTORM, PALM, uPAINT). Dans un échantillon biologique dont la structure tridimensionnelle est déjà connue, nous montrerons que nous sommes capables de retrouver les valeurs attendues. Puis, dans des échantillons fins comme dans des échantillons d'une centaine de microns

d'épaisseur, nous verrons que la technique SELFI permet de faire des images de super-résolution 3D à haute densité de marquage. Nous discuterons ensuite d'un projet, fait en collaboration avec une équipe de neurobiologistes, sur l'étude de l'organisation spatiale des récepteurs synaptiques.

Enfin, dans le troisième chapitre nous confirmerons qu'il est pertinent d'utiliser la technique SELFI pour l'étude dynamique en profondeur dans des échantillons biologiques vivants. Nous terminerons par une étude montrant que la microscopie de super-résolution peut être corrélée à l'imagerie sans marquage pour apporter de nouvelles informations à propos des échantillons biologiques.

Chapitre 1

Imagerie de super résolution en 3D par interférences auto-référencées

Le phénomène d'interférences se produit lorsque au moins 2 ondes cohérentes se recouvrent. La superposition de ces ondes peut donner lieu à une intensité nulle localement, on parle alors d'*interférences destructives*, ou à une intensité non nulle lors d'*interférences constructives*. Si des ondes non cohérentes entre elles arrivent au même endroit au même moment, leurs intensités s'ajoutent simplement et nous n'observons pas d'interférences.

En microscopie, le phénomène d'interférences peut être utilisé pour augmenter le contraste de l'échantillon. Le contraste de phase de Zernike permet, par déphasage, d'atténuer l'amplitude de la lumière qui n'est pas diffractée par l'échantillon [48]. Autre exemple, la technique du contraste interférentiel différentiel (*DIC*) [49] se sert d'un prisme de Wollaston pour séparer spatialement le faisceau d'illumination en deux. Les deux répliques vont subir un déphasage en traversant l'échantillon, puis, après recombinaison avec un deuxième prisme de Wollaston, elles vont interférer sur le détecteur. Cela résulte en une image faisant apparaître un contraste lié aux gradients de phase invisibles en microscopie de transmission classique.

Il existe aussi des méthodes interférométriques en microscopie de fluorescence. Par exemple, l'holographie de corrélation incohérente de Fresnel (*Fresnel Incoherent Correlation Holography* - FINCH) [50] se base sur l'interférence de la fluorescence émise par l'échantillon lui-même. Cette méthode permet de reconstruire une image en trois dimensions de l'échantillon. Cependant comme l'holographie FINCH nécessite de travailler avec

[48] Zernike, *Z. Tech. Phys.*, 1935

[49] Kagalwala, *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics*, 2003

[50] Rosen, *Nature Photonics*, 2008

un signal défocalisé, il est difficile de l'utiliser en microscopie de localisation de molécules uniques. En effet, la brillance d'une molécule fluorescente individuelle est faible.

En microscopie de super-résolution, la seule méthode existante à ce jour permettant de faire efficacement des interférences avec le signal de fluorescence émis par une molécule unique est le iPALM [35] (*Interferometric Photoactivated Localization Microscopy*). Malgré la complexité du montage optique, c'est la technique de super-résolution 3D la plus précise car elle collecte la quasi-totalité des photons grâce au montage 4π . Cependant elle est limitée à une étude en surface de l'échantillon (à moins de $1\mu m$ de profondeur). Il n'est pas possible d'utiliser le iPALM pour la localisation de molécules uniques au sein d'échantillons d'une centaines de microns d'épaisseur, la cohérence entre les bras de collection étant impossible à assurer en tous points du champ de vue.

Dans ce chapitre, nous allons voir une nouvelle approche basée sur les auto-interférences (*self-interferences*). Nous discuterons de l'interprétation de ce signal afin de mesurer la localisation spatiale tridimensionnelle d'une molécule unique. Puis, nous montrerons que cette technique, utilisée au cours de ce travail de thèse, est robuste en profondeur dans un échantillon biologique épais.

1.1 Super-localisation par interférences auto-référencées

Dans cette partie nous allons détailler le principe sur lequel repose la technique SELFI (*Self Interferences*) développée au sein du LP2N [51]. Nous comprendrons d'abord que le signal de phase porte l'information de la position axiale. Puis, nous verrons la formation d'interférogrammes et enfin nous expliquerons comment extraire une localisation à partir de cet interférogramme.

1.1.1 Mise en évidence d'une complémentarité entre l'intensité et la phase

Intéressons nous à un émetteur fluorescent dont l'image est formée par un microscope. Il est important de comprendre que toute l'étude qui suit se fait lors de la détection du signal de fluorescence : nous nous plaçons en sortie du microscope, en supposant une émission de lumière isotrope par un émetteur ponctuel.

[35] Shtengel, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009

[51] Bon & Linares-Loyez, *Nature Methods*, 2018

Par définition, l'image d'un point source par un système optique est la fonction d'étalement du point. Le champ électromagnétique en sortie de microscope peut être approximé par un faisceau gaussien et peut s'écrire $PSF(x, y, z) = |PSF|(x, y, z)\exp(i\cdot\varphi(x, y, z))$, avec x , y et z les coordonnées de la position considérée du signal détecté, et $\varphi(x, y, z)$ la phase en ce point, que nous définissons comme étant la courbure du champ émis. Le schéma de la figure 1.1 représente la propagation d'un faisceaux gaussien en sortie de microscope, les notations utilisées y sont décrites.

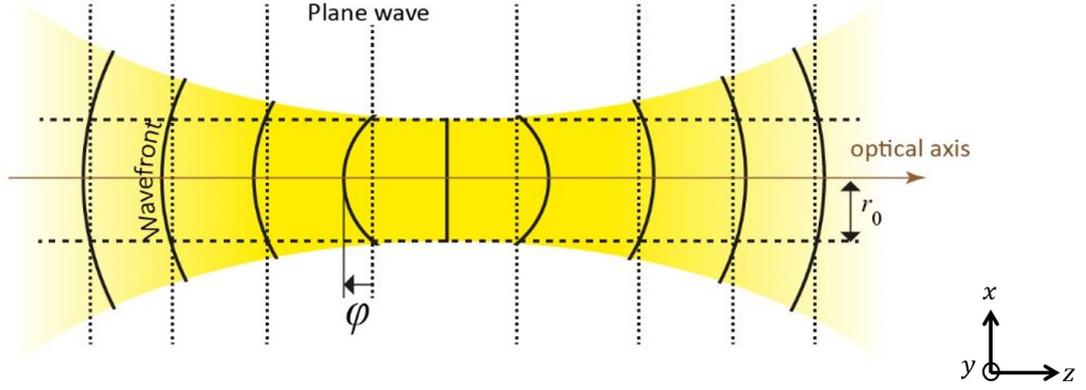


Figure 1.1 : Schéma de la propagation du faisceau gaussien en sortie de microscope

Dans le cas d'un microscope sans aberration et d'ouverture numérique NA , nous pouvons approximer la propagation du faisceau de fluorescence comme la propagation d'un faisceau gaussien :

$$|PSF|(r, z) \approx \frac{I_0}{2\pi\sigma(z)^2} \exp\left[\frac{-r^2}{2\sigma(z)^2}\right], \quad (1.1)$$

où

$$\begin{cases} \sigma(z) \approx \sigma_0 \left[1 + \frac{z^2}{8k^2\sigma_0^4}\right] \\ \sigma_0 = \frac{r_{PSF}}{2\sqrt{2\ln 2}} \end{cases}$$

Avec I_0 le nombre de photons détectés, λ la longueur d'onde, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ le vecteur d'onde et $r_{PSF} = 1,22\frac{\lambda}{2NA}$ le rayon de la PSF. Pour simplifier les écritures on pose $r^2 = x^2 + y^2$. Quant à la phase du champ électromagnétique, définie comme la courbure du front d'onde, elle peut s'écrire :

$$\varphi(r, z) = -k\frac{r^2 - r_0^2}{R(z)}, \quad (1.2)$$

avec $R(z)$ le rayon de courbure du front d'onde dans le plan z .

Pour un microscope d'ouverture numérique $NA_{obj} = 1.3$ et un grandissement $g_y = 60$, l'ouverture numérique image est $NA_{image} = NA_{obj}/g_y = 0.02$, on peut donc se placer dans l'approximation de l'optique paraxiale et

$$R(z) \approx z \left(1 + \frac{2k^2\sigma^4}{z^2} \right).$$

La figure 1.2 présente les courbes d'intensité et de phase en fonction de la position axiale pour un montage optique d'ouverture numérique $NA = 1.3$, de grandissement $g_y = 60$ et utilisé à une longueur d'onde $\lambda = 700nm$. Pour plus de simplicité ces courbes sont tracées pour $r = 0$, c'est à dire au centre du faisceau.

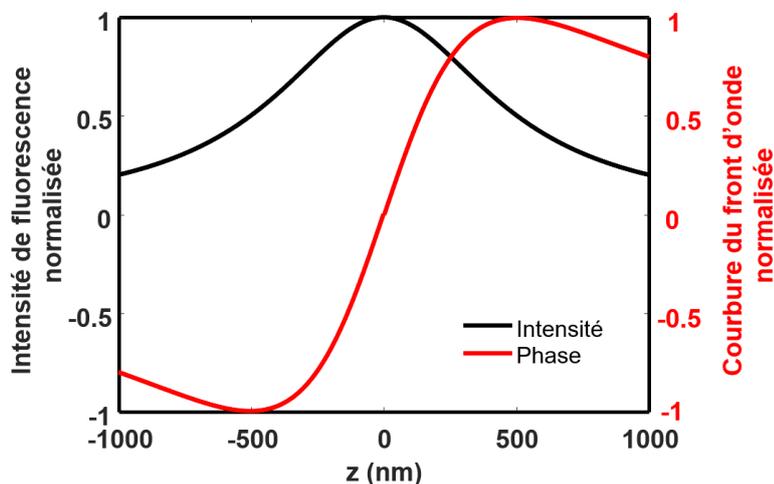


Figure 1.2 : *Propagation de l'intensité et de la phase d'un faisceau gaussien sur une profondeur de champ de $2\mu m$, pour un montage optique d'ouverture numérique $NA = 1.3$, de grandissement $g_y = 60$, à une longueur d'onde $\lambda = 700nm$*

Le signal d'intensité peut être approximé par une gaussienne dont on peut calculer le centroïde. Cela permet de connaître la position d'une particule dans le plan image avec une précision inférieure au rayon de la PSF, on parle alors de super-localisation (*cf.* Introduction). Comme l'intensité de fluorescence varie doucement dans la profondeur de champ, il est toujours possible d'extraire la position latérale d'une particule dans la profondeur de champ. Au contraire, le signal de phase subit une forte variation au cours de la propagation du champ électromagnétique, c'est donc à partir de ce signal que l'on peut espérer déterminer la position axiale de la particule avec précision.

Notons que ces deux signaux, d'intensité et de phase, portent des informations complémentaires : l'un porte l'information sur la localisation latérale et l'autre porte celle sur la

localisation axiale. C'est sur cette complémentarité que repose la technique de localisation tridimensionnelle SELFIE. Nous allons maintenant voir comment mesurer et extraire ces informations.

1.1.2 Formation d'interférences auto-référencées

Nous avons constaté qu'une mesure conjointe de l'intensité et de la phase donne accès au positionnement tridimensionnel d'un émetteur ponctuel. Nous allons maintenant montrer comment générer des interférences permettant de remonter à ces grandeurs utiles. La fluorescence émise par une molécule résulte d'une désexcitation radiative depuis un niveau vibrationnel de haute énergie. En raison de la présence de différents niveaux vibrationnels, le spectre de fluorescence est un spectre relativement étalé, ce que l'on observe sur l'exemple présenté sur la figure 1.3.

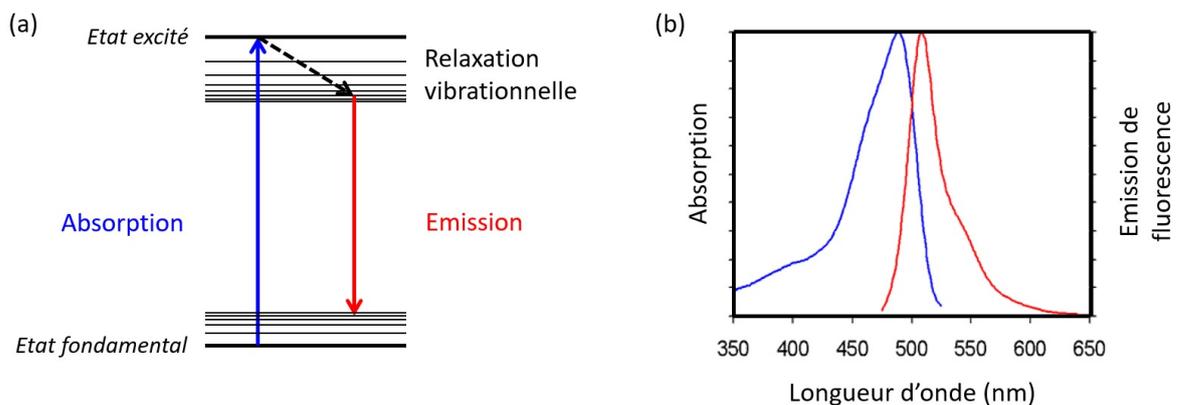


Figure 1.3 : (a) Diagramme de Jablonski simplifié d'une molécule fluorescente; (b) spectre d'absorption et d'émission de la Green Fluorescent Protein (GFP), l'une des molécules fluorescentes les plus utilisées en bio-imagerie.

La largeur de ce spectre est trop grande pour qu'une molécule fluorescente soit considérée comme une source cohérente temporellement. Cette incohérence ainsi que la statistique de temps de vie sur l'état excité rendent très difficile l'utilisation d'une référence extérieure, comme en holographie classique [52], pour faire des interférences. La technique que nous avons développée repose sur l'utilisation d'un réseau de diffraction, dont nous détaillerons les propriétés, permettant de générer des interférences malgré une incohérence temporelle : le réseau diffracte le signal et les ordres de diffraction, cohérents entre eux, interfèrent sur la caméra. Nous obtenons ainsi des interférences auto-référencées, d'où le nom de la technique SELFIE (*Self Interferences*).

[52] Cuche, *Appl. Opt.*, 1999

Dans la suite de cette section, nous allons d’abord comprendre le fonctionnement du réseau de manière géométrique, puis de manière analytique.

Compréhension géométrique du phénomène

La technique SELFI repose sur l’utilisation de répliques faiblement décalées du faisceau de fluorescence. Ces répliques interfèrent dans le plan du détecteur, là où elles se recouvrent. Le principe est très similaire au principe de l’analyseur de front d’onde à décalage quadrilatéral [53] dont nous parlerons en fin de chapitre. La figure 1.4 explique ce principe.

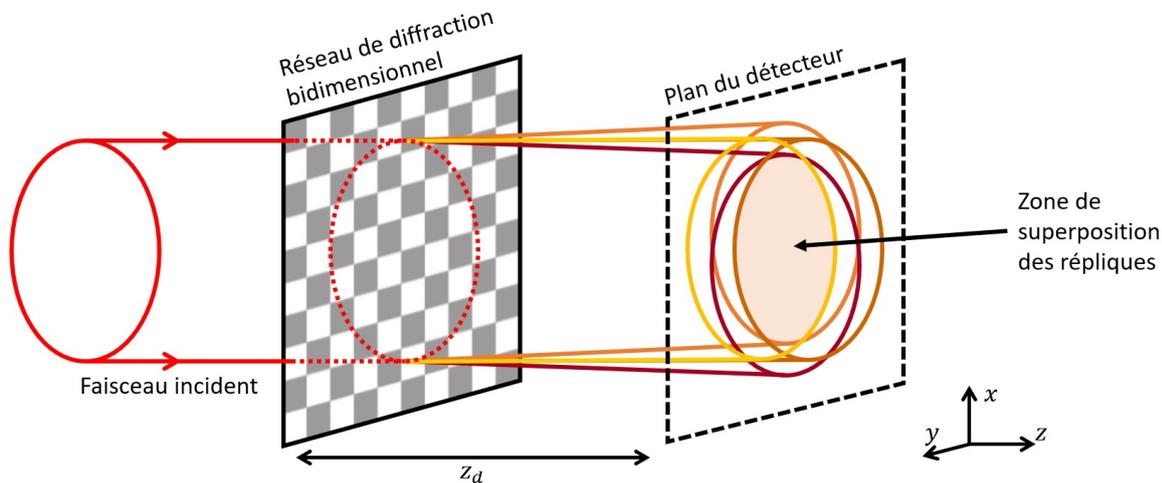


Figure 1.4 : Schéma de principe de la technique SELFI : visualisation tridimensionnelle de la formation de répliques qui interfèrent dans le plan du détecteur.

Le réseau utilisé dans cette thèse est un réseau de phase pur, c’est à dire qu’il ne module pas l’amplitude du signal. Cela est important en microscopie de super-résolution car le signal de fluorescence d’une molécule unique est très faible, il faut donc transmettre un maximum de photons jusqu’à la caméra.

Comme le signal de fluorescence est incohérent temporellement, il faut que le réseau de phase permette d’obtenir un signal d’interférences qui puisse être considéré comme achromatique sur une étendue spectrale équivalente au spectre d’émission de fluorescence. Une solution consiste à utiliser un réseau ne transmettant pas l’ordre 0 de la diffraction [54]. Nous avons donc choisi de construire un réseau en damier, déphasant un trou sur

[53] Bon, *Opt. Express*, 2009

[54] Primot, *Appl. Opt.*, 2000

deux de π , comme illustré en figure 1.5. La transmittance du réseau de pas p s'écrit :

$$t(x, y) = \exp \left[i\pi \operatorname{rect} \left(\frac{x}{p} \right) \operatorname{rect} \left(\frac{y}{p} \right) \right], \quad (1.3)$$

avec $\operatorname{rect}(\alpha) = \begin{cases} 1 & \text{si } -\frac{p}{2} < \alpha < 0 \\ 0 & \text{si } 0 < \alpha < \frac{p}{2} \end{cases}$

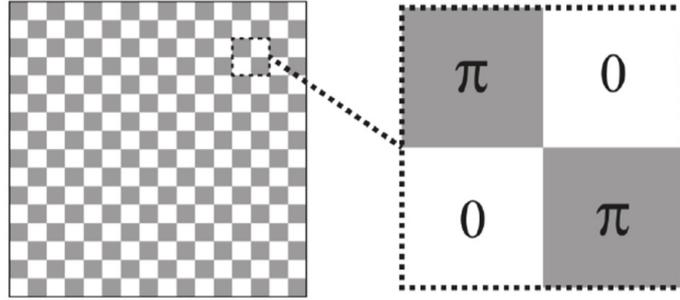


Figure 1.5 : Réseau de phase bidimensionnel en damier, déphasant une case sur deux de π

Il est intéressant de faire apparaître les ordres diffractés par ce réseau en écrivant la transmittance $t(x, y)$ en série de Fourier. Pour simplifier les écritures, nous allons d'abord calculer les coefficients de Fourier c_n dans le cas unidimensionnel le long de x , puis nous généraliserons pour obtenir l'expression de la transmittance dans le cas bidimensionnel. Par définition :

$$t(x) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} c_n e^{2i\pi \frac{n}{p} x}, \quad (1.4)$$

$$\text{avec } c_n = \frac{1}{p} \int_{-p/2}^{p/2} t(x) e^{-2i\pi \frac{n}{p} x} dx,$$

qui se réécrit :

$$c_n = \frac{1}{p} \int_{-p/2}^0 e^{-2i\pi \frac{n}{p} x} dx - \frac{1}{p} \int_0^{p/2} e^{-2i\pi \frac{n}{p} x} dx.$$

Pour $n = 0$, $c_n = 0$. Et pour tout $n \neq 0$ on trouve :

$$\begin{aligned} c_n &= \frac{-1}{p} \left[\frac{e^{-2i\pi \frac{n}{p} x}}{2i\pi \frac{n}{p}} \right]_{-p/2}^0 + \frac{1}{p} \left[\frac{e^{-2i\pi \frac{n}{p} x}}{2i\pi \frac{n}{p}} \right]_0^{p/2} \\ &= \frac{1}{2i\pi n} (e^{i\pi n} + e^{-i\pi n} - 2) \\ &= \frac{i}{\pi n} (1 - \cos(\pi n)). \end{aligned}$$

Donc

$$\begin{cases} \forall n \text{ pair et } n \neq 0, & c_n = 0 \\ \forall n \text{ impair,} & c_n = \frac{2i}{\pi n}. \end{cases}$$

Que l'on peut écrire :

$$\forall n, \quad c_n = \frac{2i}{\pi(2n+1)}. \quad (1.5)$$

La figure 1.6 représente les amplitudes des ordres diffractés par le réseau unidimensionnel. Nous retrouvons la décroissance des amplitudes de Fourier en $1/n$, ce qui est attendu pour un signal créneau. Le déphasage de π permet, par interférences destructives, de supprimer tous les ordres pairs, notamment l'ordre 0 qui représente le champ non diffracté par le réseau.

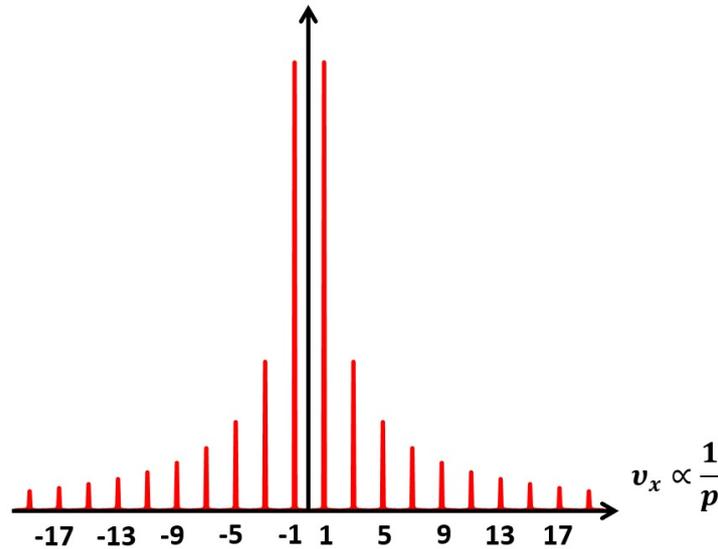


Figure 1.6 : *Amplitude de Fourier du réseau unidimensionnel selon les fréquences ν_x*

Nous pouvons généraliser cette équation au réseau de phase bidimensionnel :

$$t(x, y) = \frac{-4}{\pi^2} \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \sum_{m=-\infty}^{+\infty} \frac{e^{\frac{2i\pi}{p}[(2n+1)x+(2m+1)y]}}{(2n+1)(2m+1)}. \quad (1.6)$$

L'énergie diffractée dans chacun des ordres peut donc être obtenue pour une onde incidente plane [Fig.1.7] : 66% de l'énergie transmise par le réseau se retrouve dans les quatre premiers ordres de diffraction (les ordres +1 et -1 selon les deux directions x et y).

Ce qui nous permet de considérer que le réseau génère principalement quatre répliques du signal et que ce sont ces quatre répliques qui sont majoritairement responsables de la formation de l'interférogramme.

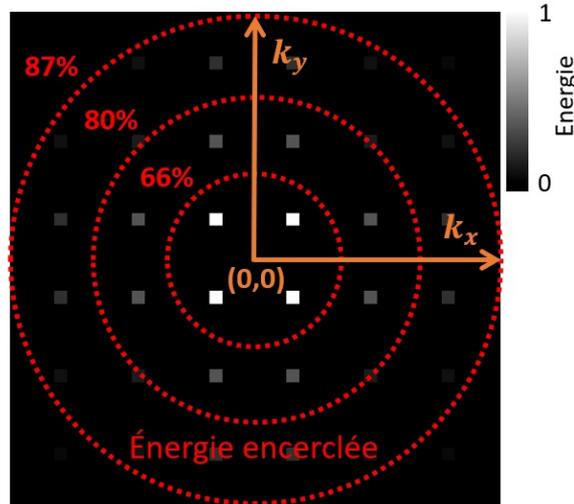


Figure 1.7 : Transformée de Fourier du réseau de phase bidimensionnel

La figure 1.8 présente un schéma du montage optique que nous avons construit pour utiliser ce réseau. Nous définissons l'axe z comme étant l'axe de focalisation.

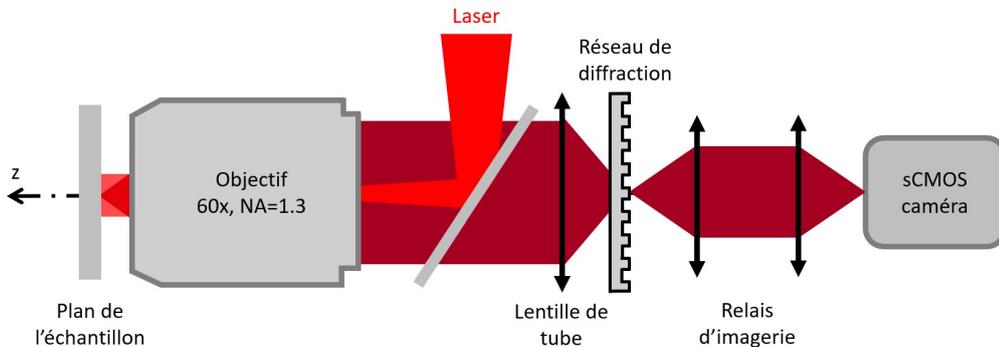


Figure 1.8 : Schéma du montage optique

Un laser est envoyé sur l'échantillon pour exciter les molécules fluorescentes, puis le signal de fluorescence est collecté par l'objectif (objectif à huile de silicone, Olympus, 60x, NA=1.3). Le réseau de diffraction est placé en sortie du microscope, quelques microns avant le plan image du microscope, pour que les répliques se superposent à l'échelle de la PSF. Par simplicité de montage nous utilisons un relais d'imagerie pour relayer le plan image sur la caméra (sCMOS, Orca Flash 4, Hamamatsu). Ce relais d'imagerie a une

ouverture numérique de 0,25, ce qui permet de collecter 87% de l'énergie transmise par le réseau à une longueur d'onde $\lambda_{em} = 700nm$ et 92% à $\lambda_{em} = 520nm$. On a donc peu de perte de photons au cours du chemin optique.

La figure 1.9 présente trois interférogrammes, correspondant à trois localisations axiales différentes, obtenus dans ces conditions expérimentales pour une nanoparticule fluorescente émettant 2000 photons.

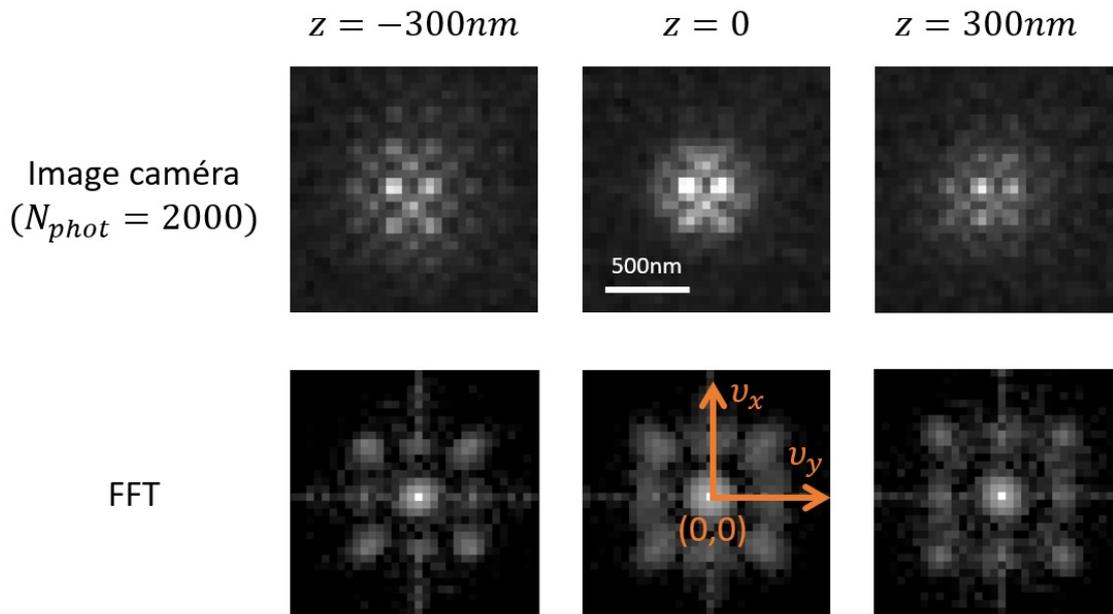


Figure 1.9 : *Interférogrammes obtenus sur la caméra pour différentes localisations axiales, dans les conditions expérimentales citées pour une nanoparticule fluorescente émettant 2000 photons, avec leurs transformées de Fourier respectives*

Considérons le cas unidimensionnel dans un premier temps. Selon les notations détaillées sur le schéma de la figure 1.10, le champ au point de coordonnée x peut être vu comme la somme de deux champs :

— l'ordre -1 du champ au point $x + \frac{s}{2}$:

$$E(x + s/2) = \frac{a(x + s/2)}{\sqrt{2}} e^{ik_0\varphi(x+s/2) + i\vec{k}_- \cdot \vec{r}},$$

— et l'ordre +1 du champ au point $x - \frac{s}{2}$:

$$E(x - s/2) = \frac{a(x - s/2)}{\sqrt{2}} e^{ik_0\varphi(x-s/2) + i\vec{k}_+ \cdot \vec{r}}.$$

On pose $i_0(x) = \frac{a^2(x+s/2) + a^2(x-s/2)}{2}$ et $i(x) = a(x + s/2) a(x - s/2)$. Nous écrivons l'intensité dans le plan du détecteur, au point x :

$$\begin{aligned} I(x) &= \left| \frac{E(x+s/2)}{\sqrt{2}} + \frac{E(x-s/2)}{\sqrt{2}} \right|^2 \\ &= \frac{1}{2} (E(x + s/2) + E(x - s/2)) \cdot (E^*(x + s/2) + E^*(x - s/2)) \\ &= i_0(x) + \frac{i(x)}{2} \left[\begin{array}{c} e^{ik_0\varphi(x+s/2) + i\vec{k}_- \cdot \vec{r} - ik_0\varphi(x-s/2) - i\vec{k}_+ \cdot \vec{r}} \\ + e^{-ik_0\varphi(x+s/2) - i\vec{k}_- \cdot \vec{r} + ik_0\varphi(x-s/2) + i\vec{k}_+ \cdot \vec{r}} \end{array} \right] \\ &= i_0(x) + i(x) \cos \left[k_0 (\varphi(x + s/2) - \varphi(x - s/2)) + (\vec{k}_- - \vec{k}_+) \cdot \vec{r} \right] \end{aligned}$$

D'après les notations introduites en figure 1.10 $\vec{k}_- - \vec{k}_+ = -2k_0 \sin(\xi) \vec{x}$, donc

$$I(x) = i_0(x) + i(x) \cos [k_0 (\varphi(x + s/2) - \varphi(x - s/2)) - 2 \sin(\xi)x]$$

Comme la distance z_d est choisie telle qu'il y ait un maximum de recouvrement entre les répliques, on peut considérer $s \ll 1$. Nous pouvons donc utiliser le développement de Taylor :

$$\varphi(x + \varepsilon) = \varphi(x) + \varepsilon \frac{\partial \varphi}{\partial x}$$

Ce qui permet d'écrire :

$$\varphi(x + s/2) - \varphi(x - s/2) = s \frac{\partial \varphi}{\partial x}.$$

Ainsi

$$I(x) = i_0(x) + i(x) \cos \left[k_0 \left(2 \sin(\xi)x - s \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) \right].$$

La loi des réseaux permet de relier l'angle diffracté à l'angle incident par la relation $\sin(\theta_{\text{diffracté}}) - \sin(\theta_{\text{incident}}) = n \frac{\lambda_0}{p}$, où $n \in \mathbb{Z}$ l'ordre de diffraction. Donc

$$\sin(\xi) = \frac{\lambda_0}{p},$$

et

$$\sin(\xi) \approx \tan(\xi) = \frac{s/2}{z_d}.$$

Donc

$$s \approx 2z_d \frac{\lambda_0}{p}.$$

Ainsi on obtient un interférogramme au point x :

$$I(x) \approx i_0(x) + i(x) \cos \left[\frac{2\pi}{p/2} \left(x - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial x}(x) \right) \right]. \quad (1.7)$$

L'interférogramme obtenu est une fonction sinusoïdale de x , de période $\frac{p}{2}$. Il est important de remarquer qu'aucun terme ne dépend de la longueur d'onde λ_0 dans cette équation. Cela traduit le caractère achromatique de la technique SELFI. Nous obtenons donc, comme souhaité, des interférences avec une source étendue spectralement comme l'est un émetteur fluorescent. Cependant cela n'est vrai qu'en ayant fait l'approximation que seuls les ordres $+1$ et -1 de chaque direction contribuent à la formation de l'interférogramme. Les autres ordres rajoutent une faible dépendance de l'interfrange de l'interférogramme vis à vis de la longueur d'onde. Nous n'avons pas pris en compte cette faible dépendance dans cette thèse, cependant il pourrait être intéressant de développer, à partir de cela, un moyen de différencier des émetteurs de longueur d'onde différentes. Un autre terme important dans l'équation 1.7 est la distance z_d entre le réseau et le détecteur, présent devant le gradient du front d'onde $\frac{\partial \varphi}{\partial x}$. Plus cette distance est grande, meilleure est la sensibilité sur la détection du gradient du front d'onde. On dit que l'interférométrie à décalage est une technique à *sensibilité continûment variable*.

Dans le cas d'une onde non plane (focalisation, présence d'objet) telle que $\frac{\partial \varphi}{\partial x} \neq \text{Constante}$, les franges de l'interférogramme vont se déformer en suivant une modulation fréquentielle autour de la fréquence $\frac{2}{p}$. Ainsi l'analyse de l'interférogramme se fera, en pratique, par une démodulation autour de cette fréquence dans l'espace de Fourier. Ce qui permettra d'obtenir le gradient du front d'onde.

Ré-écrivons l'équation 1.7 dans le cas bidimensionnel :

$$\begin{aligned}
 I(x, y) &= \left| \frac{E(x+s/2, y+s/2)}{2} + \frac{E(x-s/2, y+s/2)}{2} + \frac{E(x+s/2, y-s/2)}{2} + \frac{E(x-s/2, y-s/2)}{2} \right|^2 \\
 &= \left| \begin{aligned}
 &\frac{a(x+s/2, y+s/2)}{2} e^{ik_0\varphi((x+s/2, y+s/2)+i\vec{k}_{++}\cdot\vec{r})} \\
 &+ \frac{a(x-s/2, y+s/2)}{2} e^{ik_0\varphi((x-s/2, y+s/2)+i\vec{k}_{+-}\cdot\vec{r})} \\
 &+ \frac{a(x+s/2, y-s/2)}{2} e^{ik_0\varphi((x+s/2, y-s/2)+i\vec{k}_{-+}\cdot\vec{r})} \\
 &+ \frac{a(x-s/2, y-s/2)}{2} e^{ik_0\varphi((x-s/2, y-s/2)+i\vec{k}_{--}\cdot\vec{r})}
 \end{aligned} \right|^2,
 \end{aligned}$$

où

$$\begin{aligned}
 \vec{k}_{++} &= k_0 \begin{pmatrix} \sin(\xi) \\ \sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}, & \vec{k}_{+-} &= k_0 \begin{pmatrix} \sin(\xi) \\ -\sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}, \\
 \vec{k}_{-+} &= k_0 \begin{pmatrix} -\sin(\xi) \\ \sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}, & \vec{k}_{--} &= k_0 \begin{pmatrix} -\sin(\xi) \\ -\sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}.
 \end{aligned}$$

En calculant de la même manière que dans le cas unidimensionnel, on obtient l'équation de l'interférogramme (calcul détaillé dans l'Annexe A) :

$$\begin{aligned}
 I(x, y) &= I_0 + I_x \cos\left(\frac{4\pi}{p} \left(x - z_d \frac{\partial\varphi}{\partial x}\right)\right) \\
 &\quad + I_y \cos\left(\frac{4\pi}{p} \left(y - z_d \frac{\partial\varphi}{\partial y}\right)\right) \\
 &\quad + I_{x+y} \cos\left(\frac{4\pi}{p} \left((x+y) - z_d \frac{\partial\varphi}{\partial(x+y)}\right)\right) \\
 &\quad + I_{x-y} \cos\left(\frac{4\pi}{p} \left((x-y) - z_d \frac{\partial\varphi}{\partial(x-y)}\right)\right).
 \end{aligned} \tag{1.8}$$

Avec

$$\left\{ \begin{array}{l} I_0 = \frac{a^2(x+s/2,y+s/2)+a^2(x-s/2,y+s/2)+a^2(x+s/2,y-s/2)+a^2(x-s/2,y-s/2)}{4} \\ I_x = \frac{a(x+s/2,y+s/2)a(x-s/2,y+s/2)+a(x+s/2,y-s/2)a(x-s/2,y-s/2)}{2} \\ I_y = \frac{a(x+s/2,y+s/2)a(x+s/2,y-s/2)+a(x-s/2,y+s/2)a(x-s/2,y-s/2)}{2} \\ I_{x+y} = \frac{a(x+s/2,y+s/2)a(x-s/2,y-s/2)}{2} \\ I_{x-y} = \frac{a(x+s/2,y-s/2)a(x-s/2,y+s/2)}{2} \end{array} \right.$$

Cet interférogramme contient les informations sur les gradients du front d'onde dans les directions x et y . Il nous donne aussi accès aux gradients selon les directions $x + y$ et $x - y$, il est pertinent de les prendre tous en compte car la redondance de ces informations permet d'augmenter le rapport signal à bruit.

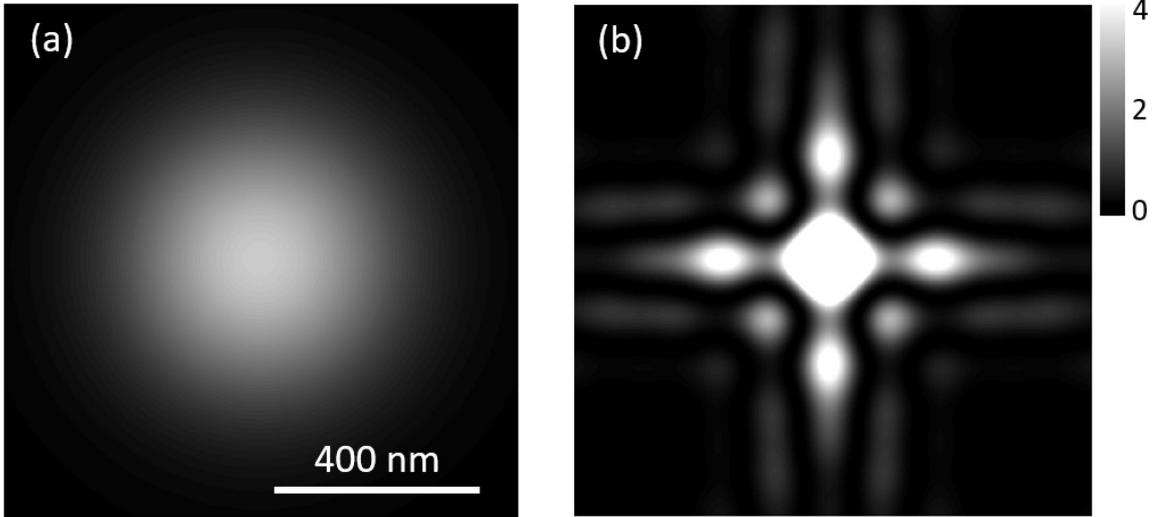


Figure 1.11 : Simulation, dans l'espace image du microscope, de la PSF (a) et de l'interférogramme (b) pour une longueur d'onde $\lambda = 700\text{nm}$, une ouverture numérique $NA = 1.3$, un pas de réseau $p = 20\mu\text{m}$ et un grandissement $g_y = 60$.

En considérant que la PSF est une somme d'ondes planes cohérentes, nous avons simulé la PSF du montage optique ainsi que l'interférogramme obtenu avec le réseau de diffraction. La figure 1.11 montre le résultat de la simulation pour une longueur d'onde $\lambda = 700\text{nm}$, une ouverture numérique $NA = 1.3$, un pas de réseau $p = 20\mu\text{m}$.

On remarque que les interférences viennent structurer la PSF sans l'étaler latéralement de manière notable. L'énergie présente dans la PSF est conservée lors de la formation de l'interférogramme.

Nous venons de calculer les interférences obtenues à la suite de la diffraction du signal de fluorescence sur le réseau. Nous allons maintenant comprendre comment extraire une localisation 3D de cet interférogramme.

1.1.3 Extraction des gradients après échantillonnage du signal par le détecteur

Sur le montage optique, comme le montre le schéma de la figure 1.8, nous utilisons une caméra pour enregistrer le signal en sortie du microscope. Nous nous heurtons donc au problème d'échantillonnage du signal sur les pixels du détecteur. L'interférogramme détecté sur la caméra est l'interférogramme que nous venons de calculer, échantillonné avec la fréquence $\frac{1}{T_{pix}}$, où T_{pix} est la taille d'un pixel :

$$I_e(x, y) = I(x, y) \cdot \text{III}_{T_{pix}}(x, y), \quad (1.9)$$

où $\text{III}_{T_{pix}}$ est le peigne de Dirac de période T_{pix} . Pour pouvoir reconstruire de manière fidèle un signal il faut un nombre suffisant de points détectés, sinon il y a perte d'information. Le théorème de Nyquist-Shannon [55] nous dit que, pour ne pas perdre d'information sur le signal, il faut que la fréquence d'échantillonnage soit au moins égale à deux fois la fréquence maximale présente dans le spectre de ce signal.

Dans notre cas, l'interférogramme porte l'information sur le gradient de la phase sous forme d'une modulation fréquentielle autour de la fréquence spatiale $\frac{2}{p}$. Pour bien échantillonner ce signal, nous cherchons N tel que $\frac{2}{p} = \frac{1}{NT_{pix}}$.

Le schéma de la figure 1.12 montre les notations utilisées, dans l'espace de Fourier, pour comprendre les fréquences contenues dans le signal détecté sur la caméra. Notons ν_{int} la fréquence maximale de l'information d'intensité I_0 et $\Delta\nu_{mod}$ le support des modulations autour de la fréquence porteuse $\frac{2}{p}$.

[55] Shannon, *Bell System Technical Journal*, 1948

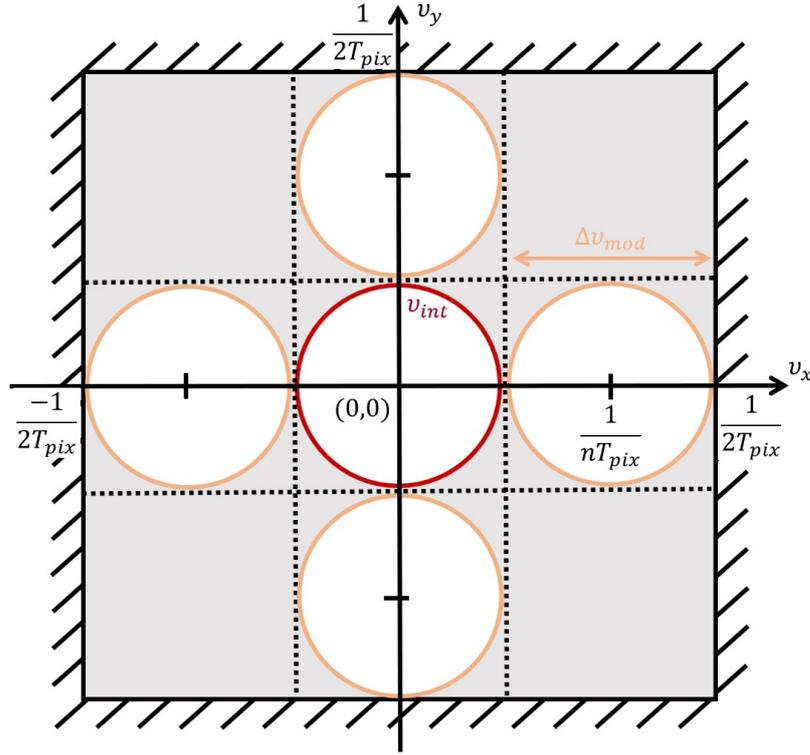


Figure 1.12 : Schéma illustrant les notations permettant de décrire l'espace de Fourier d'un interférogramme

Comme nous sommes sous l'hypothèse d'une enveloppe lentement variable, nous pouvons considérer que les modulations ne peuvent pas être supérieures à la fréquence porteuse, soit $\Delta v_{\text{mod}}^{\text{max}} = \frac{1}{NT_{\text{pix}}}$. D'après le théorème de Nyquist-Shannon :

$$\begin{aligned} \frac{2}{p} + \frac{\Delta v_{\text{mod}}^{\text{max}}}{2} &\leq \frac{1}{2T_{\text{pix}}} \\ \Leftrightarrow \frac{1}{NT_{\text{pix}}} + \frac{1}{2NT_{\text{pix}}} &\leq \frac{1}{2T_{\text{pix}}} \\ \Leftrightarrow \frac{3}{2N} &\leq \frac{1}{2} \\ \Leftrightarrow N &\geq 3 \end{aligned}$$

Cependant, nous décrivons l'analyse d'un signal de fluorescence émis par une molécule unique, il faut donc tenir compte du fait que le nombre de photons collectés sur la caméra est limité. De ce fait, il ne faut pas échantillonner le signal sur trop de pixels pour ne pas trop diviser le budget photon qui est limité. Nous avons donc choisi de nous placer tel que $N = 3$, ce qui veut dire qu'une frange de l'interférogramme est échantillonnée sur trois par trois pixels de la caméra.

Les informations sur l'intensité et la phase du signal peuvent maintenant être extraites à partir de la transformée de Fourier de l'interférogramme. L'image de l'intensité est obtenue en appliquant un filtre passe bas sur la transformée de Fourier. Puis, en l'ajustant avec une fonction gaussienne, on peut retrouver la position latérale (dans le plan d'imagerie) de la molécule étudiée comme étant le centroïde de cette gaussienne. Le signal de phase, obtenu par intégration des gradients, donne, quant à lui, accès à la localisation axiale de cette molécule. Cependant, cette démodulation est un calcul dont nous n'avons pas forcément besoin pour retrouver la position de la particule. Nous pouvons en effet générer et utiliser une table de correspondance de PSF-SELFI pour déterminer la position axiale.

Obtention de la localisation axiale grâce à l'utilisation d'une calibration du signal d'interférence

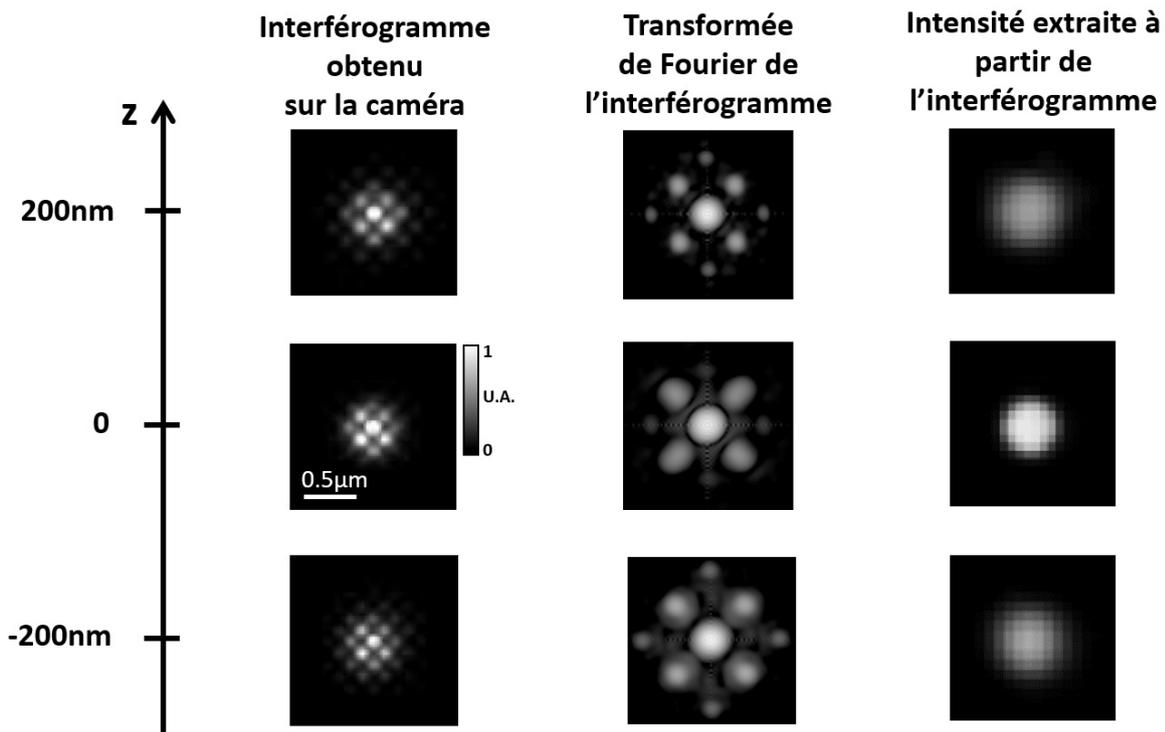


Figure 1.13 : *Interférogrammes obtenus dans différents plans ($z = 200\text{nm}$, $z = 0$ et $z = -200\text{nm}$), avec leurs transformées de Fourier et les images d'intensité reconstruites à partir de ces interférogrammes*

Nous avons choisi de constituer cette table de correspondance de PSF-SELFI en effectuant une calibration expérimentale. La calibration expérimentale permet de connaître

la réponse impulsionnelle réelle du système. Elle se fait en utilisant un émetteur fluorescent sous-résolu : dans notre cas, nous utilisons des billes fluorescentes d'un diamètre de $100nm$ (TetraSpeck; Thermo Fisher). Grâce à la motorisation du microscope (répétabilité à 25 nm), nous décalons l'objectif du microscope selon l'axe z , ce qui permet d'acquérir l'interférogramme de la nanoparticule dans chacun des plans de la profondeur de champ. Il est important, pour qu'elle soit robuste, d'effectuer la calibration avec un maximum de photons par PSF, nous nous plaçons dans une régime où $N_{photon} > 2000$ par PSF. La figure 1.13 présente les interférogrammes obtenus dans différents plans, ainsi que leurs transformées de Fourier. Les images de l'intensité des PSF-SELFI pour chaque plan y sont également représentées. Remarquons que l'étalement de l'intensité induit par la formation d'interférences est extrêmement limité ($<10\%$). Les franges viennent structurer la PSF sans la déformer.

Le schéma de la figure 1.14 explique l'algorithme utilisé pour localiser une molécule détectée dans le champ de la caméra. La localisation latérale est obtenue grâce à l'intensité extraite, comme expliqué précédemment. Et, en comparant la transformée de Fourier de la molécule avec les transformées de Fourier de la calibration, nous obtenons la localisation axiale. Cette comparaison au dictionnaire se fait en utilisant la corrélation de Pearson qui est une manière de mesurer la corrélation entre deux images indépendamment de l'amplitude relative de chacune des images.

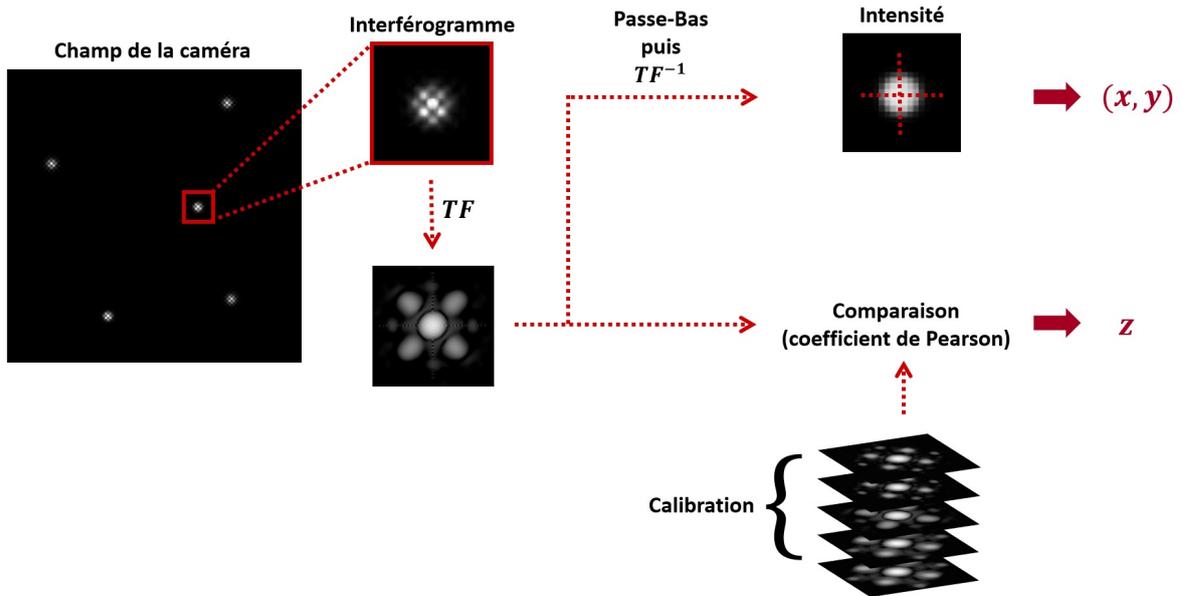


Figure 1.14 : Schéma illustrant l'algorithme utilisé pour retrouver la localisation tridimensionnelle d'une particule détectée dans le champ de la caméra

Il est intéressant de noter que nous comparons les transformées de Fourier et non pas les interférogrammes pour ne pas dépendre du positionnement relatif des franges brillantes et sombres d'une molécule à l'autre.

1.2 Précision de localisation

Nous avons vu le principe et le fonctionnement de la technique SELFI comme méthode de localisation tridimensionnelle d'une molécule unique. Nous allons voir maintenant avec quelle précision nous sommes capables d'effectuer cette localisation. Nous allons dans un premier temps définir ce qu'est la *précision de localisation*, puis nous verrons que cette précision dépend du rapport signal à bruit et donc des différentes sources de bruit. Nous verrons ensuite une méthode de calcul donnant la limite théorique d'un problème de localisation de molécule unique tenant compte du bruit. Enfin, nous calculerons la précision expérimentale que nous pouvons atteindre.

1.2.1 Précision de pointé pour la super-localisation et rapport signal à bruit

A chaque détection de molécule unique correspond une localisation et une précision de pointé. La *précision de pointé* est la précision avec laquelle nous sommes capables de connaître la localisation d'une molécule.

Une molécule est détectée par la caméra grâce aux photons reçus. La précision de localisation dépend du nombre de photons détectés, elle est donc sensible au rapport signal à bruit. De manière à obtenir une bonne précision de pointé, il est nécessaire de réduire toutes sources de bruit présentes sur le montage.

Sources de bruit et perte du rapport signal à bruit

Nous utilisons comme détecteur une caméra sCMOS (Orca Flash 4, Hamamatsu). Cette caméra a un *bruit de lecture* de $\beta_{lecture} = 0.9$ électrons. Grâce à une circulation d'eau froide, les capteurs sont refroidis pour atteindre -20°C . Cela permet d'obtenir un *bruit thermique* à $\beta_{thermique} = 0.01$ électrons par pixel par seconde.

En nous plaçant dans les conditions expérimentales, nous avons estimé le *bruit de fond* de fluorescence à $\beta_{fond} = 2$ photons par pixel dans le meilleur des cas (*i.e.* lors d'une imagerie proche de la lamelle de microscope). Ce bruit de fond correspond à la lumière

parasite que la caméra perçoit en absence de molécule dans le plan de mise au point. Ces bruits sont intrinsèques au montage optique et ne dépendent pas du signal à mesurer.

A cela s'ajoute le *bruit de photon* du signal β_s qui est un bruit statistique sur le signal reçu par le détecteur. Ce bruit de photon est proportionnel à la racine carré du nombre de photons reçus par la caméra $\beta_s \propto \sqrt{N_{phot}^{signal}}$.

Nous négligerons par la suite le bruit de lecture et le bruit thermique de la caméra, seuls le bruit de fond et le bruit de photon seront pris en compte dans les calculs de la précision de pointé.

$$\beta \propto \sqrt{N_{phot}^{signal} + \beta_{fond}^2}$$

Je viens de détailler différentes sources de bruit qui influencent le rapport signal à bruit lors d'une détection de molécule unique fluorescente. Cependant ce rapport signal à bruit est aussi influencé par toute perte de signal. Comme une mesure de localisation est basée sur la détection des photons émis par la molécule, une perte de photons engendre une perte de précision.

En microscopie biologique les principales pertes de photons sont dues à l'absorption, à la diffusion et aux aberrations présentes dans l'échantillon. La figure 1.15 illustre ces différents phénomènes physiques.

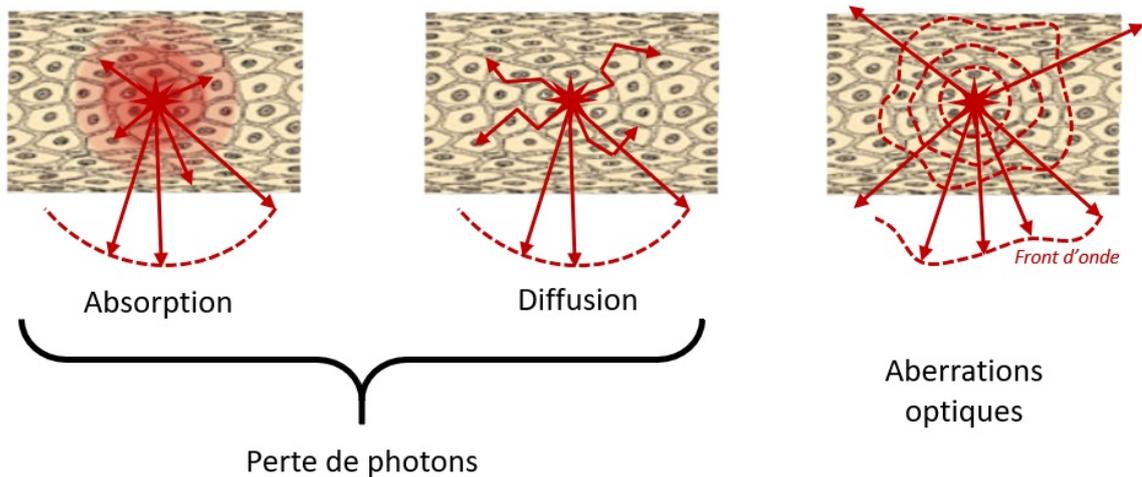


Figure 1.15 : Schéma illustrant la perte de signal par la présence d'aberrations, de diffusion et d'absorption de la lumière générées par l'échantillon biologique

Plus l'échantillon est épais, plus il va y avoir de perte de signal. Si l'on veut pouvoir localiser une molécule en profondeur dans un échantillon biologique il faut diminuer ces pertes de signal.

Comme le tissu biologique absorbe le plus dans le vert et moins dans le proche infrarouge, nous avons choisi de travailler majoritairement avec des molécules émettant à une longueur d'onde $\lambda_{em} = 700nm$. Cela permet de réduire l'absorption de la lumière par l'échantillon tout en ayant des molécules brillantes.

Les principales aberrations présentes sur le montage sont les aberrations sphériques. Pour corriger un maximum ces aberrations, nous avons utilisé la bague de correction de l'objectif. Cette bague est présente sur l'objectif de microscope pour compenser l'utilisation de lamelles de microscopie d'épaisseurs différentes. Nous avons calibré cette bague de manière à limiter, à chaque profondeur dans l'échantillon, les aberrations sphériques présentes sur le chemin optique. Cela permet de maximiser la concentration des photons au centre de la PSF et donc d'augmenter la détectabilité des molécules fluorescentes ayant un faible rapport signal à bruit. Ainsi, lors de l'étape de la calibration avant chaque expérience, nous réglons la bague pour réduire au mieux les erreurs de localisation dues à la présence d'aberrations. Cependant, nous ne pouvons pas annuler complètement les aberrations présentes sur le chemin optique, il faut donc que la méthode SELFIE soit robuste aux aberrations (et c'est ce que nous verrons dans la suite de ce chapitre).

En travaillant dans des échantillons biologiques épais et complexes nous ne pouvons pas nous affranchir complètement de toute source de bruit ou perte de signal. Il faut donc pouvoir travailler avec peu de photons. Nous allons voir que la technique SELFIE permet de localiser une molécule avec seulement quelques photons balistiques (photons conservant une relation de phase entre eux permettant de former une image ponctuelle) collectés par le détecteur. Cela rend cette technique robuste pour localiser en 3D des molécules uniques en profondeur dans des échantillons biologiques épais.

Précision de pointé

Toutes ces sources de bruit et de pertes de signal entraînent une différence entre la mesure de la localisation de la molécule et la valeur réelle de l'observable. Une mesure de localisation de molécule unique suit une loi normale [56]. Un ensemble de mesures est donc une distribution normale. L'écart-type σ de cette distribution donne une bonne

[56] Thompson, *Biophysical Journal*, 2002

estimation de la précision de pointé. Cette précision peut aussi être exprimée en fonction de la largeur à mi-hauteur FWHM (*Full Width Half Maximum*) de la distribution des mesures de localisation plutôt qu'en fonction de l'écart-type. La largeur à mi-hauteur est surtout utilisée lors du calcul de la résolution d'une image. Cependant, ces deux manières de retrouver la précision de localisation sont équivalentes :

$$\text{FWHM} = 2\sqrt{2\ln(2)}\sigma \approx 2.3548\sigma.$$

Nous avons choisi, pour la suite de cette thèse, d'exprimer la précision de pointé grâce à l'écart-type σ communément utilisé dans le domaine de la microscopie de super-localisation.

1.2.2 Calcul théorique de la précision de localisation

Nous allons décrire dans cette partie une méthode théorique, basée sur la matrice d'information de Fisher, qui permet de connaître la précision de pointé de n'importe quelle technique de super-localisation. Nous allons d'abord définir le problème de localisation de molécule unique, puis nous verrons quel est le meilleur estimateur possible pour ce problème de localisation, et enfin nous donnerons, grâce au calcul de la bande de Cramèr-Rao, la limite théorique de l'erreur de localisation que nous appliquerons à notre problématique.

Définition du problème

Prenons un ensemble de N localisations 3D mesurées pour une même molécule :

$$\chi = \{(x_1, y_1, z_1), \dots, (x_n, y_n, z_n)\}$$

Cet ensemble est supposé aléatoire. Chaque localisation est liée au nombre de photons détectés et l'ensemble de ces photons suit une loi normale. On peut donc considérer que l'ensemble χ des localisations est une distribution normale.

Pour une variable aléatoire suivant une loi normale nous pouvons définir la fonction de densité de probabilité (*Probability Density Function, PDF*) en 1D :

$$P_x(\mathbf{x}) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_x} \exp\left(-\frac{(\mathbf{x} - \bar{\mathbf{x}})^2}{2\sigma_x^2}\right),$$

où σ_x^2 est la variance de la variable aléatoire $\mathbf{x} = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ et $\bar{\mathbf{x}}$ sa moyenne.

En généralisant en 3D, nous définissons la *vraisemblance* (*likelihood*), son expression est la suivante :

$$L(\chi|\theta) = P_\theta(\chi) = \prod_{i=1}^n P_\theta(x_i, y_i, z_i),$$

où θ est un scalaire ou un vecteur qui représente les paramètres de la PDF. Dans un problème de localisation de molécule unique nous définissons : $\theta = (x, y, z)$.

Estimateur & qualité de l'estimateur

Supposons que la vraie localisation de la particule observée soit $\theta_0 = (x_0, y_0, z_0)$. Et considérons un ensemble de mesures $\chi = \{(x_1, y_1, z_1), \dots, (x_n, y_n, z_n)\}$.

Dans le problème de localisation, la fonction d'ajustement utilisée sur les données définit un *estimateur* de la position de la molécule observée. Notons $T[\chi]$ un tel estimateur, c'est une fonction de χ . Nous pouvons facilement dire que $T[\chi]$ est un *bon estimateur* de la position de la particule si les valeurs trouvées pour la mesure sont suffisamment proches de la vraie valeur. Comme nous sommes dans un problème statistique, la méthode classique pour calculer cette proximité est de prendre la moyenne du carré de l'erreur (*Mean Square Error, MSE*) :

$$\begin{aligned} MSE(T[\chi]) &= E [|T[\chi] - \theta_0|^2] \\ &= E [|(T[\chi] - E[T[\chi]]) + (E[T[\chi]] - \theta_0)|^2] \\ &= E [|T[\chi] - E[T[\chi]]|^2] + 2E [(T[\chi] - E[T[\chi]]) (E[T[\chi]] - \theta_0) + (E[T[\chi]] - \theta_0)^2], \end{aligned}$$

avec $E[T[\chi]] = \int T[\chi]L(\chi|\theta)d\chi$ l'espérance de l'estimateur.

Nous définissons 2 termes :

- . $b_T = E[T[\chi]] - \theta_0$ le *biais* de l'estimateur, c'est à dire la différence entre sa moyenne et la vraie valeur du paramètre. Un estimateur non-biaisé est un estimateur pour lequel $b_T = 0$
- . $\sigma_T^2 = E[|T[\chi] - E[T[\chi]]|^2]$ la *variance* de l'estimateur

Et comme $E[(T[\chi] - E[T[\chi]])] = 0$:

$$MSE(T[\chi]) = \sigma_T^2 + b_T^2$$

Ce qui veut dire que dans le cas d'un estimateur non biaisé, la qualité de l'estimateur est uniquement caractérisée par sa variance.

L'estimateur de la position d'une molécule est la fonction tridimensionnelle qui nous permet d'ajuster la PSF, cet estimateur est choisi de manière à être non biaisé. On peut donc définir la précision de localisation comme étant la variance de cette fonction dans chacune des directions de l'espace.

La bande de Cramèr-Rao

Dans un problème d'estimation, il est intéressant de déterminer le meilleur estimateur possible. Dans cette section, nous définissons la bande de Cramèr-Rao, qui est la valeur minimale théorique de la variance d'un estimateur [57] [58].

Cramèr-Rao Lower Bound (CRLB) :

Si le domaine de définition de χ ne dépend pas de θ , la variance $\sigma_T^2(\theta)$ de n'importe quel estimateur non-biaisé $T[\chi]$ de θ est telle que :

$$\sigma_T^2(\theta) \leq \frac{1}{F_I(\theta)} \quad (1.10)$$

avec F_I l'information de Fisher définie comme suit :

$$F_I(\theta) = -E \left[\frac{\partial^2 \ln L(\chi|\theta)}{\partial \theta^2} \right]$$

Cette information de Fisher n'est autre que la courbure de la fonction $\ln L(\theta)$ (le log de la vraisemblance) au point considéré. Plus cette courbure est forte, plus la dépendance de l'estimateur vis à vis de ce paramètre est importante, meilleur est l'estimateur.

Dans le cas vectoriel, *i.e.* lorsque l'estimateur dépend de plusieurs paramètres, la précision d'un estimateur est donné par la matrice de covariance. La matrice d'information de Fisher est définie pour trouver la valeur minimale des éléments de la covariance. Pour plus de simplicité nous l'écrivons ici dans le cas où les paramètres sont indépendants [59] (nous verrons que c'est le cas dans cette thèse) :

$$F_I(\theta) = -E \left[\left[\frac{\partial \ln L(\chi|\theta)}{\partial \theta} \right]^T \left[\frac{\partial \ln L(\chi|\theta)}{\partial \theta} \right] \right].$$

[57] Van Trees, *Detection, Estimation and Modulation Theory*, 1968

[58] Kay, *Fundamentals of statistical signal processing*, 1993

[59] Ober, *Biophysical Journal*, 2004

Lors de l'estimation de la localisation d'une molécule, la fonction de vraisemblance n'est autre que la PSF 3D, dont les paramètres d'intérêt sont les localisations latérale et axiale [33]

$$F_I(\theta) = \begin{bmatrix} \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \left(\frac{\partial \mu(\theta)}{\partial x} \right)^2 & \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial x} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial y} & \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial x} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial z} \\ \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial x} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial y} & \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \left(\frac{\partial \mu(\theta)}{\partial y} \right)^2 & \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial y} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial z} \\ \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial x} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial z} & \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial y} \frac{\partial \mu(\theta)}{\partial z} & \sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta)+\beta} \left(\frac{\partial \mu(\theta)}{\partial z} \right)^2 \end{bmatrix} \quad (1.11)$$

Ici $\theta = (x, y, z)$ est la localisation 3D d'une molécule, μ est la PSF pixélisée, et β est le bruit de fond en un pixel.

La matrice d'information de Fisher ci-dessus nous informe sur la dépendance de la PSF 3D vis-à-vis des différentes directions de l'espace.

Étant donné que les localisations x, y, z sont indépendantes, ce sont les éléments diagonaux de la matrice de covariance qui nous donnent accès à la variance selon chacun des paramètres. Nous justifierons cette indépendance lors de l'application de cette théorie à la méthode SELFI. Ainsi, selon Cramér-Rao, la meilleure précision possible σ_α avec laquelle on peut localiser une molécule est donnée par :

$$\frac{1}{\sigma_\alpha} = \sqrt{\sum_{x,y} \frac{1}{\mu(\theta) + \beta} \left(\frac{\partial \mu(\theta)}{\partial \alpha} \right)^2}, \quad (1.12)$$

avec α le paramètre considéré (x, y , ou z)

Calcul de la CRLB pour SELFI

L'application de cette théorie à la méthode SELFI n'est pas directe car nous n'avons pas d'expression analytique complète de l'interférogramme. L'équation de l'interférogramme Eq.1.8 calculée précédemment peut-être généralisée comme suit :

$$I(x, y, z) = |PSF|_z(x, y) \begin{bmatrix} 1 + A_x(z) \cos \left(\frac{2\pi}{p/2} \left(x - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) \right) \\ + A_y(z) \cos \left(\frac{2\pi}{p/2} \left(y - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial y} \right) \right) \\ + A_{x+y}(z) \cos \left(\frac{2\pi}{p/2} \left((x+y) - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial (x+y)} \right) \right) \\ + A_{x-y}(z) \cos \left(\frac{2\pi}{p/2} \left((x-y) - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial (x-y)} \right) \right) \end{bmatrix}, \quad (1.13)$$

[33] Badieirostami, *Applied Physics Letters*, 2010

où les coefficients $A_x(z)$, $A_y(z)$, $A_{x+y}(z)$ et $A_{x-y}(z)$ sont des invariants selon les directions x et y mais pas selon z . Comme l'expression analytique de ces coefficients dépend de nombreux paramètres expérimentaux, nous ne pouvons pas calculer directement l'équation 1.12. Cependant, à partir d'interférogrammes expérimentaux nous pouvons obtenir les taux d'accroissement de $I(x, y, z)$ selon les trois directions de l'espace x , y et z . Ces taux d'accroissement peuvent être obtenus, par exemple, avec les interférogrammes faits lors de la calibration du système sur une bille fluorescente dont nous avons remis artificiellement la brillance à $N_{phot} = 1000$ photons. De cette manière nous obtenons la matrice d'information de Fisher complète [eq.1.11] en $z_0 = 0$:

$$\frac{F_I(x_0, y_0, z_0)}{F_I(x_0, y_0, z_0)[0, 0]} = \begin{bmatrix} 1 & -2.10^{-3} & -2.10^{-4} \\ -2.10^{-3} & 1 & -1.10^{-4} \\ -2.10^{-4} & -1.10^{-4} & 0.32 \end{bmatrix}_{z_0=0}.$$

Le détail de cette matrice justifie le fait que les paramètres x , y et z sont indépendants et que nous pouvons considérer que la variance selon chacun des paramètres est donnée par l'élément diagonal correspondant [eq.1.12]. Les résultats du calcul de la bande de Cramèr-Rao pour la méthode SELFI sont donnés sur la figure 1.16.

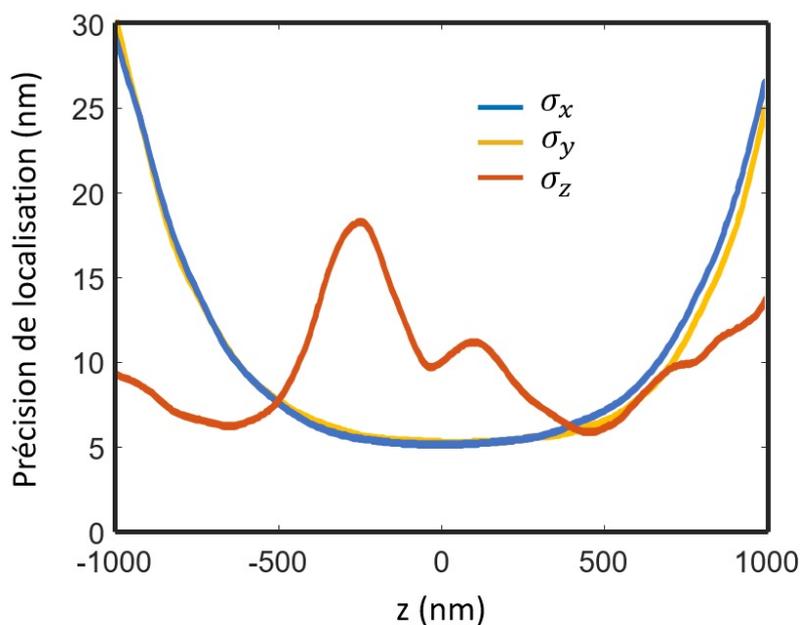


Figure 1.16 : Bande de Cramèr-Rao, selon les trois directions de l'espace calculée pour la technique SELFI ($N_{phot} = 1000$ et $\beta = 2$).

Nous remarquons que nous pouvons obtenir une précision de pointé inférieure à $20nm$ sur quasiment toute la profondeur de champ selon les trois directions de l'espace. Au plan de mise au point $z = 0$ nous obtenons une précision de localisation latérale aussi bonne qu'annoncée dans la littérature [3] : $\sigma_x = \sigma_y = 6nm$, avec $N_{phot} = 1000$ photons et un bruit de fond $\beta = 2$ photons par pixels. La précision de localisation axiale théorique est aussi très bonne : $\sigma_z = 12nm$.

1.2.3 Précision de localisation obtenue expérimentalement

Laissons place maintenant à l'expérience. Nous allons analyser la précision expérimentale de la mesure d'une localisation avec la méthode SELFI, puis nous comparerons ces résultats avec la technique de la mise en forme de PSF par astigmatisme (que nous appellerons *la méthode de la lentille cylindrique*).

Préparation de l'échantillon métrologique

Pour simuler un échantillon biologique épais, nous avons utilisé ici un gel d'agarose à 4%. Des billes fluorescentes (TetraSpeck ; Thermo Fisher) sont mélangées dans le gel réchauffé, puis, lorsque le gel d'agarose refroidit, les billes restent immobilisées. La figure 1.17(a) montre un schéma de l'échantillon mimétique. Cela nous permet de faire plusieurs mesures à différentes profondeurs z_{depth} . J'utilise le terme de *profondeur*, ici et dans la suite de ce manuscrit, pour désigner la distance entre la lamelle et le plan de focalisation au sein de l'échantillon.

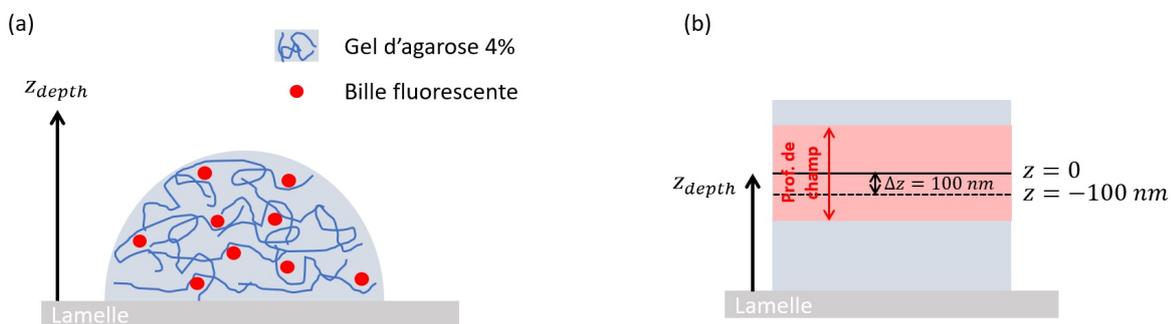


Figure 1.17 : (a) Schéma de l'échantillon mimétique utilisé pour mesurer la précision de localisation ; (b) schéma expliquant les notations utilisées.

[3] Rust, *Nature Methods*, 2006

Mesure de la précision de localisation

Pour la mesure de la précision de localisation nous nous sommes placés dans un régime où $N_{phot} = 1000$, ce qui correspond à ce que nous détectons typiquement lors d'une expérience de dSTORM ou de (u)PAINT. Nous avons choisi de développer ici les résultats du calcul de la précision de localisation expérimentale à deux profondeurs différentes : $z_{depth} = 0$ et $z_{depth} = 40\mu m$. A chaque profondeur (*i.e* distance à la lamelle) nous avons évalué la précision de localisation pour une molécule fluorescente dans le plan de mise au point et hors plan de mise au point. Pour cela nous avons choisi une nanoparticule se situant à une distance souhaitée z_{depth} de la lamelle, cette nanoparticule est donc au point pour une focalisation à cette profondeur. Puis, en déplaçant progressivement l'objectif par pas de Δz autour de cette profondeur, nous pouvons faire l'image de la nanoparticule dans les différents plans de la profondeur de champ pour une focalisation à z_{depth} dans l'échantillon. La figure 1.17(b) illustre les notations utilisées.

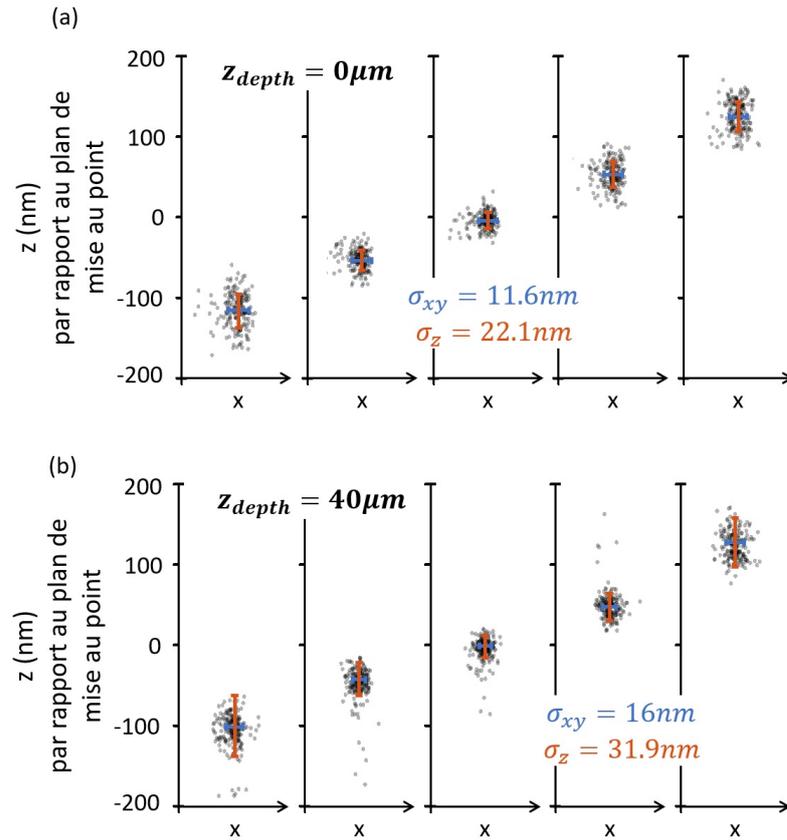


Figure 1.18 : Résultats expérimentaux pour le calcul de la précision de localisation : (a) pour 100 images d'une molécule située à $z_{depth} = 0$ et (b) pour 100 images d'une molécule située à $z_{depth} = 40\mu m$, $N_{phot} = 1000$.

De cette manière nous pouvons évaluer la précision avec laquelle nous sommes capables de localiser, pour chaque profondeur z_{depth} , les molécules fluorescentes présentes dans la profondeur de champ de l'objectif.

A chaque profondeur ($z_{depth} = 0$ et $z_{depth} = 40\mu m$) nous avons pris 200 images dans chacun des plans de la profondeur de champ. La précision de localisation est calculée en prenant l'écart-type de l'ensemble des localisations. La figure 1.18 présente les données obtenues. Comme attendu, à une profondeur donnée, la précision est meilleure dans le plan de focalisation. Dans leur plan de focalisation respectif, nous obtenons :

$$\sigma_{x,y}^{depth=0} = 11.6nm \quad \sigma_{x,y}^{depth=40\mu m} = 16.0nm$$

$$\sigma_z^{depth=0} = 22.1nm \quad \sigma_z^{depth=40\mu m} = 31.9nm$$

Ces résultats nous permettent de tracer la courbe de précision de localisation obtenue dans la profondeur de champ à la lamelle [Fig 1.19]. Plus une molécule est éloignée du plan de focalisation, moins bonne est sa précision de pointé. On remarque que la précision de localisation obtenue expérimentalement est moins bonne que celle prévue théoriquement. Cela est attendu car le calcul de la bande de Cramèr-Rao donne la limite de la résolution que l'on peut espérer atteindre. La précision obtenue reste cependant, en moyenne, inférieure à $25nm$ sur la profondeur de champ pour chaque direction de l'espace.

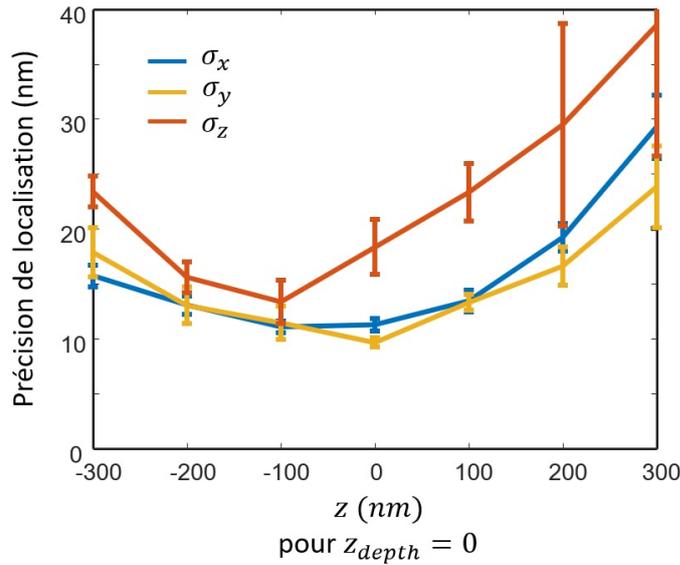


Figure 1.19 : *Précision de localisation dans la profondeur de champ à $z_{depth} = 0$, pour $N_{phot} = 1000$.*

Pour calculer l'évolution de la précision de localisation axiale en fonction de la profondeur à laquelle on se situe dans l'échantillon, nous avons distingué deux termes : la *précision* et le *biais*. La précision est liée à l'étalement des localisations autour d'une valeur, c'est l'écart-type de la distribution des localisations. C'est ce que nous avons calculé jusqu'à présent. Le biais est lié au fait que la valeur trouvée soit la vraie position de la molécule. Le biais est la pente de la droite $z_{réel}$ en fonction de $z_{théorique}$.

Nous avons calculé la précision de localisation axiale selon ces deux définitions, à différentes profondeurs : $z_{depth} = 0, 10, 20, 30, 40\mu m$. Les résultats sont présentés en figure 1.20. Nous obtenons une précision et une justesse de localisation axiale plutôt stable : $\sigma_z < 45nm$ même à une profondeur de $z_{depth} = 40\mu m$.

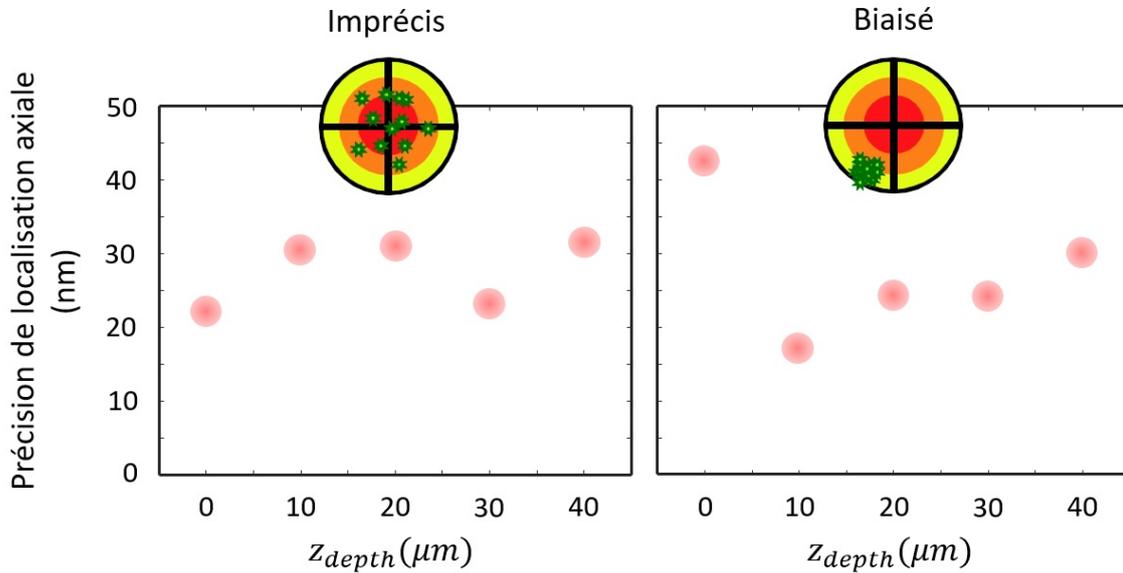


Figure 1.20 : Evolution de la précision de localisation axiale et du biais en fonction de la profondeur au sein de l'échantillon, pour $N_{phot} = 1000$.

1.3 Comparaison avec la technique de la mise en forme de PSF par astigmatisme

Pour prouver que la technique SELFIE est une réelle innovation dans le domaine de la super-localisation tridimensionnelle, nous l'avons comparée à l'état de l'art. Comme la technique la plus répandue sur les montages de super-résolution est la technique de la lentille cylindrique [23], c'est celle-ci que nous avons choisie comme point de comparaison.

[23] Huang, *Science*, 2008

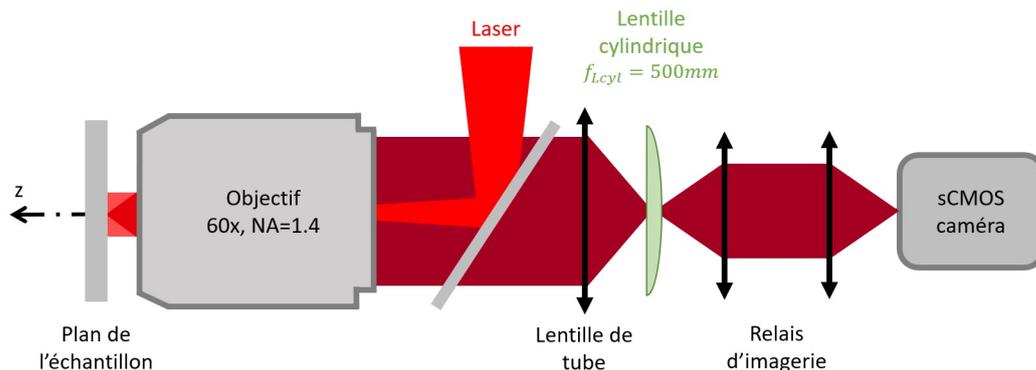


Figure 1.21 : Schéma du montage optique avec la lentille cylindrique

Nous avons utilisé le montage optique décrit par la figure 1.21. Une simple modification a été faite par rapport au montage SELFI : le réseau de diffraction a été retiré pour faire place à une lentille cylindrique de focale $f_{Lcyl} = 500mm$. Nous avons, dans un premier temps, calculé la précision théorique de cette méthode grâce à la bande de Cramèr-Rao. Puis nous avons effectué une comparaison expérimentale des précisions de localisation 3D.

1.3.1 Calcul de la CRLB pour la méthode de localisation 3D basée sur de la mise en forme de PSF par astigmatisme

Dans le cas de la méthode de la mise en forme de PSF par astigmatisme décrite par Zhuang [23], la PSF peut-être approximée par une gaussienne elliptique :

$$G(x, y, z) = A \exp \left(-\frac{(x - x_0)^2}{2w_x^2} - \frac{(y - y_0)^2}{2w_y^2} \right) + B$$

où A est l'amplitude, B le bruit de fond, (x_0, y_0) le centre de la gaussienne, et w_x et w_y sont les largeurs selon les deux directions latérales. La force de cette méthode réside dans le fait que les deux largeurs w_x et w_y varient en fonction de la position axiale z .

$$w_{xy} = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z - c}{d} \right)^2 + a \left(\frac{z - c}{d} \right)^3 + b \left(\frac{z - c}{d} \right)^4}$$

où $w_0 = 0,673r_{PSF}$ est la largeur de la gaussienne sans astigmatisme, c est le décalage des plans focaux x et y , d est la demi profondeur de champ, et a et b sont les coefficients des ordres supérieurs. Pour la simplification des calculs, nous ne tiendrons pas compte

[23] Huang, *Science*, 2008

de ces deux derniers termes. Le détail des calculs des dérivées de la gaussienne $G(x, y, z)$ selon les trois directions de l'espace se trouve dans l'Annexe B. En appliquant la formule donnée par la bande de Cramèr-Rao Eq.1.12, nous sommes capables de tracer la limite théorique de résolution atteignable, selon les axes x , y et z , en fonction de la position axiale. Nous avons calculé ces courbes [Fig.1.22(a)] pour $N_{phot} = 1000$ photons émis et $\beta = 2$ photons par pixel. Nous retrouvons bien les mêmes valeurs que celles trouvées dans la littérature[33].

Un point intéressant est le fait que la méthode SELFI est une technique de localisation tridimensionnelle bien plus isotrope que la technique de la mise en forme de PSF par astigmatisme. En effet, en moyenne sur la profondeur de champ $[-1000nm; 1000nm]$ nous obtenons pour SELFI $\sigma_x^{moy} = \sigma_y^{moy} \approx \sigma_z^{moy} \approx 12nm$, tandis qu'avec la lentille cylindrique $\sigma_x^{moy} = \sigma_y^{moy} \approx \frac{\sigma_z^{moy}}{2} \approx 9nm$.

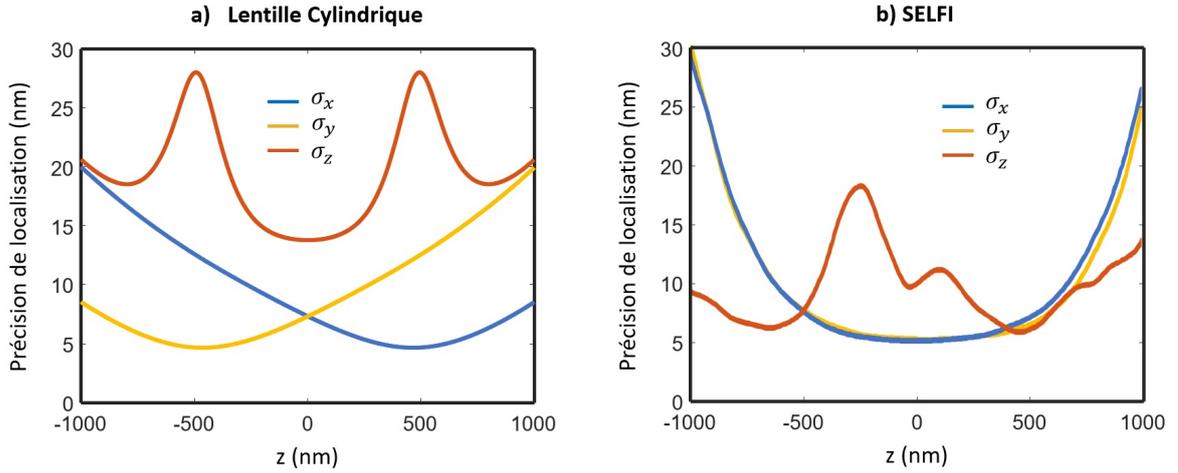


Figure 1.22 : Bande de Cramèr-Rao, selon les trois directions de l'espace calculée pour la technique de la lentille cylindrique (a) et pour la technique SELFI (b), $N_{phot} = 1000$ et $\beta = 2$.

1.3.2 Comparaison expérimentale

Pour comparer de manière expérimentale la méthode SELFI et la méthode de la lentille cylindrique, nous avons réalisé plusieurs acquisitions (200 images) à chaque profondeur ($z_{depth} = 0, 10, 20, 30, 40\mu m$). De même que précédemment, nous nous sommes placés dans un régime où $N_{phot} = 1000$. Les mêmes acquisitions ont été faites avec le réseau de diffraction en place, sans la lentille cylindrique.

[33] Badieirostami, *Applied Physics Letters*, 2010

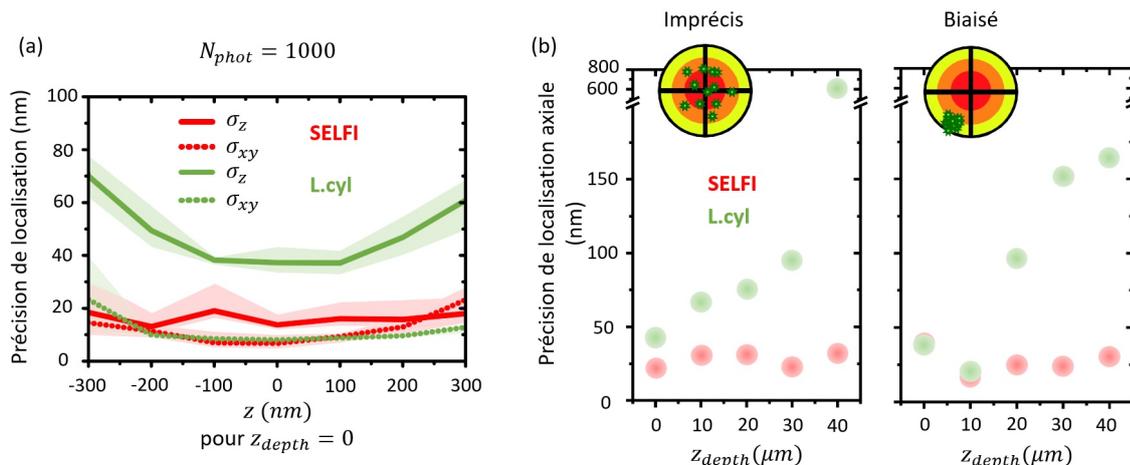


Figure 1.23 : Résultats expérimentaux de la comparaison entre SELFI et la lentille cylindrique, pour $N_{phot} = 1000$: (a) précision de localisation dans la profondeur de champ pour $z_{depth} = 0$; (b) évolution de la précision de localisation axiale et du biais en fonction de la profondeur au sein de l'échantillon.

La figure 1.23 présente les résultats obtenus. Dans un premier temps nous avons calculé les précisions de localisation latérale et axiale à la surface de la lamelle ($z_{depth} = 0$), en fonction de la localisation z au sein de la profondeur de champ. Comme pour SELFI, ces valeurs sont supérieures à celles calculées théoriquement par la bande de Cramèr-Rao. Dans le cas de la lentille cylindrique, les valeurs théoriques diffèrent particulièrement des valeurs expérimentales car l'approximation faite pour le calcul théorique de la bande de Cramèr-Rao diffère de l'expression réelle de la PSF. On retrouve néanmoins le fait que la méthode SELFI est une méthode de localisation tridimensionnelle plus isotrope que la méthode de mise en forme de la PSF par astigmatisme. Au plan de mise au point : $\sigma_z^{SELFI} \approx 2\sigma_{xy}^{SELFI} = 14nm$ et $\sigma_z^{Lcyl} \approx 4\sigma_{xy}^{Lcyl} = 40nm$.

Les courbes de la figure 1.23(b), obtenues pour le même niveau d'aberrations, mettent en évidence la robustesse de la technique SELFI qui garde une très bonne précision de localisation ($\sigma_z^{SELFI} \approx 25nm$) jusqu'à $z_{depth} = 40\mu m$. Tandis que la méthode de la lentille cylindrique, qui code l'information de la localisation axiale dans l'astigmatisme présent dans la PSF, est très sensible à la profondeur de focalisation. En effet, plus on pénètre dans l'échantillon, plus il y a d'aberrations. Ces aberrations présentes dans l'échantillon viennent brouiller le signal qui code l'information axiale. De ce fait, sans correction d'aberrations, cette technique est limitée à une profondeur de $z_{depth} < 20\mu m$. Au delà de ces premiers microns, la précision de localisation s'envole : $\sigma_z^{Lcyl} > 100nm$.

Au contraire, la technique SELFIE est capable de garder une bonne précision de localisation tant que la calibration est obtenue avec des PSF présentant une quantité d'aberration proche des PSF mesurées. Cela confirme que la technique SELFIE peut travailler sur des échantillons épais.

1.4 Image de super-résolution et stabilisation du microscope

Jusqu'à présent nous avons présenté la *super-localisation* de molécules uniques. Nous pouvons étendre l'étude à la formation d'image de *super-résolution*. Dans notre cas, une image de super-résolution sera composée d'un ensemble de détections de molécules uniques obtenues successivement. Cela implique que la résolution d'une image dépend du nombre de molécules détectées. De la même manière que nous avons défini la *précision de pointé* lors de la localisation de particules, nous allons définir la *résolution* d'une image. Dans cette partie nous allons aussi voir que pour la formation d'images de super-résolution nous avons besoin de stabiliser le microscope et nous expliquerons notre solution à ce problème.

1.4.1 Définition de la résolution d'une image

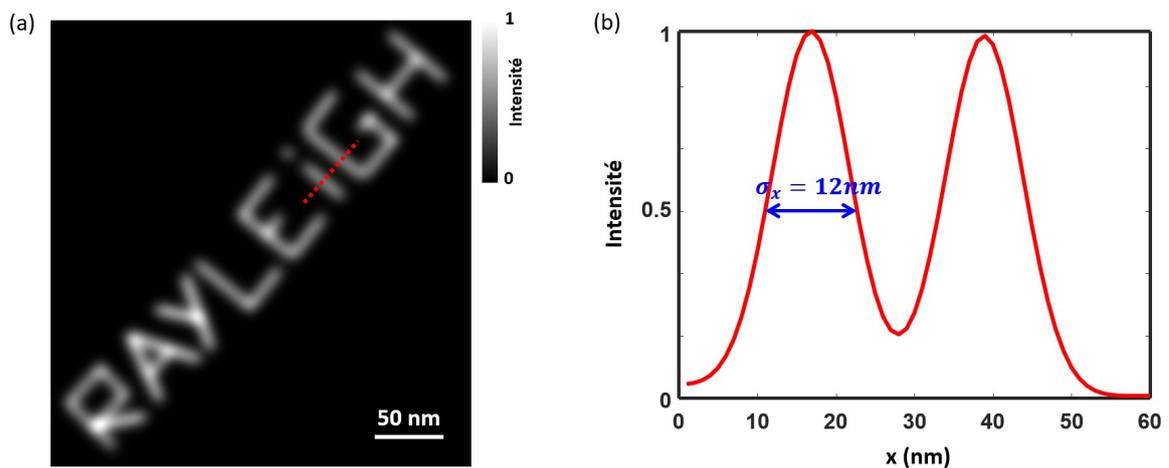


Figure 1.24 : Mesure expérimentale de la résolution : (a) simulation d'une image de super-résolution formée de lignes infiniment fines ; (b) profil de l'intensité le long de la ligne en pointillé rouge tracée dans (a). Pour cette image simulée la résolution latérale est de 12nm.

En microscopie de localisation de molécules uniques, nous pouvons définir la *résolution d'une image* comme étant la plus petite structure que nous sommes capables de distinguer. Cette résolution δ_R , correspondant à la plus petite distance résolvable entre deux points sources, peut être calculée de manière théorique en utilisant une extension du critère de Rayleigh [60]. La résolution d'une image peut aussi être obtenue de manière expérimentale. Comme le montre la figure 1.24, il suffit simplement de mesurer l'écart type de la distribution spatiale d'une structure bien distincte dans l'image.

Une technique plus récente et plus robuste pour le calcul de la résolution est la corrélation d'anneaux de fréquences dans l'espace de Fourier (Fourier Ring Correlation - FRC)[61] [62]. Le principe est illustré sur la figure 1.25. Toutes les détections permettant de reconstruire l'image sont réparties en deux groupes de manière aléatoire. Ces deux groupes permettent de reconstruire deux images similaires. En prenant ensuite les transformées de Fourier de ces deux images, on fait, pour chaque fréquence spatiale q , la corrélation entre les deux transformées de Fourier le long du périmètre du cercle de rayon q . La courbe obtenue permet de donner la résolution de l'image. Cette technique est robuste car elle se base sur un jeu de données expérimentales et tient compte de tous les facteurs expérimentaux (budget photons, densité de molécules, système optique).

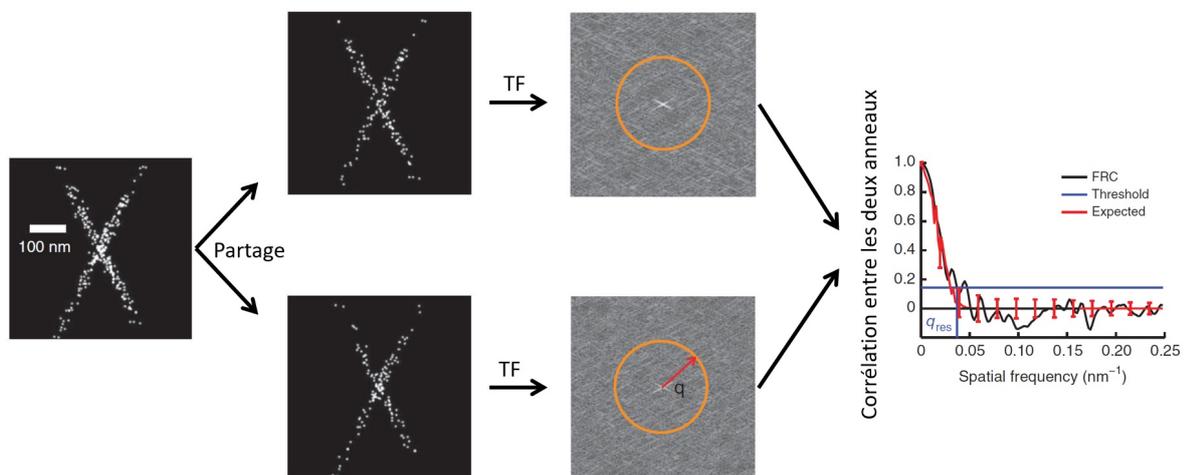


Figure 1.25 : Schéma de principe de la corrélation des anneaux de Fourier comme méthode de calcul de la résolution, illustration extraite de Nieuwenhuizen, *Nature Methods*, 2013 [61]

[60] Ram, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006

[61] Nieuwenhuizen, *Nature Methods*, 2013

[62] Banterle, *Journal of Structural Biology*, 2013

Le nombre de molécules détectées étant important dans la formation d'une image de super-résolution, il est facile de comprendre qu'une acquisition pour la reconstruction d'une image prend du temps (plusieurs minutes, voire plusieurs heures). Il faut donc que le montage optique soit stable durant toute la durée de l'acquisition. Bien que le microscope soit robuste, il existe une légère dérive mécanique de quelques nanomètres, parfois même de quelques microns. Pour pouvoir atteindre une résolution de l'ordre de la dizaine de nanomètres, il faut s'affranchir de tout mouvement d'amplitude supérieure au nanomètre.

Nous avons mis en évidence [Fig.1.26] ce problème en imageant sur plusieurs secondes une nanoparticule de brillance $N_{phot} = 10000$ photons immobilisée à la surface de la lamelle. Les courbes [Fig 1.26(a)] des localisations latérales et axiale au cours du temps montrent clairement une tendance de dérive. Les histogrammes des positions [Fig 1.26(b)] sont très étalés et dans ce cas la précision de localisation est d'une quinzaine de nanomètres. Cependant, les valeurs de la dérive du microscope peuvent être soustraites aux valeurs des positions, ce qui permet de s'affranchir de la dérive mécanique et d'obtenir une résolution de $4nm$ [Fig 1.26(c)].

Pour pouvoir s'affranchir de cette dérive, nous avons implémenté sur notre montage une stratégie pour la mesurer en temps réel grâce à l'imagerie de phase quantitative. Ainsi nous pouvons en tenir compte lors de la reconstruction d'image ou lors du suivi d'une molécule. Nous allons voir dans la dernière partie de ce chapitre comment enregistrer ces valeurs en temps réel. Les données seront prises en compte lors du calcul des localisations.

1.4.2 Deuxième modalité du montage : imagerie de phase quantitative par transmission

Nous avons implémenté sur notre montage un deuxième bras d'imagerie permettant d'imager l'échantillon en transmission. Un système d'interférométrie à décalage quadrilatéral (SID4, Phasics), permettant de faire de l'imagerie de phase quantitative, est placé sur le chemin optique [Fig 1.27]. C'est grâce à cette modalité que nous mesurons la dérive du microscope. Nous allons dans un premier temps comprendre la formation d'une image de phase quantitative par ce système d'imagerie, puis nous verrons comment utiliser ce système comme moyen de stabilisation du microscope dans les trois dimensions de l'espace. Cette modalité sera également utilisée dans le chapitre 3 de ce manuscrit pour imager des cellules vivantes en temps réel.

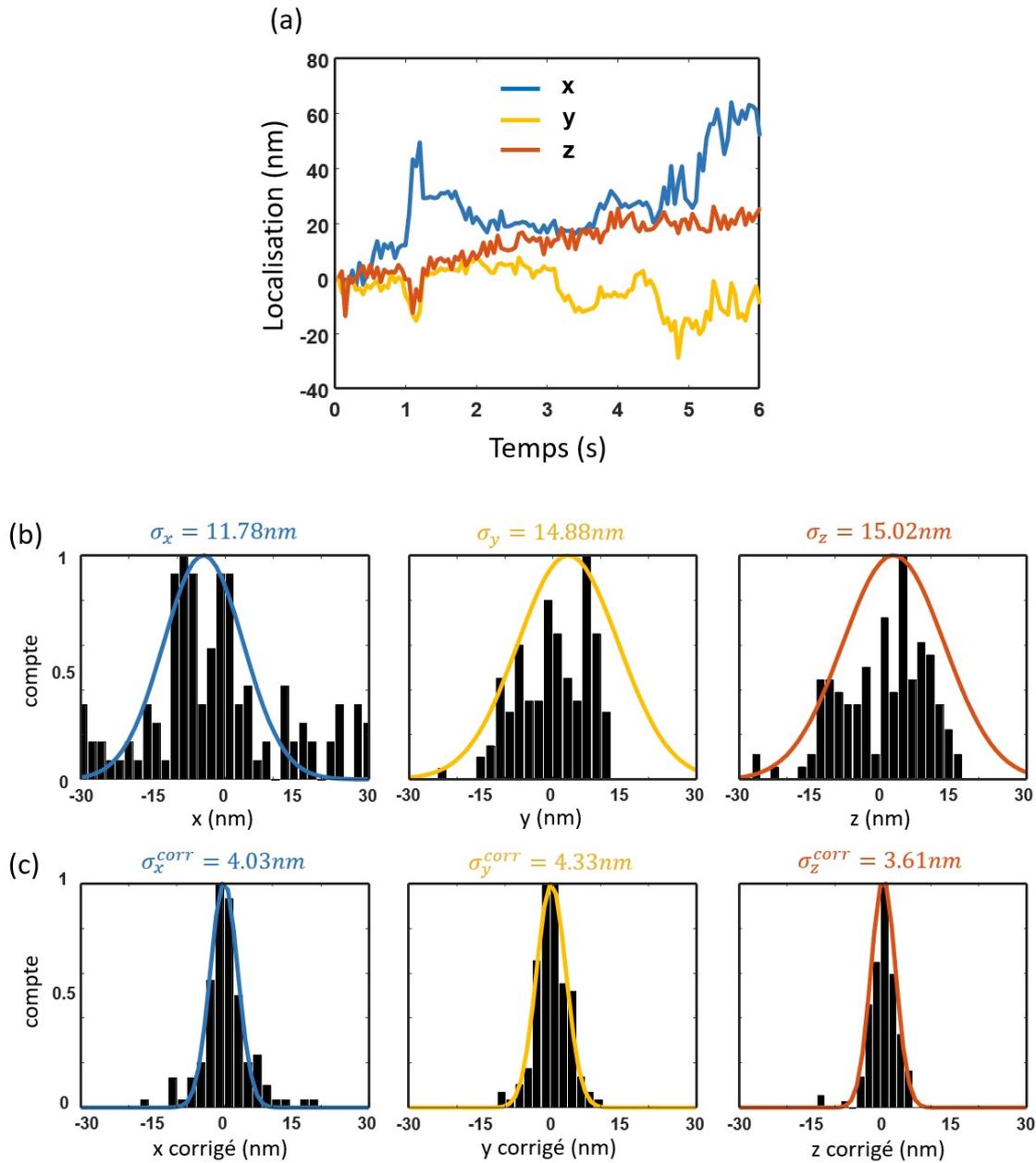


Figure 1.26 : Mise en évidence du besoin de corriger la dérive du microscope sur une bille TetraSpeck fixe sur la lamelle et émettant $N_{phot} = 10000$ photons : (a) courbes des localisations x , y et z au cours du temps ; (b) histogrammes des localisations avec leurs ajustements ; (c) histogrammes des localisations dont on a soustrait la valeur de la dérive, avec leurs ajustements.

Principe de l'analyseur de front d'onde par décalage quadrilatéral

Comme illustré sur la figure 1.27, une source de lumière blanche illumine l'échantillon et un deuxième bras d'imagerie permet de collecter la lumière transmise. La source de lumière est réglée en éclairage Köhler de manière à avoir une illumination cohérente spatialement sur l'échantillon. L'interféromètre SID4, placé avant la caméra, est un analyseur de front d'onde basé sur un principe similaire à la technique SELFI [53] : un réseau de diffraction génère des répliques qui interfèrent en se superposant sur le détecteur. Par rapport à la technique SELFI, le réseau utilisé génère uniquement 4 ordres de diffraction (2 suivant x , 2 suivant y).

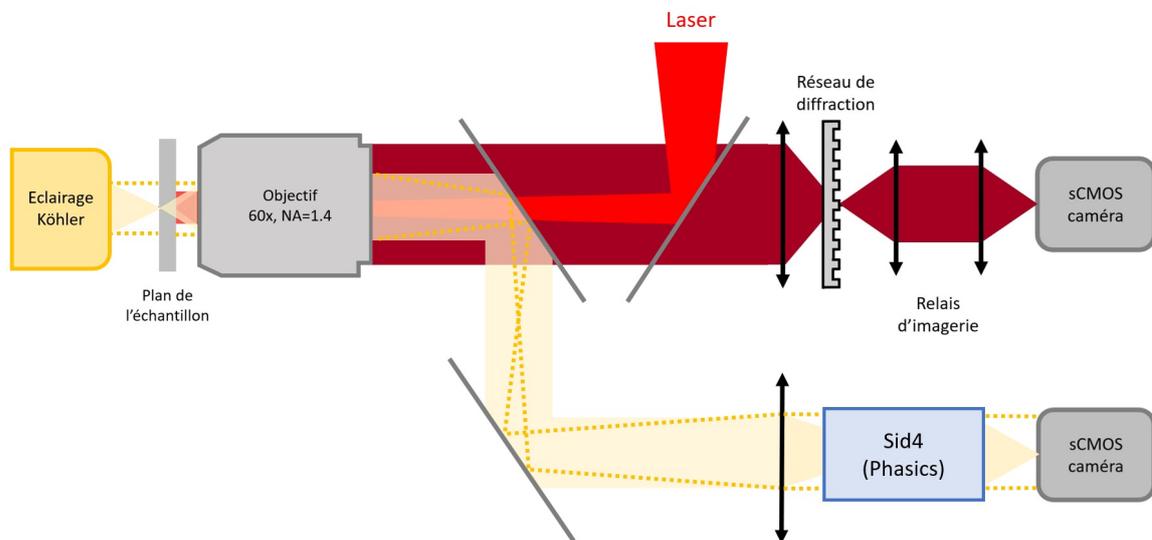


Figure 1.27 : Schéma du montage optique complet avec la modalité de super résolution et celle permettant de faire de l'imagerie par transmission

Le réseau de diffraction utilisé dans la génération d'interférence à quatre ondes (*Quadri Wave Lateral Shearing Interferences* - QWLSI) est un masque de Hartmann modifié (MHM) [54]. Comme illustré en figure 1.28(a), ce réseau est composé d'un damier de phase déphasant un trou sur deux de π et d'un masque d'amplitude. Ce dernier est un masque de Hartmann pur, c'est une matrice de trou carré. Le damier de phase, comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, permet de supprimer par interférences destructives les ordres de diffraction pairs, dont l'ordre 0. On notera que le réseau utilisé dans le montage SELFI est donc un masque de Hartmann sans réseau d'amplitude.

[53] Bon, *Opt. Express*, 2009

[54] Primot, *Appl. Opt.*, 2000

Le masque de Hartmann pur permet de supprimer les ordres +3 et -3 [Fig 1.28(b)]. De cette manière 90% de l'énergie est transmise dans les ordres +1 et -1, ce qui permet de considérer que le masque de Hartmann modifié est un réseau de diffraction quasi-quatre ordres. La transmittance d'un tel réseau est donnée par [53] :

$$t(x, y) = \cos\left(\frac{\pi x}{p}\right) \cos\left(\frac{\pi y}{p}\right), \quad (1.14)$$

où p est le pas du réseau.

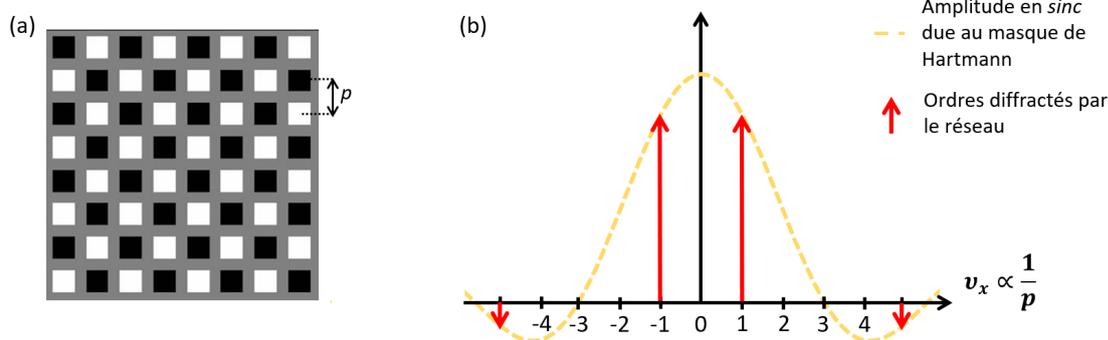


Figure 1.28 : (a) Réseau de diffraction utilisé pour la génération d'interférences à quatre ondes : masque de Hartmann ajouté au damier de phase; (b) amplitude de Fourier unidimensionnelle du masque de Hartmann modifié selon les fréquences ν_x : les ordres pairs sont annulés par le damier de phase et les ordres +3 et -3 sont tués par le sinus cardinal du masque d'amplitude.

Le masque de Hartmann modifié a aussi pour effet de diminuer de 64% l'énergie transmise. Cela ne pose aucun problème dans le cas de l'imagerie par transmission car nous ne sommes pas limités par le nombre de photons. Les photons détectés sont ceux émis par la source d'illumination et qui sont passés au travers de l'échantillon. Cependant cela n'est pas souhaitable en imagerie de fluorescence car le budget photons émis par une molécule fluorescente est limité. Cela explique pourquoi un réseau de phase pur est utilisé pour la technique SELFI.

Cet analyseur de front d'onde permet d'obtenir un interférogramme sur la caméra. Nous détaillons la formation et l'analyse de cet interférogramme dans l'Annexe C.

[53] Bon, *Opt. Express*, 2009

L'interférogramme obtenu est très similaire à celui obtenu avec la méthode SELFI. Cependant, il faut bien comprendre que ces deux techniques mesurent les mêmes grandeurs physiques mais les interprétations que l'on en fait sont très différentes.

Comme l'illustre la figure 1.29, SELFI mesure le champ électromagnétique émis par un émetteur fluorescent. L'interférogramme obtenu permet de mesurer l'intensité émise ainsi que le courbure φ de ce champ. Tandis que l'imagerie de phase faite avec le SID4 mesure le champ électromagnétique transmis par l'échantillon. L'interférogramme obtenu mesure l'intensité transmise ainsi que la différence de chemin optique (OPD) induite par l'échantillon.

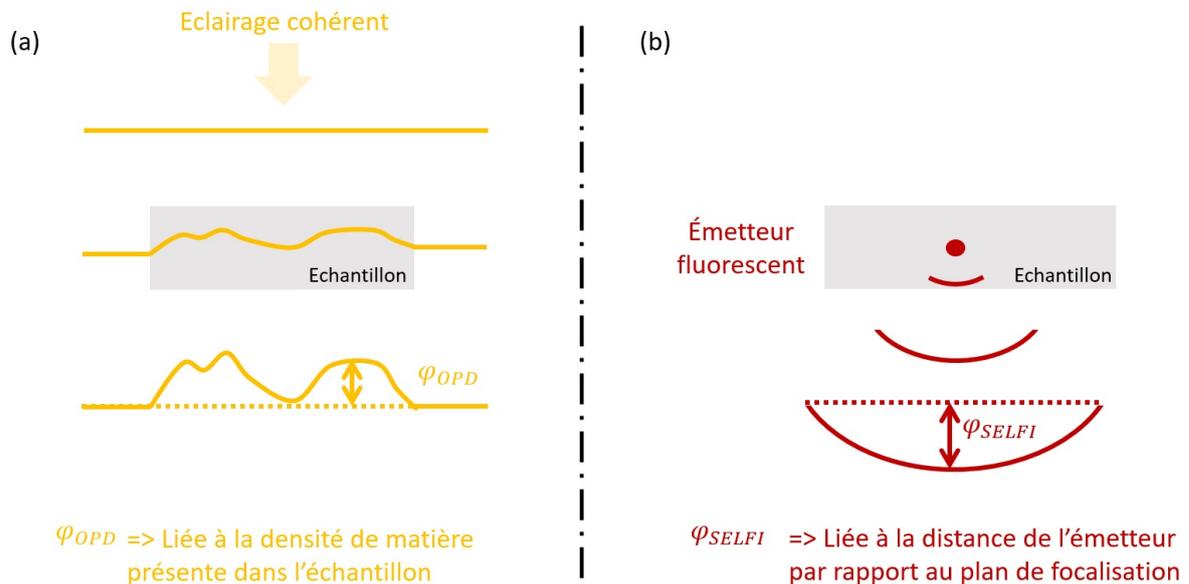


Figure 1.29 : Schéma expliquant la notion de phase en transmission (a), et de phase en fluorescence (b). (a) L'onde plane d'illumination est déformée par la présence de matière dans l'échantillon qui induit une différence de chemin optique, le front d'onde n'est plus plan après avoir traversé l'échantillon ; (b) L'émetteur émet des photons dans toutes les directions de l'espace, le front d'onde est un front divergeant.

La figure 1.30(a) montre un exemple d'interférogramme obtenu grâce au SID4, l'échantillon est une cellule cancéreuse cultivée sur une lamelle de microscope. A partir de cet interférogramme nous pouvons reconstruire une image d'intensité transmise [Fig. 1.30(b)] et une image de phase quantitative [Fig. 1.30(c)]. L'image d'intensité est similaire à une image obtenue avec un microscope standard.

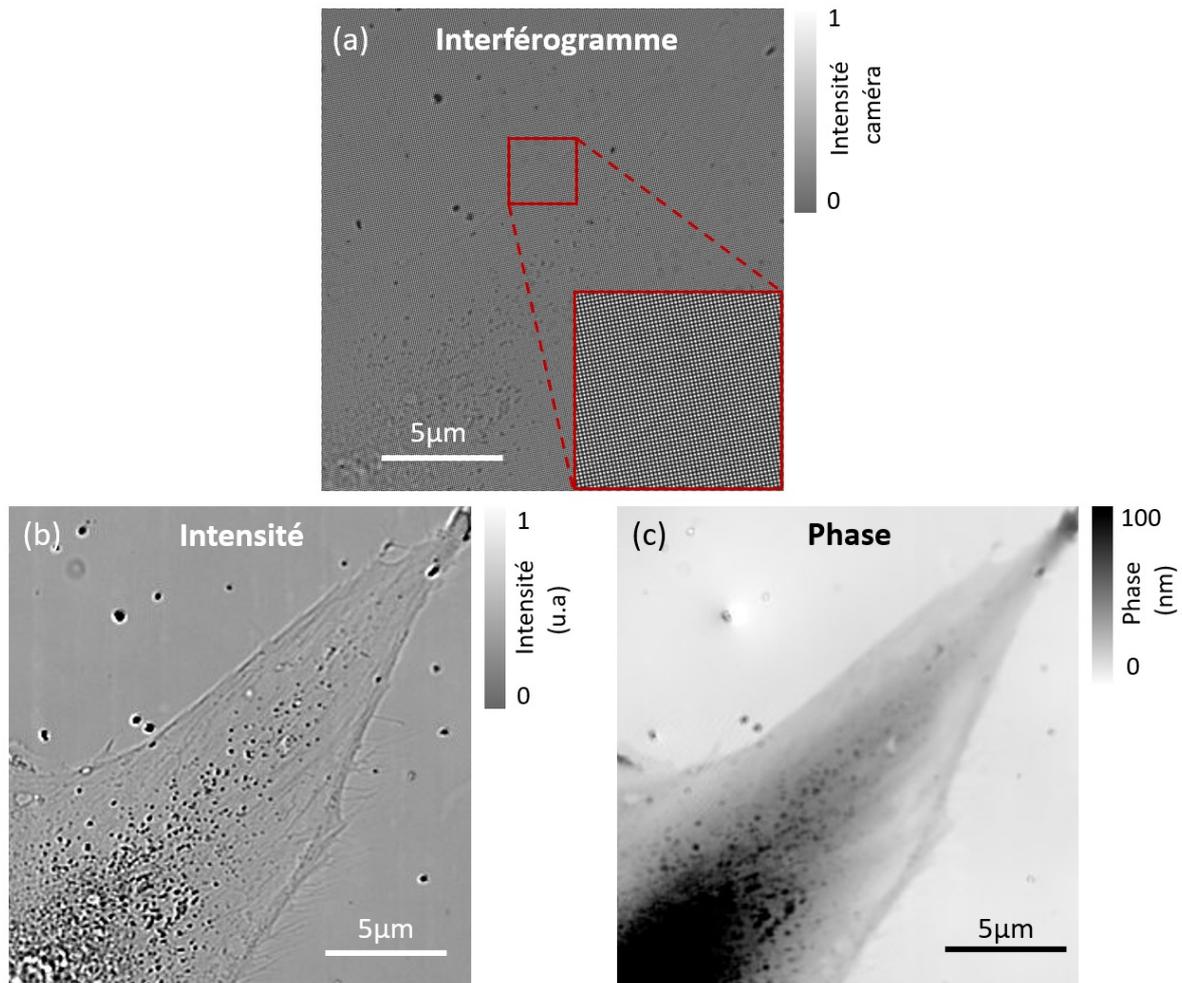


Figure 1.30 : (a) Exemple d'interférogramme obtenu avec le SID4, pour une cellule fibroblaste ; (b) l'image d'intensité reconstruite à partir de l'interférogramme (a) ; (c) l'image de phase reconstruite à partir de l'interférogramme (a)

1.4.3 Utilisation de l'imagerie de phase quantitative pour faire une mise au point automatique sur l'échantillon

L'ajout de cette modalité sur le montage permet de connaître l'intensité et la phase de la lumière transmises par l'échantillon. Nous avons donc toutes les informations nécessaires pour remonter au champ électromagnétique transmis par un objet. Ici nous parlons d'objet pour désigner toutes sortes d'échantillons observés : nanoparticules, cellules vivantes ou non, *etc...*

Une propagation numérique faite dans le domaine de Fourier [63] [64] permet de calculer ce champ électromagnétique dans différents plans. Je ne vais pas détailler ici ce calcul car cela a été développé avant ce travail de thèse, mais en voici les étapes principales. Ces étapes sont illustrées en figure 1.31.

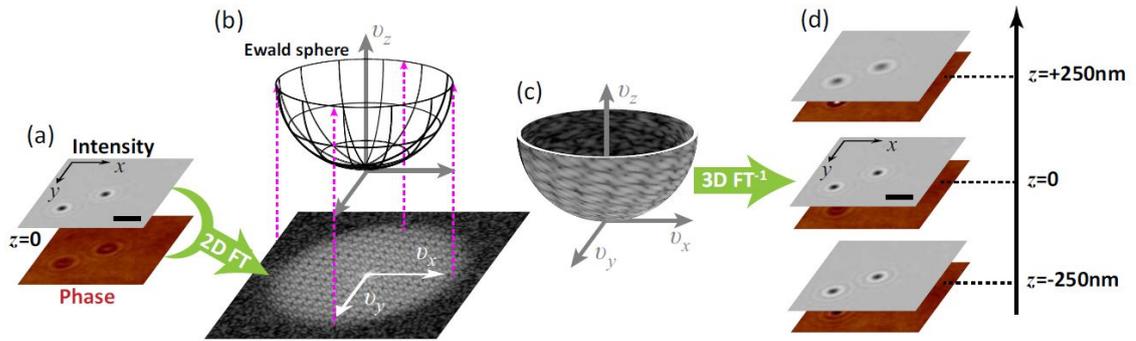


Figure 1.31 : Figure extraite de Bon, *Nat Commun*, 2015 [64] illustrant les étapes de la propagation numérique faite à partir des images de phase et d'intensité. (a) images de phase et d'intensité de billes d'or de 100nm de diamètre; (b) Transformée de Fourier 2D du champ électromagnétique reconstruit à partir des images de phase et d'intensité, ainsi que la sphère d'Ewald calculée selon les paramètres de l'expérience; (c) Projection de la transformée de Fourier 2D sur la sphère d'Ewald; (d) Images d'intensité et de phase dans différents plans obtenues par une transformée de Fourier 3D inverse de (c).

Les fréquences spatiales objet (K_{ox}, K_{oy}) sont accessibles dans la transformée de Fourier du champ électromagnétique. Pour une diffraction induite par cet objet, on a :

$$\vec{k}_i + \vec{K}_o = \vec{k}_d,$$

\vec{k}_i est le vecteur d'onde de l'illumination de l'objet et \vec{k}_d le vecteur d'onde du champ diffracté par l'objet.

[63] Bon, *Opt. Express*, 2014

[64] Bon, *Nat Commun*, 2015

Or la diffraction est un procédé élastique, donc $\|\vec{k}_i\| = \|\vec{k}_d\|$ ce qui nous permet d'écrire :

$$k_i^2 = (k_{ix} + K_{ox})^2 + (k_{iy} + K_{oy})^2 + (k_{iz} + K_{oz})^2.$$

Cette équation est l'équation d'une sphère. Les fréquences de l'objet définissent donc une sphère de centre (k_{ix}, k_{iy}, k_{iz}) dans le domaine de Fourier. Cette sphère est appelée la sphère d'Ewald. Une fois la sphère reconstruite et en effectuant une transformée de Fourier tridimensionnelle inverse, on obtient le champ électromagnétique transmis par l'objet dans différents plans. Nous sommes donc capables de *propager* le champ électromagnétique reçu par le détecteur correspondant à un plan donné.

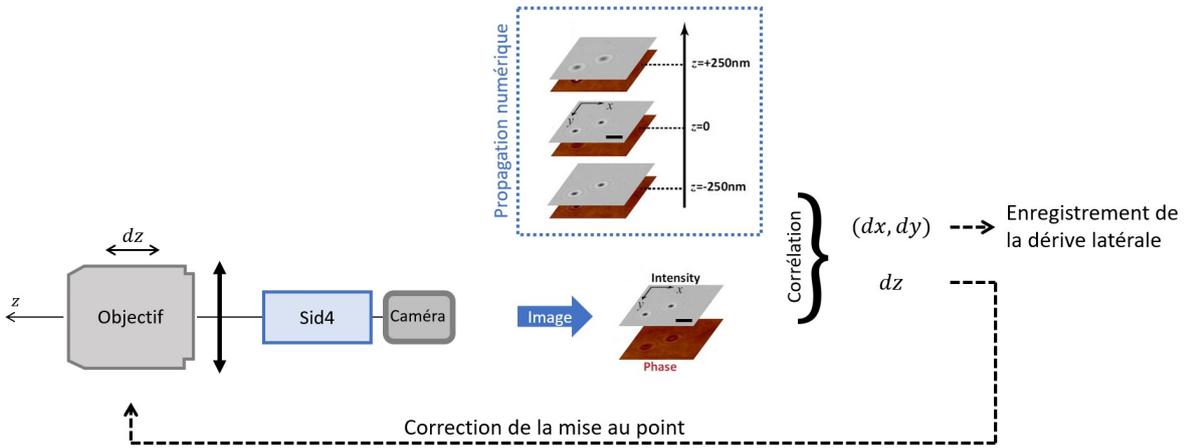


Figure 1.32 : *Asservissement du microscope pour enregistrer la dérive et corriger la mise au point en temps réel*

En pratique nous faisons la mise au point sur l'échantillon dans le plan souhaité. A partir de l'image faite dans ce plan nous effectuons une *propagation numérique* qui permet d'accéder à l'intensité et la phase de l'objet dans n'importe quel plan d'imagerie. Puis un asservissement du microscope, illustré en figure 1.32, permet de maintenir la focalisation souhaitée dans l'échantillon. Sur le montage, nous sommes capables de corriger la focalisation à une fréquence de $10Hz$ à $20Hz$, la limitation de cette correction est le temps d'intégration sur l'interféromètre et le temps de calcul de l'asservissement.

Comme cette technique utilise à la fois l'intensité et la phase du champ électromagnétique transmis, elle permet d'avoir une grande sensibilité vis à vis de la dérive 3D du microscope. Les valeurs de dérives latérales sont enregistrées avec une précision de $2nm$ et la dérive axiale avec une précision de $5nm$.

La figure 1.33 montre un exemple de la dérive enregistrée par cette méthode au cours du temps lors d'une acquisition.

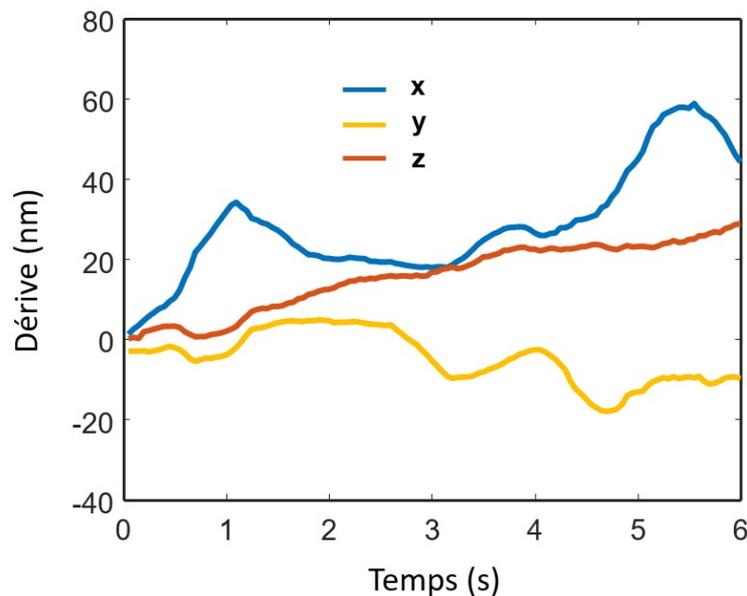


Figure 1.33 : Dérive au cours du temps pour l'acquisition illustrée en figure 1.26

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons décrit le fonctionnement de la technique SELFI. Nous avons vu que cette méthode de localisation tridimensionnelle d'émetteurs uniques est basée sur le phénomène d'interférences. L'utilisation d'un réseau de diffraction permet de générer des répliques du signal de fluorescence, ces répliques interfèrent sur le détecteur. Lors d'un problème de localisation de molécules uniques, il est important de collecter un maximum des photons émis par la molécule, c'est pour cela que nous utilisons un réseau de phase pur. Nous collectons 87% de l'énergie transmise par ce réseau à la longueur d'onde $\lambda_{em} = 700nm$, et 92% à $\lambda_{em} = 520nm$.

Le détail des calculs de l'interférogramme obtenu nous a permis de montrer que, pour une approximation au premier ordre, la technique SELFI est achromatique. Il serait intéressant de détailler les calculs en tenant compte de plusieurs ordres de diffractions, et non pas seulement les ordres +1 et -1 selon les directions x et y , pour affiner l'étude théorique de la formation des franges.

Les interférences générées par le réseau de diffraction viennent structurer la PSF avec un sur-étalement spatial minimal. L'énergie présente dans la PSF est conservée lors de la formation de l'interférogramme.

Pour extraire l'information sur la localisation spatiale d'une molécule unique à partir d'un interférogramme, nous utilisons un dictionnaire de PSF-SELFI en fonction du plan de mise au point. Ce dictionnaire constitue une calibration de la réponse du montage optique en chacun des plans de la profondeur de champ de l'objectif. La localisation axiale d'une nanoparticule est retrouvée par comparaison à cette calibration. La localisation latérale, quant à elle, est retrouvée de manière classique en faisant un ajustement de l'intensité de la PSF-SELFI par une fonction gaussienne. Le centroïde de la fonction d'ajustement donne la localisation latérale.

Après avoir détaillé les différentes sources de bruit et de perte de signal présentes sur le montage, nous avons calculé la limite théorique de l'erreur faite lors de la localisation 3D d'une nanoparticule. Pour la technique SELFI, cette limite, basée sur le calcul de la bande de Cramèr-Rao, est $\sigma_{xy} = 6nm$ et $\sigma_z = 12nm$ en $z = 0$, pour une molécule émettant $N_{phot} = 1000$ photons et un bruit de fond $\beta = 2$ photons par pixel.

Nous avons utilisé un échantillon mimétique pour calculer expérimentalement la précision de localisation avec laquelle nous sommes capables de trouver la position d'une molécule unique. Les résultats prouvent que nous pouvons localiser précisément en 3D une molécule unique en profondeur dans un échantillon biologique épais. Pour une molécule émettant $N_{phot} = 1000$ photons, nous obtenons une précision de localisation de $\sigma_{xy} = 11nm$ et de $\sigma_z = 22nm$ si elle est présente à la surface de la lamelle ($z_{depth} = 0$). Si elle est présente à une profondeur $z_{depth} = 40\mu m$ dans l'échantillon, la précision de localisation est de $\sigma_{xy} = 16nm$ et de $\sigma_z = 32nm$. La précision et la justesse de localisation axiale restent inférieures à $45nm$ jusqu'à une profondeur $z_{depth} = 40\mu m$ dans l'échantillon. Ce qui n'est pas le cas pour la technique de la mise en forme de PSF par astigmatisme : la présence d'aberrations dans l'échantillon brouille l'information sur la position axiale. Au-delà des 10 premiers microns dans l'échantillon la précision de localisation axiale chute fortement.

Enfin, grâce à la deuxième modalité du montage optique utilisé durant cette thèse qui permet de faire de l'imagerie de phase quantitative en utilisant un interféromètre SID4 (Phasics, France), nous avons vu que nous pouvons enregistrer la dérive du microscope au cours de l'acquisition. Cette dérive soustraite aux localisations de chacune des détections permet de faire des acquisitions longues et ainsi de reconstruire des images de super-résolution.

Nous verrons, lors du dernier chapitre de cette thèse, une combinaison des détections de super-localisation faites grâce à SELFIE et des images de phase de cellules vivantes faites grâce au SID4. Nous montrerons alors que ces deux techniques d'imagerie sont complémentaires en bioimagerie.

La technique SELFIE est une méthode de localisation tridimensionnelle de molécules uniques. Cette technique peut-être combinée à d'autres techniques de super-résolution, c'est ce que nous allons voir dans le chapitre suivant.

Chapitre 2

Microscopie de super-résolution 3D dans des échantillons biologiques complexes statiques grâce à la technique SELFI

La technique SELFI est une méthode permettant de super-localiser en 3D des émetteurs fluorescents uniques. Dans le chapitre précédent nous avons expliqué le principe physique sur lequel repose cette technique et nous avons calculé les précisions de localisation théorique et expérimentale atteignables avec cette méthode. La technique SELFI nécessite de mettre en forme le signal de fluorescence détecté simplement par l'insertion d'un réseau de diffraction en sortie de microscope. Par conséquent, elle peut être combinée à n'importe quelle technique d'illumination de l'échantillon et donc à beaucoup de techniques dédiées à la super-résolution. Grâce à ces différentes combinaisons, nous allons montrer que la technique SELFI est une méthode robuste pour localiser en 3D des molécules uniques dans des échantillons biologiques complexes.

Dans la suite de cette thèse, nous allons former des images super-résolues grâce aux techniques permettant de se placer, en champ large, dans un régime de molécules uniques. Les techniques de microscopie de localisation de molécules uniques utilisées dans ma thèse sont : PALM[4], (d)STORM [19] et (u)PAINT[20]. Ces techniques permettent de séparer temporellement la fluorescence de molécules spatialement trop proches. Ainsi, après l'acquisition de plusieurs images brutes sur lesquelles il y a quelques détections, on peut

[4] Betzig, *Science*, 2006

[19] van de Linde, *Nature Protocols*, 2011

[20] Giannone, *Biophysical Journal*, 2010

reconstruire une image de super résolution d'un marquage moléculaire dense.

La technique PALM (*Photoactivated Localization Microscopy*)[4] est une technique de super-résolution basée sur la photo-activation de protéines fluorescentes. Sous illumination à une longueur d'onde λ_{PA} (souvent dans le domaine ultraviolet), la protéine subit un changement de conformation. Ce réarrangement structural peut être réversible si la protéine se déforme, ou bien irréversible si une liaison moléculaire se rompt. La réorganisation moléculaire des protéines photo-activables a pour effet d'augmenter leur fluorescence dans une bande donnée.

Le dSTORM (*direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy* [19]) est basé sur une transformation de l'état excité des fluorophores. Le principe repose sur l'utilisation d'une solution tampon, peu compatible avec des études sur cellules vivantes, qui permet de mettre une molécule fluorescente dans un "état noir". Cette solution tampon, à $pH = 8 - 8.5$, contient du thiol et est désoxygénante (protocole en Annexe D.3). La figure 2.1 illustre le cycle subi par la molécule fluorescente lors d'une acquisition de dSTORM.

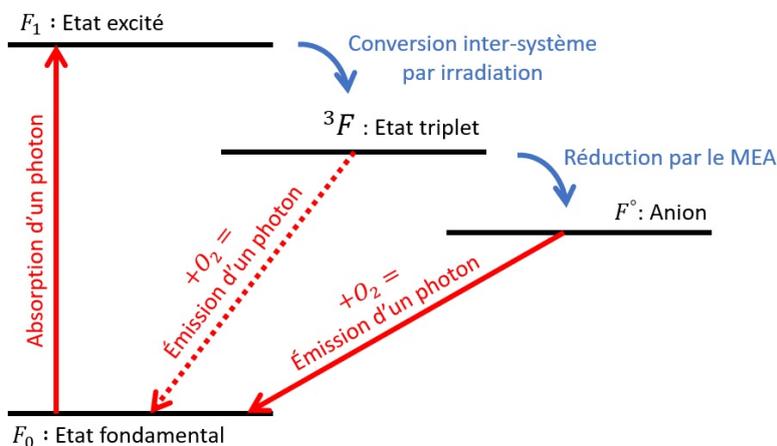


Figure 2.1 : Schéma du cycle de fluorescence de l'Alexa lors d'une expérience de dSTORM [19]

Sous illumination laser à forte puissance, l'état excité de la molécule fluorescente devient un état triplet par conversion inter-système. Cet état triplet peut revenir à l'état fondamental en réagissant avec une molécule d'oxygène et en émettant un photon. Cependant la solution tampon utilisée contient très peu d'oxygène, ce qui rend cet évènement peu probable.

[4] Betzig, *Science*, 2006

[19] van de Linde, *Nature Protocols*, 2011

De plus, la présence de thiol (MEA) dans la solution, qui est un excellent donneur d'électrons, permet la création d'un anion à partir de l'état triplet. Cet anion a la propriété de peu réagir avec l'oxygène, ce qui augmente encore la capacité de la molécule à rester dans un état non fluorescent, d'autant plus qu'il y a peu d'oxygène dans la solution. C'est ce cycle qui permet d'obtenir un régime de molécules uniques durant l'acquisition : de manière totalement aléatoire, chaque molécule fluorescente revient à son état fondamental et peut dès lors émettre un certain nombre de photons (environ 1000 à 10000 photons) avant de photoblanchir ou retourner dans l'état triplet. Ainsi, lors d'une acquisition, pour un temps d'exposition d'une dizaine de millisecondes, il y a seulement quelques PSF bien distinctes sur chaque image enregistrée. Ces PSF ne restent que sur 1 à 3 images consécutives ce qui est le régime idéal.

Je discuterai du (u)PAINT dans le chapitre suivant qui sera consacré à une étude dynamique des échantillons biologiques vivants. Dans ce chapitre, nous allons voir l'utilisation du SELFI-PALM et du SELFI-dSTORM pour une étude statique. Dans un premier temps nous verrons que, malgré un faible nombre de photons détectés par molécule, SELFI permet de retrouver des différences de localisations axiales entre des protéines marquées dans différents échantillons. Ensuite nous montrerons que la technique SELFI permet de faire des images de super-résolution tridimensionnelles à haute densité de marquage en surface dans des échantillons fins comme en profondeur dans des échantillons épais et complexes. Enfin, ayant prouvé que nous pouvons avoir confiance dans la localisation spatiale trouvée grâce à SELFI, nous pourrons l'appliquer à une problématique de neurobiologie pour répondre à des questions sur l'organisation de récepteurs synaptiques.

2.1 Super-localisation au sein d'un échantillon biologique connu

Jusqu'à présent, nous avons vu que la méthode SELFI permet de localiser en trois dimensions des molécules uniques avec une précision inférieure à $20nm$. Cependant, la localisation axiale est toujours donnée par rapport au plan de mise au point. Nous effectuons donc, comme dans la plupart des techniques de super-résolution 3D, une *mesure relative* de la position axiale des particules. A ce jour, la seule technique permettant d'obtenir une *mesure absolue* de la position axiale est celle basée sur l'émission super-critique de fluorescence [34]. Effectuer une mesure relative devient gênant lorsque la molécule d'intérêt doit être détectée par rapport à un objet de référence, comme la lamelle de mi-

[34] Bourg, *Nature Photonics*, 2015

croscopie, ou lorsqu'on souhaite comparer des hauteurs entre différents échantillons. Dans cette partie, nous allons montrer qu'il est possible, avec la technique SELFI, de faire une mesure absolue de la position axiale, de manière à ne plus dépendre du plan de mise au point.

L'étude de l'enchaînement moléculaire au sein des points focaux d'adhésion de la cellule nécessite de connaître la localisation des molécules par rapport à la lamelle qui sert de référence [65]. Cette structure moléculaire bien connue [66] va nous servir d'outil métrologique : en marquant différentes protéines dans différents échantillons, nous allons voir que nous pouvons utiliser une référence commune pour retrouver les différences de localisations axiales attendues.

Dans la suite de cette partie nous décrirons de manière simple le modèle moléculaire des points focaux d'adhésion, puis nous montrerons comment l'architecture moléculaire 3D de ce modèle peut être retrouvée avec la méthode SELFI couplée à la technique de super-résolution PALM.

2.1.1 Structure moléculaire simplifiée des points focaux d'adhésion des cellules : un outil métrologique biologique

Modèle moléculaire

En biologie, les interactions entre la cellule et l'espace extra-cellulaire jouent un rôle primordial. C'est grâce à ces interactions que la morphogénèse et les déplacements de la cellule sont possibles. Depuis les années 1990, on sait que la cellule communique avec l'espace extra-cellulaire *via* des sites d'adhésion, appelés *points focaux d'adhésion* [67]. Ces sites ont été l'objet de nombreuses études de mécano-transduction [68] [69]. Récemment, grâce au développement des techniques de super-résolution, il a été possible de connaître avec précision l'enchaînement 3D des molécules au sein de ces points focaux d'adhésion [66]. La configuration 4π du montage du iPALM a rendu possible, sur des cellules fixées, de voir que les points focaux d'adhésion sont constitués de différentes couches de protéines. Ces protéines permettent à la cellule de faire le lien entre l'espace qui l'entoure et son cytosquelette. Cette structure moléculaire, connue à l'échelle nanométrique, va nous servir ici d'outil métrologique pour montrer que la technique SELFI nous fait accéder

[65] Linares-Loyez, *Frontiers in Physics*, 2019

[67] Burridge, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1996

[68] Geiger, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001

[69] Bershadsky, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2003

[66] Kanchanawong, *Nature*, 2010

à la localisation 3D exacte de molécules au sein d'échantillons biologiques. Ce travail a été fait en collaboration avec G.Giannone et O.Rossier experts de la mobilité cellulaire à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (*IINS, Bordeaux*).

L'échantillon utilisé est représenté en figure 2.2. Des cellules adhérentes provenant d'embryon de souris (*Mouse Embryonic Fibroblasts - MEFs*) ont été ensemencées sur des lamelles de microscope recouvertes de fibronectine. Le protocole de préparation de l'échantillon est détaillé dans l'Annexe D.1. Le revêtement (Fibronectin $10\mu g/mL$, Roche) est utile lors de l'étude de l'adhésion des cellules car il mime les propriétés de l'espace extra-cellulaire réel. Cela fait un substrat plus bio-compatible que la lamelle brute pour les cellules, ce qui s'apparente mieux à la réalité de l'environnement cellulaire.

Des nanoparticules fluorescentes, de $100nm$ de diamètre, ont été insérées dans le revêtement. Ces nanoparticules serviront comme référence pour le $z = 0$ lors du calcul des localisations et lors de la formation des images.

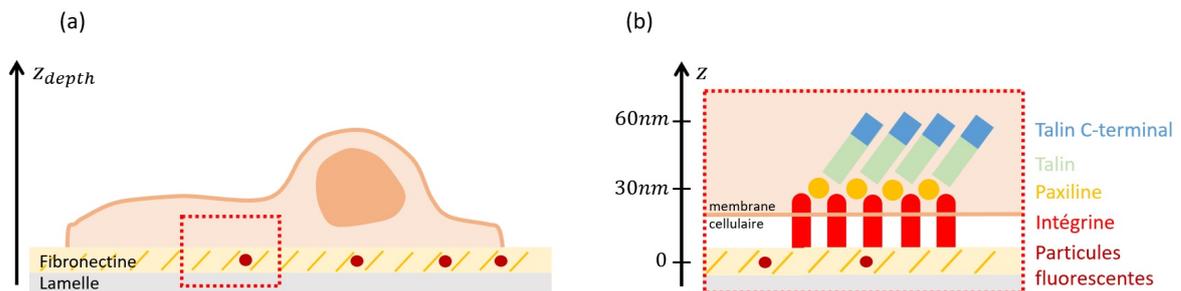


Figure 2.2 : (a) Schéma de l'échantillon utilisé; (b) agrandissement de l'encadré rouge dans (a) illustrant l'enchaînement de protéine d'un point focal d'adhésion.

La figure 2.2(b) présente un schéma simplifié de la structure nanométrique des protéines d'un point focal d'adhésion. L'intégrine est une protéine transmembranaire ayant un domaine extra-cellulaire permettant l'accroche de la cellule au substrat. Il y a ensuite tout un enchaînement moléculaire d'environ $60nm$ de hauteur pour relier la partie intra-cellulaire de l'intégrine à l'actine. L'actine est un des éléments du cytosquelette : ce sont des filaments flexibles constituant un réseau dense dans la cellule. Le cytosquelette contribue à donner sa forme à la cellule, c'est aussi ce qui lui permet de se déplacer. De l'enchaînement moléculaire des points focaux d'adhésion, nous avons choisi d'étudier deux protéines : la paxiline et la talin-C. La paxiline fait partie des protéines de la première couche tandis que la talin-C se situe plus haut, proche de l'actine.

Montage optique pour le SELFI-PALM

Les deux protéines étudiées ont été couplées à la protéine mEos2, un marqueur fluorescent. Le marquage, par transfection, a été effectué par nos collaborateurs de l'équipe Giannone à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (*IINS, Bordeaux*). La mEos2 est une protéine photoactivable : lorsqu'elle est excitée à $\lambda_{ex} = 568nm$, elle peut subir une photoconversion sous illumination à $\lambda_{PA} = 405nm$. Cela a pour effet d'augmenter la fluorescence de la protéine à $\lambda_{em} = 584nm$. Cette photoconversion est irréversible.

L'imagerie a été faite grâce à une combinaison SELFI-PALM. Nous avons construit le montage illustré en figure 2.3. L'excitation des molécules mEos2 se fait grâce à un laser (250 mw, Sapphire, Coherent) de longueur d'onde $\lambda_{ex} = 568nm$ placé en configuration de réflexion totale interne (*Total Internal Illumination Fluorescence - TIRF* [70]). Cela permet d'illuminer uniquement la partie utile de la cellule : les points focaux d'adhésion, situés en surface. Cela diminue l'autofluorescence de l'échantillon et donc diminue le bruit de fond reçu sur la caméra. La photoactivation à $\lambda_{PA} = 405nm$ se fait, quant à elle, grâce à une source de lumière (Intensilight, Nikon) en épifluorescence avec un filtre d'excitation (385/11, Semrock).

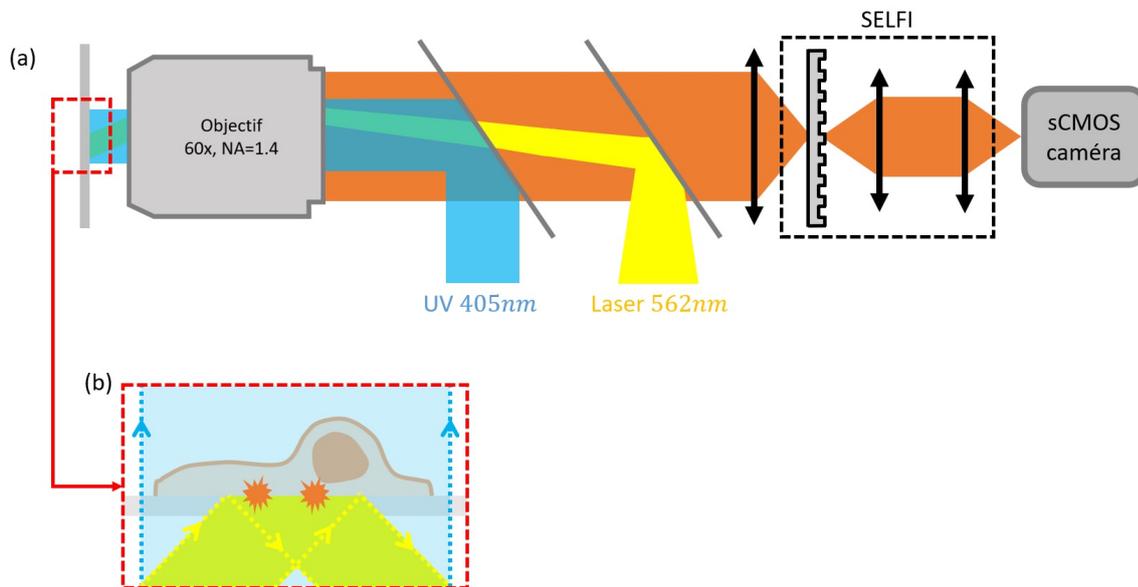


Figure 2.3 : (a) Schéma du montage optique SELFI-PALM; (b) zoom sur l'échantillon pour voir l'illumination de photoactivation en épifluorescence et le laser d'excitation en configuration TIRF

[70] Axelrod, *The Journal of Cell Biology*, 1981

Photophysique du fluorophore utilisé

Un étude photophysique de la molécule mEos2 a été faite pour déterminer les conditions de travail (puissance laser et temps d'intégration). Des molécules mEos2 purifiées ont été déposées sur une lamelle propre et une acquisition d'une centaine de secondes a été faite pour chaque condition. Nous avons testé deux puissances laser pour l'excitation à $\lambda_{ex} = 568nm$: $P = 0.8kW/cm^2$ et $P = 1.6kW/cm^2$, pour deux temps d'intégration : $t_{exp} = 30ms$ et $t_{exp} = 60ms$. Nous nous sommes intéressés à deux critères : le nombre de photons détectés par molécule et le nombre de molécules détectées sur chaque image. Les résultats sont présentés en figure 2.4 pour 30 000 molécules détectées.

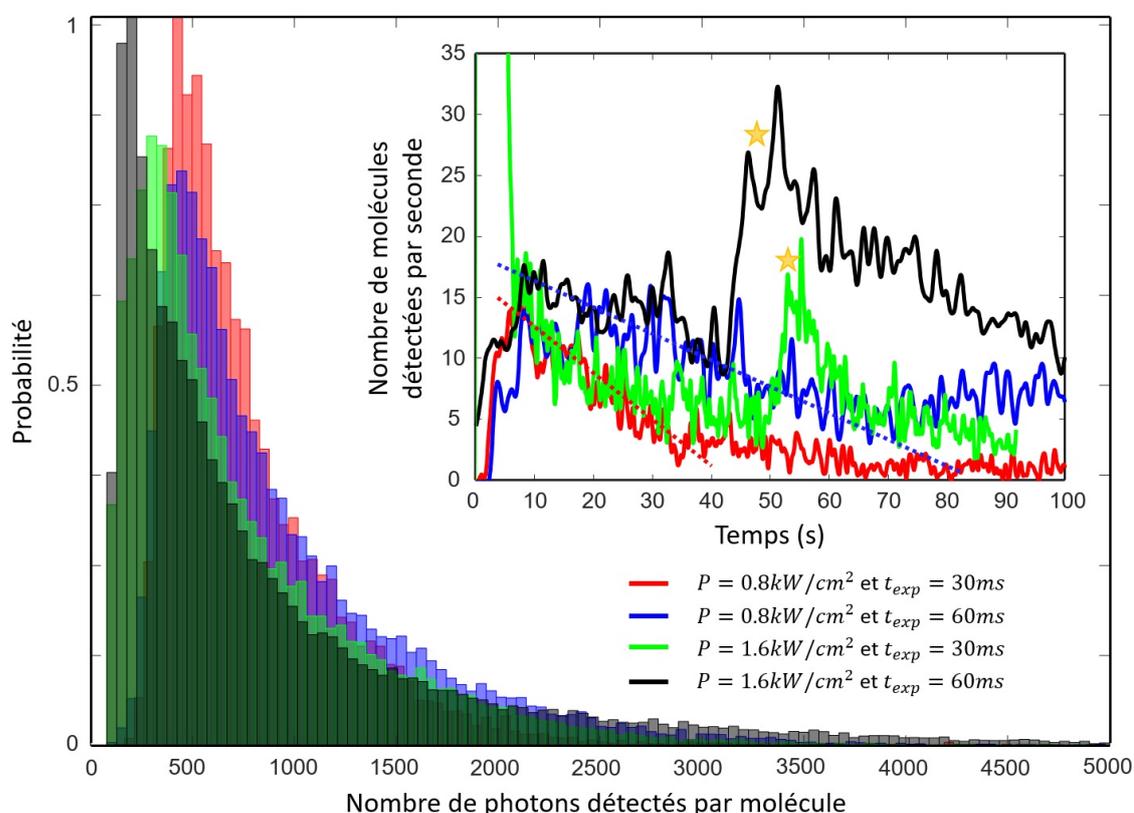


Figure 2.4 : Étude de la molécule mEos2 selon différentes conditions de puissance laser et de temps d'intégration. Les étoiles représentent un moment où la puissance d'illumination de photoactivation à $\lambda_{PA} = 405nm$ a été augmentée.

Les courbes du nombre de molécules détectées par seconde montrent que la quantité de molécules par instant diminue deux fois plus vite pour un temps d'exposition $t_{exp} = 30ms$ que pour $t_{exp} = 60ms$. Cependant au bout d'une cinquantaine de secondes lors de l'acquisition pour une puissance laser de $P = 1.6kW/cm^2$, ayant l'impression de ne plus voir suffisamment de molécule, j'ai augmenté la puissance de l'illumination de

photoactivation à $\lambda_{PA} = 405nm$. Ces instants sont marqués par une étoile jaune sur le graphe. Cette impression se justifie lorsqu'on regarde le nombre de photons détectés par molécule. En effet, pour une puissance d'excitation $P = 0.8kW/cm^2$ la médiane de l'histogramme du nombre de photons se situe à 500 photons, tandis que pour une puissance plus élevée $P = 1.6kW/cm^2$ cette médiane est inférieure à 200 photons. Une trop forte puissance laser sature la molécule fluorescente.

Nous avons donc choisi d'utiliser une puissance laser d'excitation à $P = 0.8kW/cm^2$ et un temps d'exposition de $t_{exp} = 60ms$ pour la suite des acquisitions.

2.1.2 Résultats de l'imagerie statique SELFI-PALM

Dans les conditions que nous venons de détailler, nous avons effectué des acquisitions de SELFI-PALM sur cellules vivantes [65]. La dynamique de certaines protéines au sein des points focaux d'adhésion peut être très rapide (de l'ordre de la seconde), mais les points focaux d'adhésion eux-même ont une dynamique bien plus lente et restent stables pendant quelques minutes [71]. Notre étude ici étant de connaître la localisation spatiale moyenne de la paxiline et de la talin-C au sein des points focaux d'adhésion, nous n'avons pas tenu compte de la dynamique de ces protéines. Les acquisitions ont duré 5min, ce qui nous permet de considérer une étude statique dans les points focaux d'adhésion.

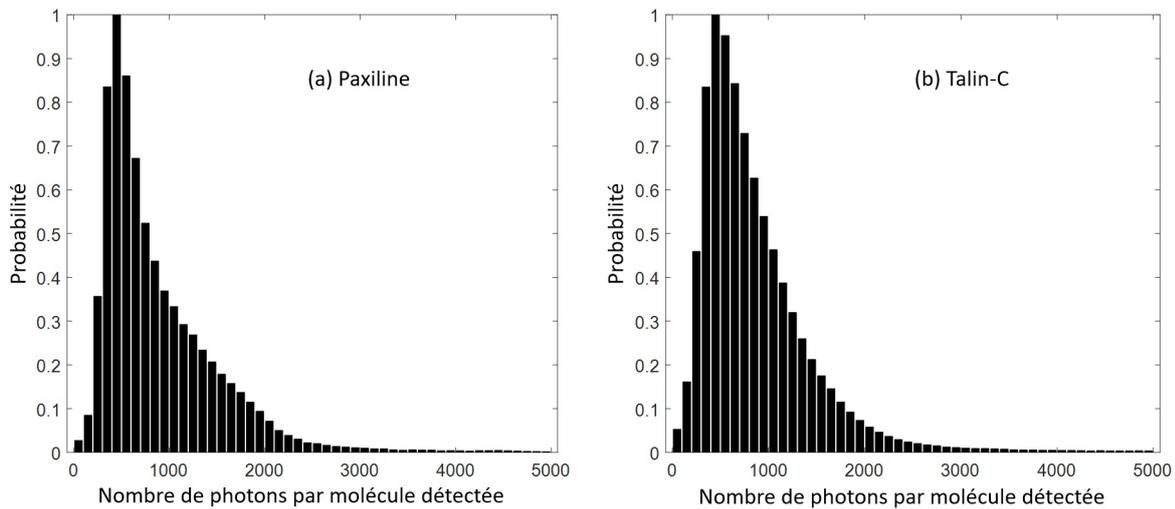


Figure 2.5 : Histogramme du nombre de photons par molécule détectée pour les acquisitions SELFI-PALM : (a) Paxiline et (b) Talin-C

[65] Linarès-Loyez, *Frontiers in Physics*, 2019

[71] Rossier, *Nature Cell Biology*, 2012

Pour chaque cellule imagée nous avons fait une image des points focaux d'adhésion grâce à un marquage GFP (*Green Fluorescent Protein*) de la paxiline. La figure 2.6 présente les images de super résolution tridimensionnelles obtenues grâce au SELF-PALM. Ces images permettent d'affirmer que la paxiline et la talin-C se trouvent principalement dans les sites d'adhésion de la cellule visibles dans les images GFP. Chaque image super-résolue représente environ 150 000 molécules détectées. J'ai représenté en figure 2.5 les histogrammes du nombre de photons par molécule détectée pour ces images. On retombe bien sur une médiane à $N_{phot} = 500$ photons comme attendu selon l'étude précédente [Fig2.4].

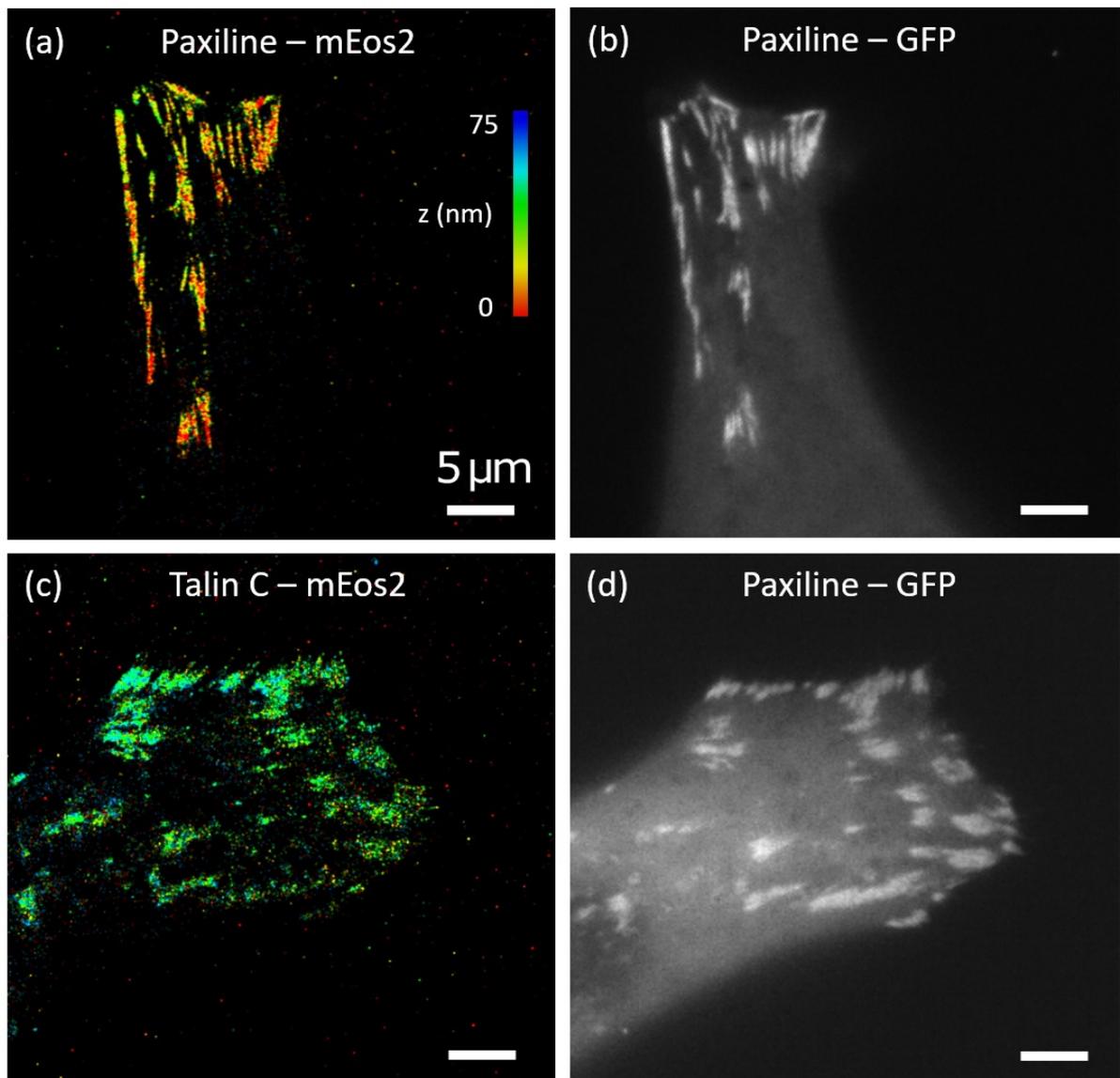


Figure 2.6 : Résultats du SELF-PALM : images super-résolues tridimensionnelles de la paxiline (a) et de la talin-C (c) ainsi que leurs images GFP respectives (b et d)

Les nanoparticules adsorbées dans la fibronectine ont servi de référence. Leur position relative au plan de mise au point a été soustraite aux localisations axiales des molécules lors du calcul des localisations. Cela permet de s'affranchir du plan de mise au point pour chacune des zones étudiées et nous obtenons des valeurs de localisations axiales absolues par rapport au substrat. Le fait d'avoir une référence commune (le substrat) pour toutes les images permet de comparer les localisations axiales entre elles. La figure 2.7 présente la comparaison entre les localisations axiales de la paxiline et de la talin-C. Les histogrammes montrent clairement deux distributions bien distinctes.

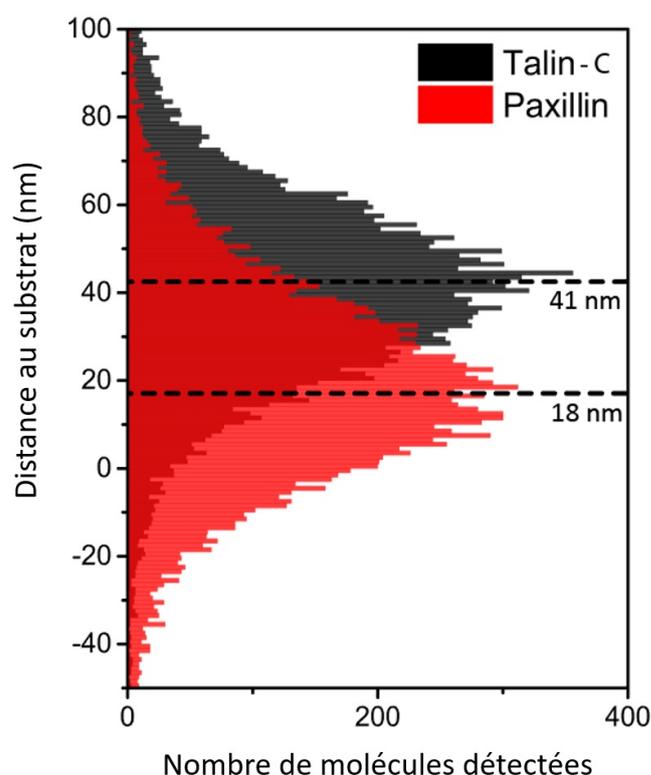


Figure 2.7 : Histogramme des localisations axiales de la paxiline-mEos2 et de la talin-C-mEos2 ayant pour référence le substrat

Nous retrouvons que la paxiline est plus proche de la lamelle et que la talin-C se situe plus haut. Les deux distributions observées sont :

$$z_{paxilin} = 18 \pm 22nm \quad \text{et} \quad z_{talin} = 41 \pm 25nm.$$

Elles sont donc séparées de $\Delta_z = 23nm$. Les valeurs de localisations axiales attendues pour ces protéines sont [66] :

$$z_{paxilin}^{lit} = 43.1 \pm 22nm \quad \text{et} \quad z_{talin}^{lit} = 76.7 \pm 15.7nm.$$

En tenant compte de la précision de localisation, la différence de hauteur retrouvée est conforme à ce qu'on trouve dans la littérature. Cependant, les valeurs absolues ne correspondent pas à celles obtenues sur des cellules fixées : on observe un décalage d'environ $25nm$.

Ce décalage peut venir du fait que la méthode utilisée pour retrouver la position de la lamelle n'est pas optimale : il y a seulement une ou deux nanoparticules dans le champ de la caméra qui est de $40\mu m$ par $40\mu m$. Ce champ est large et bien que tout soit optimisé sur le montage il existe malgré tout une légère inclinaison de la lamelle.

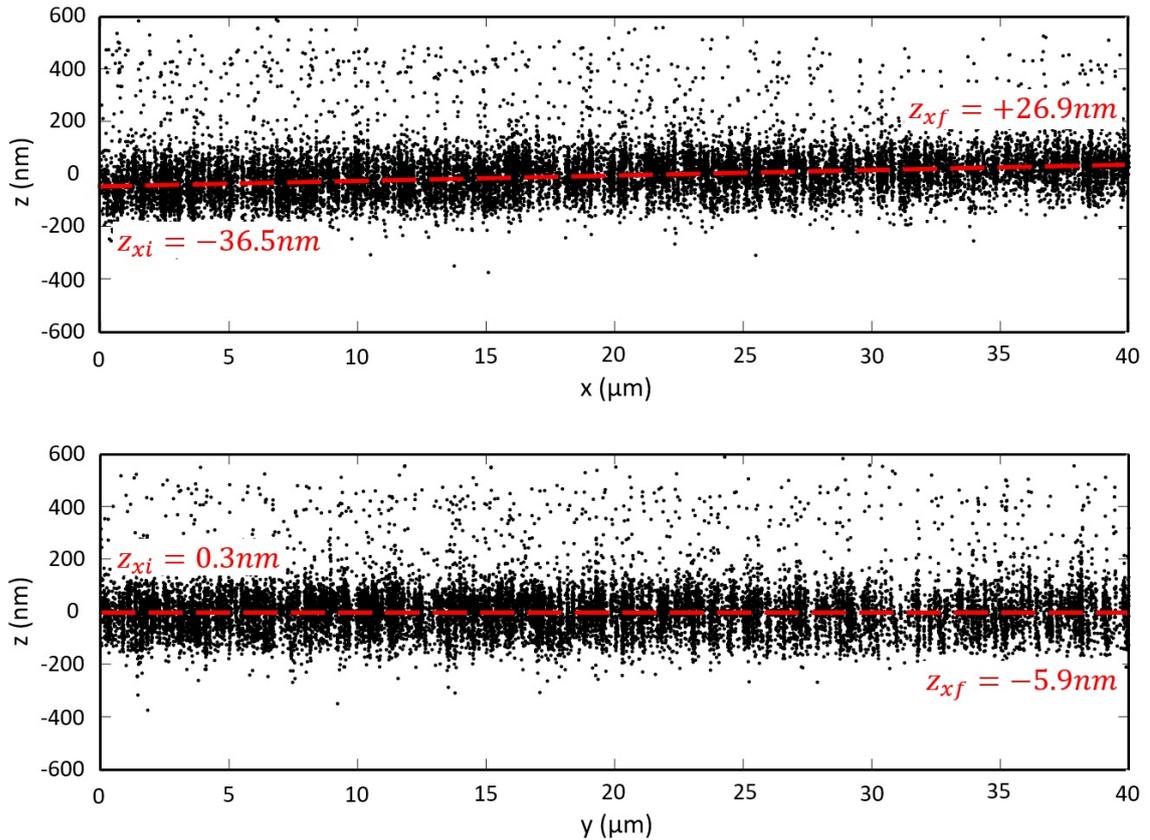


Figure 2.8 : Profils (xz) et (yz) de 30 000 molécules *mEos2* purifiées déposées sur une lamelle de microscope et imagées pendant quelques secondes

[66] Kanchanawong, *Nature*, 2010

Nous l'avons mis en évidence en imageant des molécules purifiées déposées sur une lamelle. La figure 2.8 est un exemple de profil que nous obtenons pour 30 000 molécules imagées pendant quelques secondes sur une lamelle. Le profil selon (yz) ne présente pas d'inclinaison. Par contre le profil (xz) présente une inclinaison dont la pente est de $1.5nm/\mu m$, ce qui correspond à une différence de $\Delta_z = 63.4nm$ entre les extrémités du champ. Un exemple de lamelle comme celle-ci peut expliquer que si la nanoparticule se trouve dans un coin et la cellule dans l'autre il y a une erreur sur la référence pour le calcul de $z = 0$.

Pour s'affranchir de ce problème, il faudrait avoir une méthode pour connaître la position exacte du substrat en tout point du champ. Cela constitue la suite de ce projet et n'a pas été étudié dans le cadre de ma thèse.

Malgré ce risque de biais pour la référence de la lamelle, nous avons montré que nous sommes capables de coupler la méthode SELFI avec la technique de super-résolution PALM. Cette combinaison, beaucoup moins coûteuse et complexe que le PALM interférométrique, permet de retrouver la hiérarchie des protéines dans une structure biologique complexe. De plus, la molécule fluorescente utilisée, mEos2, n'est pas une molécule très brillante : seulement $N_{phot} = 500$ photons en moyenne sont collectés par molécule. Ces résultats montrent que la technique SELFI est une méthode de localisation 3D robuste, qui permet d'obtenir une bonne résolution ($\sim 25nm$) même avec un faible nombre de photons détectés. Cette étude est la première étude de la hiérarchie des protéines des points d'adhésion en cellule vivante.

2.2 Super-résolution à haute densité de molécules

Nous avons montré que la technique SELFI permet de retrouver la localisation spatiale de molécules dans un échantillon biologique. Nous allons maintenant prouver que cette technique est capable de reconstituer une image super-résolue 3D d'un marquage dense. Pour cela nous allons coupler la technique SELFI avec la méthode de super-résolution dSTORM (*direct Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*) [51].

Cette combinaison SELFI-dSTORM va nous permettre de former des images de super-résolution 3D en surface de lamelle sur des échantillons fins puis en profondeur dans des échantillons épais et complexes.

[51] Bon & Linarès-Loyez, *Nature Methods*, 2018

Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction de ce chapitre, le dSTORM est une méthode de super résolution basée sur l'utilisation d'une solution tampon et d'une très forte puissance laser. Le montage optique que nous avons effectué pour le SELFI-dSTORM est le suivant [Fig 2.9] : l'excitation de la fluorescence se fait grâce à une diode laser à $\lambda_{ex.STORM} = 630nm$, en épifluorescence, pour une puissance en entrée de microscope de $P_{STORM} = 500mW$ (ce qui correspond à environ $10kW/cm^2$ sur l'échantillon). Le signal de fluorescence, collecté par l'objectif d'ouverture numérique $NA = 1.3$, diffracte sur le réseau de SELFI, puis interfère sur la caméra.

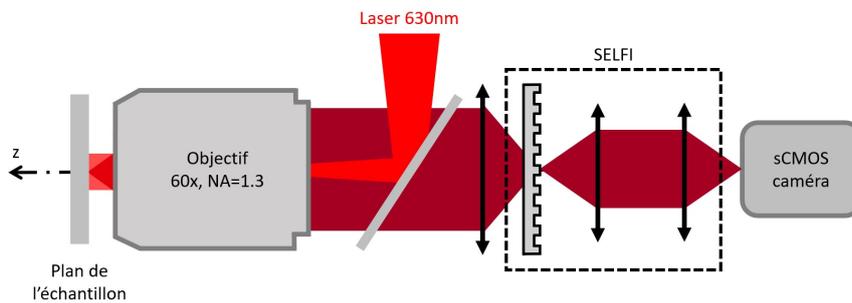


Figure 2.9 : Schéma du montage optique pour une acquisition de dSTORM

2.2.1 SELFI-dSTORM sur un échantillon biologique fin

Marquage de l'actine : réseau très dense dans la cellule

Dans un premier temps nous avons utilisé un échantillon fin composé de cellules fibroblastiques humaines (WI-38) adhérentes à la lamelle du microscope et que nous avons fixées. Un marquage de l'actine a été effectué avec la phalloïdine couplée à la molécule fluorescente Alexa 647 (A22287; Thermo Fisher). Le protocole de préparation de l'échantillon est détaillé dans l'Annexe D.2. Nous rappelons que l'actine fait partie du cytosquelette de la cellule, c'est une protéine qui forme des filaments fins qui structurent la cellule. L'actine forme un réseau très dense à l'intérieur de la cellule. La phalloïdine est une molécule qui vient s'intercaler entre deux molécules d'actine. Cela rend le marquage aussi dense que le réseau d'actine lui-même. Il est également très précis car la distance entre une molécule d'actine et une molécule fluorescente est réduite à quelques nanomètres. L'Alexa 647, quant à elle, est une molécule fluorescente très utilisée en super-résolution, notamment en dSTORM, car il est relativement simple sur des échantillons fixés de se placer en régime de molécule unique. Nous allons aussi voir que c'est une molécule fluorescente ayant une bonne brillance ($N_{phot} \approx 1000$ photons).

Résultats du SELFIE-dSTORM en surface de la lamelle sur un échantillon biologique fin

La figure 2.11 présente les résultats obtenus pour le SELFIE-dSTORM : l'image en 2.11(a) a été reconstruite à partir de 26.10^6 molécules détectées dans la profondeur de champ de l'objectif du microscope. On retrouve le réseau dense que forme l'actine dans la cellule. Les ramifications denses et fines en bord de membrane sont bien reconstruites. Grâce à la troisième dimension apportée par la technique SELFIE nous pouvons clairement distinguer deux cellules l'une au dessus de l'autre sur cette image.

L'obtention d'une telle image n'est possible qu'en corrigeant la dérive du microscope au cours du temps. En effet une acquisition de ce type dure plusieurs heures. Ce temps est nécessaire pour détecter chaque molécule du marquage : plus le marquage est dense, plus il y a de molécules à détecter et plus le temps d'acquisition est long. C'est grâce à la deuxième modalité du montage optique, décrit dans le chapitre précédent, que nous effectuons la correction de cette dérive.

La distribution du nombre de photons par molécule détectée est représenté en figure 2.10. La molécule Alexa647 émet en moyenne $N_{phot} = 1000$ photons.

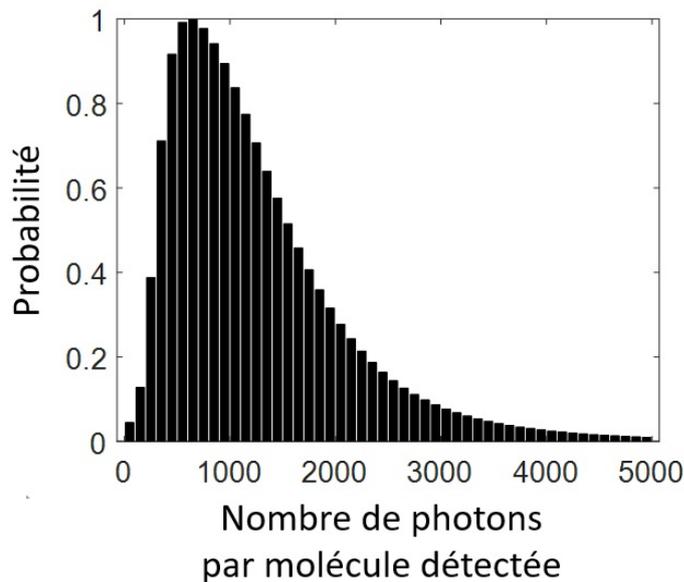


Figure 2.10 : Distribution du nombre de photons par molécule détectée pour une acquisition de SELFIE-dSTORM à la lamelle

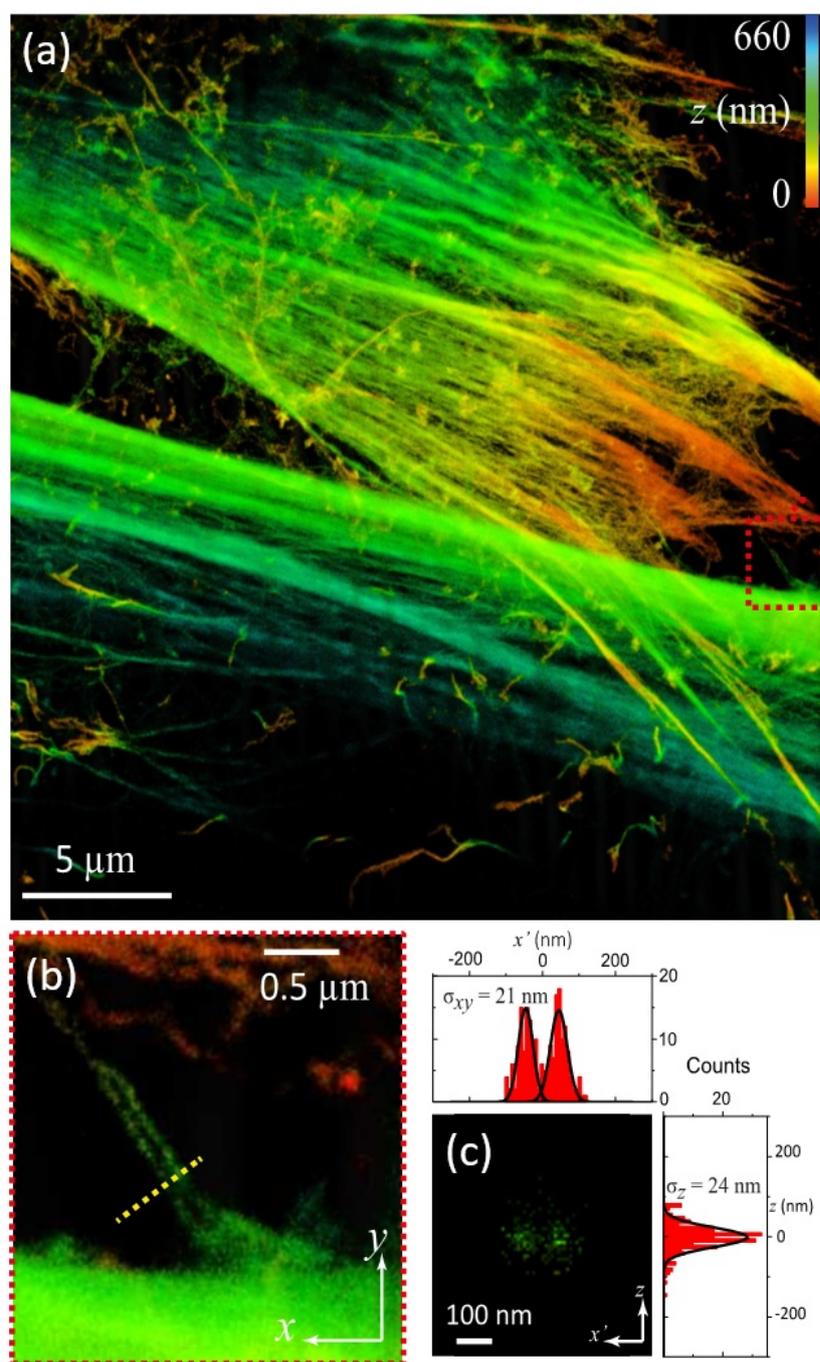


Figure 2.11 : Résultats du SELFI-dSTORM sur une cellule de fibroblaste humain. (a) image de super-résolution tridimensionnelle reconstruite, (b) zoom sur l'encadré rouge de (a) sur lequel sont présentes deux fines fibres d'actine bien distinctes, (c) coupe selon les axes (x , z) de la ligne indiquée en pointillés jaune sur (b) avec une projection des histogrammes des localisations selon x et z .

En figure 2.11(b), zoom d'une partie de l'image (a), on voit deux filaments d'actine très fins, bien distincts, qui nous ont servi pour déterminer la résolution de l'image obtenue. En effectuant un ajustement gaussien des distributions des localisations latérales et axiales [2.11(c)], on obtient :

$$\sigma_x^{fit} = 21nm, \quad \sigma_y^{fit} = 21nm \quad \text{et} \quad \sigma_z^{fit} = 24nm.$$

Nous avons aussi calculé la résolution de l'image en utilisant la technique des anneaux de Fourier (*Fourier Ring Correlation-FRC*) que nous avons expliquée dans le chapitre précédent, et nous obtenons une résolution similaire :

$$R_x^{FRC} = 40nm, \quad R_y^{FRC} = 40nm \quad \text{et} \quad R_z^{FRC} = 49nm.$$

Ces résultats confirment que l'image de super-résolution 3D des filaments d'actine obtenue grâce au SELFI-dSTORM est quasi-isotropique. La méthode SELFI est donc une méthode de super-résolution 3D permettant de faire l'image tridimensionnelle de structures très denses dans une cellule. Cette imagerie à haute densité de molécules n'est possible que parce qu'il n'y a pas d'étalement de la PSF avec la méthode SELFI : il y a un minimum de recouvrement entre différentes PSF obtenues sur la même image caméra.

2.2.2 SELFI-dSTORM dans un échantillon biologique épais, dense et homogène

Comme nous l'avons vu lors de la contextualisation de cette thèse, il est difficile en microscopie de molécules fluorescentes uniques de faire des images 3D au sein d'échantillons biologiques épais à plus de $20\mu m$ de profondeur. Cela est dû au fait que l'échantillon biologique est complexe, il absorbe et diffuse la lumière. Les photons émis par les molécules fluorescentes au sein de l'échantillon sont alors déviés, absorbés et subissent un déphasage dû aux aberrations présentes sur le chemin optique. Il est donc difficile d'exploiter le signal reçu sur le détecteur.

Cependant nous avons montré dans le chapitre précédent que nous sommes capables d'obtenir, avec la technique SELFI, une très bonne précision de localisation au sein d'un échantillon mimétique épais. En effet, à $z_{depth} = 40\mu m$ dans l'échantillon d'agarose, la précision reste inférieure à $30nm$.

Nous allons voir dans cette partie que cela reste vrai dans un échantillon de tissu biologique réel.

Organoïde : tissu biologique dense et complexe

L'échantillon utilisé ici est illustré en figure 2.12. C'est un sphéroïde cellulaire d'environ $150\mu m$ de diamètre. Cet organoïde constitue un modèle cellulaire 3D obtenu en cultivant des cellules dans une capsule d'alginate. L'encapsulation des cellules se fait grâce à un système de micro-fluidique permettant de contrôler la densité de cellules présentes dans chaque capsule et la taille de ces capsules [72]. Ces organoïdes sont de récents modèles très utilisés en biologie fondamentale, notamment pour la recherche en médecine régénérative [43] [73].

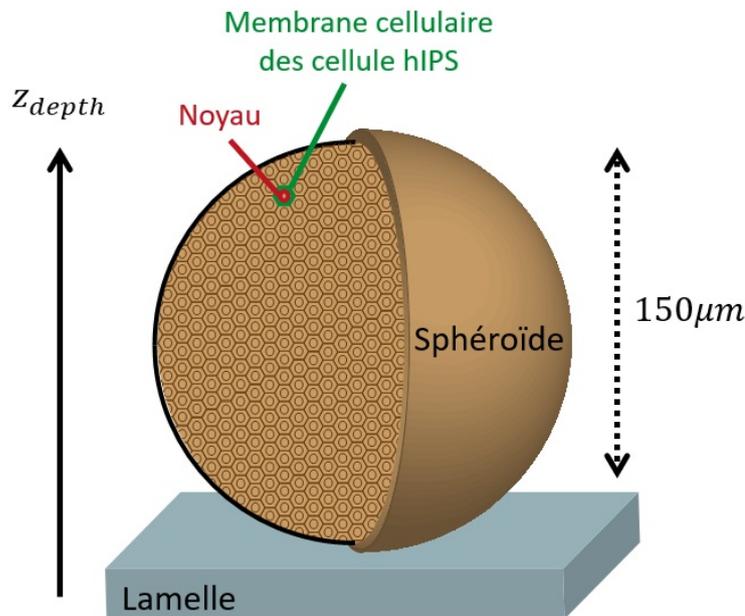


Figure 2.12 : Schéma d'un sphéroïde de cellules souches humaines pluripotentes

Nous avons utilisé ici des sphéroïdes, cultivés par le groupe de P.Nassoy au sein du LP2N (protocole en Annexe D.2), contenant des cellules souches humaines pluripotentes (*human Induced Pluripotent Stem cells - hIPS*)[51]. Les cellules sont encapsulées à une faible densité au départ, ce qui leur permet de croître et de se développer jusqu'à atteindre la confluence. A ce stade de développement le plus avancé, les cellules sont distribuées de manière dense et homogène à l'intérieur du sphéroïde.

[72] Alessandri, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013

[43] Clevers, *Cell*, 2016

[73] McCauley, *Development*, 2017

[51] Bon & Linarès-Loyez, *Nature Methods*, 2018

Nous avons utilisé la technique SELFI-dSTORM sur ces échantillons tissulaires en utilisant le même marquage, la même solution tampon et le même montage optique que précédemment. Pour les acquisitions de SELFI-dSTORM les sphéroïdes ont été fixés (protocole en Annexe D.2).

Résultats du SELFI-dSTORM à haute densité de marquage en profondeur dans un organoïde

Nous présentons ici les résultats du SELFI-dSTORM pour deux profondeurs différentes $z_{depth} = 25\mu m$ et $z_{depth} = 50\mu m$ à l'intérieur des sphéroïdes cellulaires. A chaque profondeur nous avons réglé la bague de l'objectif pour réduire au maximum les aberrations sphériques présentes dans l'échantillon afin de maximiser la brillance des molécules. La distribution du nombre de photons par molécules détectées à ces deux profondeurs est représentée en figure 2.13. On observe une diminution du nombre de photons à $z_{depth} = 50\mu m$ due à la diffusion et à l'absorption de la lumière au sein de l'échantillon.

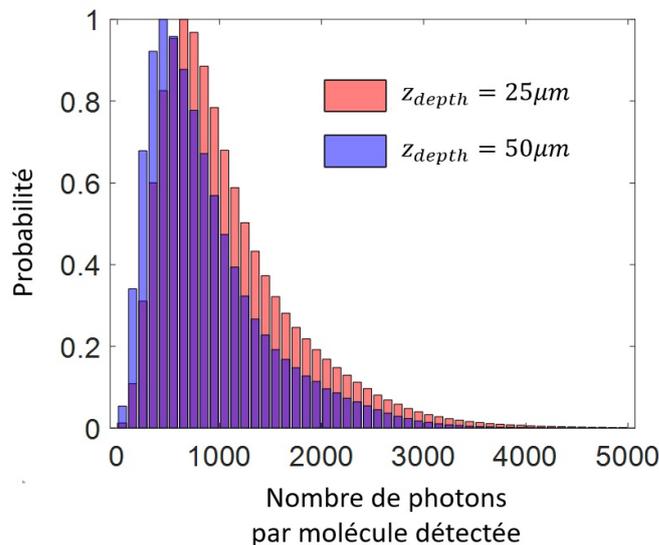


Figure 2.13 : Distribution du nombre de photons par molécule détectée pour une acquisition de SELFI-dSTORM à deux profondeurs dans le sphéroïde

A $50\mu m$ de profondeur dans l'échantillon, le fond de fluorescence devient bien plus fort qu'en surface étant donné l'illumination en épifluorescence champ large. La détectabilité des molécules s'en ressent. Il serait pertinent d'utiliser ici un éclairage adapté à l'imagerie profonde, comme par exemple la sélection d'un plan d'imagerie (*Single Plane Illumination Microscopy - SPIM*) [74]. Ce point est très important pour un développement futur du montage SELFI en tissulaire.

Cependant, le rapport signal à bruit des molécules uniques détectées par la caméra est suffisant pour reconstituer des images super-résolues 3D [Fig 2.14(a) et 2.15(a)]. Ces images révèlent la structure des filaments d'actine dans un échantillon 3D : ils sont denses et proches de la membrane plasmique. Malgré la complexité de l'échantillon tissulaire nous sommes capables de reconstituer le réseau dense et fin de l'actine. Cela est bien visible sur l'image 2.14(b) où l'on voit une belle périodicité de fibres d'actine.

Les résultats du calcul de la résolution de ces images sont quasi isotropiques à $z_{depth} = 25\mu m$ comme à $z_{depth} = 56\mu m$. Les résolutions données par la corrélation des anneaux de Fourier sont :

$$R_x^{25\mu m} = 61nm, \quad R_y^{25\mu m} = 61nm \quad \text{et} \quad R_z^{25\mu m} = 66nm,$$

$$R_x^{56\mu m} = 103nm, \quad R_y^{56\mu m} = 103nm \quad \text{et} \quad R_z^{56\mu m} = 117nm.$$

Comme attendu, plus on pénètre dans l'échantillon, moins la résolution est bonne. La diffusion de la lumière dans le tissu réduit le nombre de photons balistiques atteignant la caméra et augmente le bruit de fond comme vu sur l'histogramme de la figure 2.13.

Ces images montrent que la combinaison SELFI-dSTORM permet de faire des images de super-résolution 3D à haute densité de marquage en profondeur dans des échantillons biologiques denses et complexes. Cela est possible car la technique SELFI est une méthode de localisation tridimensionnelle qui ne génère aucun étalement de la PSF. De plus, comme vu au chapitre 1 la technique SELFI est faiblement sensible aux aberrations, donc à partir du moment où une partie des photons balistiques émis par une molécule atteignent le réseau de diffraction, un interférogramme peut être obtenu sur la caméra et la molécule ainsi localisée.

[74] Huisken, *Science*, 2004

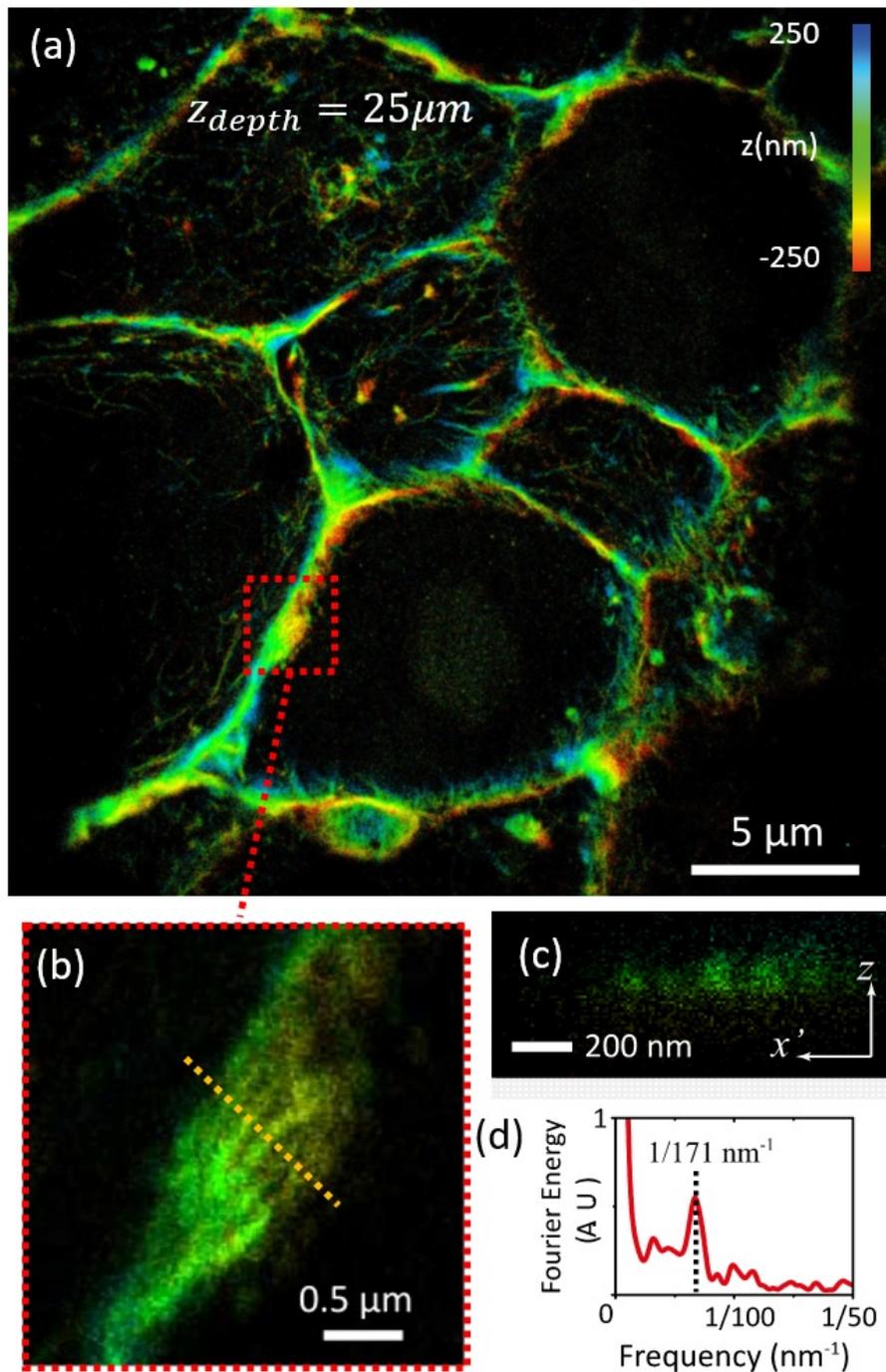


Figure 2.14 : Résultat du SELFIE-dSTORM à $z_{depth} = 25 \mu\text{m}$ dans l'organoïde : (a) image de super-résolution tridimensionnelle des filaments d'actine, avec $1.6 \cdot 10^6$ molécules détectées, (b) zoom sur l'encadré rouge de (a) où les fibres d'actine présentent une périodicité, (c) coupe selon les axes (x, z) de la ligne indiquée en pointillés jaunes sur (b), (d) transformée de Fourier de (c) où l'on voit clairement une périodicité de 171 nm

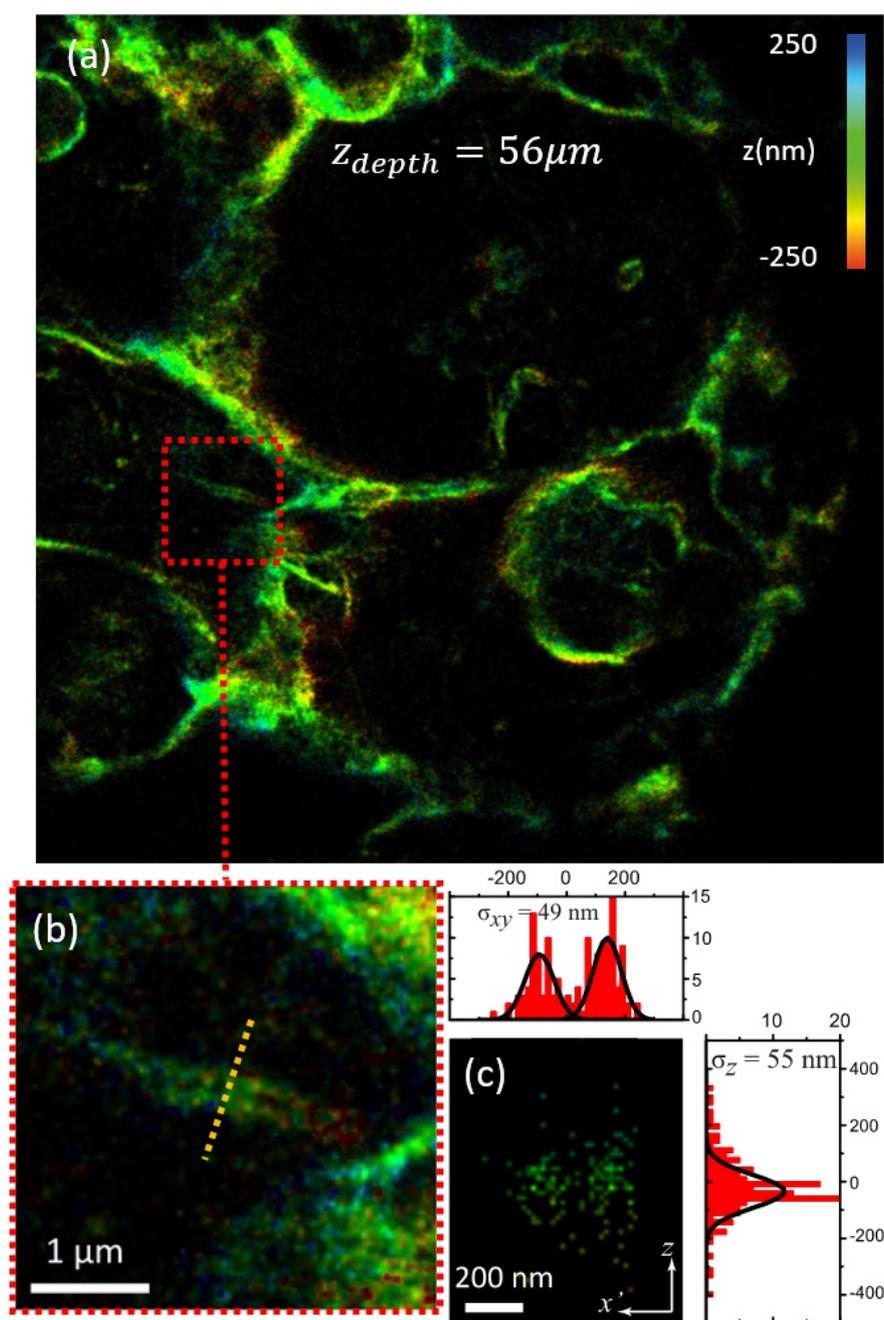


Figure 2.15 : Résultat du SELFI-dSTORM à $z_{depth} = 50 \mu m$ dans l'organoïde : (a) image de super-résolution tridimensionnelle des filaments d'actine, avec $1.6 \cdot 10^6$ molécules détectées, (b) zoom sur l'encadré rouge de (a) montrant deux fibres d'actine parallèles, (c) coupe selon les axes (x, z) de la ligne indiquée en pointillés jaunes sur (b) avec une projection des histogrammes des localisations selon x et z

2.2.3 Imagerie de super-résolution 3D d'un marquage endogène moins dense dans un échantillon biologique épais

Nous venons de prouver que grâce à la technique SELFIE nous pouvons reconstruire des images super-résolues 3D de structures denses dans des échantillons biologiques épais et denses. Nous allons finir cette partie en montrant qu'une imagerie de super-résolution 3D moléculaire moins dense peut aussi être faite.

Marquage d'une protéine endogène dans un organoïde

Nous avons considéré ici un sphéroïde de cellules souches humaines formant des structures acineuses. Comme représentées en figure 2.16, ces structures sont des cavités entourées de cellules. Au stade de développement auquel nous utilisons les sphéroïdes, ces cavités sont les prémices des futures structures acineuses que l'on retrouve dans différents organes notamment dans les glandes. Les organoïdes présentant cette structure sont très inhomogènes et présentent donc beaucoup d'aberrations. Nous avons effectué un immunomarquage (à base d'anti-corps primaires et secondaires) pour cibler la protéine OCT4 qui est un facteur de transcription présent dans le noyaux des cellules souches humaines pluripotentes.

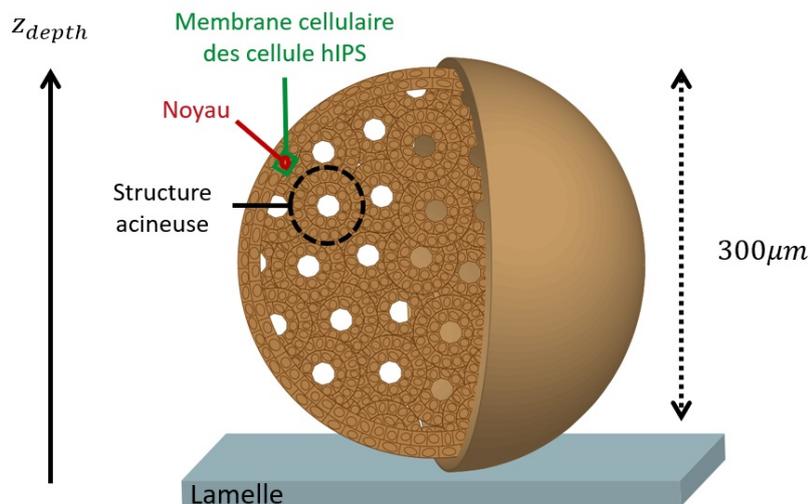


Figure 2.16 : Schéma d'un sphéroïde de cellules souches humaines pluripotentes présentant des structures acineuses

Résultats du SELFI-dSTORM dans un organoïde inhomogène pour une protéine endogène

Nous avons effectué du SELFI-dSTORM sur ces échantillons. Étant donné que le marquage n'est pas très dense, une acquisition de 30 minutes est suffisante pour reconstruire une image de super-résolution 3D de la zone étudiée. Nous présentons en figure 2.17 le résultat obtenu pour une acquisition à $z_{depth} = 25\mu m$ au sein d'un organoïde. L'image super-résolue 3D est composée de 7000 détections ayant au moins $N_{phot} = 1500$ photons chacune. Il est clair sur cette image que la protéine OCT4 est présente dans les noyaux des cellules, et complètement absente en dehors. La résolution selon les trois dimensions calculées par la corrélation des anneaux de Fourier est :

$$R_x^{FRC} = 68 \pm 20nm, \quad R_y^{FRC} = 68 \pm 20nm \quad \text{et} \quad R_z^{FRC} = 115 \pm 32nm.$$

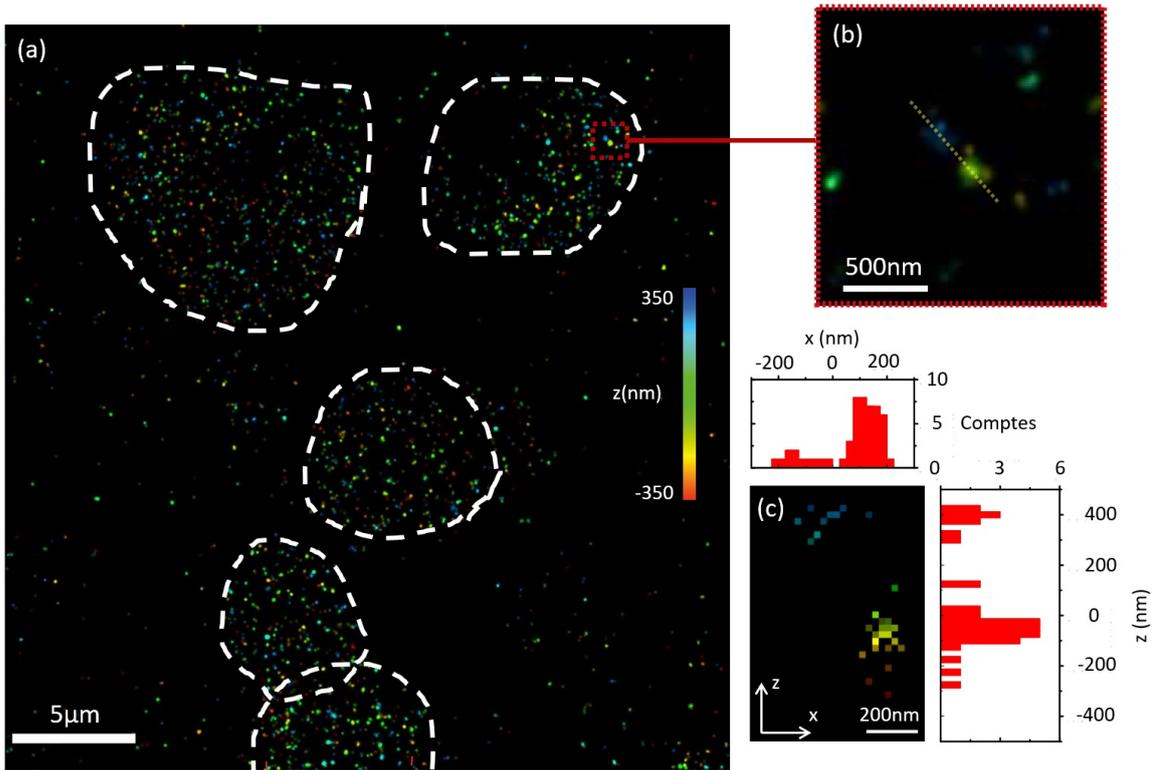


Figure 2.17 : Résultat du SELFI-dSTORM à $z_{depth} = 25\mu m$ dans l'organoïde pour le marquage d'une protéine endogène OCT4 : (a) image de super-résolution tridimensionnelle avec 7000 molécules détectées, (b) zoom sur l'encadré rouge de (a), (c) coupe selon les axes (x, z) de la ligne indiquée en pointillés jaunes sur (b) avec une projection des histogrammes des localisations selon x et z

Il est important de noter que nous atteignons ici les limites de l'approche par corrélation des anneaux de Fourier. En effet, les molécules détectées sont intrinsèquement peu nombreuses et assez espacées ce qui n'est pas l'hypothèse de travail pour le calcul de la résolution par cette méthode.

2.3 Application à la détection de récepteurs neuro- naux

Nous avons montré que la méthode SELFI est une méthode de localisation 3D pouvant être couplée à différentes méthodes d'illumination de l'échantillon pour générer des images de super-résolution en trois dimensions. SELFI permet d'obtenir une très bonne résolution malgré un faible nombre de photons. Il est possible de faire des images de super-résolution 3D à haute densité de marquage, aussi bien sur un échantillon fin à la lamelle qu'en profondeur dans un tissu biologique épais et complexe.

Cependant, jusqu'à présent les échantillons biologiques étaient utilisés pour des raisons métrologiques : nous n'avons pas soulevé de question biologique sur ces échantillons. Dans cette partie nous montrons un exemple d'application directe de la méthode SELFI. Nous avons travaillé avec le groupe de L.Groc à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (*IINS, Bordeaux*) dont la recherche porte sur les mécanismes moléculaires ayant lieu dans les synapses glutamatergiques. Dans la suite de cette partie nous allons décrire l'étude faite sur des neurones en culture et dans des tranches de cerveau.

2.3.1 SELFI-dSTORM sur des neurones en culture

Problématique

Le cerveau fonctionne par la transmission de signaux entre les neurones. La compréhension de ces signaux est une étape primordiale dans la compréhension du fonctionnement du cerveau. Nous nous intéressons ici à la communication neuronale, particulièrement à la réception des neurotransmetteurs par les récepteurs synaptiques. Ces derniers ont un rôle clef dans le fonctionnement du cerveau. Dans la recherche sur les maladies neurodégénératives, il est crucial de comprendre comment ces récepteurs sont organisés et quelle est leur dynamique [75].

[75] Paoletti, *Nature Reviews Neuroscience*, 2013

Le glutamate est le principal neurotransmetteur du système exciteur dans notre système nerveux [75]. Il existe plusieurs types de récepteurs au glutamate qui régulent son action. Dans cette thèse nous avons seulement étudié les récepteurs NMDA (*N-methyl-D-asparate*) qui ont un rôle central dans la plasticité du cerveau et dans la formation de la mémoire. Ces récepteurs NMDA sont des protéines tétramériques composées de quatre sous-unités dont deux sont toujours le GluN1, comme illustré en figure 2.18. Il existe six autres formes de sous-unité, codées par différents gènes, mais nous ne parlerons ici que des sous-unités GluN2A et GluN2B. On trouve ces variations des récepteurs NMDA principalement dans l'hippocampe, siège de la mémoire.

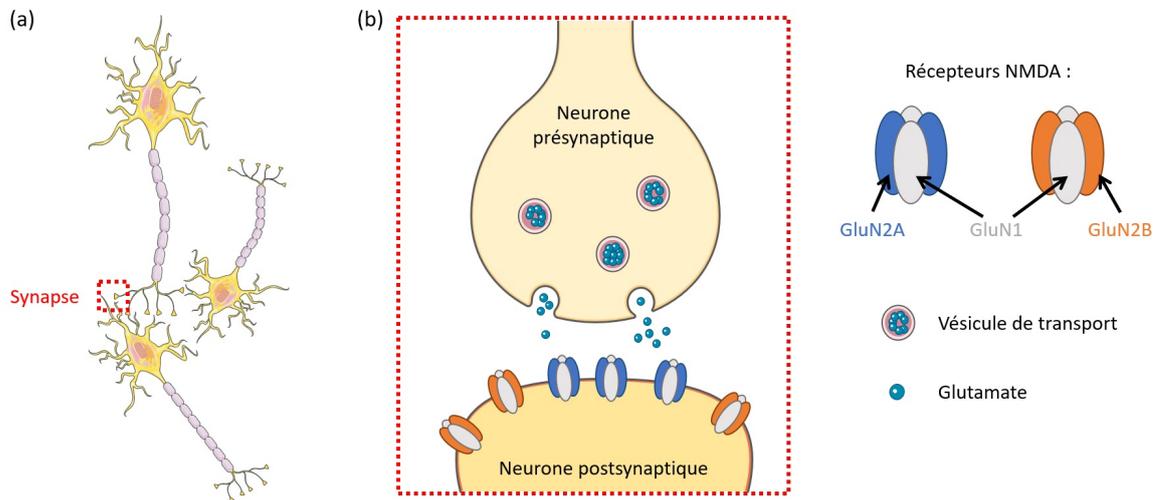


Figure 2.18 : (a) Schéma de plusieurs neurones communiquant entre eux via des synapses ; (b) zoom sur une synapse : les vésicules du neurone présynaptique apportent le glutamate qui est déversé dans la synapse, puis les récepteurs NMDA du neurone postsynaptique doivent s'organiser pour recevoir le signal.

Il y a une dizaine d'années, grâce à la microscopie électronique, il a été montré que les récepteurs postsynaptiques NMDA-GluN2A et NMDA-GluN2B ont des mécanismes bien distincts [76]. Cependant, leur organisation à l'échelle nanométrique n'a, jusqu'à présent, pas été mise en évidence. Grâce à la combinaison SELFI-dSTORM [Fig.2.9], nous avons étudié cette organisation spatiale sur des cultures primaires de neurones fixés à la lamelle [77].

[76] Park, *Neuroscience*, 2008

[77] Kellermayer & Linarès-Loyez, *Neuron*, 2018

Culture primaire de neurones et immunomarquage

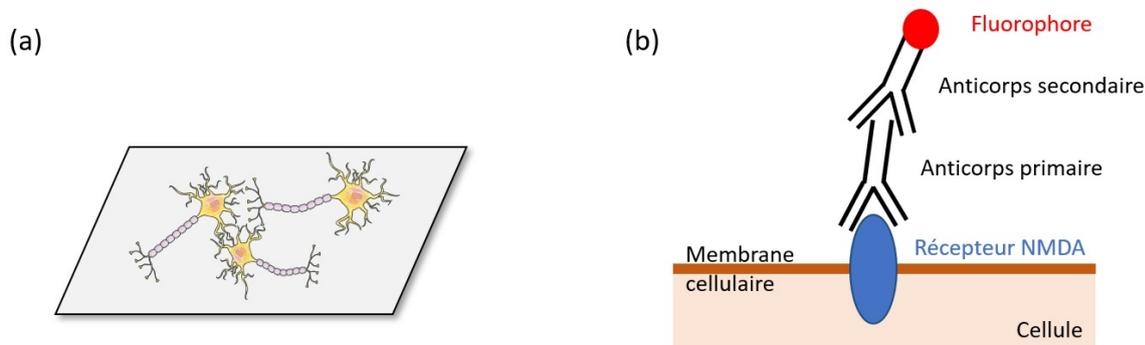


Figure 2.19 : (a) schéma des neurones en culture primaire sur une lamelle de microscope, (b) schéma de l'immunomarquage fait avec deux anticorps.

L'échantillon étudié dans cette partie est constitué de neurones en culture primaire déposés sur une lamelle [Fig.2.19(a)]. Cette culture a été préparée par l'équipe de L.Groc : l'hippocampe d'un embryon de rat de 18 jours a été disséqué, puis les neurones extraits ont été déposés sur des lamelles de microscope. Ces lamelles ont été préalablement recouvertes d'un polymère, la *Poly-L-lysine* (PLL) à 1mg/mL , qui forme un substrat souple sur lequel les neurones ont plus de facilité à croître.

Le marquage des récepteurs étudiés a été fait par immunomarquage [Fig.2.19(b)] : les neurones vivants en culture ont été incubés avec un anticorps primaire ciblant les récepteurs, puis les neurones ont été fixés, et enfin un deuxième anticorps a été incubé pour cibler l'anticorps primaire et le marquer avec une protéine fluorescente (Alexa 647). Les protocoles complets sont décrits en Annexe D.5.

Images de super-résolution 3D des neurones en culture

Les images de super-résolution tridimensionnelles obtenues avec la technique SELFISTORM sont présentées en figure 2.20. Ces images ont été obtenues à partir de 70 000 molécules détectées, dont la distribution du nombre de photons est donnée en figure 2.21. Les images d'épifluorescence, limitées par la diffraction, montrent que les récepteurs NMDA sont organisés en petits groupes tout le long des dendrites. Les images de super-résolution, quant à elles, révèlent que ces groupes sont en fait constitués de sous-groupes de récepteurs. Nous appellerons ces sous-groupes des *nano-domaines*, déjà observés par l'équipe de L.Groc.

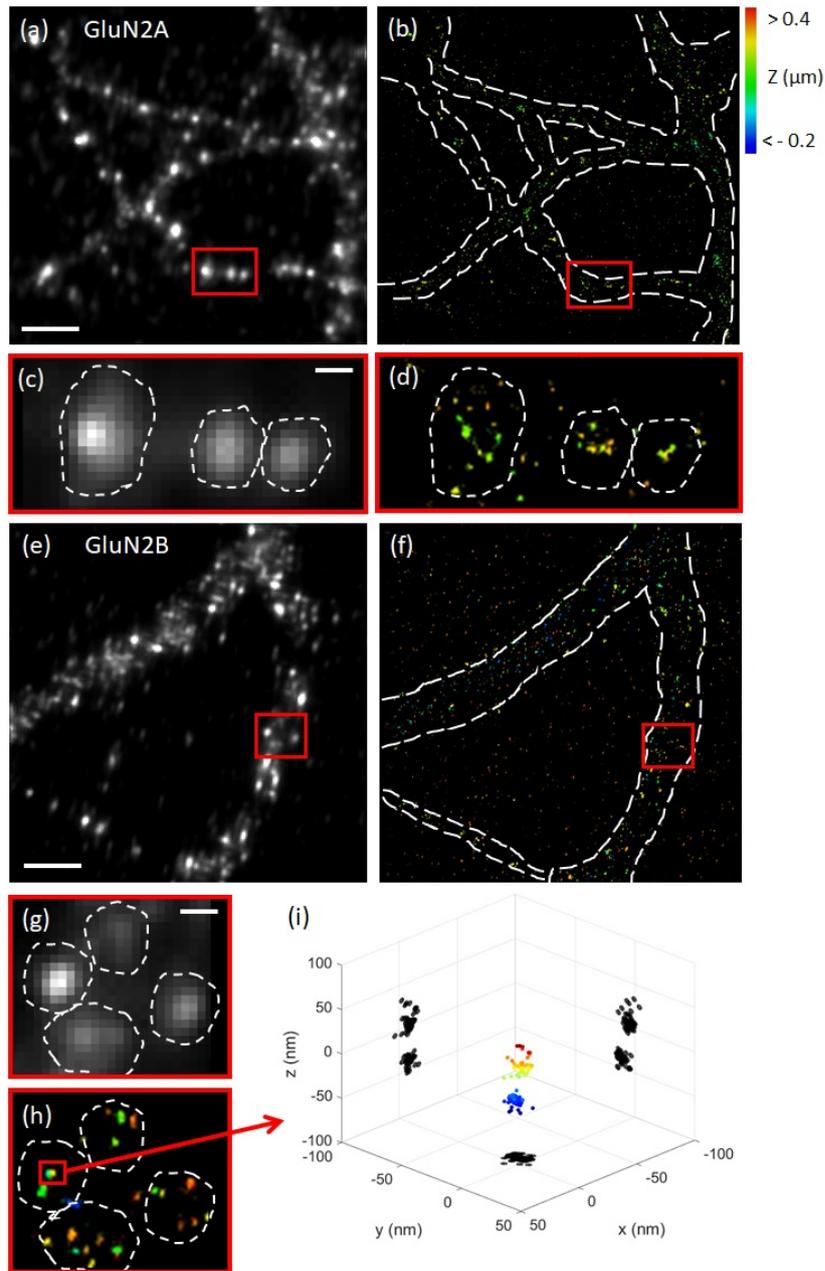


Figure 2.20 : Résultats du SELF-dSTORM sur des neurones en culture : (a) image d'épifluorescence du marquage des récepteurs *GluN2A*, barre d'échelle = $5\mu\text{m}$; (b) image de super-résolution 3D de la répartition spatiale du récepteur NMDA-*GluN2A* ; (c) et (d) zooms respectifs sur les images d'épifluorescence et de super-résolution 3D, barre d'échelle = $1\mu\text{m}$; (e) image d'épifluorescence du marquage de récepteur *GluN2B*, barre d'échelle = $5\mu\text{m}$; (f) image de super-résolution 3D de la répartition spatiale du récepteur NMDA-*GluN2B* ; (g) et (h) zooms respectifs sur les images d'épifluorescence et de super-résolution 3D, barre d'échelle = $1\mu\text{m}$; (i) visualisation tridimensionnelle du zoom sur un groupe de détections, en noir sont les projections selon les différents axes.

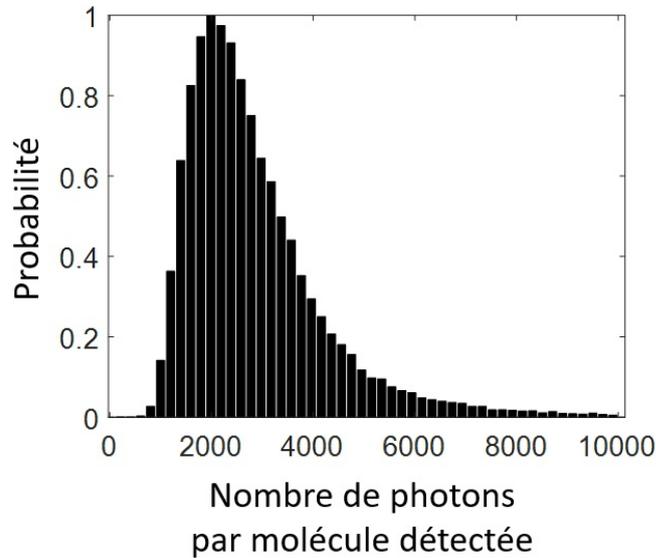


Figure 2.21 : Distribution du nombre de photons par molécule détectée pour les acquisitions de SELFI-dSTORM sur des neurones en culture primaire

Si en regardant les images d'épifluorescence on ne peut déduire aucune différence structurelle entre les récepteurs GluN2A et GluN2B, cela n'est pas le cas sur les images de super-résolution. En effet, les nano-domaines au sein d'un même groupe sont plus nombreux pour les récepteurs GluN2A que GluN2B. Nous discuterons plus tard de la quantification de cette observation. Il est important de noter ici que la super-localisation en trois dimensions est nécessaire pour la quantification des nano-domaines. C'est ce que met en évidence la figure 2.20(i) : la projection selon les axes x et y ne présente qu'un seul nano-domaine tandis que la troisième dimension en révèle un deuxième positionné juste au-dessus.

2.3.2 SELFI-dSTORM dans des tranches de cerveau

Précédemment, nous avons prouvé que SELFI est une technique de localisation tridimensionnelle capable de localiser des molécules uniques en profondeur dans des échantillons épais et complexes. Nous allons maintenant utiliser cette propriété de la technique SELFI pour faire l'étude dont nous venons de parler au sein de tranches de cerveau épaisses d'une centaine de microns.

Tranche organotypique

Les tranches de cerveau étudiées dans cette partie sont ce qu'on appelle des *tranches organotypiques*. Ces tranches, épaisses d'environ $350\mu m$, sont issues de l'hippocampe de jeunes rats âgés de 5 à 7 jours. Une fois découpées, ces tranches sont placées dans un milieu de culture, à $37^{\circ}C$ dans l'incubateur, pour être cultivées pendant une quinzaine de jours. Le protocole de culture est décrit en Annexe D.4. Ces tranches organotypiques sont plus aisées à manipuler que des tranches de cerveau "fraîches" (dites *aiguës*), notamment lors des marquages fluorescents. En effet, le fait d'être remises en culture les rend plus souples : les cellules ont la place de s'étendre et l'espace extra-cellulaire se dilate. Ces tranches organotypiques sont depuis longtemps un outil largement utilisé en neurosciences [78] pour étudier le réseau neuronal.

Pour effectuer une étude qui s'approche le plus de l'*in vivo*, nous avons aussi utilisé des tranches de cerveau aiguës. Cependant je ne détaille pas les résultats obtenus avec ces tranches dans ce manuscrit car leur analyse est encore en cours. Les résultats préliminaires ont montré que l'on retrouve statistiquement les mêmes conclusions que dans une tranche organotypique.

Le même marquage des récepteurs GluN2A et GluN2B, décrit précédemment, a été effectué sur ces tranches. Le marquage du récepteur GluN1 a aussi été fait. Comme l'échantillon est plus épais, les temps d'incubation et de rinçage sont plus longs. Pour valider les protocoles de marquage, nous avons effectué des contrôles. Dans les mêmes conditions nous avons fait les acquisitions dans des tranches organotypiques pour des conditions différentes : (i) avec seulement l'étape d'incubation de l'anticorps primaire, (ii) avec seulement l'étape d'incubation de l'anticorps secondaire, (iii) avec le marquage complet du récepteur GluN1, (iv) avec le marquage complet du récepteur GluN2A et (v) avec le marquage complet du récepteur GluN2B. Nous avons ensuite compté le nombre de molécules détectées dans chacune de ces conditions. Les résultats de ces contrôles sont présentés en figure 2.22. Les contrôles négatifs sur les anticorps seuls, avec moins de 10 000 molécules détectées, prouvent le bon fonctionnement des marquages : l'anticorps primaire sans le secondaire s'accroche à la protéine étudiée mais n'émet pas de signal fluorescent et l'anticorps secondaire sans anticorps primaire ne peut s'accrocher à l'échantillon et n'est plus présent après les rinçages. On remarque aussi que le récepteur GluN1, qui est la sous-unité la plus présente des récepteurs NMDA, est bien le récepteur ayant le plus de détections.

[78] Stoppini, *Journal of Neuroscience Methods*, 1991

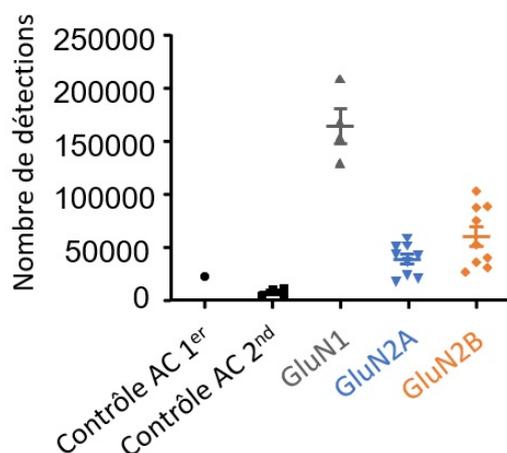


Figure 2.22 : Nombre de molécules détectées pour chaque condition de contrôle

Images de super-résolution 3D dans les tranches organotypiques

La figure 2.24 présente les résultats obtenus pour le marquage du récepteur GluN2A à $z_{depth} = 20\mu m$ au sein d'une tranche de cerveau. L'image super-résolue 3D a été obtenue à partir de 100 000 molécules détectées, dont la distribution du nombre de photons est donnée en figure 2.23.

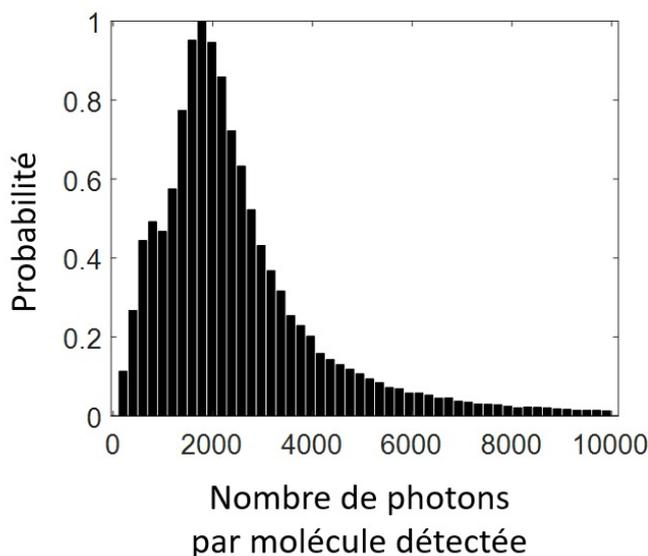


Figure 2.23 : Distribution du nombre de photons par molécule détectée pour les acquisitions de SELFI-dSTORM à $z_{depth} = 20\mu m$ dans une tranche organotypique

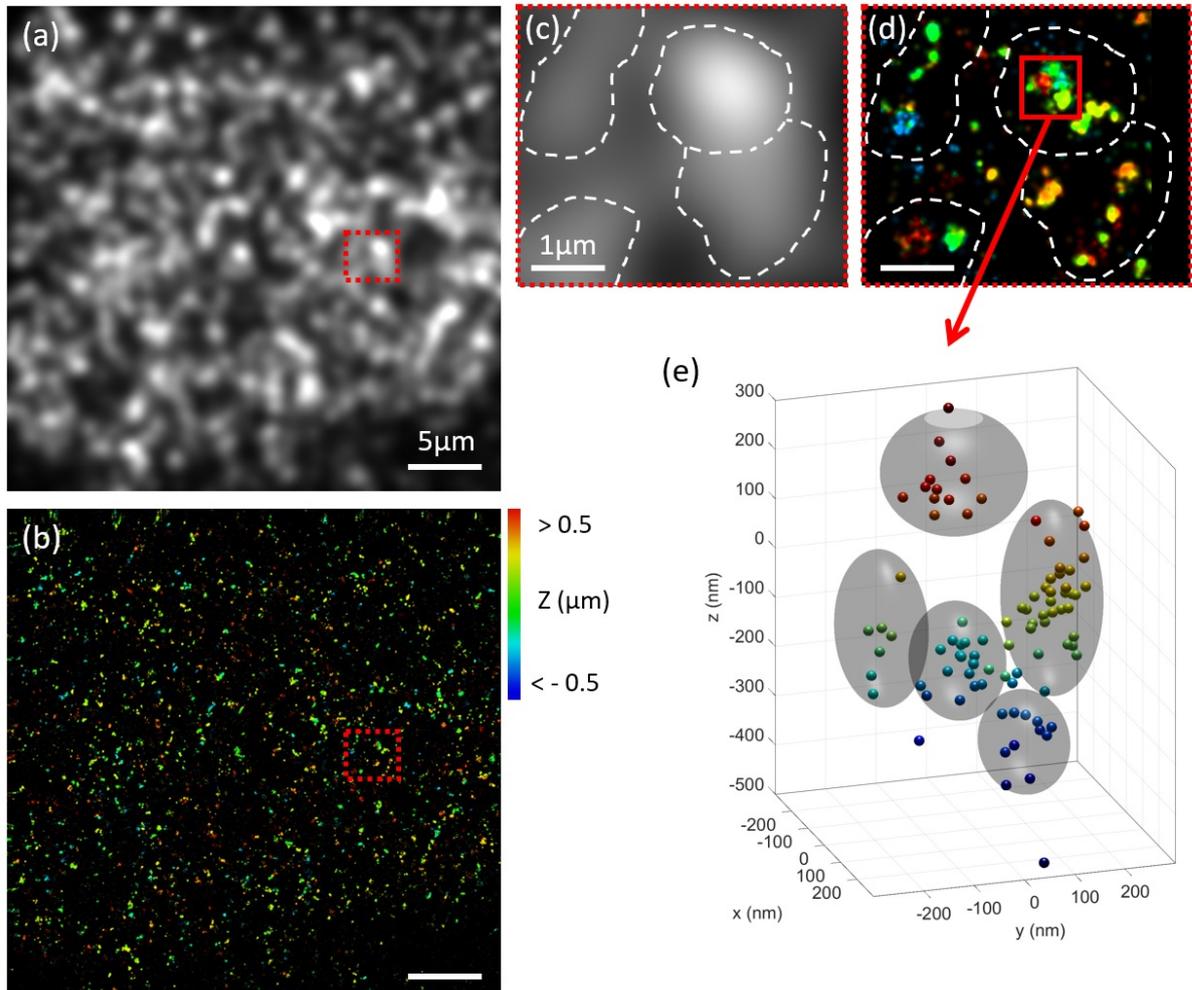


Figure 2.24 : Résultats du SELFI-dSTORM pour le marquage du récepteur *GluN2A* dans une tranche de cerveau à $z_{depth} = 20\mu\text{m}$: (a) image d'épifluorescence, comme il n'est pas possible de faire cette image à cause d'une trop forte autofluorescence de l'échantillon, l'image a été calculée à partir de l'image de super-résolution obtenue ; (b) image de super-résolution 3D ; (c) zoom sur l'encadré dans (a) ; (d) zoom sur l'encadré dans (b) qui révèle les nano-domaines présents dans les groupes repérés dans la zone (c) ; (e) visualisation 3D des nano-domaines avec une visualisation de leur segmentation.

Étant donné que l'excitation est faite en champ large, aucune image exploitable d'épifluorescence ne peut être obtenue en tissulaire. Il est cependant possible d'obtenir une image d'épifluorescence en convoluant l'image de super-résolution par la PSF du système. Cette image limitée par la diffraction [Fig2.24(a)] montre que, de même que dans les neurones en culture, les récepteurs sont organisés en groupes. L'image de super-résolution 3D [Fig2.24(b)] révèle les nano-domaines présents dans chacun des groupes visibles sur l'image d'épifluorescence. On remarque que le marquage est beaucoup plus dense que sur les neurones en culture : comme les neurones sont beaucoup plus denses dans le tissu, les synapses sont plus nombreuses dans la fenêtre d'observation. Les zooms en figure 2.24(c)

et (d) manifestent que les récepteurs GluN2A sont organisés en nano-domaines tridimensionnels, comme nous l'avons vu pour les neurones en culture. La figure 2.24(e) représente la visualisation 3D d'un groupe de nano-domaines. Pour ce groupe, la projection selon les axes x et y ne nous permet pas de faire une quantification précise. Il est cependant clair, grâce aux données axiales, qu'il y a 5 nano-domaines dans ce groupe.

2.3.3 Quantification de l'organisation des récepteurs NMDA grâce à la localisation 3D

Comme nous nous intéressons à l'organisation spatiale des récepteurs NMDA, nous avons quantifié les nano-domaines observés dans chaque groupe de récepteurs. La quantification des nano-domaines présents par groupe de récepteurs a été faite grâce à l'utilisation d'un logiciel fait-maison.

Segmentation des nano-domaines

L'étude des localisations de molécules s'apparente à une étude pointilliste. Pour pouvoir déterminer des groupes de localisations nous devons donc introduire différents paramètres comme le nombre de localisations acceptées dans un groupe et le nombre minimum de proches voisins pour chaque localisation dans ce groupe.

La première étape est de trouver les points de l'espace ayant le plus de proches voisins, cela revient à trouver le barycentre de chaque groupe de localisations recherchés, pour démarrer la propagation. Puis on étend les groupes localisation par localisation en tenant compte des paramètres d'entrée.

C'est une simple explication de l'algorithme du logiciel permettant la quantification des nano-domaines par groupe de récepteurs. C'est en fait une généralisation tridimensionnelle, dans un espace pointilliste, de segmentation par ligne de partage des eaux.

Validation du logiciel sur les résultats des neurones en culture

Nous avons, dans un premier temps, validé le comptage de nano-domaines effectué par le logiciel fait-maison en comparant à un comptage manuel sur une centaine de groupes de récepteurs. Cette comparaison a été faite en utilisant les résultats des localisations 3D obtenus sur les neurones en culture pour les récepteurs GluN2A et GluN2B. Le graphe 2.25 présente les résultats de cette comparaison. Ayant une différence de nombre de nano-domaines par groupe inférieure à 10% nous pouvons valider la segmentation effectuée par le logiciel.

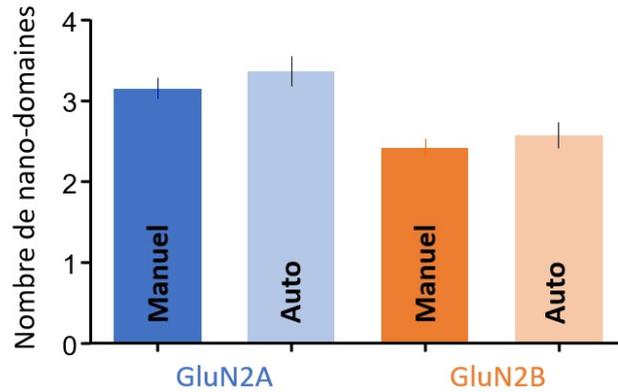


Figure 2.25 : Nombre de nano-domaines par groupe de récepteurs comptés manuellement et automatiquement en 3D pour chaque condition

Nous avons ensuite comparé le nombre de nano-domaines par groupe en utilisant la projection bidimensionnelle et leur nombre obtenu en tenant compte des trois dimensions. Le graphe de la figure 2.26(a) présente les comptes obtenus. Les résultats prennent en compte 165 groupes de récepteurs répartis sur 7 échantillons différents pour chaque condition. On néglige de 15% le nombre de nano-domaines pour le récepteur GluN2A et de 10% pour le récepteur GluN2B avec une étude 2D.

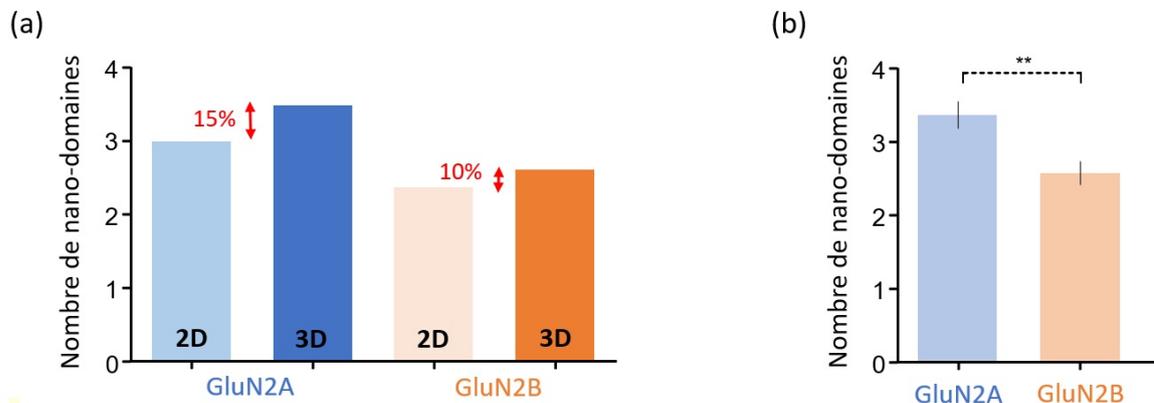


Figure 2.26 : (a) Graphe du comptage des nano-domaines en 2D versus en 3D pour chaque condition, (b) graphe comparant le nombre de nano-domaines pour chaque condition. $N = 165$ pour chaque condition. Les étoiles représentent le résultats du test de Kruskal-Wallis.

Nous avons donc tenu compte de la troisième dimension, obtenue grâce à la technique SELFIE, pour comparer l'organisation des récepteurs GluN2A et GluN2B. Le graphe de la figure 2.26(b) présente cette comparaison. Pour un même groupe de récepteurs la segmentation 3D permet de séparer chaque nano-domaine. Le test de Kruskal-Wallis, test statistique basé sur les médianes de deux distributions indépendantes, nous permet

de conclure que les organisations à l'échelle nanométrique des récepteurs GluN2A et GluN2B sont significativement différentes.

Résultats de la segmentation des nano-domaines dans les tranches organotypiques

Cette même segmentation a été effectuée pour les récepteurs GluN2B et GluN1, à une profondeur de $z_{depth} = 20\mu m$ dans les tranches de cerveau. Neuf tranches ont été imagées pour chacune des conditions.

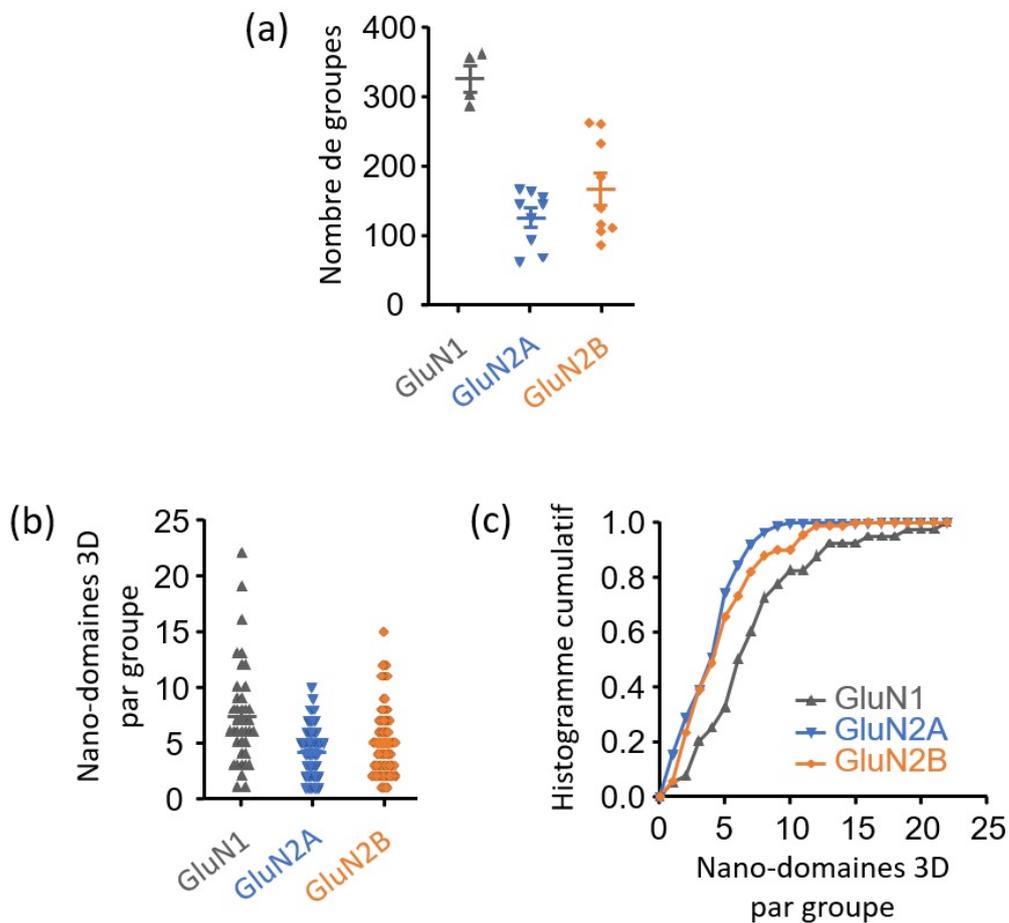


Figure 2.27 : Graphiques présentant les résultats de la segmentation à $z_{depth} = 20\mu m$ dans les tranches de cerveau : (a) nombre de groupes comptés par condition, (b) nombre de nano-domaines trouvés par groupe, (c) histogramme cumulatif du nombre de nano-domaines pour chacun des récepteurs

On retrouve que le récepteur GluN1 est le récepteur ayant le plus de groupes par champ de vue : presque trois fois plus que les autres conditions selon le graphe 2.27(a). Quant au nombre de nano-domaines présents par groupe de récepteur, les résultats de la quantification en figures 2.27(b) et (c) montrent clairement que les récepteurs étudiés ont des organisations différentes. Comme nous l'avons déjà vu : les groupes de récepteurs GluN2A contiennent plus de nano-domaines que ceux des récepteurs GluN2B. Et le récepteur GluN1 forme plus de nano-domaines que les récepteurs GluN2A et GluN2B. Cela peut s'expliquer par le fait que les récepteurs au NMDA sont tous composés de sous unité GluN1, il y a donc la possibilité que les groupes de GluN1 soient aussi constitués de nano-domaines GluN2A et GluN2B. Pour prouver cela il faudrait pouvoir faire l'image de la même zone d'une même tranche de cerveau avec les trois marquages. Cela permettrait de superposer les localisations spatiales et en apprendre plus sur l'organisation de ces récepteurs au glutamate. Au cours de cette thèse, nous avons tenté de faire du SELFIDSTORM bicouleur. Nous sommes actuellement en train de travailler sur l'élaboration de protocoles de marquage bicouleur au sein de tranche de cerveau. En raison de la complexité des échantillons nous n'avons pas encore de résultat concluant.

Conclusion

Dans ce chapitre nous avons pu analyser des échantillons complexes grâce à des combinaisons de la technique SELFIDSTORM à d'autres méthodes de super-résolution. Nous avons mis en évidence que la méthode SELFIDSTORM permet de retrouver la hiérarchie des protéines des points focaux d'adhésion. De cette étude, qui n'avait jusque là jamais été faite sur cellules vivantes, nous montrons que nous pouvons avoir confiance dans les résultats de localisation axiale obtenus grâce au montage SELFIDSTORM. Avec le couplage SELFIDSTORM, nous avons pu reconstituer des images de super-résolution 3D des fibres d'actine sur cellules adhérentes et au sein d'organoïdes. C'est parce que le sur-étalement spatial de la PSF est minimisé et que la technique SELFIDSTORM est faiblement sensible aux aberrations que nous pouvons reconstituer ces structures denses avec une résolution de $60nm$ à une distance $z_{depth} = 25\mu m$ de la lamelle de microscope et de $100nm$ à une profondeur $z_{depth} = 50\mu m$.

Ayant montré les capacités de la technique SELFI couplée au PALM ou au dSTORM, nous avons appliqué cette technique à la détection des récepteurs postsynaptiques NMDA. Grâce aux localisations tridimensionnelles obtenues avec une précision de quelques dizaines de nanomètres, nous avons comparé les organisations de ces récepteurs à l'échelle moléculaire. Les quantifications faites ont montré une réelle différence d'organisation en fonction du type de récepteur.

Pour aller plus loin dans ce projet il faudrait développer un moyen de faire de la super-localisation 3D de différentes protéines présentes au même endroit dans l'échantillon. Dans la littérature il existe des techniques permettant d'étudier la même zone avec différents marquages. Par exemple le dSTORM multicolore [79] est un moyen de faire des acquisitions successives de dSTORM avec des fluorophores différents. Pour réussir à faire cycliser plusieurs fluorophores différents il faut adapter à ces molécules fluorescentes la solution tampon utilisée lors du dSTORM. On trouve plusieurs protocoles adaptés à la photophysique de différents fluorophores dans la littérature [80]. Nous avons essayé de les appliquer, sans succès à ce jour, pour détecter différentes molécules au sein des tranches organotypiques. Cependant, même si le clignotement de différents fluorophores dans un même échantillon est complexe à obtenir, nous avons montré tout au long de ce chapitre que SELFI peut être utilisé à différentes longueurs d'onde d'émission : la molécule mEOS utilisée pour le SELFI-PALM émet à $\lambda_{mEOS} = 580nm$, et l'Alexa647 utilisée pour le SELFI-dSTORM émet à $\lambda_{Alexa647} = 647nm$. C'est donc plus un développement biochimique qu'un développement optique qu'il reste à faire.

Ce chapitre a été consacré à l'étude statique d'échantillons biologiques, dans le chapitre suivant nous allons faire des études dynamiques en profondeur au sein d'échantillons biologiques vivants.

[79] Nahidiazar, *Plos One*, 2016

[80] Beghin, *Nature Methods*, 2017

Chapitre 3

Suivi de molécules uniques 3D au sein d'échantillons biologiques vivants

Le développement des techniques de super-localisation a rendu possible le suivi de molécules uniques [81] [82]. Dans le chapitre précédent nous avons montré que la technique SELFIE, combinée à d'autres techniques de super-résolution, permet de reconstruire des images de super-résolution 3D mais aussi de quantifier l'organisation spatiale tridimensionnelle de molécules à l'échelle nanométrique dans des échantillons épais fixés. Dans ce chapitre nous proposons d'étudier la dynamique 3D de molécules individuelles dans des échantillons vivants. L'originalité de ce travail réside dans le fait que nous allons montrer qu'il est important de prendre en compte la dynamique morphologique de l'échantillon biologique en temps réel simultanément à l'étude des mouvements nanométriques des molécules.

Après avoir exposé la méthode de calcul des comportements de diffusion en se basant sur des simulations et sur des échantillons mimétiques, nous montrerons que la technique SELFIE permet d'effectuer du suivi de molécules uniques en profondeur dans des échantillons biologiques vivants, denses, complexes et dynamiques.

Puis nous montrerons l'importance de suivre l'évolution de l'environnement de l'échantillon au cours d'une acquisition de détections de molécules. Grâce à l'emploi simultané de la microscopie de phase quantitative en lumière blanche pour observer la morphologie cellulaire et la modalité SELFIE pour le suivi de molécules uniques en 3D, nous effectu-

[81] Saxton, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1997

[82] Tardin, *The EMBO Journal*, 2003

rons une étude complémentaire entre les détections de super-localisation et ces images de phase quantitatives. La dernière partie de cette thèse sera consacrée à l'analyse conjointe de ces données. Nous mettrons en évidence que cela apporte de nouvelles informations sur l'échantillon et permet une étude plus complète.

3.1 Suivi de la diffusion de nanoparticules uniques insérées dans l'espace extracellulaire du cerveau

L'objectif de cette partie est de montrer que la méthode SELFIE permet de réaliser du suivi de molécules uniques en profondeur dans des échantillons biologiques complexes et vivants. Avant la démonstration expérimentale, nous allons présenter succinctement la base théorique utilisée pour l'analyse des propriétés de diffusion d'une molécule à partir de trajectoires enregistrées. Pour cela, nous illustrerons notre propos à l'aide de simulations de mouvement brownien. Nous appliquerons ensuite ces calculs à des molécules diffusant librement dans des gels d'agarose, nous montrerons que nous retrouvons les comportements de diffusion attendus. Enfin, nous détaillerons les résultats de suivi de molécules uniques au sein de tranches de cerveau.

3.1.1 Déplacement quadratique moyen pour un mouvement brownien

Si le mouvement brownien est observé pour la première fois en 1828 par le botaniste R.Brown [83], c'est A.Einstein qui, en 1905, est le premier à théoriser le mouvement d'une particule en découvrant son origine thermique [84]. Il décrit le déplacement quadratique moyen comme une fonction linéaire de la durée Δt en introduisant le coefficient de diffusion D :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R}, \quad (3.1)$$

où k_B est la constante de Boltzmann, T la température, η la viscosité du fluide et R le rayon de la particule.

[83] Brown, *The Philosophical Magazine*, 1828

[84] Einstein, *Annalen der Physik*, 1905

Le suivi de molécules uniques, qui existe depuis déjà plusieurs dizaines d'années [81], permet de connaître le comportement dynamique des molécules en reconstruisant leurs trajectoires. Une des approches les plus répandues est celle basée sur le déplacement quadratique moyen (*Mean Square Displacement - MSD*) qui décrit l'aire explorée par la particule pour une certaine durée Δt :

$$MSD(\Delta t) = \langle (r(t + \Delta t) - r(t))^2 \rangle. \quad (3.2)$$

La théorie d'A.Einstein permet d'écrire :

$$MSD(\Delta t) = 2dD\Delta t, \quad (3.3)$$

où d est la dimension du problème. Grâce à cette théorie, il est possible d'obtenir des informations sur la viscosité du fluide ou bien sur le rayon de la particule à partir des données d'une trajectoire.

Afin de produire une illustration du phénomène et de l'approche analytique pour extraire le coefficient de diffusion caractérisant le mouvement observé, nous avons généré une trajectoire 3D à partir d'une simulation réaliste du mouvement brownien pour une particule de rayon $R = 25nm$, à température ambiante $T = 23C$, dans un fluide de viscosité $\eta = 0.02Pa.s$. Pour ces données le coefficient de diffusion théorique est $D_{théo} = 0.43\mu m^2/s$. Le pas de la trajectoire a été calculé en prenant la racine du déplacement quadratique moyen donné par l'équation 3.3 auquel un bruit gaussien a été rajouté pour simuler la précision de pointé. A partir des localisations de cette trajectoire [Fig3.1(a)], la valeur du déplacement quadratique moyen a été calculée pour chaque durée Δt , ce qui permet de tracer la courbe en figure 3.1(b). En prenant la pente d'un fit linéaire de cette courbe, nous pouvons remonter au coefficient de diffusion $D_{trajectoire} = 0.39 \pm 0.04\mu m^2/s$. Il est possible sur une trajectoire de calculer le coefficient de diffusion instantanée sur une dizaine de points. En faisant le calcul de ce coefficient de diffusion instantanée tout le long de la trajectoire, on obtient les variations locales du coefficient de diffusion qui dans un milieu inhomogène sont imposées par les caractéristiques locales du milieu. C'est ce coefficient de diffusion instantanée qui est le plus souvent utilisé lors d'études de la diffusion de molécules au sein d'échantillons biologiques [85].

[81] Saxton, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 1997

[85] Winckler, *Scientific Reports*, 2013

Nous avons tracé un histogramme cumulatif des coefficients de diffusion instantanée pour 1000 trajectoires simulées en figure 3.1(c). Dans ce cas, la variabilité observée est donnée par les fluctuations statistiques du mouvement brownien. La médiane de la distribution correspond à un coefficient de diffusion instantanée de $D = 0.36 \pm 0.15 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

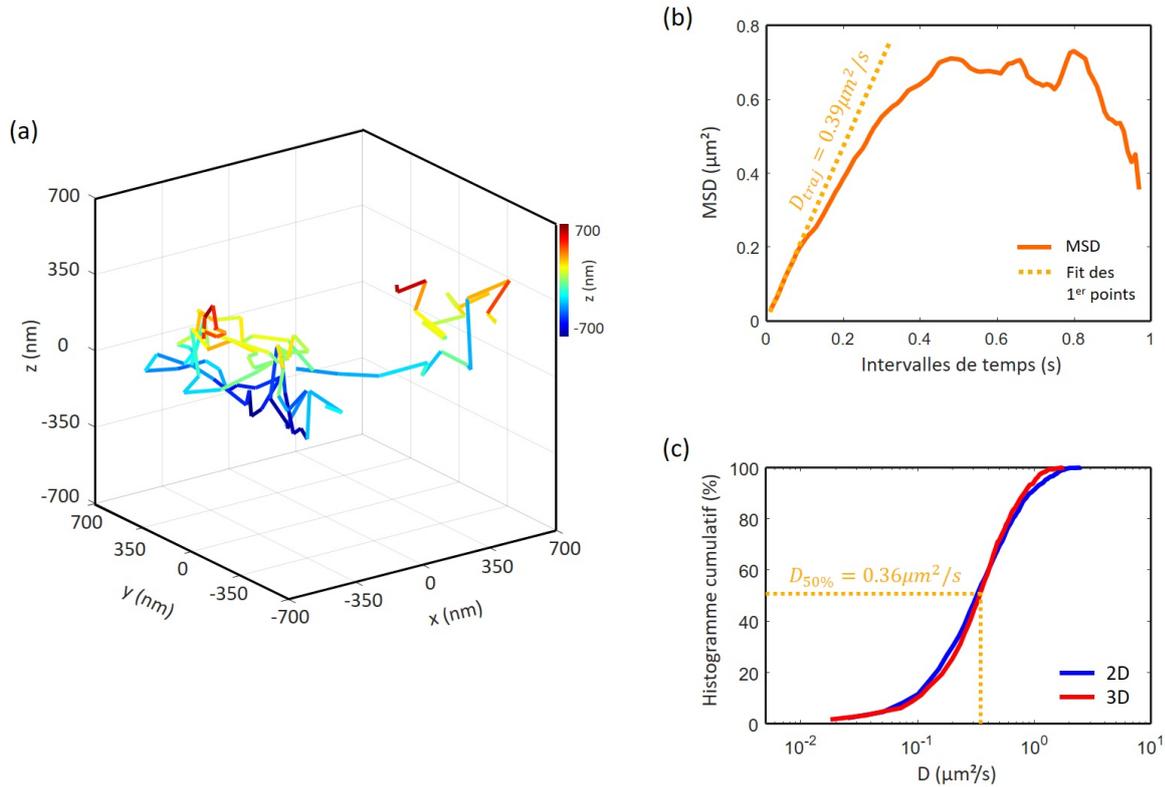


Figure 3.1 : (a) Trajectoire brownienne simulée pour une particule de taille $R = 25\text{nm}$ dans un milieu de viscosité $\eta = 0.02\text{Pa}\cdot\text{s}$ à température ambiante ; (b) courbe du déplacement quadratique moyen de la trajectoire simulée en (a) ; (c) histogramme cumulé des coefficients de diffusion instantanée calculés sur 1000 trajectoires simulées.

3.1.2 Suivi de molécules uniques dans un gel d'agarose

Nous venons de montrer comment à partir d'une trajectoire nous pouvons analyser les caractéristiques de diffusion de la particule considérée. Nous allons maintenant montrer que nous pouvons suivre différents comportements de diffusion en observant la diffusion de quantum dots insérés dans un gel d'agarose. L'excitation des quantum dots se fait en épifluorescence à $\lambda_{ex} = 405\text{nm}$.

La figure 3.2(a) montre un schéma de l'échantillon étudié : des quantum dots émettant à $\lambda_{QD} = 655nm$ (QD655 Streptavidin Conjugate, ThermoFisher) ont été mélangés à un gel d'agarose à 6%. A cette concentration certes élevée, les quantum dots montrent une certaine mobilité dans le gel. Cependant localement, le gel d'agarose n'est pas homogène et comporte une structuration pouvant ralentir ou piéger le quantum dot.

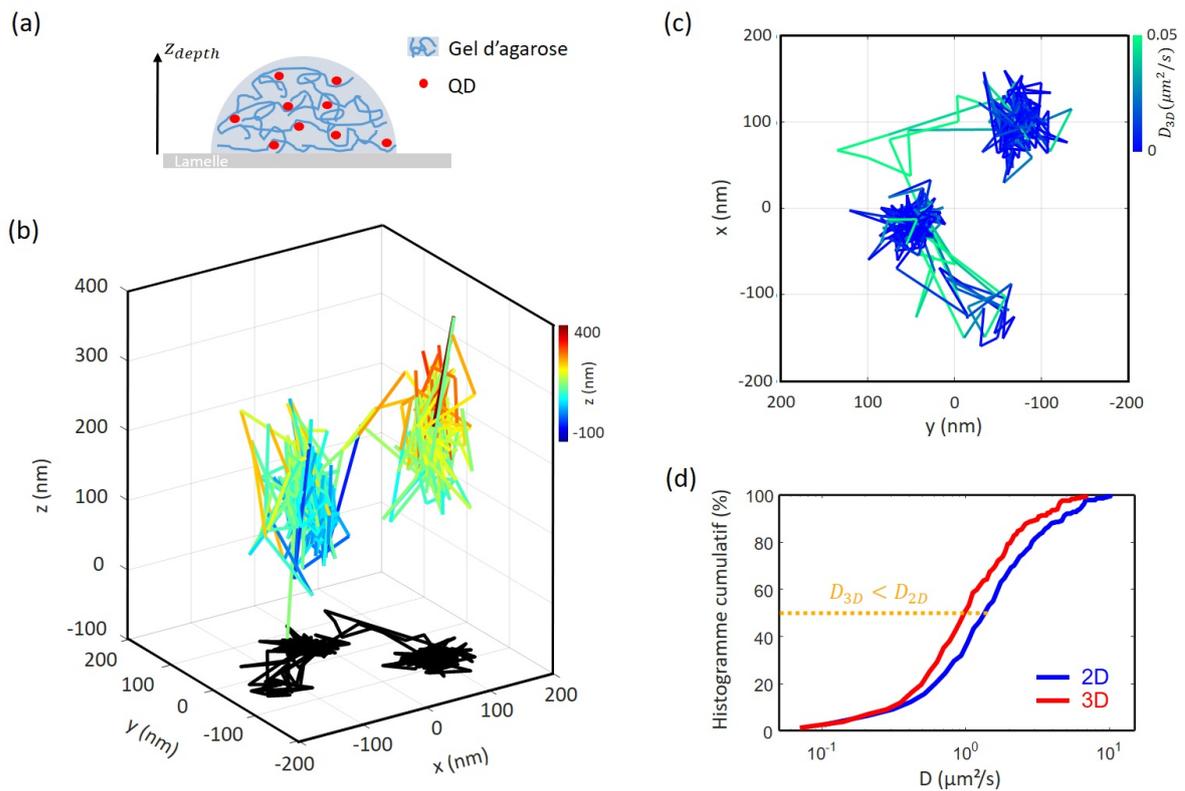


Figure 3.2 : Résultats de la diffusion des quantum dots dans un gel d'agarose : (a) échantillon utilisé, (b) exemple de trajectoire 3D avec sa projection dans le plan (xy), (c) carte de la diffusion instantanée de la particule dont la trajectoire est représentée en (b), (d) histogrammes cumulatifs des coefficients de diffusion instantanée 2D et 3D pour les 300 trajectoires visibles dans le champ.

Les expériences ont été faites à différentes profondeurs dans l'échantillon, mais je ne présente ici que les résultats obtenus à $z_{depth} = 15\mu m$. Les trajectoires 3D sont reconstituées à partir des localisations 3D d'une même particule sur des images consécutives. Un exemple de trajectoire 3D est illustré en figure 3.2(b). La visualisation tridimensionnelle et la projection de cette trajectoire sur le plan (xy) permettent de voir que le quantum dot diffuse dans toutes les directions de l'espace, mais aussi qu'il explore différentes zones dans lesquelles il reste confiné. Le coefficient de diffusion instantanée calculé le long de la trajectoire est représenté sur la figure 3.2(c). Cette carte de diffusion révèle deux comportements : une diffusion lente dans les endroits où le quantum dot est confiné et une

diffusion plus rapide entre ces zones. Nous avons répété cette analyse pour 300 trajectoires : l'histogramme cumulé des coefficients de diffusion instantanée se trouve en figure 3.2(d). Nous avons également calculé les coefficients de diffusion en 2D en utilisant les coordonnées enregistrées dans le plan (xy) . Nous obtenons que les coefficients de diffusion calculés en 3D sont inférieurs à ceux calculés en 2D :

$$D_{50\%}^{3D} = 1\mu m^2/s, \quad D_{50\%}^{2D} = 1.4\mu m^2/s.$$

Une explication possible de cette observation est la limitation de la profondeur de champ. En effet, si une particule diffuse principalement selon le plan (xy) nous pouvons la suivre si elle reste dans le champ qui est de 32 par $32\mu m^2$. Dans ce cas, la diffusion en 3D est contrainte par l'environnement dans un plan alors que l'analyse 3D suppose une diffusion tridimensionnelle isotrope. Par contre, si une particule diffuse de manière plus isotrope, et donc fréquemment orthogonalement à ce plan, nous la perdons de vue rapidement car la profondeur de champ n'est que d' $1\mu m$. Cela est d'autant plus clair que cette différence de diffusion entre la 3D et la 2D n'est pas visible sur la simulation qui est complètement libre. Les limitations spatiales du montage optique privilégient donc certainement l'observation des objets diffusant de manière anisotrope autour du plan de focalisation moyen. Dans le cas des quantum dots diffusant de manière confinée dans un gel, la valeur correcte des coefficients de diffusion doit donc se situer entre la valeur donnée par l'analyse en 3D et celle en 2D, qui diffèrent de 40%.

Pour palier à ce problème il faudrait développer un montage qui permettrait de s'accrocher à la particule étudiée et de la suivre en temps réel grâce à une mise au point automatique.

3.1.3 Suivi 3D de quantum dots uniques en profondeur dans une tranche de cerveau vivante

L'échantillon utilisé ici est une *tranche organotypique* de cerveau de rat, nous avons déjà décrit ce que sont ces tranches dans le chapitre précédent. Ces tranches organotypiques ont été incubées pendant une heure avec une solution contenant les quantum dots. Un schéma de l'échantillon est représenté en figure 3.3(a). Les tranches sont montées dans une chambre régulée en dioxyde de carbone et à une température de $35^{\circ}C$ pour l'imagerie. Si l'échantillon peut rester en culture pendant une quinzaine de jours, il est préférable de faire les acquisitions le plus tôt possible car lorsque l'échantillon vieillit il s'entoure d'une couche d'astrocytes empêchant les quantum dots de pénétrer dans la tranche. Plus l'échantillon est jeune, moins cette couche est épaisse et les quantum dots ont plus de facilité à diffuser dans la tranche.

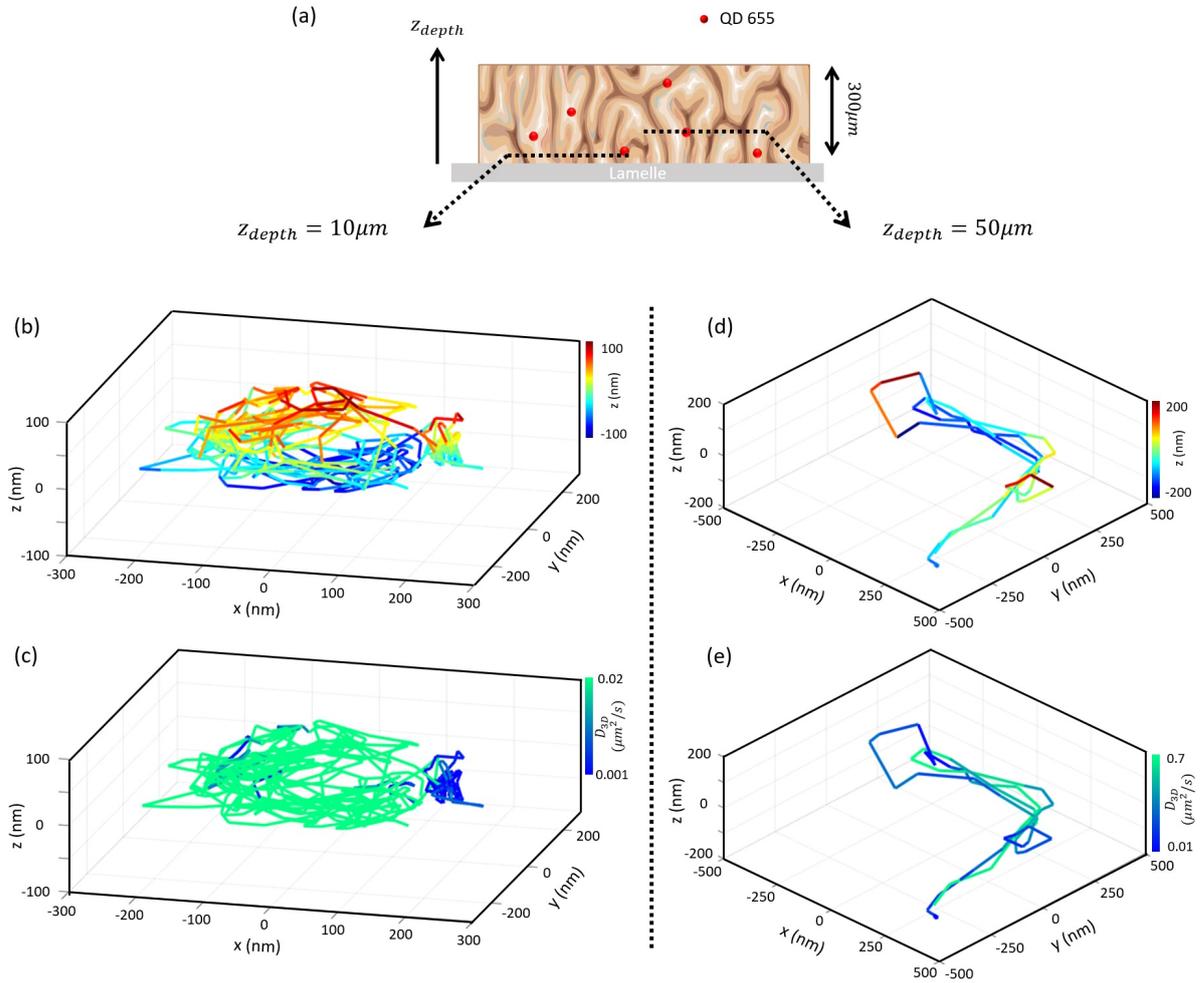


Figure 3.3 : Exemples de trajectoires reconstruites à partir des détections de quantum dots dans les tranches organotypiques : (a) schéma de l'échantillon ; (b) trajectoire à $z_{depth} = 10\mu m$; (c) carte de diffusion de la trajectoire (b) ; (d) trajectoire à $z_{depth} = 50\mu m$; (e) carte de diffusion de la trajectoire (d)

Nous avons effectué un suivi de particules à différentes profondeurs dans les tranches organotypiques [65]. Les acquisitions ont été faites avec un temps d'exposition $t_{exp} = 20ms$. Ce temps est un compromis entre la détection d'un nombre suffisant de photons et la capacité à suivre des mouvements rapides. A partir des localisations extraites des détections, nous avons reconstruit les trajectoires des différents quantum dots diffusant dans l'espace extracellulaire de la tranche de cerveau vivante.

[65] Linares-Loyez, *Frontiers in Physics*, 2019

L'avantage d'utiliser des quantum dots ici provient de leur forte brillance : en moyenne $N_{phot} = 2500$ photons par détection. Cela permet d'avoir une précision de localisation de 20nm selon toutes les directions de l'espace.

La figure 3.3 présente deux exemples de trajectoires reconstruites à partir des détections faites à $z_{depth} = 10\mu m$ et à $z_{depth} = 50\mu m$. La trajectoire à $z_{depth} = 10\mu m$ [Fig.3.3(b) et (c)] est remarquable car le quantum dot tourne autour de quelque chose, nous ne sommes pas en mesure de dire de quelle structure il s'agit sans être trop spéculatif, mais il y a clairement un vide au milieu de la trajectoire. Le coefficient de diffusion 3D instantanée a été calculé le long de la trajectoire, ce qui a permis de tracer la carte de diffusion en figure 3.3(c). On remarque qu'en suivant ce quantum dot pendant 23 secondes nous observons deux types de diffusion : une diffusion rapide $D_{3D} = 0.02\mu m/s$ pendant laquelle la particule tourne autour d'un élément de l'échantillon, et une diffusion plus lente $D_{3D} = 0.001\mu m/s$ lorsque le quantum dot se coince sur le coté.

L'exemple de trajectoire choisi pour illustrer le suivi de particule à $z_{depth} = 50\mu m$ [Fig.3.3(d) et (e)] est plus court (1.3 secondes) que celui dont nous venons de discuter (23 secondes). En regardant la carte des coefficients de diffusion 3D instantanée on voit que ce quantum dot diffuse rapidement : en moyenne $D_{3D} = 0.35 \pm 0.01\mu m/s$. Il s'en va hors du champ en moins de 2 secondes, ce qui explique qu'on ne puisse le suivre très longtemps.

Nous venons d'illustrer dans cette partie que la technique SELFI est un outil pour effectuer du suivi 3D de nanoparticules au sein d'échantillons biologiques vivants. Il est possible de suivre une molécule unique jusqu'à $z_{depth} = 50\mu m$ dans l'échantillon, et ce quelque soit son régime de diffusion (lent ou rapide).

Au cours de cette thèse, nous n'avons pas souhaité approfondir cette étude mais des travaux sont en cours par d'autres membres du groupe pour exploiter et appliquer ces résultats à des questions biologiques précises. La dernière partie de cette thèse est en revanche consacrée à un autre développement méthodologique qui a porté une étude dynamique de super-localisation combinée à de l'imagerie de phase quantitative.

3.2 Imagerie quantitative multimodale simultanée

La microscopie de super-résolution n'est pas adaptée à l'étude d'échantillons très dynamiques car elle nécessite de longs temps d'exposition et d'acquisition. Dans cette partie nous proposons une manière de s'affranchir de ce problème en suivant l'évolution de l'environnement de l'échantillon pour continuer à faire des études statistiques sur les détections de molécules uniques.

Nous avons déjà mentionné au cours de ce manuscrit la possibilité de disposer d'une deuxième modalité d'imagerie qui nous permet de faire de l'imagerie de phase quantitative. Nous avons expliqué dans le premier chapitre le fonctionnement de cette imagerie et comment elle nous sert pour calculer et s'affranchir de la dérive du microscope. Nous rappelons en figure 3.4 un schéma du montage optique avec les deux modalités d'imagerie. Nous allons dans cette partie montrer en quoi cette modalité peut-être complémentaire à l'imagerie de fluorescence.

Pour cela nous avons utilisé une combinaison de SELFI-uPAINT permettant de super-localiser en 3D des récepteurs membranaires uniques dans un échantillon biologique vivant. Nous décrivons dans la suite l'échantillon que nous avons choisi d'utiliser pour cette étude, nous mettrons en avant que l'imagerie par transmission permet de suivre l'évolution de l'environnement cellulaire pendant les acquisitions de super-résolution. Enfin nous montrerons qu'une analyse conjointe permet d'extraire de nouvelles informations sur l'échantillon.

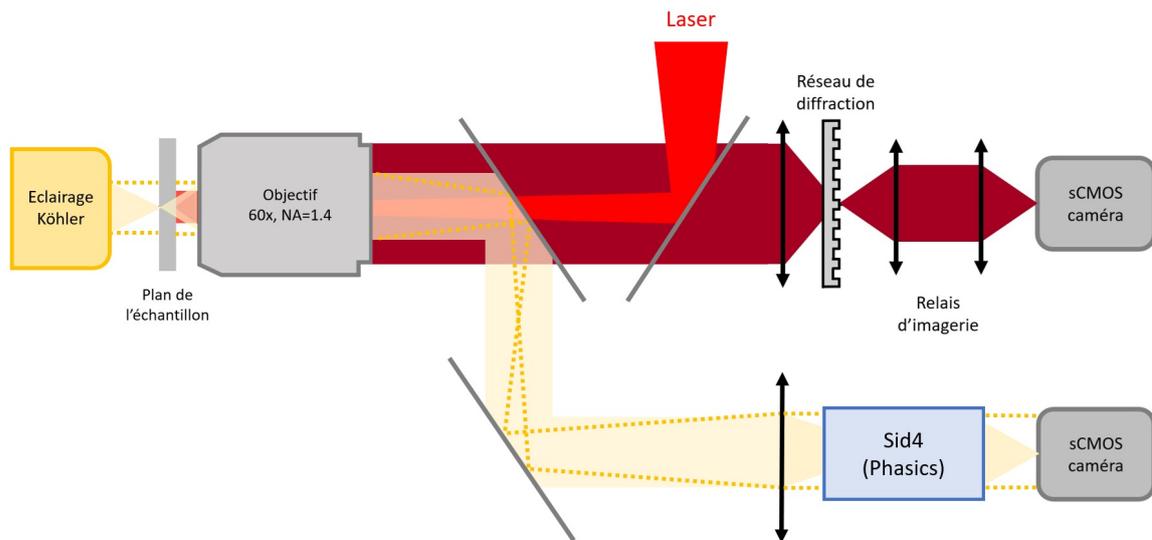


Figure 3.4 : Schéma du montage optique complet avec les deux bras d'imagerie : un pour la fluorescence et l'autre pour l'imagerie par transmission

3.2.1 SELF-uPAINT dans un échantillon vivant

L'objet de notre étude ici est l'évolution de la membrane cellulaire due à la présence du facteur de croissance dans la solution. Nous allons suivre cette évolution grâce à l'imagerie de phase quantitative tout en suivant la diffusion des récepteurs lors de leur activation par le facteur de croissance le long de la membrane grâce à la combinaison SELF-uPAINT.

Facteur de croissance dans les cellules cancéreuses

Nous avons choisi d'étudier des cellules cancéreuses A431. Ces cellules proviennent de carcinome d'épiderme humain et ont une forte expression du récepteur au facteur de croissance EGF (*Epidermal Growth Factor*). Les récepteurs à l'EGF (EGFr) sont des récepteurs membranaires ayant une partie extra-cellulaire où l'EGF peut s'accrocher et une partie intracellulaire. Les EGFr sont présents à la surface de la membrane sous forme de monomère. Lorsqu'une protéine EGF s'accroche à ce récepteur, cela induit une dimérisation qui conduit à une cascade de signalisations intracellulaires. Ces signalisations ont pour résultat un changement phénotypique de la cellule comme une prolifération ou une migration [86].

Les images de la figure 3.5 montrent la prolifération d'une cellule A431 après une activation par l'EGF. Les images 3.5(a) sont les images de phase quantitative obtenues grâce à l'interféromètre SID4 (Phasics, France). Pour mieux voir les détails présents dans ces images, nous avons appliqué un filtre passe haut fréquentiel, le résultat sont les images en figure 3.5(b). Le temps $t = 0$ correspond à l'injection des protéines EGF dans la solution. Les flèches rouges indiquent les endroits où la croissance de la cellule est très forte. Le temps de réponse de la cellule est d'environ 3 minutes, puis la prolifération est très rapide : 10 minutes après l'injection de l'hormone protéique, la cellule a gagné quelques microns de diamètre et des *vagues* se sont formées en bord de membrane. Ce phénomène rapide est un bon modèle pour montrer l'importance du suivi de l'environnement d'une cellule lors d'une acquisition de super-résolution dans un échantillon vivant. Par ailleurs, nous nous posons la question de la (re)localisation et du mouvement des EGFr activés pendant ce processus fortement dynamique.

[86] Diagaradjane, *Clinical Cancer Research*, 2008

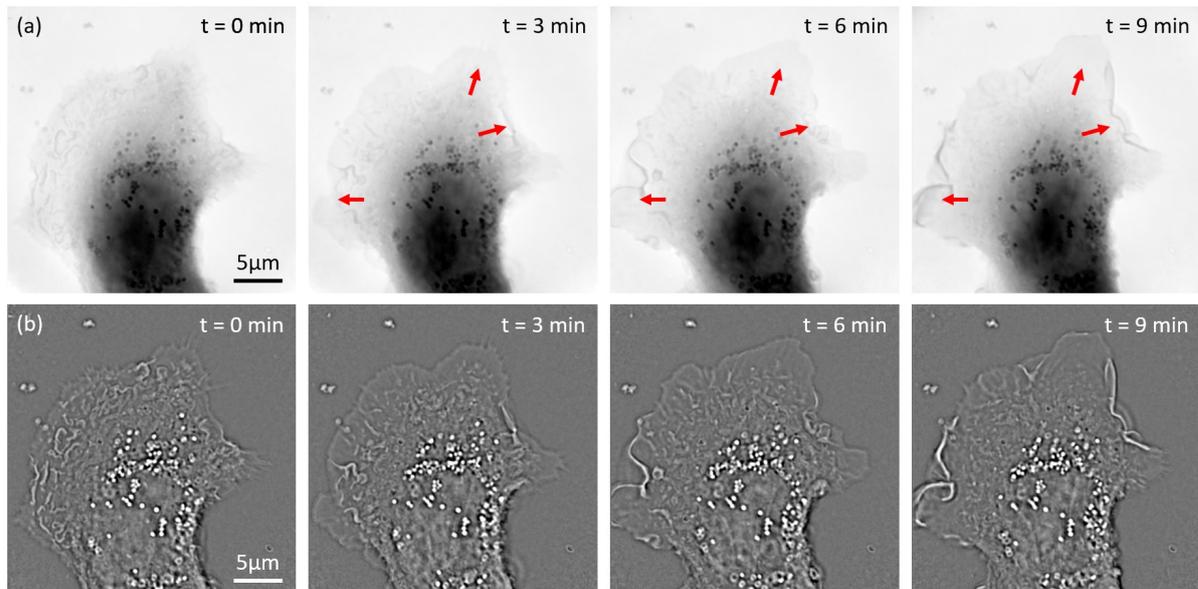


Figure 3.5 : *Évolution de la cellule sous activation par la protéine EGF : (a) images de phase extraite de l'interférogramme obtenu grâce au SID4, (b) filtre passe haut appliqué sur ces images pour mieux distinguer les détails*

Montage du SELFI-uPAINT

La technique du uPAINT (*universal points accumulation for imaging in nanoscale topography*)[20] est une généralisation du PAINT [6]. C'est la seule technique permettant de faire de la super localisation de protéines endogènes fraîchement activées par un ligand au sein d'échantillons biologiques vivants. Des ligands fluorescents, comme par exemple des facteurs de croissance ou des anticorps, sont utilisés et injectés en temps réel dans la solution contenant les cellules sur le microscope. Ces molécules forment un fond de fluorescence car elles diffusent rapidement en solution. Lorsqu'une molécule fluorescente s'accroche à la protéine d'intérêt, celle-ci génère un pic de fluorescence à l'endroit de l'accroche, ce qui révèle l'évènement. Pour ne pas exciter la totalité de l'échantillon et réduire le bruit de fond dû aux molécules présentes en solution, il est pertinent d'illuminer uniquement le plan d'imagerie. Comme dans cette étude l'échantillon étudié est constitué de cellules étalées sur une lamelle de microscope, nous avons utilisé une illumination rasante pour n'éclairer que les premiers microns de l'échantillon : le faisceau d'excitation collimaté est envoyé avec un angle d'environ 60° sur l'échantillon.

[20] Giannone, *Biophysical Journal*, 2010

[6] Sharonov, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006

Marqueur fluorescent

Le choix du marqueur fluorescent est crucial pour le bon déroulement des expériences. Nos premiers essais furent avec le fluorophore Cy5. Cependant cette molécule fluorescente photoblanchit rapidement et nous ne sommes pas en mesure de la suivre pendant une longue durée. L'Atto647 étant plus brillant nous avons testé le couplage de l'EGF avec cette molécule. Pour effectuer un couplage la molécule fluorescente est complétée par un groupe moléculaire NHS (N-hydroxysuccinimide). Nous avons constaté qu'une fois couplée, l'Atto647-N produit un marquage non spécifique en raison de l'électronégativité de cette molécule. Nous n'avons donc pas pu utiliser ce fluorophore.

Le couplage que nous avons finalement effectué est celui de la protéine EGF avec le fluorophore JF646 (JF646SE, R& D system). Cette molécule fluorescente est un très bon fluorophore, plutôt stable et brillant [87]. Le protocole du couplage est décrit en Annexe D.7. Pour vérifier l'efficacité et la spécificité du marquage nous avons effectué une expérience contrôle. Les protéines couplées (EGF-JF646) ont été incubées pendant 10 minutes dans un échantillon de cellules A431, ainsi que dans un échantillon de cellules HeLa. Les cellules HeLa expriment moins le récepteur à l'EGF : le séquençage de l'ARN permet de savoir qu'une cellule HeLa exprime $4E10^{-3}$ fois moins de récepteurs à l'EGF qu'une cellule A431 (*The Human Protein Atlas*, www.proteinatlas.org). Ces cellules constituent donc un très bon contrôle négatif. Les résultats du contrôle, présentés en figure 3.6, confirment que le couplage est spécifique et affin. Sur l'image de phase la cellule A431 a réagi à l'EGF, on le voit aux vagues présentes en bord de membrane. Et comme attendu, le signal de fluorescence est présent dans la cellule A431, signe de l'endocytose des récepteurs quelques minutes après leur activation par l'EGF. De plus, la fluorescence est complètement absente pour la cellule HeLa.

Nous avons aussi utilisé un couplage d'anticorps anti-EGFr avec la molécule fluorescente Atto532. L'anticorps que nous avons utilisé est le panitumumab, c'est un anticorps monoclonal humain très spécifique aux récepteurs à l'EGF. Cet anticorps empêche les protéines EGF de s'accrocher à leur récepteur [88]. Le couplage effectué pour une étude précédente dans notre équipe [85] nous a permis de comparer la localisation et la diffusion des récepteurs à l'EGF lorsque la cellule est activée ou non.

[87] Grimm, *Nature Methods*, 2015

[88] Saltz, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006

[85] Winckler, *Scientific Reports*, 2013

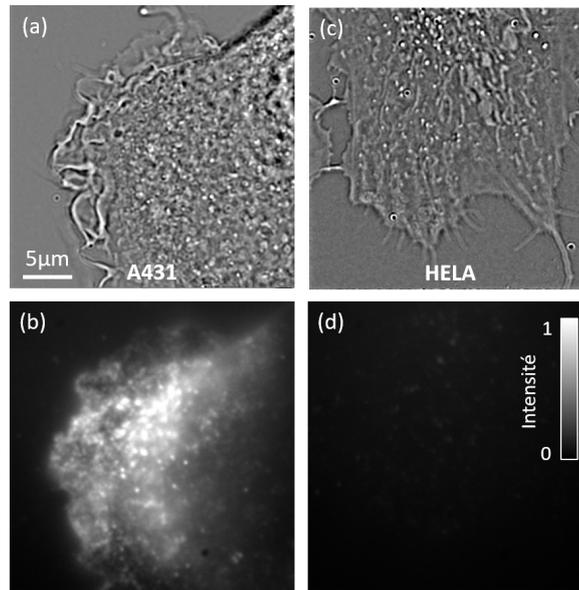


Figure 3.6 : Contrôle du couplage EGF-JF646 sur une cellule A431 et une cellule HeLa : (a) et (c) images de phase quantitative des cellules, (b) et (d) images d'intensité reconstruites à partir des interférogramme SELFI pour visualiser la fluorescence présente au bout de 10 minutes d'incubation de l'EGF-JF646

Substrat pour la culture des cellules

Pour cette étude nous avons utilisé plusieurs revêtements pour la lamelle du microscope. Cela est dû au besoin d'un substrat souple pour les cellules et au besoin de stabilisation du microscope. Comme nous l'avons expliqué dans le premier chapitre, afin d'enregistrer avec précision la dérive du microscope et corriger les trajectoires mesurées de cette dérive, nous la suivons en nous accrochant sur un détail fixe dans l'échantillon. Pour un échantillon de cellules vivantes nous avons choisi d'insérer des billes d'or (100nm de diamètre) proches de la lamelle.

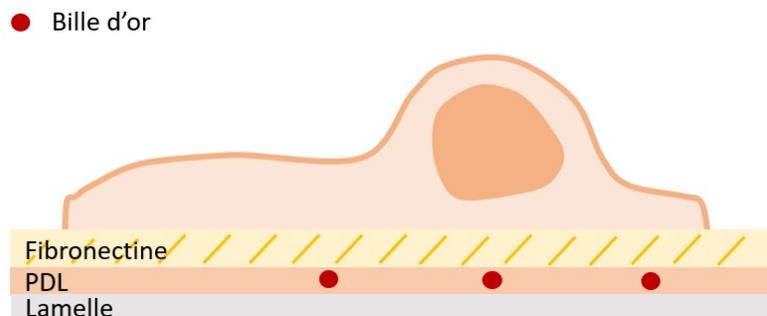


Figure 3.7 : Schéma de l'échantillon préparé pour les expériences de SELFI-uPAINT

La figure 3.7 décrit l'échantillon préparé pour chacune des expériences. Un premier revêtement de la lamelle est effectué avec de la Poly-D-Lysine (PDL, 20mg, Corning BioCoat), c'est un polymère qui permet d'accrocher les billes d'or à la lamelle [64]. Puis la fibronectine (Fibronectine, Roche) sert de substrat souple pour la culture des cellules.

3.2.2 Complémentarité lumière blanche et fluorescence

Dans un premier temps nous allons mettre en évidence la complémentarité entre l'imagerie par transmission et l'imagerie de super-résolution lors d'une étude sur un échantillon vivant. Nous montrerons que nous pouvons observer la dynamique morphologique de l'échantillon pendant une acquisition uPAINT. Nous verrons à cette occasion comment nous pouvons déterminer le seuil d'intensité laser à ne pas dépasser afin d'éviter un dysfonctionnement de la cellule observée pendant une acquisition uPAINT.

Pertinence de réaliser des images super-résolues d'échantillons vivants à dynamique rapide

Comme mentionné plus haut, l'activation des récepteurs par l'EGF engendre une réaction rapide de la cellule A431. Nous l'avons observé sur les images de phase successives de la figure 3.5. Nous montrons en figure 3.8 les conséquences d'une telle réorganisation cellulaire conduisant à la difficulté de reconstruire une image de super-résolution à très haute densité de molécules. Cette problématique est générale car les techniques de microscopie de super-résolution bénéficient d'une résolution accrue, mais au détriment de la résolution temporelle d'acquisition. Pour chaque minute de l'acquisition nous avons rassemblé les détections faites pour former une image de super-résolution. Les images 3.8(d) à (k) présentent des images correctes, mais non conformes à la réalité. Grâce aux images de phase quantitative acquises simultanément, nous avons détecté le contour de la cellule à chaque minute. Les contours trouvés sont visibles en figure 3.8(c). La dynamique de la prolifération de la membrane cellulaire est bien visible : les contours de la cellule se sont déplacés de $2.5\mu m$ en 10 minutes.

Il est donc évident que lors d'une étude d'un phénomène dynamique à l'échelle nanoscopique il faut prendre en compte les temps d'évolution de l'échantillon.

[64] Bon, *Nat. Comm.*, 2015

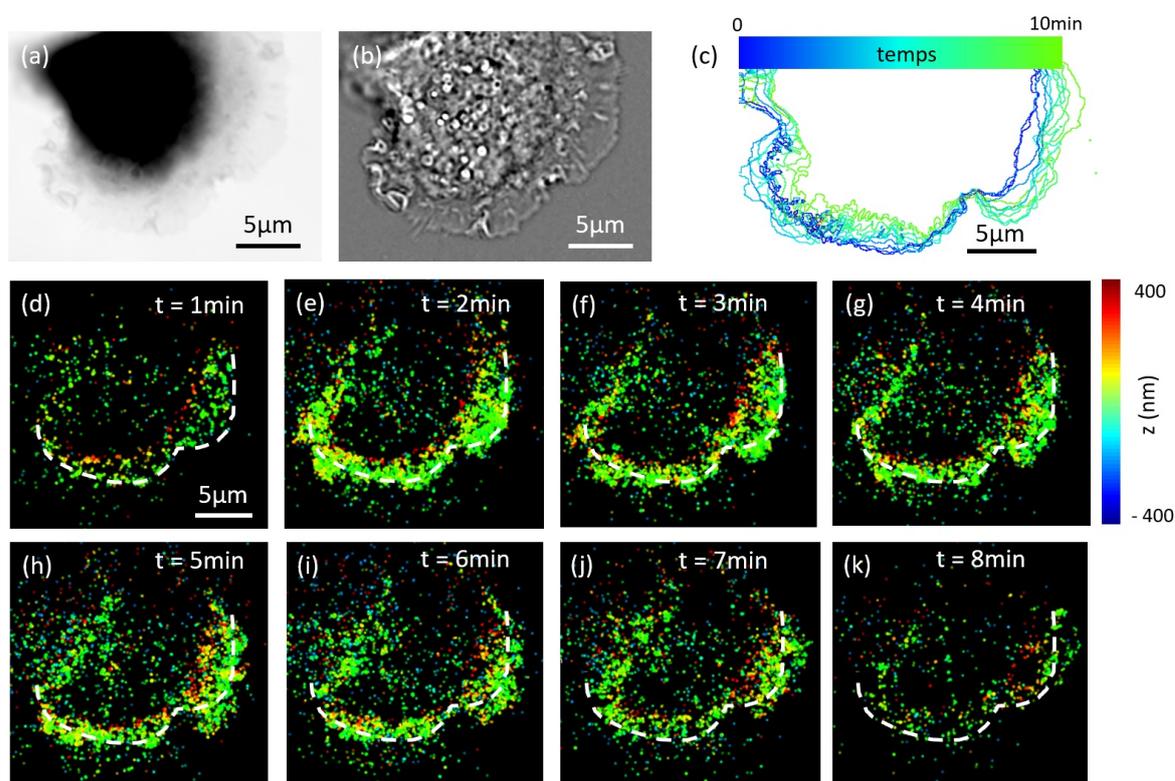


Figure 3.8 : Mise en évidence de la dynamique du phénomène étudié : (a) image de phase quantitative d'une cellule A431 2 minutes après injection de l'EGF dans la solution, (b) image passe haut de (a), (c) évolution du contour de la cellule au cours de l'acquisition, (d) à (k) images de super-résolution reconstruites pour chaque minute de l'acquisition

Influence de la puissance laser sur l'intégrité cellulaire

Nous avons étudié un autre phénomène primordial lors de toute expérience d'imagerie : l'influence de l'illumination sur l'intégrité de l'échantillon. Pour cela nous avons imagé des cellules à 37°C , en présence de CO_2 , et sans aucune stimulation extérieure (*i.e.* sans application d'EGF). Nous avons illuminé ces cellules à différentes puissances laser ($\lambda_{\text{laser}} = 532\text{nm}$) pendant une dizaine de minutes. Puis nous avons analysé la viabilité des cellules sous cette illumination.

Pour étudier l'intégrité de la cellule, il nous a fallu déterminer un critère objectif. Nous avons utilisé le fait que lorsque la dynamique intracellulaire change fortement cela indique une altération de la fonction cellulaire. Les protéines, les vésicules et les organelles présents dans une cellule vivante diffusent de manière guidée. Lors de l'apoptose de la cellule cette dynamique s'arrête brutalement. Le noyau se décompose en relarguant ses vésicules dans la cellule qui éclate en plusieurs morceaux. Le critère de non-intégrité cellulaire que nous avons choisi est donc l'arrêt de la dynamique intracellulaire.

Grâce aux images de phase quantitative nous avons la possibilité de mesurer les variations

de dynamique intracellulaire : ces mouvements sont visibles dans les fluctuations de la phase transmise par l'échantillon. La figure 3.9 illustre l'algorithme utilisé pour calculer ces variations.

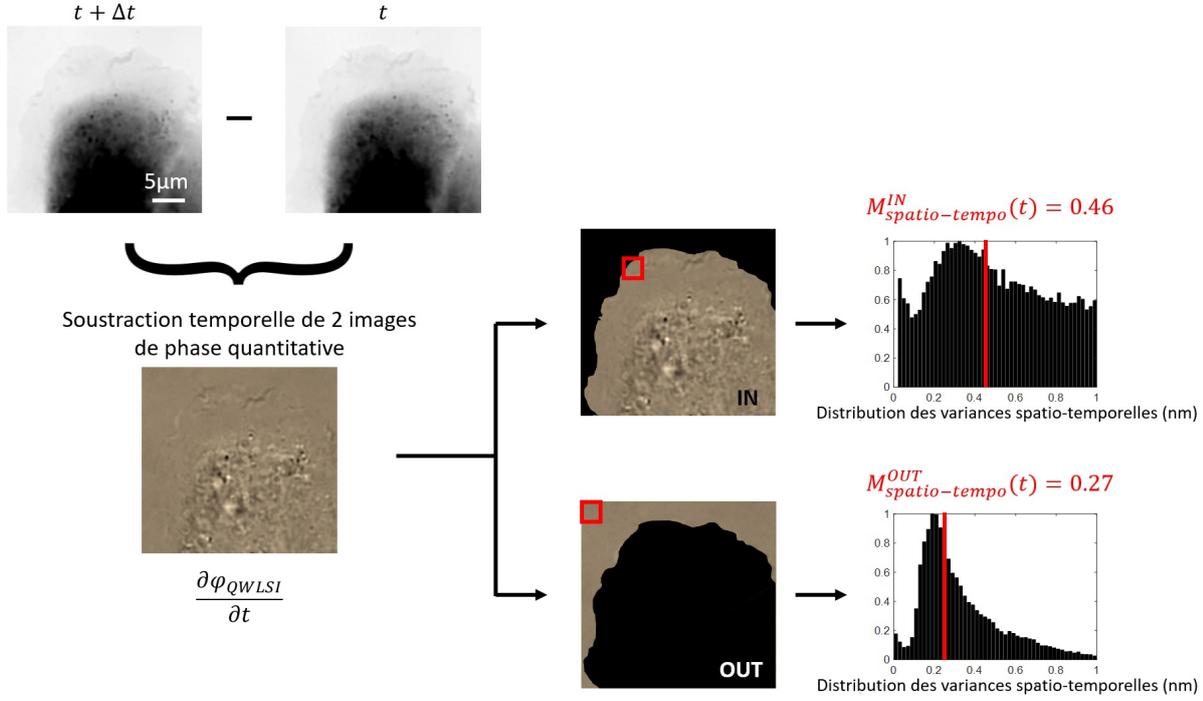


Figure 3.9 : Algorithme pour le calcul de la variance spatio-temporelle de la phase à chaque instant t de l'acquisition

A chaque instant t nous avons soustrait l'image précédente ($\Delta t = 1s$). L'image différentielle résultante correspond aux fluctuations de phase temporelles : $\frac{\partial \varphi_{QWLSI}}{\partial t}$. Puis nous avons appliqué un masque pour calculer les fluctuations spatiales à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule. Les fluctuations spatiales sont calculées en faisant parcourir une imagerie de 5 par 5 pixels sur l'image. Pour chaque imagerie i , la variance spatiale des fluctuations de phase temporelles est

$$\sigma \left[\frac{\partial \varphi_{QWLSI}}{\partial t} \right]_i^2.$$

Ainsi, pour chaque image nous avons deux distributions (intérieure et extérieure) de variances spatio-temporelles de la phase :

$$V^{IN}(t) = \left\{ \sigma \left[\frac{\partial \varphi_{QWLSI}}{\partial t} \right]_{IN,1}^2, \sigma \left[\frac{\partial \varphi_{QWLSI}}{\partial t} \right]_{IN,2}^2, \dots \right\}$$

et

$$V^{OUT}(t) = \left\{ \sigma \left[\frac{\partial \varphi_{QWLSI}}{\partial t} \right]_{OUT,1}^2, \sigma \left[\frac{\partial \varphi_{QWLSI}}{\partial t} \right]_{OUT,2}^2, \dots \right\}.$$

Pour chaque distribution nous gardons la médiane $M_{spatio-tempo}$. Donc pour chaque instant t de l'acquisition nous avons une valeur médiane de variance spatio-temporelle à l'intérieur de la cellule $M_{spatio-tempo}^{IN}(t)$ et une valeur médiane de variance spatio-temporelle à l'extérieur de la cellule $M_{spatio-tempo}^{OUT}(t)$. On remarque, sur l'exemple donné en figure 3.9, que les valeurs de la variance spatio-temporelle de la phase sont plus élevées à l'intérieur de la cellule qu'à l'extérieur, ce qui est attendu. La dernière étape est la soustraction de ces deux valeurs :

$$M_{spatio-tempo}^{IN}(t) - M_{spatio-tempo}^{OUT}(t).$$

Ce dernier calcul permet d'obtenir la vraie valeur de la variance spatio-temporelle de la phase dans la cellule en s'affranchissant de fluctuation de la solution présente autour de la cellule.

Nous avons effectué plusieurs acquisitions : sans illumination laser (contrôle), avec une illumination laser ($\lambda_{laser} = 532nm$) à $P = 1kW/cm^2$ et à $P = 2kW/cm^2$. Nous avons regroupé chaque condition sur la figure 3.10. Ce graphe représente l'évolution de la variance spatio-temporelle de la phase au cours de l'acquisition. Les valeurs ont été normalisées par rapport à la valeur à $t = 0$ qui correspond au début de l'illumination laser. Chaque courbe représente la moyenne et l'écart-type des acquisitions faites pour une même condition.

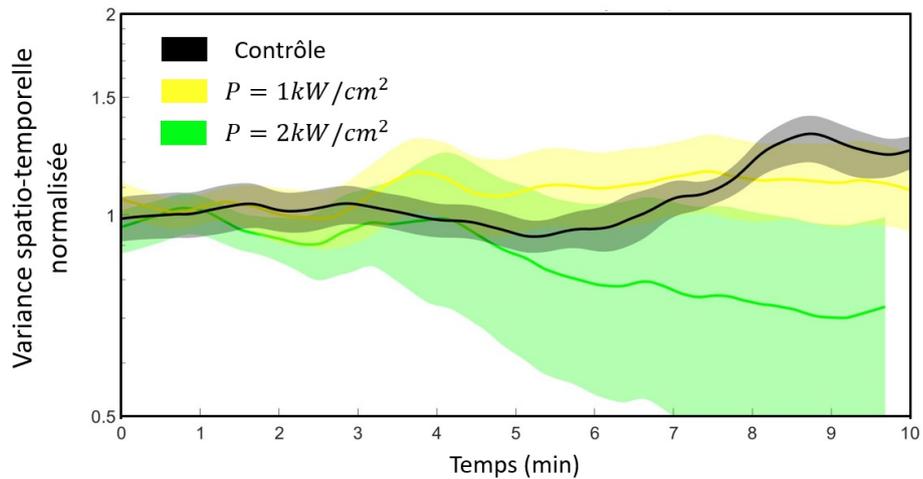


Figure 3.10 : Courbes des variances spatio-temporelles de la phase pour chaque condition (moyenne et écart-type) au cours du temps, pour 2 acquisitions de contrôle et 4 acquisitions pour chaque autre condition

Les acquisitions de contrôle sont similaires et présentent une fluctuation de phase régulière au cours du temps : les cellules vivent normalement. Pour une puissance laser $P = 1kW/cm^2$, les cellules sont peu affectées. La fluctuation de phase est plutôt régulière, cependant les acquisitions ne sont pas toutes similaires : l'écart-type sur toutes les acquisitions faites s'élargit au bout de quelques minutes. Pour une puissance laser $P = 2kW/cm^2$, les cellules sont largement affectées : les fluctuations de phase diminuent. Cependant l'écart-type sur les acquisitions montre que chaque cellule ne répond pas de manière identique : certaines vont rapidement subir une modification de la dynamique intracellulaire (en moins de 5 minutes), d'autre moins rapidement (9 - 10 minutes). Nous avons effectué un test de Kolmogorov-Smirnov pour évaluer la similitude entre ces différentes conditions (contrôle, $P = 1kW/cm^2$, $P = 2kW/cm^2$) au cours du temps. Le tableau en figure 3.11 donne le temps t_{diff} à partir duquel chaque condition diffère d'une autre, *i.e.* lorsque la valeur $p_{Kolmogorov-Smirnov}$ du test devient inférieure à 0.05. Si une trop forte puissance laser $P = 2kW/cm^2$ conduit à une modification importante de la dynamique cellulaire, une plus faible puissance $P = 1kW/cm^2$ affecte de façon limitée le bon fonctionnement de la cellule.

	$P = 1kW/cm^2$ vs Contrôle	$P = 2kW/cm^2$ vs Contrôle	$P = 2kW/cm^2$ vs $P = 1kW/cm^2$
t_{diff}	2min30s	1min	1min

Figure 3.11 : *Tableau donnant le temps auquel $p_{Kolmogorov-Smirnov} < 0.05$ lors de la comparaison entre chaque condition*

Les acquisitions pour cette étude ont été faites à une longueur d'onde $\lambda_{laser} = 532nm$ à laquelle les échantillons biologiques ont un grand taux d'absorption, il s'agit donc des conditions les moins favorables. Pour la suite nous utilisons un laser à $\lambda_{laser} = 630nm$, longueur d'onde beaucoup moins absorbée par le vivant. Nous avons vérifié que pour une puissance de $P = 1kW/cm^2$ les cellules n'étaient pas affectées par ce laser.

Toute cette étude montre qu'il est important de suivre l'évolution de l'environnement cellulaire lors d'une acquisition de super-résolution ou de super-localisation dans un échantillon vivant. L'imagerie de phase quantitative permet ce suivi. Nous allons voir que l'imagerie de phase quantitative permet aussi d'apporter de nouvelles informations sur l'échantillon et qu'il est intéressant de faire une analyse conjointe de la super-localisation et de la phase transmise par l'échantillon.

3.2.3 Étude morphologique cellulaire par changement de référentiel

Nous étudions ici le facteur de croissance (EGF) dans les cellules cancéreuses (A431). Nous avons vu plus haut que l'EGF a pour effet de faire croître la membrane de la cellule. Nous avons donc concentré notre étude sur la membrane cellulaire. Il s'agit de suivre l'évolution de la membrane au cours du temps grâce à l'imagerie de phase quantitative, tout en acquérant les détections de récepteurs EGFR nouvellement activés par l'accrochage de l'EGF grâce à la partie SELFI-uPAINT. Pour toutes les acquisitions, les images de phase ont été enregistrées à une fréquence de $1Hz$ et le temps d'exposition pour les détections de SELFI-uPAINT était de $t_{exp} = 50ms$.

Pour une analyse conjointe des deux modalités, nous avons fait une image de phase en lumière blanche de la même zone de l'échantillon sur les deux caméras. Il est effectivement possible de faire une telle image avec la modalité SELFI car comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de cette thèse, le réseau utilisé pour faire de l'imagerie de phase quantitative est très similaire à celui utilisé pour la technique SELFI. En assimilant la technique SELFI à un analyseur de front d'onde et en utilisant l'algorithme de traitement de l'interférogramme utilisé avec le SID4, nous pouvons obtenir une image de phase grâce à la modalité SELFI. Le produit de convolution entre les deux images ainsi obtenues donne le décalage réel d'une caméra par rapport à l'autre. Ce décalage, calculé avec une erreur inférieure à un demi pixel, a été pris en compte pour toute la suite de l'analyse.

L'objet de notre étude ici est l'évolution de la membrane cellulaire due à la présence d'EGF et la diffusion des récepteurs à l'EGF par rapport à cette membrane. Nous avons imaginé un changement de référentiel pour rendre l'analyse plus cohérente. J'ai donc mis au point et implémenté un algorithme permettant de passer de l'image d'une cellule *dans le référentiel du laboratoire*, que nous désignerons comme l'image laboratoire, à l'image de cette même cellule *dans le référentiel de sa membrane*, que nous désignerons comme l'image linéarisée. C'est à dire que nous faisons une linéarisation de la membrane cellulaire : on déroule le contour de la membrane pour qu'il devienne rectiligne. La figure 3.12 illustre ce changement de référentiel.

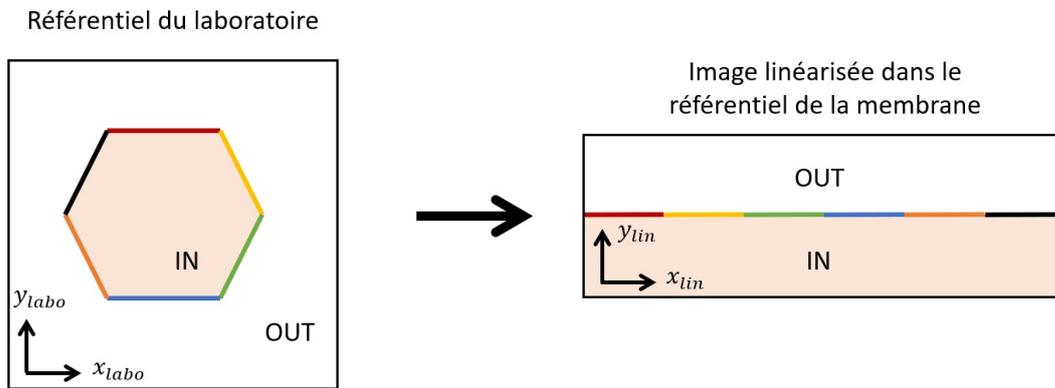


Figure 3.12 : Schéma illustrant le passage du référentiel du laboratoire au référentiel de la membrane cellulaire

Algorithme pour le changement de référentiel

Nous allons décrire dans cette partie le fonctionnement de l'algorithme de changement de référentiel entre *le référentiel du laboratoire* et *le référentiel de la membrane cellulaire*. La détection du contour de la membrane cellulaire se fait sur les images de phase quantitative. C'est grâce à la grande sensibilité vis à vis des variations de phase de ces images que nous sommes capables de donner précisément la position de la membrane à chaque instant t .

Nous faisons un suivi temporel de la membrane cellulaire : la position de la membrane est calculée à chaque instant t et elle nous sert de point de départ pour trouver la position de la membrane à l'instant $t + 1$. A l'instant $t = 0$ nous utilisons une segmentation basée sur la détection de contour dans une image.

La figure 3.13 décrit les grandes étapes de l'algorithme utilisé pour la linéarisation de la membrane.

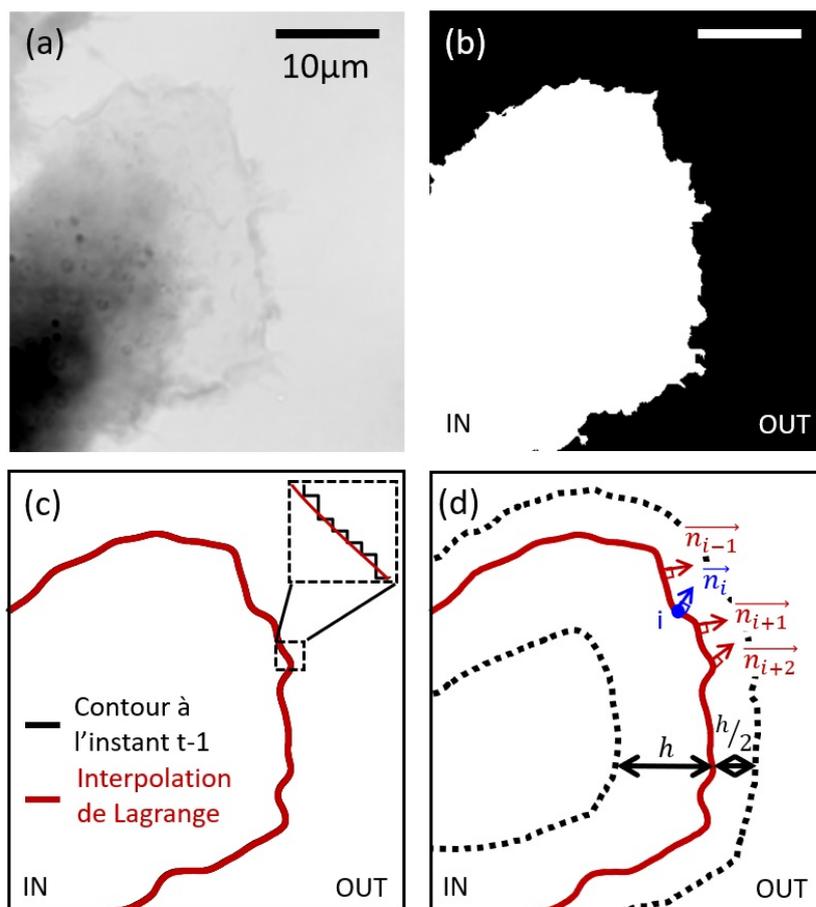


Figure 3.13 : Illustration des étapes de l'algorithme permettant le changement de référentiel : (a) image de phase de la cellule étudiée, image laboratoire ; (b) masque sur la cellule pour définir l'intérieur et l'extérieur de la cellule ; (c) interpolation de Lagrange sur le contour à $t - 1$; (d) calcul des vecteurs normaux à la membrane, définition des bornes (lignes pointillées) pour le calcul du changement de référentiel

A partir du contour de la membrane détecté à l'instant $t - 1$, nous effectuons une interpolation de Lagrange, de manière à s'affranchir de la pixelisation du contour dans l'image laboratoire [Fig 3.13(c)]. Puis le vecteur normal au contour est calculé en chaque point, ce vecteur donne la direction intérieure ou extérieure de la cellule [Fig 3.13(d)]. Nous choisissons une distance à la membrane h pour définir les bornes spatiales au-delà desquelles il n'est pas nécessaire d'étendre les calculs : seul le bord de la cellule nous intéresse dans cette étude.

Après cette étape nous avons un ensemble de points et de vecteurs : les points du contour de la membrane cellulaire ainsi que le vecteur normal correspondant et les points des bornes extérieure et intérieure pour le calcul de la linéarisation de l'image. A partir de ces points nous avons développé la fabrication de polygones définissant des régions per-

perpendiculaires à la membrane, de la même manière qu'un diagramme de Voronoï définit des régions d'influence. Comme illustré en figure 3.15(a) tous les polygones sont juxtaposés de manière à couvrir l'ensemble de la zone de l'image laboratoire sur laquelle nous souhaitons calculer l'image linéarisée. Ces polygones sont fabriqués en partant des points de la membrane et en calculant tous les points d'intersection entre deux droites voisines perpendiculaires à la membrane. La fabrication se fait de manière itérative [Fig 3.14] : parmi l'ensemble des points d'intersection, celui le plus proche d'un point de la membrane est choisi, cela ferme un polygone. Puis une nouvelle droite est calculée à partir des deux droites qui se sont intersectées. Et on recommence jusqu'à atteindre les bornes.

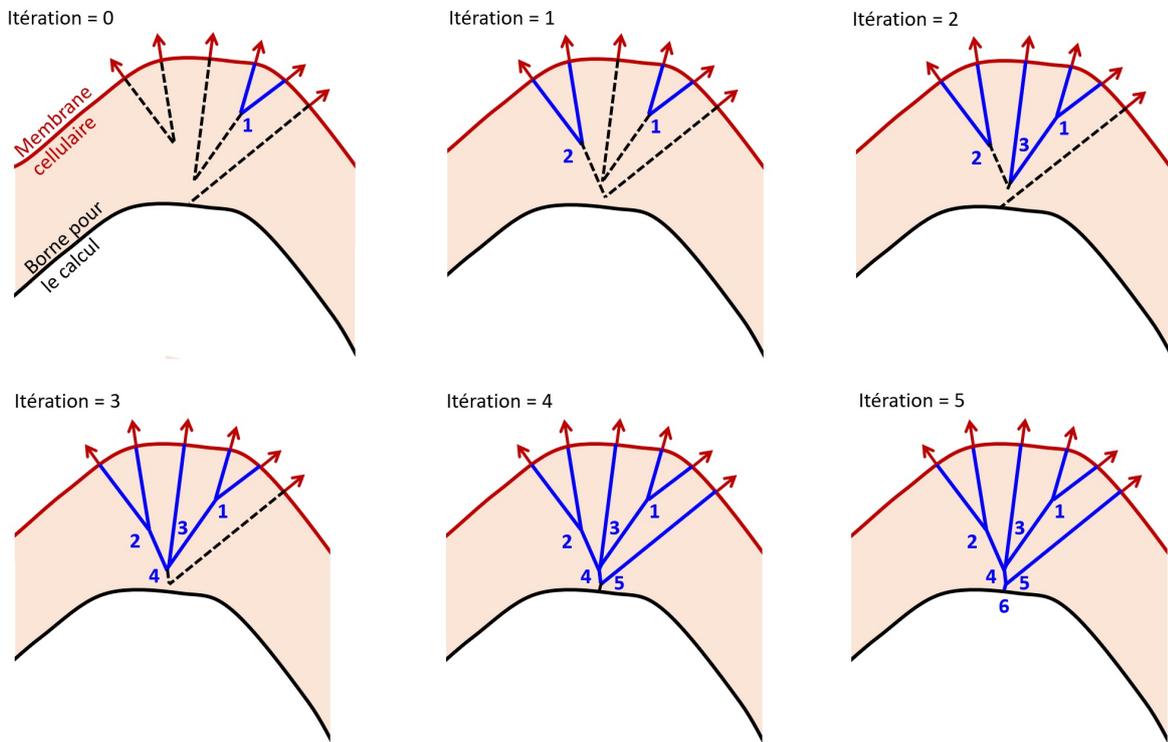


Figure 3.14 : *Illustration de la fabrication des polygones pour le changement de référentiel*

A chaque point de la membrane correspond donc un polygone. En chaque polygone nous faisons la moyenne des valeurs de phase selon des droites parallèles à la membrane. Cela donne une ligne de valeur de phase en chaque point de la membrane. Sur la figure 3.15(a) un polygone est colorié en bleu, il engendre la ligne bleue sur l'image 3.15(b) et correspond aux valeurs de phase représentées en 3.15(c). Toutes ces lignes contribuent à former l'image linéarisée du bord de la cellule 3.15(b).

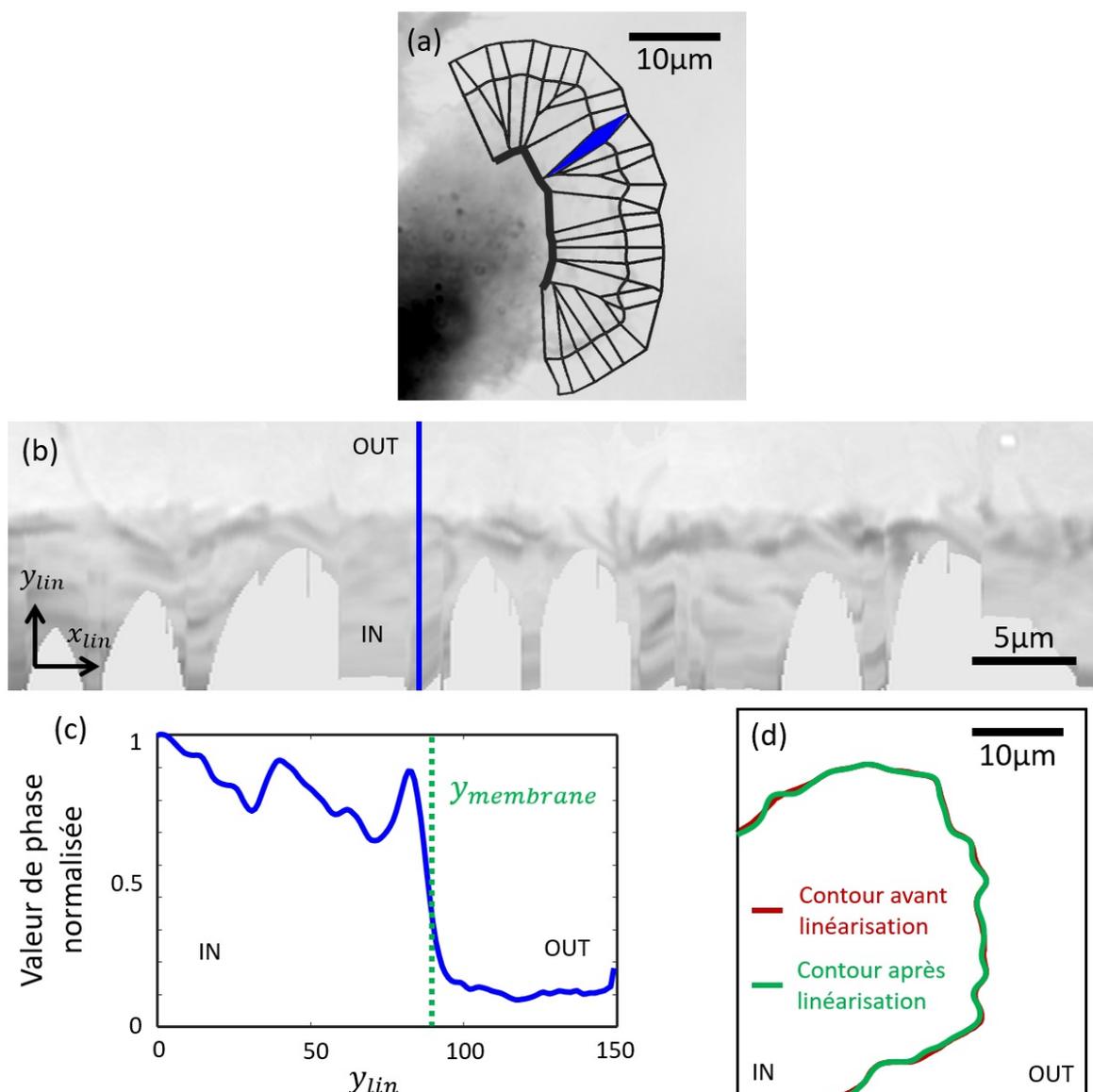


Figure 3.15 : (a) illustration des polygones fabriqués à partir de la membrane et des vecteurs normaux; (b) image de phase de la cellule dans le référentiel de la membrane cellulaire, image linéarisée; (c) valeur de la phase le long de la ligne bleue dans (b) permettant de connaître avec précision la position de la membrane; (d) contours de la membrane avant et après la linéarisation dans l'image laboratoire.

La dernière étape consiste à calculer avec précision la position de la membrane dans l'image linéarisée. Comme illustré en figure 3.15(c), pour chaque point x_{lin} de l'image linéarisée correspond un point de membrane. La position de la membrane y_{lin} se calcule facilement grâce à la courbe des valeurs de phase.

La position exacte du contour de la membrane peut donc être retrouvée à plus ou moins deux pixels, ce qui correspond à une précision de 200nm. Comme on le voit en figure 3.15(d) le contour s'est modifié un peu entre avant et après la linéarisation. Ce nouveau contour constitue le contour membranaire de la cellule à l'instant t et va être utilisé pour calculer le contour de la cellule à l'instant d'après $t + 1$.

Pour que les valeurs de phase quantitative soient conservées, cet algorithme a été construit de manière à être bijectif et à énergie constante. Pour valider cela, nous avons calculé l'erreur sur la conservation de l'énergie entre l'image laboratoire et l'image linéarisée. Cette erreur est calculée en prenant la différence entre la somme des valeurs de phase dans l'image laboratoire qui contribuent à la formation de l'image linéarisée et la somme des valeurs de phase dans la nouvelle image :

$$\varepsilon = \frac{\sum \varphi_{labo} - \sum \varphi_{lin}}{\sum \varphi_{labo}} = 13\%$$

L'erreur étant de 13% nous pouvons considérer que notre méthode est robuste.

Nous venons d'expliquer comment changer de référentiel pour effectuer une étude plus appropriée pour l'étude de la dynamique des récepteurs à l'EGF le long de la membrane cellulaire. Ce changement de référentiel est possible car nous utilisons l'imagerie de phase quantitative qui nous permet de détecter précisément le contour de la membrane cellulaire. Nous allons maintenant donner les résultats de l'analyse des détections dans ce nouveau référentiel.

3.2.4 Analyse corrélative des détections de super-localisation et des images de phase quantitative

La première chose que nous avons remarqué en superposant les détections de super-localisation sur les images de phase est que les récepteurs à l'EGF se trouvent proches du bord extrême de la membrane cellulaire. Grâce au changement de référentiel qui permet de localiser précisément la membrane nous avons quantifié la distance entre les récepteurs à l'EGF et le bord de la membrane. La figure 3.16 présente les résultats du calcul de cette distance. L'image 3.16(a) est l'image passe haut de la phase d'une cellule, à l'instant $t = 1min$ après ajout des protéines EGF. Nous y avons superposé les détections faites 5 secondes avant et 5 secondes après. Cela correspond à 2123 détections ayant un nombre de photons compris entre $N_{phot} = 200$ et $N_{phot} = 2000$.

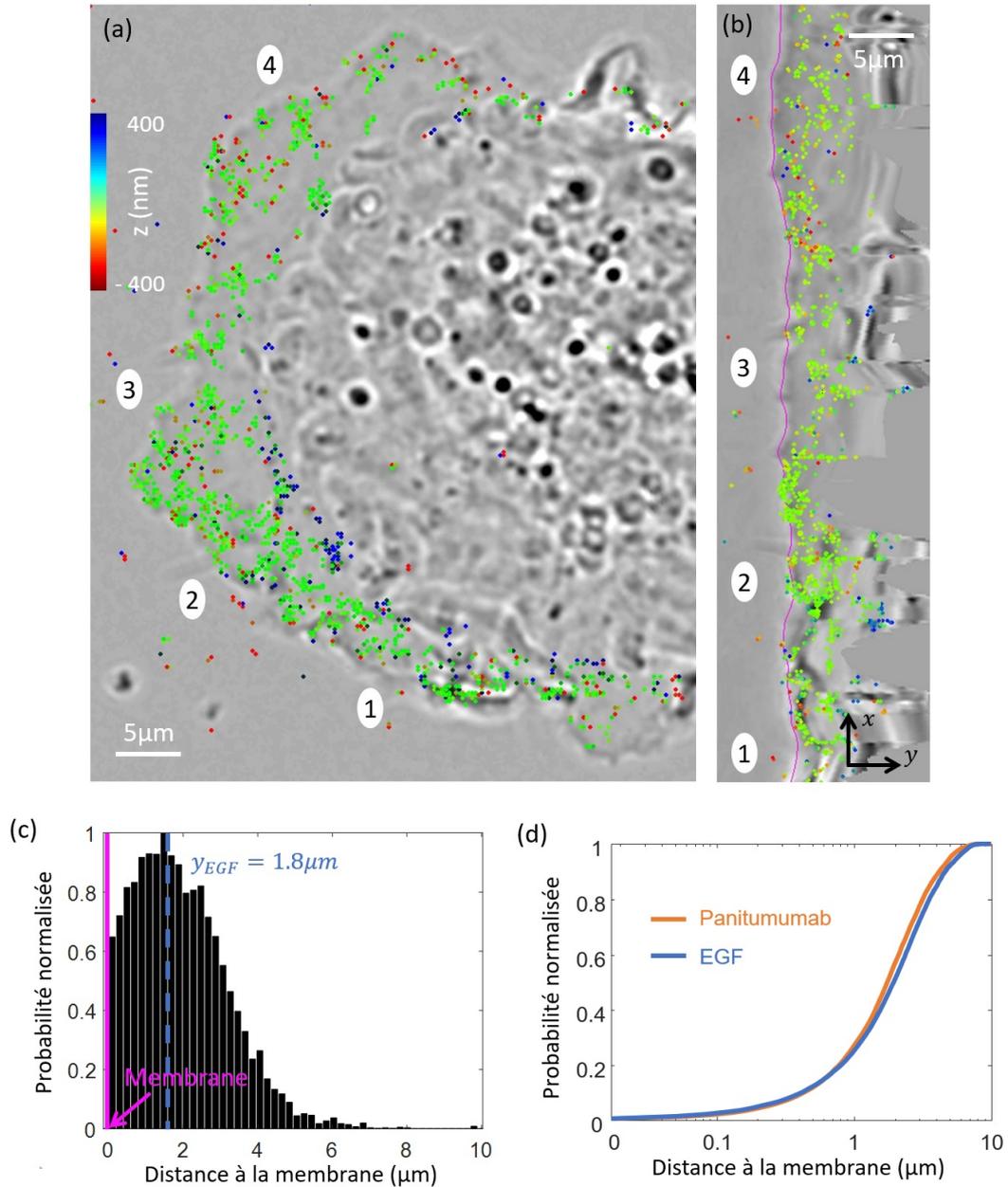


Figure 3.16 : Résultat de l'analyse conjointe des détections de super-localisation et des images de phase quantitative : (a) image de phase à laquelle est appliqué un filtre passe haut d'une cellule A431 à l'instant t sur laquelle les détections 3D d'EGF faites 5s avant et 5s après sont représentées, la couleur code la localisation axiale ; (b) même image que (a) dans le référentiel de la membrane cellulaire (représentée en violet) ; (c) histogramme des distances des localisations de l'EGF à la membrane cellulaire sur la totalité d'une acquisition ; (d) histogramme cumulatif des distances à la membrane pour l'EGF et le panitumumab

L'image linéarisée de la membrane de cette cellule est en figure 3.16(b). Des numéros ont été placés comme repères entre les deux images. Sur l'image dans le référentiel de la membrane cellulaire, nous avons représenté la position détectée de la membrane par la ligne violette. L'histogramme des distances entre les EGFR et la membrane est en figure 3.16(c). Cette histogramme tient compte de toutes les détections faites durant les 10 minutes d'acquisition. La membrane se trouve à $y = 0\mu m$, et la médiane révèle une position privilégiée pour les récepteurs à $y_{EGF} = 1.8 \pm 0.5\mu m$ de la membrane.

En figure 3.16(d) sont représentés les histogrammes cumulés des distances à la membrane pour les deux conditions testées : l'EGF et le panitumumab. Ces histogrammes sont semblables et révèlent que les récepteurs à l'EGF, activés ou non, sont préférentiellement situés à $y_{EGF} = 1.8 \pm 0.5\mu m$ et $y_{Panitumumab} = 1.7 \pm 0.3\mu m$ du bord de la membrane cellulaire, mais couvrent cependant $4\mu m$ du bord vers le centre de la cellule.

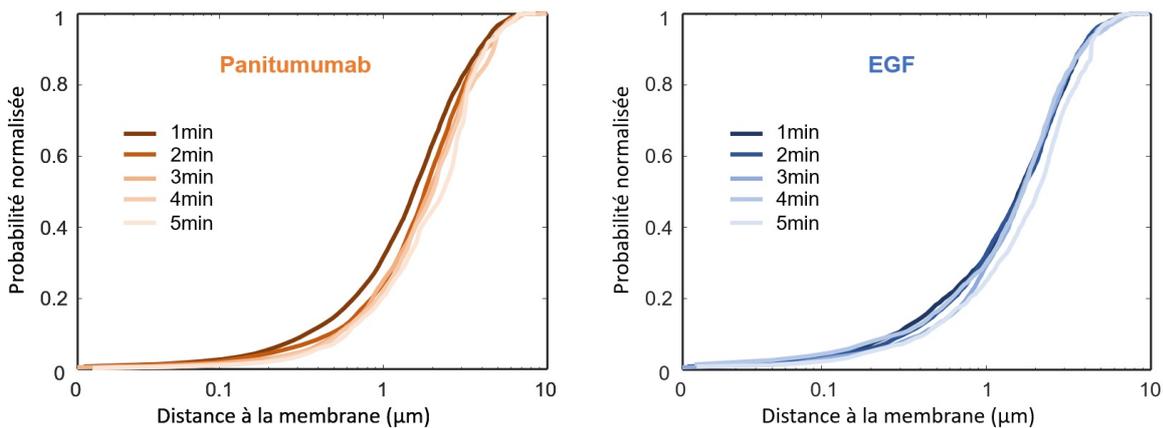


Figure 3.17 : *Histogrammes cumulés des distributions des distances à la membrane en fonction du temps pour l'EGF et le panitumumab*

Comme nous l'avons vu plus haut, nous nous intéressons à un phénomène membranaire très dynamique. Il est donc pertinent de regarder l'évolution de la position des EGFR par rapport au bord de la membrane au cours du temps. La figure 3.17 présente les histogrammes cumulatifs pour les 5 premières minutes d'acquisitions pour l'EGF et le panitumumab. On remarque que plus le temps avance, plus les localisations du panitumumab s'éloignent de la membrane. Au contraire, il n'y a pas de différences entre les distributions des distances à la membrane pour l'EGF avant la cinquième minute. Cette observation pourrait s'expliquer par le fait que le panitumumab, qui est un anticorps bloquant l'accroche de l'EGF, n'est pas internalisé par la cellule. Les récepteurs saturent au fur et à mesure. Alors que l'EGF est une protéine qui est internalisée par la cellule, les

récepteurs sont rapidement remplacés. Ce qui explique qu'ils ne soient pas saturés avant la cinquième minute.

Nous avons également effectué une analyse dynamique des récepteurs à l'EGF en étudiant leur diffusion lorsqu'il y a une activation provoquée par l'EGF et sans cette activation. A partir des localisations nous avons reconstitué les trajectoires de l'EGF et du panitumumab après leurs accroches aux récepteurs. Ces trajectoires ont été calculées dans le référentiel laboratoire. Puis nous avons calculé les coefficients de diffusion instantanée de ces trajectoires. Le graphe en figure 3.18 présente les histogrammes cumulatifs des coefficients de diffusion instantanés 2D et 3D pour l'EGF et le panitumumab. Les médianes de ces distributions sont :

$$D_{Panitumumab}^{2D} = 0.1\mu m^2/s \quad D_{Panitumumab}^{3D} = 0.08\mu m^2/s$$

$$D_{EGF}^{2D} = 0.5\mu m^2/s \quad D_{EGF}^{3D} = 0.3\mu m^2/s$$

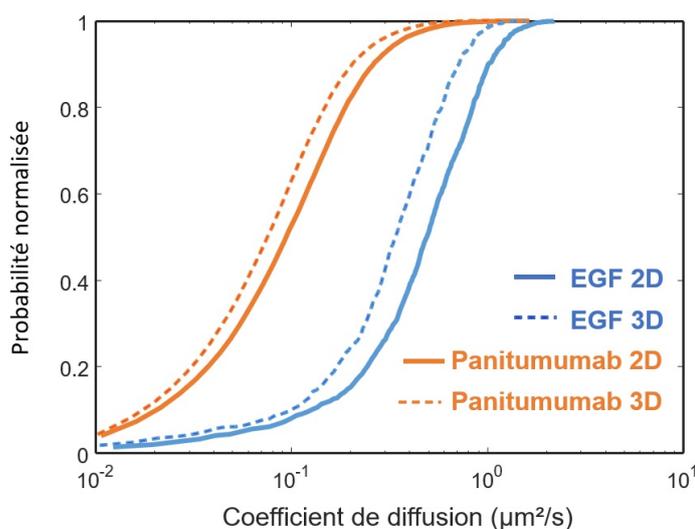


Figure 3.18 : *Histogramme cumulatif des distributions des coefficients de diffusion 2D et 3D de l'EGF et du panitumumab après leur accroche au récepteurs membranaires*

Les coefficients de diffusion instantanée que nous retrouvons sont conformes à ce que l'on trouve dans la littérature [85]. On remarque que les récepteurs diffusent quatre à cinq fois plus vite après l'accroche de l'EGF qu'après l'accroche de l'anticorps panitumumab. Cela peut confirmer que le panitumumab est un anticorps qui bloque le comportement natif des récepteurs activés.

[85] Winckler, *Scientific Reports*, 2013

Un autre effet visible sur ces graphes est la différence entre la diffusion calculée dans le plan (xy) et celle calculée en 3D : la diffusion 3D est moins rapide que la diffusion en 2D. Cette observation peut s'expliquer par l'internalisation du récepteur membranaire. Mais cela peut aussi être dû, comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, au fait que le montage optique privilégie les objets ayant une diffusion anisotrope.

Comme nous avons un outil permettant de mesurer la distance d'une molécule au bord de la membrane cellulaire, nous avons regardé l'évolution du coefficient de diffusion instantanée 3D en fonction de cette distance. La figure 3.19 présente les résultats de cette étude. Il n'y a aucune différence de diffusion pour l'anticorps panitumumab qu'il soit proche ou loin de la membrane cellulaire. En revanche, les récepteurs auxquels l'EGF s'est accroché ont une diffusion plus rapide sur les deux premiers microns du bord de la cellule.

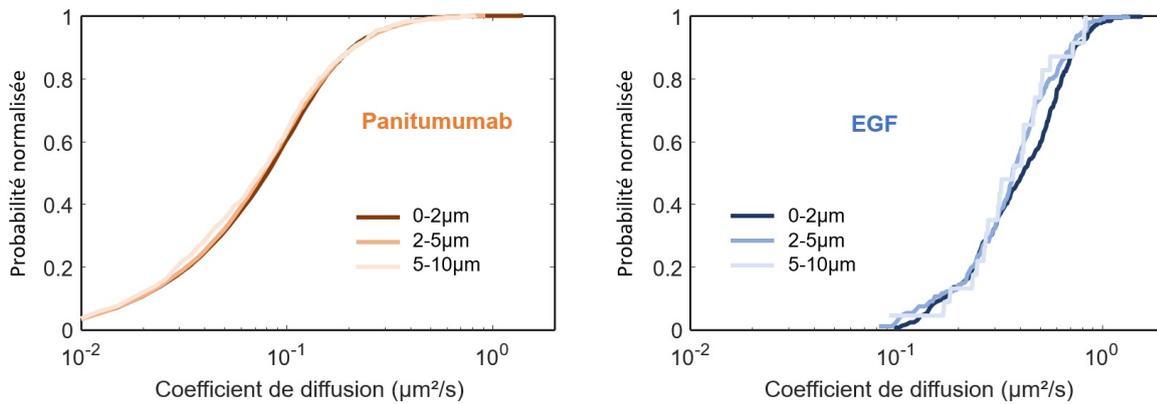


Figure 3.19 : *Histogrammes cumulés des distributions des coefficients de diffusion 3D en fonction de la distance entre la trajectoire et la membrane cellulaire pour l'EGF et le panitumumab*

Cette étude révèle qu'il est important en microscopie de super-localisation de suivre l'évolution de l'échantillon au cours des acquisitions. Nous avons montré que l'imagerie de phase quantitative permet non seulement de faire ce suivi, mais permet en plus d'apporter de nouvelles informations sur l'échantillon. Une analyse corrélative des détections de super-localisation et des images de phase de l'échantillon permet d'obtenir des informations inaccessibles sans cette complémentarité.

Conclusion

Tout au long de ce chapitre nous avons montré la pertinence de la technique SELFIE pour l'étude de la dynamique au sein d'échantillons vivants et complexes.

Par le suivi de nanoparticules uniques insérées dans l'espace extracellulaire de tranches de cerveau vivantes, nous avons vu que nous pouvons analyser différents comportements de diffusion jusqu'à $50\mu m$ de profondeur dans l'échantillon. Cela étant possible, de nouveaux projets pourraient voir le jour en fonctionnalisant les nanoparticules pour sonder le comportement d'une protéine ou d'une molécule spécifique. Par exemple, dans la continuité de l'étude des récepteurs synaptiques NMDA vu au chapitre 2, la différence de dynamique entre le GluN2A et le GluN2B pourrait être explorée au sein d'échantillons proches de l'*in vivo*. La dynamique des récepteurs NMDA a déjà été étudiée, mais seulement sur des échantillons de neurones en culture [89] [90].

Cependant nous avons mis en évidence une limitation du montage optique SELFIE actuel : le volume étudié est limité par la profondeur de champ de l'objectif ($1\mu m$). Il pourrait être intéressant d'implémenter le multiplan sur le montage optique [91]. Ou bien, de développer une manière de s'accrocher sur la molécule étudiée pour qu'elle soit constamment proche du plan de mise au point et qu'on puisse suivre sa dynamique. Cela pourrait être possible sur le montage optique utilisé au cours de cette thèse grâce à la deuxième modalité du montage qui permet de faire de l'imagerie de phase quantitative.

La dernière partie de ce chapitre a été consacrée à un travail original montrant qu'il est important de prendre en compte la dynamique morphologique de l'échantillon biologique en temps réel lors du suivi de molécules uniques dans des échantillons vivants. Et pour cela nous avons utilisé les deux modalités présentes sur le montage : la modalité SELFIE et l'imagerie de phase quantitative. Et nous avons développé un algorithme permettant de faire une analyse corrélative entre les images de phase et les détections de molécules uniques.

Cet algorithme est spécifique à des études faites sur la membrane cellulaire. Cependant nous avons montré qu'il est possible d'obtenir de nouvelles informations pertinentes sur l'échantillon étudié en effectuant l'analyse des détections dans un référentiel adapté à l'étude.

[89] Groc, *Nature Neuroscience*, 2004

[90] Groc, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006

[91] Hajj, *Biomed. Opt. Express*, 2016

Conclusion & Perspectives

Le travail décrit dans ce manuscrit a permis de montrer que grâce à la technique SELFI, il est possible de faire des images de super-résolution 3D et du suivi de molécules uniques, avec une précision de localisation d'une dizaine de nanomètres, jusqu'au moins $50\mu m$ de profondeur dans des tissus biologiques denses, complexes et épais d'une centaine de microns.

Le principe et le fonctionnement de cette technique ont été décrits : le signal de fluorescence diffracte en passant au travers d'un réseau de diffraction placé en sortie du microscope, les ordres selon les deux directions x et y interfèrent ensuite en se superposant sur le détecteur. Les interférences ainsi obtenues viennent structurer la PSF tout en conservant un sur-étalement spatial minimal. Selon une approximation au premier ordre, le signal d'interférence obtenu sur la caméra est achromatique, ce qui est essentiel lorsque l'on s'intéresse à une source étendue spectralement comme l'est un émetteur fluorescent. L'information sur la localisation axiale d'un émetteur fluorescent est extraite à partir de la comparaison de la transformée de Fourier de l'interférogramme à une calibration de PSF-SELFI. La localisation latérale, quant à elle, est retrouvée en ajustant l'intensité de la PSF-SELFI par une fonction gaussienne bidimensionnelle.

L'erreur faite lors de la localisation 3D d'une molécule unique a été calculée théoriquement et expérimentalement. La limite théorique de la précision de localisation, donnée par la bande de Cramèr-Rao, est de $\sigma_{xy} = 6nm$ et $\sigma_z = 12nm$ en $z = 0\mu m$, pour une molécule émettant $N_{phot} = 1000$ photons. Expérimentalement la précision de localisation obtenue pour le même nombre de photons est de $\sigma_{xy} = 11nm$ et $\sigma_z = 22nm$ pour $z_{depth} = 0\mu m$, et à une profondeur $z_{depth} = 40\mu m$ nous obtenons $\sigma_{xy} = 16nm$ et $\sigma_z = 32nm$. Nous avons observé que la précision et la justesse de localisation axiale restent inférieures à $45nm$ jusqu'à $40\mu m$ de profondeur dans l'échantillon.

En combinant la méthode SELFI à différentes techniques de super-résolution (PALM, dSTORM et uPAINT), nous avons montré que cette méthode de localisation tridimensionnelle permet de retrouver la hiérarchie et l'organisation de protéines dans des cellules

vivantes. Nous avons mis en évidence la robustesse de la technique SELFI en reconstruisant des images de super-résolution 3D de structures denses en profondeur dans des échantillons tissulaires complexes. C'est parce que la méthode SELFI est peu sensible aux aberrations présentes dans l'échantillon qu'il est possible de faire du suivi de particules uniques en 3D jusqu'à $50\mu m$ de profondeur dans des échantillons complexes, comme par exemple dans des tranches de cerveau.

L'application de la technique SELFI à la détection de récepteurs postsynaptiques NMDA a permis de mettre en évidence une différence d'organisation entre les deux sous-unités GluN2A et GluN2B de ce récepteur au glutamate. Cette différence d'organisation a été observée sur des échantillons de neurones en culture primaire, mais aussi au sein de tranches organotypiques de cerveaux de rats.

Enfin, nous avons montré l'importance de suivre l'évolution de l'environnement des échantillons biologiques vivants lors des acquisitions de détectons de molécules. Grâce à l'utilisation additionnelle et simultanée de l'imagerie de phase quantitative, nous avons pu étudier la dynamique de la membrane cellulaire après activation par un facteur de croissance. L'analyse corrélative entre les images de phase quantitative en lumière blanche et les détectons de molécules fluorescentes uniques permet d'obtenir de nouvelles informations pertinentes sur l'échantillon étudié.

La technique SELFI repose sur l'utilisation d'un réseau de diffraction placé en sortie de microscope. La simplicité du montage nous a permis de combiner la méthode SELFI à différentes techniques d'illumination de l'échantillon. Au cours de cette thèse nous avons utilisé l'épifluorescence, l'illumination oblique et la configuration en réflexion totale (*Total Internal Illumination Fluorescence - TIRF*) [70]. L'illumination de l'échantillon en épifluorescence, utilisée pour faire du SELFI-dSTORM, permet d'envoyer une très forte puissance laser sur l'échantillon au détriment du rapport signal à bruit. Comme l'échantillon est excité dans toute son épaisseur il y a un fort bruit de fond. Grâce à l'illumination oblique nous avons pu diminuer ce bruit de fond et ainsi effectuer du SELFI-uPAINT. Pour pouvoir réaliser du SELFI-PALM, nous avons utilisé la configuration TIRF. Cette configuration d'illumination réduit considérablement le bruit de fond car seules les molécules fluorescentes localisées à une distance de la lamelle inférieure à la longueur d'onde sont excitées. La technique d'illumination qui n'a pas été exploitée durant mes trois années de thèse est la sélection d'un seul plan d'imagerie (*Single Plane Illumination Microscopy - SPIM*) [74]. Une lentille cylindrique, placée sur le chemin du faisceau d'excitation, per-

[70] Axelrod, *The Journal of Cell Biology*, 1981

[74] Huisken, *Science*, 2004

met de focaliser le faisceau selon une seule direction et ainsi former une *feuille de lumière* dans l'échantillon. De cette manière seul le plan imagé par la détection est illuminé. Le SPIM permet de sélectionner n'importe quel plan, situé à z_{depth} , d'un échantillon épais pour en faire l'imagerie.

L'équipe de J.B.Sibarita à l'Institut Interdisciplinaire de Neurosciences (IINS, Bordeaux) a développé une manière de créer cette feuille de lumière dans l'échantillon en utilisant le même objectif que pour la détection de la fluorescence [92]. Il pourrait être pertinent de combiner la technique SELFI à cette technique, nommée soSPIM, afin de réaliser des images de super-résolution 3D ou bien du suivi de molécules uniques au sein d'échantillon tissulaire en réduisant considérablement le bruit de fond dû à la fluorescence en dehors du plan de mise au point.

Au cours des différents projets de cette thèse, nous avons été confrontés à certaines limitations inhérentes à l'imagerie de molécules individuelles, en particulier dans les tissus biologiques. Notamment lors du projet en collaboration avec le groupe de L.Groc à l'Institut de Neurosciences de Bordeaux sur les récepteurs synaptiques, nous avons vu qu'il serait pertinent de pouvoir détecter deux récepteurs différents présents au même endroit dans un même échantillon. Cela permettrait, en co-localisant ou non ces récepteurs, de mieux comprendre leur organisation. Pour ce faire, nous avons déjà évoqué le dSTORM multicolore [79] qui rend possible des acquisitions successives de dSTORM avec des fluorophores différents. Si, dans cette thèse, nous n'avons pas réussi à trouver la solution tampon permettant d'obtenir le clignotement de différentes molécules fluorescentes dans un même échantillon, nous avons montré que la technique SELFI peut être utilisée avec des fluorophores émettant à différentes longueur d'onde ($\lambda_{mEOS} = 580nm$ et $\lambda_{A647} = 647nm$).

Il existe aussi, pour faire du multicolore, la technique du DNA-PAINT [93] basée sur le principe du PAINT [6]. Chaque protéine étudiée est marquée par un premier anticorps relié à un brin d'ADN bien défini. Puis lors de l'acquisition, l'échantillon est mis dans une solution contenant le fluorophore couplé au brin d'ADN complémentaire à la première protéine étudiée. Après quelques minutes d'acquisition la solution est rincée puis remplacée par une autre solution contenant un fluorophore couplé au brin d'ADN complémentaire à la deuxième protéine. Et ainsi de suite, la solution peut être rincée autant de fois qu'il y a de protéines à étudier. De plus la même molécule fluorescente peut être

[92] Galland, *Nature Methods*, 2015

[79] Nahidiazar, *Plos One*, 2016

[93] Jungmann, *Nature Methods*, 2014

[6] Sharonov, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006

utilisée tout au long des acquisitions ce qui simplifie le montage optique. Cependant, travailler dans des échantillons épais d'une centaine de microns (comme par exemple des tranches de cerveaux) nécessite de long temps de rinçage.

Ces méthodes, combinées au montage SELFI permettraient de faire des images de super-résolution 3D multicolore en profondeur dans des échantillons biologiques statiques. Un développement de la technique SELFI elle-même pourrait rendre cela envisageable dans des échantillons vivants et dynamiques. En effet, lors du calcul de l'interférogramme obtenu sur la caméra (effectué au premier chapitre de ce manuscrit), nous avons vu que la technique SELFI est achromatique. Cependant ce résultat est obtenu en ayant fait l'approximation que seuls les ordres de diffraction +1 et -1 contribuent à la formation de l'interférogramme. Il pourrait être intéressant d'effectuer ce calcul en tenant compte de tous les ordres. En connaissant la dépendance de l'interférogramme vis à vis de la longueur d'onde nous pourrions réaliser une imagerie simultanée à plusieurs couleurs en distinguant spectralement les molécules fluorescentes.

Dans la continuité du suivi 3D de particules uniques effectué au cours de ce travail de thèse un autre développement du montage SELFI est envisageable. En effet, comme nous l'avons vu dans le chapitre 3 de ce manuscrit, la technique SELFI permet de suivre en 3D la dynamique d'une molécule unique située en profondeur dans l'échantillon. Mais ce suivi est limité par la profondeur de champ de l'objectif du microscope. Le volume de l'échantillon qui peut être observé étant limité ($\sim 40\mu m \times 40\mu m \times 1\mu m$) certains comportements de diffusion anisotrope sont privilégiés, ce qui peut biaiser l'étude de la dynamique moléculaire. Pour étendre la profondeur de champ nous pourrions effectuer une imagerie multiplane [32] [30] [91]. En imageant simultanément différents plans espacés de quelques centaines de nanomètres, il est possible de suivre la diffusion d'une particule sur plusieurs microns.

La limitation du montage SELFI due à la profondeur de champ de l'objectif peut aussi être compensée en faisant une mise au point automatique, c'est à dire un asservissement, sur la particule que l'on souhaite suivre. Cette implémentation sur le montage SELFI ne devrait pas poser de problème car un asservissement similaire, utilisant l'imagerie de phase quantitative, a été utilisé pour compenser les dérives axiales du microscope.

Jusqu'à présent nous avons considéré la technique SELFI comme moyen de localiser des objets fluorescents ponctuels. Avec cette technique il devrait être possible de localiser

[32] Abrahamsson, *Nature Methods*, 2012

[30] Geissbuehler, *Nature Communications*, 2014

[91] Hajj, *Biomed. Opt. Express*, 2016

des nano-objets de morphologie plus complexe, par exemple des nanotubes de carbone fluorescents. Ces objets sont unidimensionnels et sont actuellement utilisés pour étudier la structure dynamique de tissus complexes, comme le cerveau [94], à des échelles nanométriques. Pour ces études la super-localisation tridimensionnelle serait très intéressante. Cependant, l'interférogramme généré par la fluorescence de tels nano-objets unidimensionnels est plus complexe à analyser. Ce travail fait l'objet d'une étude actuelle dans notre groupe.

Après trois années de travail sur ce sujet, je suis persuadée que la technique SELFIE, par sa mise en œuvre simple, trouvera de nombreuses applications parmi différents projets de microscopie de super-résolution dans les milieux biologiques complexes.

[94] Godin, *Nature Nanotechnology*, 2016

ANNEXE A : Calcul de l'interférogramme 2D

Le calcul détaillé dans cette annexe explicite l'obtention de l'équation 1.8 de l'interférogramme bidimensionnel (p.27). Les notations utilisées sont celles du chapitre 1.

$$I(x, y) = \left| \frac{E(x+s/2, y+s/2)}{2} + \frac{E(x-s/2, y+s/2)}{2} + \frac{E(x+s/2, y-s/2)}{2} + \frac{E(x-s/2, y-s/2)}{2} \right|^2$$

$$= \left| \begin{aligned} & \frac{a(x+s/2, y+s/2)}{2} e^{ik_0 \varphi((x+s/2, y+s/2) + i\vec{k}_{--} \cdot \vec{r})} \\ & + \frac{a(x-s/2, y+s/2)}{2} e^{ik_0 \varphi((x-s/2, y+s/2) + i\vec{k}_{+-} \cdot \vec{r})} \\ & + \frac{a(x+s/2, y-s/2)}{2} e^{ik_0 \varphi((x+s/2, y-s/2) + i\vec{k}_{-+} \cdot \vec{r})} \\ & + \frac{a(x-s/2, y-s/2)}{2} e^{ik_0 \varphi((x-s/2, y-s/2) + i\vec{k}_{++} \cdot \vec{r})} \end{aligned} \right|^2$$

où

$$\vec{k}_{++} = k_0 \begin{pmatrix} \sin(\xi) \\ \sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}, \quad \vec{k}_{+-} = k_0 \begin{pmatrix} \sin(\xi) \\ -\sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix},$$

$$\vec{k}_{-+} = k_0 \begin{pmatrix} -\sin(\xi) \\ \sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}, \quad \vec{k}_{--} = k_0 \begin{pmatrix} -\sin(\xi) \\ -\sin(\xi) \\ \cos(\xi) \end{pmatrix}.$$

$$\begin{aligned}
 I(x, y) = & \frac{a^2(x+s/2, y+s/2) + a^2(x+s/2, y-s/2) + a^2(x-s/2, y+s/2) + a^2(x-s/2, y-s/2)}{4} \\
 & + \frac{a(x+s/2, y+s/2)a(x+s/2, y-s/2)}{2} \cos \left[\begin{array}{l} k_0 (\varphi(x+s/2, y+s/2) - \varphi(x+s/2, y-s/2)) \\ + (\vec{k}_{--} - \vec{k}_{-+}) \cdot \vec{r} \end{array} \right] \\
 & + \frac{a(x+s/2, y+s/2)a(x-s/2, y-s/2)}{2} \cos \left[\begin{array}{l} k_0 (\varphi(x+s/2, y+s/2) - \varphi(x-s/2, y-s/2)) \\ + (\vec{k}_{--} - \vec{k}_{++}) \cdot \vec{r} \end{array} \right] \\
 & + \frac{a(x+s/2, y+s/2)a(x-s/2, y+s/2)}{2} \cos \left[\begin{array}{l} k_0 (\varphi(x+s/2, y+s/2) - \varphi(x-s/2, y+s/2)) \\ + (\vec{k}_{--} - \vec{k}_{+-}) \cdot \vec{r} \end{array} \right] \\
 & + \frac{a(x-s/2, y+s/2)a(x+s/2, y-s/2)}{2} \cos \left[\begin{array}{l} k_0 (\varphi(x-s/2, y+s/2) - \varphi(x+s/2, y-s/2)) \\ + (\vec{k}_{+-} - \vec{k}_{-+}) \cdot \vec{r} \end{array} \right] \\
 & + \frac{a(x-s/2, y+s/2)a(x-s/2, y-s/2)}{2} \cos \left[\begin{array}{l} k_0 (\varphi(x-s/2, y+s/2) - \varphi(x-s/2, y-s/2)) \\ + (\vec{k}_{+-} - \vec{k}_{++}) \cdot \vec{r} \end{array} \right] \\
 & + \frac{a(x+s/2, y-s/2)a(x-s/2, y-s/2)}{2} \cos \left[\begin{array}{l} k_0 (\varphi(x+s/2, y-s/2) - \varphi(x-s/2, y-s/2)) \\ + (\vec{k}_{-+} - \vec{k}_{++}) \cdot \vec{r} \end{array} \right]
 \end{aligned}$$

En écrivant le développement de Taylor de la fonction $\varphi(x, y)$:

$$\varphi(x + \varepsilon, y + \varepsilon) = \varphi(x, y) + \varepsilon \frac{\partial \varphi}{\partial x} + \varepsilon \frac{\partial \varphi}{\partial y},$$

on a :

$$\left\{ \begin{array}{l} \varphi(x + s/2, y + s/2) - \varphi(x + s/2, y - s/2) = \varphi(x - s/2, y + s/2) - \varphi(x - s/2, y - s/2) \\ \hspace{10em} = s \frac{\partial \varphi}{\partial y}, \\ \varphi(x + s/2, y + s/2) - \varphi(x - s/2, y + s/2) = \varphi(x + s/2, y - s/2) - \varphi(x - s/2, y - s/2) \\ \hspace{10em} = s \frac{\partial \varphi}{\partial x}, \\ \varphi(x + s/2, y + s/2) - \varphi(x - s/2, y - s/2) = s \frac{\partial \varphi}{\partial(x+y)}, \\ \varphi(x + s/2, y - s/2) - \varphi(x - s/2, y + s/2) = s \frac{\partial \varphi}{\partial(x-y)}. \end{array} \right.$$

De plus :

$$\left\{ \begin{array}{l} \vec{k}_{++} - \vec{k}_{+-} = \vec{k}_{-+} - \vec{k}_{--} = 2k_0 \sin(\xi) \vec{y}, \\ \vec{k}_{++} - \vec{k}_{-+} = \vec{k}_{+-} - \vec{k}_{--} = 2k_0 \sin(\xi) \vec{x}, \\ \vec{k}_{++} - \vec{k}_{--} = 2k_0 \sin(\xi) (\vec{x} + \vec{y}), \\ \vec{k}_{+-} - \vec{k}_{-+} = 2k_0 \sin(\xi) (\vec{x} - \vec{y}). \end{array} \right.$$

Donc

$$\begin{aligned} I(x, y) = & I_0 + I_x \cos \left(2k_0 \sin(\xi) x - k_0 s \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) \\ & + I_y \cos \left(2k_0 \sin(\xi) y - k_0 s \frac{\partial \varphi}{\partial y} \right) \\ & + I_{x+y} \cos \left(2k_0 \sin(\xi) (x + y) - k_0 s \frac{\partial \varphi}{\partial (x + y)} \right) \\ & + I_{x-y} \cos \left(2k_0 \sin(\xi) (x - y) - k_0 s \frac{\partial \varphi}{\partial (x - y)} \right), \end{aligned}$$

avec

$$\left\{ \begin{array}{l} I_0 = \frac{a^2(x+s/2, y+s/2) + a^2(x-s/2, y+s/2) + a^2(x+s/2, y-s/2) + a^2(x-s/2, y-s/2)}{4} \\ I_x = \frac{a(x+s/2, y+s/2)a(x-s/2, y+s/2) + a(x+s/2, y-s/2)a(x-s/2, y-s/2)}{2} \\ I_y = \frac{a(x+s/2, y+s/2)a(x+s/2, y-s/2) + a(x-s/2, y+s/2)a(x-s/2, y-s/2)}{2} \\ I_{x+y} = \frac{a(x+s/2, y+s/2)a(x-s/2, y-s/2)}{2} \\ I_{x-y} = \frac{a(x+s/2, y-s/2)a(x-s/2, y+s/2)}{2} \end{array} \right.$$

D'après la loi des réseaux : $\sin(\xi) = \frac{\lambda_0}{p}$. Et on a de manière géométrique $\sin(\xi) \approx \tan(\xi) = \frac{s}{2z_d}$. Donc

$$\begin{aligned} I(x, y) = & I_0 + I_x \cos \left(\frac{4\pi}{p} \left(x - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial x} \right) \right) \\ & + I_y \cos \left(\frac{4\pi}{p} \left(y - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial y} \right) \right) \\ & + I_{x+y} \cos \left(\frac{4\pi}{p} \left((x + y) - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial (x + y)} \right) \right) \\ & + I_{x-y} \cos \left(\frac{4\pi}{p} \left((x - y) - z_d \frac{\partial \varphi}{\partial (x - y)} \right) \right). \end{aligned}$$

ANNEXE B : Calcul des dérivées de la PSF obtenue avec la lentille cylindrique

Dans cette annexe je détaille le calcul des dérivées de la PSF obtenue en présence de la lentille cylindrique sur le montage. Ces dérivées sont utilisées lors du calcul de la bande de Cramer-Rao pour la méthode de la mise en forme de la PSF par astigmatisme (p.46).

La PSF obtenue avec la méthode 3D de la lentille cylindrique peut être ajustée par une fonction gaussienne elliptique :

$$G(x, y, z) = A \exp \left(-\frac{(x - x_0)^2}{2w_x^2} - \frac{(y - y_0)^2}{2w_y^2} \right) + B,$$

où

$$w_x = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z - c}{d}\right)^2 + a \left(\frac{z - c}{d}\right)^3 + b \left(\frac{z - c}{d}\right)^4},$$

$$\text{et } w_y = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z + c}{d}\right)^2 + a \left(\frac{z + c}{d}\right)^3 + b \left(\frac{z + c}{d}\right)^4}.$$

Les dérivées latérales se calculent facilement :

$$\frac{\partial G}{\partial x} = \frac{A}{w_x^2} (x - x_0) e^{\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2w_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2w_y^2}\right)}$$

$$\frac{\partial G}{\partial y} = \frac{A}{w_y^2} (y - y_0) e^{\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2w_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2w_y^2}\right)}$$

En ne tenant pas compte des termes des ordres supérieurs à l'ordre 3 :

$$w_x = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2} \quad \text{et} \quad w_y = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z+c}{d}\right)^2},$$

dont les dérivées par rapport à z sont :

$$\frac{\partial w_x}{\partial z} = w_0 \frac{z-c}{d \sqrt{1 + \left(\frac{z-c}{d}\right)^2}} \quad \text{et} \quad \frac{\partial w_y}{\partial z} = w_0 \frac{z+c}{d \sqrt{1 + \left(\frac{z+c}{d}\right)^2}}.$$

Donc :

$$\frac{\partial G}{\partial z} = \frac{Aw_0^2}{d^2} \left(\frac{(x-x_0)^2(z-c)}{w_x^4} + \frac{(y-y_0)^2(z+c)}{w_y^4} \right) e^{\left(-\frac{(x-x_0)^2}{2w_x^2} - \frac{(y-y_0)^2}{2w_y^2}\right)}.$$

ANNEXE C : Formation d'une image de phase quantitative grâce à l'interféromètre SID4

La génération d'interférence à quatre ondes se fait grâce à un masque de Hartmann modifié (p.53). Cette annexe présente la formation et l'analyse de l'interférogramme ainsi obtenu.

De même que sur le montage SELFI, les répliques générées par le réseau vont interférer en se superposant sur la caméra. Pour une onde plane incidente

$$E_{in}(r) = A_0(r)exp(-i \vec{k} \cdot \vec{r} - i\varphi_0(r)),$$

d'amplitude A_0 et de phase $\varphi_0(r)$, l'onde transmise par l'échantillon devient

$$E_{trans}(r) = A(r)exp(-i \vec{k} \cdot \vec{r} - i\varphi_0(r) - i\varphi_{OPD}(r)),$$

avec une amplitude $A(r)$ et une phase $\varphi_{OPD}(r)$ décrivant la différence de chemin optique induite par l'échantillon [Fig 1.29(a)].

L'interférogramme obtenu sur le détecteur est le suivant [53] :

$$I(x, y) = I_0 \left[\begin{array}{l} 1 + \cos \left(\frac{2\pi}{p} \left(x + z_d \frac{\partial \varphi_{OPD}}{\partial x} \right) \right) \\ + \cos \left(\frac{2\pi}{p} \left(y + z_d \frac{\partial \varphi_{OPD}}{\partial y} \right) \right) \\ + \cos \left(\frac{2\pi}{p} \left((x + y) + z_d \frac{\partial \varphi_{OPD}}{\partial (x+y)} \right) \right) \\ + \cos \left(\frac{2\pi}{p} \left((x - y) + z_d \frac{\partial \varphi_{OPD}}{\partial (x-y)} \right) \right) \end{array} \right], \quad (4)$$

où I_0 est l'intensité maximale de l'interférogramme et z_d la distance entre le réseau et le détecteur.

Comme l'interférogramme obtenu avec SELFI nous permet d'avoir accès au gradient de la courbure du front d'onde, l'imagerie de phase avec le SID4 permet d'avoir accès au gradient de la différence de chemin optique. L'information sur ces gradients de phase se traduit dans l'espace de Fourier par une modulation autour de la fréquence $\frac{1}{p}$.

De la même manière, l'analyse de l'interférogramme se fait dans le domaine de Fourier. La figure 20 illustre cette analyse. Par un filtre passe bas sur la transformée de Fourier nous obtenons l'image de l'intensité transmise par l'échantillon. Et en intégrant l'information sur les gradients de phase, nous obtenons une image de phase quantitative de l'échantillon.

Remarquons que cette technique est aussi achromatique : l'interférogramme ne dépend pas de la longueur d'onde utilisée pour l'illumination de l'échantillon.

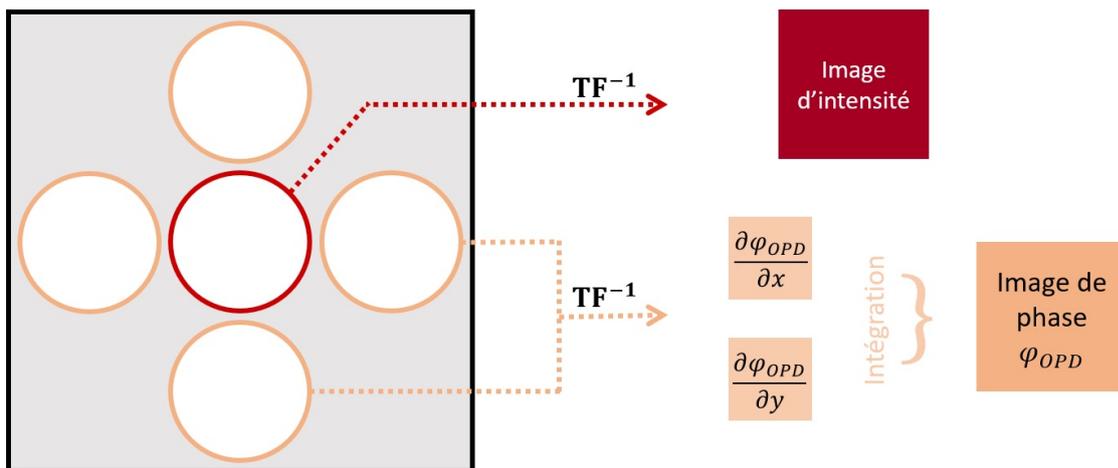


Figure 20 : Schéma illustrant le calcul des images de phase et d'intensité à partir de la transformée de Fourier de l'interférogramme obtenue sur la caméra.

ANNEXES D : Protocoles expérimentaux

Les annexes suivantes détaillent les protocoles utilisés pour les différents projets décrits dans ce manuscrit.

Annexe D.1 Protocole de préparation des échantillons pour le SELFI-PALM

Des cellules fibroblastes d'embryon de souris (*Mouse Embryonic Fiboblasts - MEF*) ont été cultivées dans le milieu de culture DMEM (Gibco) complémenté comme suit :

- 10% de sérum de fœtus bovin (FBS, Gibco),
- $100U.ml^{-1}$ de pénicilline-streptomycine,
- $1mM$ de pyruvate de sodium,
- $15mM$ d'HEPES,
- GlutaMAX.

Un à trois jours avant l'expérimentation, le marquage des protéines étudiées est fait par transfection d'un plasmide grâce à l'utilisation des kits NucleofactorTM MEF-1 et NucleofactorTM Iib (AmayaTM, Lonza).

Quatre heures avant l'acquisition, les cellules sont détachées avec une solution contenant 0.05% de trypsine et 0.02% d'EDTA (Gibco). Puis l'effet de la trypsine est stoppé en rajoutant un inhibiteur de trypsine dans la solution ($1mg/ml$ de DMEM, Sigma). Les cellules sont ensuite rincées et re-suspendues dans un milieu Ringer ne contenant pas de sérum.

Constitution du Ringer :

- $150mM$ NaCl,
- $5mM$ KCl,
- $2mM$ CaCl,
- $2mM$ $MgCl_2$,
- $10mM$ HEPES,
- pH=7.4,
- $11mM$ glucose.

Les cellules sont ensuite ensemencées sur des lamelles de microscope recouvertes de fibronectine humaine ($10\mu g/ml$, Roche).

Les acquisitions de SELFI-PALM ont été effectuées à un temps d'exposition de $60ms$ durant une quinzaine de minutes.

Annexe D.2 Protocole de préparation des échantillons pour le SELFI-dSTORM à haute densité de marquage

Culture de fibroblastes humains

Des cellules de fibroblastes humains (WI-38 ; passages 10-20 ; Coriell Institute) ont été cultivées dans un milieu DMEM complémenté comme suit :

- 10% de sérum de fœtus bovin (FBS),
- 1% de pénicilline-streptomycine (Life Technologies, USA),
- 1% de L-glutamine.

Après plusieurs jours de culture dans un incubateur à 37C, avec 5% de CO_2 , les cellules sontensemencées à faible confluence sur des lamelles de microscope.

Culture des sphéroïdes de cellules hIPS

Des cellules souches humaines pluripotentes BC-1 (WT XY ; passages 15–25 ; MTL-Globalstem, USA) sont cultivées sur des lamelles recouvertes d’une matrice de Matrigel (Corning ; 354248 ; 1/100 dans du DMEM pendant 2 h à 37C), dans un milieu mTESR1 (85850 ; Stemcell Technologies) complémenté avec 1% de pénicilline-streptomycine (Invitrogen).

Pour former les sphéroïdes, les cellules sont détachées des lamelles avec du ReLeSR (05873 ; Stemcell Technologies), puis sont re-suspendues dans une solution de sorbitol à une concentration de 2.10^6 cellules pas mL et mélangées avec du Matrigel (1 :1). Le protocole d’encapsulation des cellules est le même que celui décrit par Alessandri et al [95].

[95] Alessandri 2016

Protocole de fixation et de marquage des filaments d'actine

Composition des différentes solutions utilisées lors de la fixation :

Solution tampon pour conserver le cytosquelette (Cytoskeleton Buffer)

- 600 μ g $MgCl_2$ (1M)
- 4.1g KCl
- 152mg EGTA
- 780mg MES
- 49400 μ L eau

1ère solution de fixation

- 12 μ L Glutaraldéhyde (50%)
- 20 μ L Triton (x100, 25%)
- 500 μ L Cytoskeleton Buffer
- 1468 μ L eau

2ème solution de fixation

- 148 μ L Glutaraldéhyde (50%)
- 500 μ L Cytoskeleton Buffer
- 1420 μ L eau

Solution de pré-incubation

- 4640 μ L PBS 1X
- 160 μ L BSA (30%)

Solution de marquage

- 30 μ L Phalloïdine-Alexa647 (16.5 μ M, ThermoFisher)
- 770 μ L de la solution de pré-incubation

Étapes du marquage :

1. Laisser les cellules reposer quelques minutes à température ambiante,
2. retirer le milieu de culture,
3. pour les sphéroïdes : rincer avec du PBS,

4. ajouter $500\mu L$ de la 1ère solution de fixation dans chaque puit pendant 2min sous agitation (7min pour les sphéroïdes),
5. ajouter $500\mu L$ de la 2ème solution de fixation dans chaque puit toujours sous agitation pendant 10min (20min pour les sphéroïdes),
6. rincer au PBS : 3 fois pendant 5min (10min pour les sphéroïdes) toujours sous agitation,
7. ajouter $1mL$ de la solution de pré-incubation par puit et laisser sous agitation pendant 20min (40min pour les sphéroïdes),
8. le marquage de l'actine se fait en ajoutant $200\mu L$ de la solution de marquage sur chaque lamelle, laisser incuber toute la nuit à $4^{\circ}C$,
9. avant de faire les acquisitions : bien rincer au PBS.

Annexe D.3 Protocole de la solution tampon pour le dSTORM

Le protocole utilisé pour faire la solution tampon dans laquelle est placé l'échantillon pour une acquisition de dSTORM est basé sur l'utilisation du glucose. Il faut préparer trois solutions en avance, ces solutions sont conservées à -20°C .

Solution stock contenant l'enzyme (50mL)

- 100 μL catalase (Sigma C100, 0.1% w/v suspension)
- 200 μL TCEP (Sigma C4706, 1 mol/L)
- 25mL glycerine (Sigma)
- 22.5mL eau distillée
- 1.25mL KCl (1 M)
- 1mL Tris-HCl pH 7.5 (1 mol/L)
- 50mg glucose oxidase

Préparer des aliquotes de 250 μL à mettre au congélateur à -20°C .

Solution stock contenant le glucose (50mL)

- 5g glucose (Sigma)
- 45mL eau distillée
- 5mL glycerine (Sigma)

Préparer des aliquotes de 1000 μL à mettre au congélateur à -20°C .

Solution stock contenant le MEA (10mL) Dissoudre 1.136g de MEA-HCl (Sigma M6500) dans 10mL d'eau distillée pour obtenir une solution stock de 1mol/L. Préparer des aliquotes de 250 μL à mettre au congélateur à -20°C .

La solution finale est à préparer juste avant utilisation :

- 1000mL de la solution contenant le glucose
- 125mL de la solution contenant l'enzyme
- 125mL de la solution contenant le MEA
- ajuster le pH à 7.8 en ajoutant du NaOH.

Annexe D.4 Protocole de culture de neurones en culture primaire ou en tranches organotypiques

Culture primaire de neurones

La culture primaire de neurones est faite à partir de neurones issus de l'hippocampe d'embryon de rat de 18 jours. L'hippocampe a été disséqué puis collecté dans un milieu HBSS contenant de la penicillin-streptomycin (PS) et de l'HEPES. Les tissus sont ensuite dissociés par une solution de trypsin-EDTA, PS et HEPES. Les neurones sont ensuite ensemencés sur des lamelles recouvertes du polymère poly-L-lysine (PLL, 1mg/mL). Le milieu de culture utilisé est complété avec 10% de sérum de cheval.

Culture de tranches organotypiques

Les tranches organotypiques ont été cultivées selon les mêmes protocoles que ceux décrits dans la littérature [78].

L'hippocampe de jeunes rats de 5 à 7 jours a été découpé en tranches de $350\mu\text{m}$ grâce à l'utilisation d'une machine McIlwain (McIlwain tissue chopper), ces tranches ont été placées à 37°C dans un milieu de dissection dont la composition est la suivante (tous les produits viennent de Sigma-Aldrich) :

- 175mM sucrose
- 25mM D-glucose
- 50mM NaCl
- 0.5mM CaCl_2
- 2.5mM KCl
- 0.66mM KH_2PO_4
- 2mM MgCl_2
- 0.28mM $\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$
- 0.85mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12\text{H}_2\text{O}$
- 2.7mM NaHCO_3
- 0.4mM HEPES
- 10–5% phenol red
- pH=7.3

Après 25min d'incubation, les tranches ont été transférées sur des membranes FHLC ($0.45\mu\text{m}$) dans des inserts (Millicell Cell Culture Inserts, Millipore, 0.4mm, 30mm de

[78] Stoppini 1991

diamètre) et cultivées pendant une quinzaine de jours dans un incubateur à 35°C, 5% CO_2 , dans le milieu de culture suivant (tous les produits viennent de Gibco) :

- 50% Basal Medium Eagle,
- 25% de solution saline de Hank 1X (avec $MgCl_2$ et $CaCl_2$),
- 25% sérum de cheval,
- 0.45% D-glucose,
- 1mM L-glutamine.

Annexe D.5 Protocole de marquage par immunofluorescence

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants :

- anti-GluN1 (clone 10B11, provided by E.Gouaux),
- anti-GluN2A (Agrobio, custom-made, epitope : GHSHDVTERELRN(C), 0.1 mg/mL),
- anti-GluN2B (Agrobio, custom-made, epitope : (C)NTHEKRIYQSNMLNR, 0.1 mg/mL).

Et l'anticorps secondaire utilisé est : anti-rabbit Alexa 647 (Thermo Scientific A21244) à une concentration de 0.1mg/mL.

Immunomarquage des neurones en culture

1. Incubation pendant 15min à 37C des neurones vivants avec l'anticorps primaire (préparé dans du NBM + 1% de BSA),
2. fixation des neurones dans du PBS contenant 4% de paraformaldehyde (Sigma-Aldrich, P6148) et 4% de sucrose (Sigma-Aldrich, 0389), pendant 15min à température ambiante,
3. perméabilisation des neurones avec 0.4% de Triton X-100 pendant 5min,
4. incubation dans une solution contenant 1.5% de BSA (bovine serum albumin, Sigma-Aldrich, A3059), 0.1% de gélatine de poisson et 0.1% de Triton X-100, pendant 40min,
5. incubation avec l'anticorps secondaire à température ambiante, pendant 45min,
6. rincer avec du PBS,
7. seconde fixation de l'échantillon, puis les cellules sont gardées dans du PBS à 4C.

Immunomarquage des tranches organotypiques

1. Incubation avec l'anticorps primaire (préparé dans du NBM + 1% de BSA) pendant 2h à 35C,
2. rincer pendant 1h avec la solution de NBM + 1% de BSA, à 35C,
3. fixation avec une solution de 4% PFA et 4% de sucrose, pendant 2h à température ambiante ou bien toute la nuit à 4C, sous agitation,
4. rincer deux fois avec du PBS 1X pendant 45min-1h, à partir de cette étape tout sera fait sous agitation et à température ambiante (sauf si précisé),

5. incuber pendant 45min avec du PBS + NH₄Cl (50mM),
6. rincer deux fois avec du PBS 1X pendant 45min-1h,
7. incuber pendant 2h avec une solution contenant du PBS, 3% de BSA, 0.1% de gélatine de poisson et 0.3% de triton,
8. incuber avec l'anticorps secondaire (préparé dans une solution contenant du PBS, 3% de BSA, 0.1% de gélatine de poisson et 0.3% de triton) pendant 3h à température ambiante ou bien toute la nuit à 4°C,
9. rincer deux fois avec du PBS toute la nuit sous agitation à 4°C,
10. rincer une dernière fois avec du PBS juste avant l'acquisition.

Annexe D.6 Protocole de culture cellulaire pour les cellules A431

Culture cellulaire

La culture des cellules A431 a été faite dans un incubateur à 37C, et avec 5% de CO_2 . Le milieu de culture (DMEM) a été complété avec 10% de sérum de cheval, 1% de L-Glutamin et 1% de penicillin/streptomycin (Life Technologies).

Après 1 à 3 jours de culture, les cellules ont étéensemencées sur des lamelles préalablement recouvertes du substrat.

Préparation des lamelles pour l'imagerie

Des billes d'or (100nm de diamètre) ont été mélangées au polymère poly-D-lysine (PDL, 20mg, Corning BioCoat). Puis ce mélange a été déposé sur les lamelles de microscopie à $2.5 - 5\mu g/cm_2$.

Une fois séchées les lamelles ont ensuite été recouvertes de fibronectine (Fibronectine, Roche) à $5\mu g/cm_2$.

Annexe D.7 Protocoles de couplage fluorophore-protéine

Protocole général :

- Dans la même solution mettre la protéine et le fluorophore en respectant le rapport Protéine/Fluorophore souhaité ;
- Ajouter du $NaHCO_3$ pour ajuster le pH à 8/8.5 ;
- Incubation à 23°C sous agitation 50rpm pendant 2h ;
- Passage dans une colonne qui permet de séparer les protéines couplées aux autres en les sélectionnant par la taille.

Couplage EGF - Cy5-NHS-ester

- 500 μ L EGF (rhEGF, R& D system) à 200 μ g/mL
- 10 μ L Cy5-NHS-ester (Cy5 mono NHS ESTER, 1 mg, Sigma Aldrich) à 5mM

Couplage EGF – Alexa647-NHS-ester

- 430 μ L PBS
- 20 μ L EGF (200 μ g/mL)
- 2 μ L Alexa647-NHS-ester (Alexa Fluor 647 NHS Ester, Thermo Fisher) à 10 μ g/mL

Couplage EGF – JF646SE

- 480 μ L PBS
- 20 μ L EGF (200 μ g/mL)
- 10 μ L JF646SE (JF646SE, R& D system) à 10mM

Bibliographie

- [1] Stefan W. Hell and Jan Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt. Lett.*, 19(11) :780–782, Jun 1994.
- [2] A.M van Oijen, J Köhler, J Schmidt, M Müller, and G.J Brakenhoff. 3-dimensional super-resolution by spectrally selective imaging. *Chemical Physics Letters*, 292(1) :183 – 187, 1998.
- [3] Michael J. Rust, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nature Methods*, 3 :793, August 2006.
- [4] Eric Betzig, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, and Harald F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793) :1642–1645, 2006.
- [5] Samuel T. Hess, Thanu P.K. Girirajan, and Michael D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal*, 91(11) :4258 – 4272, 2006.
- [6] Alexey Sharonov and Robin M. Hochstrasser. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(50) :18911–18916, 2006.
- [7] Bo Huang, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Super-resolution fluorescence microscopy. *Annual Review of Biochemistry*, 78(1) :993–1016, 2009. PMID : 19489737.
- [8] Antoine G. Godin, Brahim Lounis, and Laurent Cognet. Super-resolution microscopy approaches for live cell imaging. *Biophysical Journal*, 107(8) :1777 – 1784, 2014.
- [9] Zhe Liu, Luke D. Lavis, and Eric Betzig. Imaging live-cell dynamics and structure at the single-molecule level. *Molecular Cell*, 58(4) :644 – 659, 2015.
- [10] Michael Hofmann, Christian Eggeling, Stefan Jakobs, and Stefan W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using re-

- versibly photoswitchable proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(49) :17565–17569, 2005.
- [11] Francisco Balzarotti, Yvan Eilers, Klaus C. Gwosch, Arvid H. Gynnå, Volker Westphal, Fernando D. Stefani, Johan Elf, and Stefan W. Hell. Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes. *Science*, 355(6325) :606–612, 2017.
- [12] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of Microscopy*, 198(2) :82–87, 2000.
- [13] E. Mudry, K. Belkebir, J. Girard, J. Savatier, E. Le Moal, C. Nicoletti, M. Allain, and A. Sentenac. Structured illumination microscopy using unknown speckle patterns. *Nature Photonics*, 6 :312, April 2012.
- [14] Mats G. L. Gustafsson. Nonlinear structured-illumination microscopy : Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(37) :13081–13086, 2005.
- [15] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, and J. Enderlein. Fast, background-free, 3d super-resolution optical fluctuation imaging (sofi). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52) :22287–22292, 2009.
- [16] Stefan Geissbuehler, Noelia L. Bocchio, Claudio Dellagiacoma, Corinne Berclaz, Marcel Leutenegger, and Theo Lasser. Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bsofi). *Optical Nanoscopy*, 1(1) :4, Apr 2012.
- [17] Norman Bobroff. Position measurement with a resolution and noise-limited instrument. *Review of Scientific Instruments*, 57(6) :1152–1157, 1986.
- [18] G.J. Schütz, W. Trabesinger, and T. Schmidt. Direct observation of ligand colocalization on individual receptor molecules. *Biophysical Journal*, 74(5) :2223 – 2226, 1998.
- [19] Sebastian van de Linde, Anna Löschberger, Teresa Klein, Meike Heidebreder, Steve Wolter, Mike Heilemann, and Markus Sauer. Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes. *Nature Protocols*, 6 :991, June 2011.
- [20] Gregory Giannone, Eric Hossy, Florian Levet, Audrey Constals, Katrin Schulze, Alexander I. Sobolevsky, Michael P. Rosconi, Eric Gouaux, Robert Tampé, Daniel Choquet, and Laurent Cognet. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical Journal*, 99(4) :1303 – 1310, 2010.
- [21] Ralf Jungmann, Christian Steinhauer, Max Scheible, Anton Kuzyk, Philip Tinnefeld, and Friedrich C. Simmel. Single-molecule kinetics and super-resolution mi-

- scopy by fluorescence imaging of transient binding on dna origami. *Nano Lett.*, 10(11) :4756–4761, November 2010.
- [22] H.P. Kao and A.S. Verkman. Tracking of single fluorescent particles in three dimensions : use of cylindrical optics to encode particle position. *Biophysical Journal*, 67(3) :1291 – 1300, 1994.
- [23] Bo Huang, Wenqin Wang, Mark Bates, and Xiaowei Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864) :810–813, 2008.
- [24] Sri Rama Prasanna Pavani, Michael A. Thompson, Julie S. Biteen, Samuel J. Lord, Na Liu, Robert J. Twieg, Rafael Piestun, and W. E. Moerner. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9) :2995–2999, 2009.
- [25] Shu Jia, Joshua C. Vaughan, and Xiaowei Zhuang. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function. *Nature Photonics*, 8 :302, March 2014.
- [26] Bassam Hajj, Mohamed El Beheiry, Ignacio Izeddin, Xavier Darzacq, and Maxime Dahan. Accessing the third dimension in localization-based super-resolution microscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 16 :16340–16348, 2014.
- [27] Andrey Aristov, Benoit Lelandais, Elena Rensen, and Christophe Zimmer. Zola-3d allows flexible 3d localization microscopy over an adjustable axial range. *Nature Communications*, 9(1) :2409, June 2018.
- [28] P. Prabhat, S. Ram, E. S. Ward, and R. J. Ober. Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions. *IEEE Transactions on NanoBioscience*, 3(4) :237–242, Dec 2004.
- [29] Sripad Ram, Prashant Prabhat, Jerry Chao, E. Sally Ward, and Raimund J. Ober. High accuracy 3d quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells. *Biophysical Journal*, 95(12) :6025–6043, December 2008.
- [30] Stefan Geissbuehler, Azat Sharipov, Aurélien Godinat, Noelia L. Bocchio, Patrick A. Sandoz, Anja Huss, Nickels A. Jensen, Stefan Jakobs, Jörg Enderlein, F. Gisou van der Goot, Elena A. Dubikovskaya, Theo Lasser, and Marcel Leutenegger. Live-cell multiplane three-dimensional super-resolution optical fluctuation imaging. *Nature Communications*, 5 :5830, December 2014.

- [31] Paul A. Dalgarno, Heather I. C. Dalgarno, Aurélie Putoud, Robert Lambert, Lynn Paterson, David C. Logan, David P. Towers, Richard J. Warburton, and Alan H. Greenaway. Multiplane imaging and three dimensional nanoscale particle tracking in biological microscopy. *Opt. Express*, 18(2) :877–884, Jan 2010.
- [32] Sara Abrahamsson, Jiji Chen, Bassam Hajj, Sjoerd Stallinga, Alexander Y. Katsov, Jan Wisniewski, Gaku Mizuguchi, Pierre Soule, Florian Mueller, Claire Dugast Darzacq, Xavier Darzacq, Carl Wu, Cornelia I. Bargmann, David A. Agard, Maxime Dahan, and Mats G. L. Gustafsson. Fast multicolor 3d imaging using aberration-corrected multifocus microscopy. *Nature Methods*, 10 :60, December 2012.
- [33] Majid Badieirostami, Matthew D. Lew, Michael A. Thompson, and W. E. Moerner. Three-dimensional localization precision of the double-helix point spread function versus astigmatism and biplane. *Applied Physics Letters*, 97(16), 2010.
- [34] N. Bourg, C. Mayet, G. Dupuis, T. Barroca, P. Bon, S. Lécart, E. Fort, and S. Lévêque-Fort. Direct optical nanoscopy with axially localized detection. *Nature Photonics*, 9 :587, August 2015.
- [35] Gleb Shtengel, James A. Galbraith, Catherine G. Galbraith, Jennifer Lippincott-Schwartz, Jennifer M. Gillette, Suliana Manley, Rachid Sougrat, Clare M. Waterman, Pakorn Kanchanawong, Michael W. Davidson, Richard D. Fetter, and Harald F. Hess. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3d cellular ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9) :3125–3130, 2009.
- [36] Stefan Hell and Ernst H.K. Stelzer. Fundamental improvement of resolution with a 4pi-confocal fluorescence microscope using two-photon excitation. *Optics Communications*, 93(5) :277 – 282, 1992.
- [37] Daniel Aquino, Andreas Schönle, Claudia Geisler, Claas v Middendorff, Christian A. Wurm, Yosuke Okamura, Thorsten Lang, Stefan W. Hell, and Alexander Egner. Two-color nanoscopy of three-dimensional volumes by 4pi detection of stochastically switched fluorophores. *Nature Methods*, 8 :353, March 2011.
- [38] Andrew G. York, Alireza Ghitani, Alipasha Vaziri, Michael W. Davidson, and Hari Shroff. Confined activation and subdiffractive localization enables whole-cell palm with genetically expressed probes. *Nature Methods*, 8 :327, February 2011.
- [39] Andreas Gahlmann and W. E. Moerner. Exploring bacterial cell biology with single-molecule tracking and super-resolution imaging. *Nature Reviews Microbiology*, 12 :9, December 2013.

- [40] Steffen J Sahl and WE Moerner. Super-resolution fluorescence imaging with single molecules. *Current Opinion in Structural Biology*, 23(5) :778 – 787, 2013. Protein-carbohydrate interactions / Biophysical methods.
- [41] Marta Maglione and Stephan J. Sigrist. Seeing the forest tree by tree : super-resolution light microscopy meets the neurosciences. *Nature Neuroscience*, 16 :790, June 2013.
- [42] Mototsugu Eiraku and Yoshiki Sasai. Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of es cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5) :768 – 777, 2012. Neurodevelopment and disease.
- [43] Hans Clevers. Modeling development and disease with organoids. *Cell*, 165(7) :1586 – 1597, 2016.
- [44] Hans-Ulrich Dodt, Ulrich Leischner, Anja Schierloh, Nina Jährling, Christoph Peter Mauch, Katrin Deininger, Jan Michael Deussing, Matthias Eder, Walter Ziegglängsberger, and Klaus Becker. Ultramicroscopy : three-dimensional visualization of neuronal networks in the whole mouse brain. *Nature Methods*, 4 :331, March 2007.
- [45] Fei Chen, Paul W. Tillberg, and Edward S. Boyden. Expansion microscopy. *Science*, 347(6221) :543–548, 2015.
- [46] Tatsuya C. Murakami, Tomoyuki Mano, Shu Saikawa, Shuhei A. Horiguchi, Daichi Shigeta, Kousuke Baba, Hiroshi Sekiya, Yoshihiro Shimizu, Kenji F. Tanaka, Hiroshi Kiyonari, Masamitsu Iino, Hideki Mochizuki, Kazuki Tainaka, and Hiroki R. Ueda. A three-dimensional single-cell-resolution whole-brain atlas using cubic-x expansion microscopy and tissue clearing. *Nature Neuroscience*, 21(4) :625–637, April 2018.
- [47] Sangjun Park, Wooyoung Kang, Yeong-Dae Kwon, Jaehoon Shim, Siyong Kim, Bong-Kiun Kaang, and Sungchul Hohng. Superresolution fluorescence microscopy for 3d reconstruction of thick samples. *Molecular Brain*, 11(1) :17, March 2018.
- [48] Zernike. Das phasenkontrastverfahren bei der mikroskopischen beobachtung. *Z. Tech. Phys.*, 6 :454–457, 1935.
- [49] F. Kagalwala and T. Kanade. Reconstructing specimens using dic microscope images. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics, Part B (Cybernetics)*, 33(5) :728–737, Oct 2003.
- [50] Joseph Rosen and Gary Brooker. Non-scanning motionless fluorescence three-dimensional holographic microscopy. *Nature Photonics*, 2 :190, February 2008.
- [51] Pierre Bon, Jeanne Linarès-Loyez, Maxime Feyeux, Kevin Alessandri, Brahim Lounis, Pierre Nassoy, and Laurent Cognet. Self-interference 3d super-resolution microscopy for deep tissue investigations. *Nature Methods*, 15(6) :449–454, June 2018.

- [52] Etienne Cuche, Pierre Marquet, and Christian Depeursinge. Simultaneous amplitude-contrast and quantitative phase-contrast microscopy by numerical reconstruction of fresnel off-axis holograms. *Appl. Opt.*, 38(34) :6994–7001, Dec 1999.
- [53] Pierre Bon, Guillaume Maucort, Benoit Wattellier, and Serge Monneret. Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells. *Opt. Express*, 17(15) :13080–13094, Jul 2009.
- [54] Jérôme Primot and Nicolas Guérineau. Extended hartmann test based on the pseudoguiding property of a hartmann mask completed by a phase chessboard. *Appl. Opt.*, 39(31) :5715–5720, Nov 2000.
- [55] C. E. Shannon. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3) :379–423, 1948.
- [56] Russell E. Thompson, Daniel R. Larson, and Watt W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal*, 82(5) :2775 – 2783, 2002.
- [57] H. L. Van Trees. *Detection, Estimation and Modulation Theory*. John Wiley and Sonc, Inc., New York, 1968.
- [58] S. M. Kay. *Fundamentals of statistical signal processing - Volume 1 : Estimation Theory*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, 1993.
- [59] Raimund J. Ober, Sripad Ram, and E. Sally Ward. Localization accuracy in single-molecule microscopy. *Biophysical Journal*, 86(2) :1185 – 1200, 2004.
- [60] Sripad Ram, E. Sally Ward, and Raimund J. Ober. Beyond rayleigh’s criterion : A resolution measure with application to single-molecule microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(12) :4457–4462, 2006.
- [61] Robert P. J. Nieuwenhuizen, Keith A. Lidke, Mark Bates, Daniela Leyton Puig, David Grünwald, Sjoerd Stallinga, and Bernd Rieger. Measuring image resolution in optical nanoscopy. *Nature Methods*, 10 :557, April 2013.
- [62] Niccolò Banterle, Khanh Huy Bui, Edward A. Lemke, and Martin Beck. Fourier ring correlation as a resolution criterion for super-resolution microscopy. *Journal of Structural Biology*, 183(3) :363 – 367, 2013.
- [63] Pierre Bon, Sherazade Aknoun, Serge Monneret, and Benoit Wattellier. Enhanced 3d spatial resolution in quantitative phase microscopy using spatially incoherent illumination. *Opt. Express*, 22(7) :8654–8671, Apr 2014.
- [64] Pierre Bon, Nicolas Bourg, Sandrine Lecart, Serge Monneret, Emmanuel Fort, Jerome Wenger, and Sandrine Leveque-Fort. Three-dimensional nanometre localization of nanoparticles to enhance super-resolution microscopy. *Nat Commun*, 6, July 2015.

- [65] Jeanne Linarès-Loyez, Joana S. Ferreira, Olivier Rossier, Brahim Lounis, Gregory Giannone, Laurent Groc, Laurent Cognet, and Pierre Bon. Self-interference (selfi) microscopy for live super-resolution imaging and single particle tracking in 3d. *Frontiers in Physics*, 7 :68, 2019.
- [66] Pakorn Kanchanawong, Gleb Shtengel, Ana M. Pasapera, Ericka B. Ramko, Michael W. Davidson, Harald F. Hess, and Clare M. Waterman. Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature*, 468(7323) :580–584, November 2010.
- [67] Keith Burridge and Magdalena Chrzanowska-Wodnicka. Focal adhesions, contractility, and signaling. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12(1) :463–519, 1996. PMID : 8970735.
- [68] Benjamin Geiger, Alexander Bershadsky, Roumen Pankov, and Kenneth M. Yamada. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2(11) :793–805, November 2001.
- [69] Alexander D. Bershadsky, Nathalie Q. Balaban, and Benjamin Geiger. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 19(1) :677–695, 2003. PMID : 14570586.
- [70] D Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of Cell Biology*, 89(1) :141–145, 1981.
- [71] Olivier Rossier, Vivien Oceau, Jean-Baptiste Sibarita, Cécile Leduc, Béatrice Tessier, Deepak Nair, Volker Gatterdam, Olivier Destaing, Corinne Albigès-Rizo, Robert Tampé, Laurent Cognet, Daniel Choquet, Brahim Lounis, and Grégory Giannone. Integrins $\beta 1$ and $\beta 3$ exhibit distinct dynamic nanoscale organizations inside focal adhesions. *Nature Cell Biology*, 14 :1057, September 2012.
- [72] Kévin Alessandri, Bibhu Ranjan Sarangi, Vasily Valériévitch Gurchenkov, Bidisha Sinha, Tobias Reinhold Kießling, Luc Fetler, Felix Rico, Simon Scheuring, Christophe Lamaze, Anthony Simon, Sara Geraldo, Danijela Vignjević, Hugo Doméjean, Leslie Rolland, Anette Funfak, Jérôme Bibette, Nicolas Bremond, and Pierre Nassoy. Cellular capsules as a tool for multicellular spheroid production and for investigating the mechanics of tumor progression in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(37) :14843–14848, 2013.
- [73] Heather A. McCauley and James M. Wells. Pluripotent stem cell-derived organoids : using principles of developmental biology to grow human tissues in a dish. *Development*, 144(6) :958–962, 2017.

- [74] Jan Huisken, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, and Ernst H. K. Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, 2004.
- [75] Pierre Paoletti, Camilla Bellone, and Qiang Zhou. Nmda receptor subunit diversity : impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 14 :383, May 2013.
- [76] C. S. Park, Y. Elgersma, S. G. N. Grant, and J. H. Morrison. α -isoform of calcium-calmodulin-dependent protein kinase ii and postsynaptic density protein 95 differentially regulate synaptic expression of nr2a- and nr2b-containing n-methyl-d-aspartate receptors in hippocampus. *Neuroscience*, 151(1) :43–55, January 2008.
- [77] Blanka Kellermayer, Joana S. Ferreira, Julien Dupuis, Florian Levet, Dolors Grillo-Bosch, Lucie Bard, Jeanne Linarès-Loyez, Delphine Bouchet, Daniel Choquet, Dmitri A. Rusakov, Pierre Bon, Jean-Baptiste Sibarita, Laurent Cognet, Matthieu Sainlos, Ana Luisa Carvalho, and Laurent Groc. Differential nanoscale topography and functional role of glun2-nmda receptor subtypes at glutamatergic synapses. *Neuron*, 100(1) :106 – 119.e7, 2018.
- [78] L. Stoppini, P.-A. Buchs, and D. Muller. A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of Neuroscience Methods*, 37(2) :173 – 182, 1991.
- [79] Leila Nahidiazar, Alexandra V. Agronskaia, Jorrit Broertjes, Bram van den Broek, and Kees Jalink. Optimizing imaging conditions for demanding multi-color super resolution localization microscopy. *PLOS ONE*, 11(7) :1–18, 07 2016.
- [80] Anne Beghin, Adel Kechkar, Corey Butler, Florian Levet, Marine Cabillic, Olivier Rossier, Gregory Giannone, Rémi Galland, Daniel Choquet, and Jean-Baptiste Sibarita. Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening. *Nature Methods*, 14 :1184, October 2017.
- [81] Michael J. Saxton and Ken Jacobson. Single-particle tracking :applications to membrane dynamics. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 26(1) :373–399, 1997. PMID : 9241424.
- [82] Catherine Tardin, Laurent Cognet, Cécile Bats, Brahim Lounis, and Daniel Choquet. Direct imaging of lateral movements of ampa receptors inside synapses. *The EMBO Journal*, 22(18) :4656–4665, July 2003.
- [83] Robert Brown F.R.S. Hon. M.R.S.E. & R.I. Acad. V.P.L.S. Xxvii. a brief account of microscopical observations made in the months of june, july and august 1827, on the particles contained in the pollen of plants ; and on the general existence of active

- molecules in organic and inorganic bodies. *The Philosophical Magazine*, 4(21) :161–173, 1828.
- [84] Albert Einstein et al. On the motion of small particles suspended in liquids at rest required by the molecular-kinetic theory of heat. *Annalen der physik*, 17 :549–560, 1905.
- [85] Pascale Winckler, Lydia Lartigue, Gregory Giannone, Francesca De Giorgi, François Ichas, Jean-Baptiste Sibarita, Brahim Lounis, and Laurent Cognet. Identification and super-resolution imaging of ligand-activated receptor dimers in live cells. *Scientific Reports*, 3 :2387, August 2013.
- [86] Parmeswaran Diagaradjane, Jacobo M. Orenstein-Cardona, Norman E. Colón-Casasnovas, Amit Deorukhkar, Shujun Shentu, Norihito Kuno, David L. Schwartz, Juri G. Gelovani, and Sunil Krishnan. Imaging epidermal growth factor receptor expression in vivo : Pharmacokinetic and biodistribution characterization of a bio-conjugated quantum dot nanoprobe. *Clinical Cancer Research*, 14(3) :731–741, 2008.
- [87] Jonathan B. Grimm, Brian P. English, Jiji Chen, Joel P. Slaughter, Zhengjian Zhang, Andrey Revyakin, Ronak Patel, John J. Macklin, Davide Normanno, Robert H. Singer, Timothée Lionnet, and Luke D. Lavis. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nature Methods*, 12 :244, January 2015.
- [88] Leonard Saltz, Chris Easley, and Peter Kirkpatrick. Panitumumab. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(12) :987–988, December 2006.
- [89] Laurent Groc, Martin Heine, Laurent Cognet, Kieran Brickley, F. Anne Stephenson, Brahim Lounis, and Daniel Choquet. Differential activity-dependent regulation of the lateral mobilities of ampa and nmda receptors. *Nature Neuroscience*, 7(7) :695–696, July 2004.
- [90] Laurent Groc, Martin Heine, Sarah L. Cousins, F. Anne Stephenson, Brahim Lounis, Laurent Cognet, and Daniel Choquet. Nmda receptor surface mobility depends on nr2a-2b subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(49) :18769–18774, 2006.
- [91] Bassam Hajj, Mohamed El Beheiry, and Maxime Dahan. Psf engineering in multifocus microscopy for increased depth volumetric imaging. *Biomed. Opt. Express*, 7(3) :726–731, Mar 2016.
- [92] Remi Galland, Gianluca Grenci, Ajay Aravind, Virgile Viasnoff, Vincent Studer, and Jean-Baptiste Sibarita. 3d high- and super-resolution imaging using single-objective spim. *Nature Methods*, 12 :641, May 2015.

- [93] Ralf Jungmann, Maier S. Avendaño, Johannes B. Woehrstein, Mingjie Dai, William M. Shih, and Peng Yin. Multiplexed 3d cellular super-resolution imaging with dna-paint and exchange-paint. *Nature Methods*, 11 :313, February 2014.
- [94] Antoine G. Godin, Juan A. Varela, Zhengong Gao, Noémie Danné, Julien P. Dupuis, Brahim Lounis, Laurent Groc, and Laurent Cognet. Single-nanotube tracking reveals the nanoscale organization of the extracellular space in the live brain. *Nature Nanotechnology*, 12 :238, November 2016.
- [95] Kevin Alessandri, Maxime Feyeux, Basile Gurchenkov, Christophe Delgado, Anastasiya Trushko, Karl-Heinz Krause, Daniela Vignjević, Pierre Nassoy, and Aurélien Roux. A 3d printed microfluidic device for production of functionalized hydrogel microcapsules for culture and differentiation of human neuronal stem cells (hnsc). *Lab Chip*, 16 :1593–1604, 2016.

Résumé :

Le travail de cette thèse a été consacré au développement d'une technique d'imagerie optique dédiée à la microscopie de super-localisation de molécules uniques fluorescentes. Cette méthode, appelée SELFI (pour *self-interferences*, auto-interférences en anglais) permet d'obtenir la localisation tridimensionnelle d'une molécule unique en une seule mesure et ainsi d'effectuer de l'imagerie super-résolue 3D et du suivi 3D de nanoparticules en profondeur dans des échantillons biologiques denses et complexes. La technique SELFI génère des auto-interférences au sein d'un signal de fluorescence. En combinant la méthode SELFI à différentes techniques de super-résolution, nous montrons que cette méthode de localisation tridimensionnelle permet de retrouver la hiérarchie et l'organisation de protéines dans des cellules vivantes. Nous avons mis en évidence la robustesse de la technique SELFI en reconstruisant des images de super-résolution 3D de structures denses en profondeur dans des échantillons tissulaires complexes. Le suivi en 3D de particules au sein d'échantillons biologiques intacts a également été démontré (quantum dots dans des tranches organotypiques de cerveaux). Finalement, nous avons démontré qu'enregistrer la dynamique cellulaire sans marquage (imagerie de phase quantitative) simultanément de l'imagerie de localisation de molécules uniques en 3D permet de tenir compte du biais de l'évolution dynamique des échantillons observés.

Abstract :

The work of this thesis was devoted to the development of an optical imaging technique dedicated to the single fluorescent molecules' super-localization microscopy. This method, called SELFI (for self-interference) unlocks the three-dimensional localization of a single molecule in a single measurement and thus, super-resolved 3D imaging and 3D tracking of nanoparticles at depth in dense and complex biological samples. The SELFI technique generates self-interference within a fluorescence signal. By combining the SELFI method with different super-resolution techniques, we show that this three-dimensional localization method allows to find the hierarchy and the organization of proteins in living cells. We have demonstrated the robustness of the SELFI technique by reconstructing 3D super-resolution images of dense structures at depth in complex tissue samples. 3D tracking of particles within intact biological samples has also been demonstrated (quantum dots in organotypic brains slices). Finally, we have demonstrated that recording the cell dynamics without labeling (quantitative phase imaging) simultaneously with 3D single molecule localization imaging allows us to take into account the bias linked to the dynamic evolution of the imaged samples.