



HAL
open science

Microscopie par Localisation de Molécules Individuelles en Profondeur Utilisant la Technologie soSPIM et l'Optique Adaptative

Hisham Forrière

► **To cite this version:**

Hisham Forrière. Microscopie par Localisation de Molécules Individuelles en Profondeur Utilisant la Technologie soSPIM et l'Optique Adaptative. Imagerie médicale. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0165 . tel-03372904

HAL Id: tel-03372904

<https://theses.hal.science/tel-03372904>

Submitted on 11 Oct 2021

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
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

SPÉCIALITÉ : BIOIMAGERIE

Par **Hisham FORRIERE**

**MICROSCOPIE PAR LOCALISATION DE MOLECULES
INDIVIDUELLES EN PROFONDEUR UTILISANT LA
TECHNOLOGIE SOSPIM ET L'OPTIQUE ADAPTATIVE**

Sous la direction de : **Rémi GALLAND**

Soutenue le 28 juin 2021

Membres du jury :

GALLAND, Rémi
LEVEQUE-FORT, Sandrine
FRAGOLA, Alexandra
NÄGERL, Valentin

Chargé de recherche, Université de Bordeaux
Directrice de recherche, Université Paris-Saclay
Maître de conférences, ESPCI Paris
Professeur, Université de Bordeaux

Directeur de thèse
Rapporteuse
Rapporteuse
Président

Institut Interdisciplinaire de NeuroScience (IINS)

CNRS UMR 5297

Université de Bordeaux Centre Broca Nouvelle-Aquitaine

146 Rue Léo Saignat

33076 Bordeaux (France)

Microscopie par localisation de molécules individuelles en profondeur utilisant la technologie soSPIM et l'optique adaptative.

Résumé :

Les avancées des connaissances scientifiques sont souvent corrélées au développement de nouvelles techniques instrumentales. La biologie ne déroge pas la règle. Le développement récent des techniques de microscopie à fluorescence de super-résolution, récompensé par le prix Nobel de chimie en 2014, a révolutionné la façon d'observer les échantillons biologiques en permettant de dépasser la limite de résolution dictée par la diffraction de la lumière (~200 nm) et considérée jusqu'alors comme insurmontable. Parmi ces techniques, la microscopie par localisation de molécules individuelles (SMLM) permet d'imager l'organisation de protéines à l'intérieur des cellules avec les meilleures résolutions spatiales (~ 10 nm) et donne la possibilité de suivre leur dynamique au cours du temps. Ces nouvelles capacités ouvrent la voie à une meilleure compréhension de la machinerie cellulaire, essentielle pour mieux lutter contre ses dysfonctionnements, à l'origine de nombreuses maladies.

La détection de molécules individuelles pour l'imagerie de super-résolution par SMLM est particulièrement difficile. Elle nécessite à la fois un sectionnement optique important et une grande efficacité dans la collecte du signal de fluorescence. En conséquence, elle est réalisée à l'aide de systèmes de microscopie spécialisés et dont la profondeur de pénétration dans les échantillons est extrêmement réduite. Le système de microscopie à feuille de lumière mono-objectif développé au sein de notre équipe, nommé soSPIM, permet de dépasser cette limitation. En combinant un sectionnement optique en profondeur avec l'utilisation d'un objectif à forte ouverture numérique, il permet la détection de molécules individuelles plusieurs dizaines de micromètres au-dessus d'une lamelle.

L'imagerie de volumes entiers, tels que des cellules complètes, à ces profondeurs pose cependant d'autres défis. En excitation, la diffraction de la lumière impose un compromis important entre la finesse du sectionnement qu'il est possible de réaliser et le champ de vue. Pour tenter de dépasser cela, j'ai cherché à implémenter au système soSPIM une illumination par feuille de lumière non diffractive. En détection, les performances de l'imagerie par SMLM dépendent directement de la qualité optique du système. Or des défauts appelés aberrations optiques apparaissent systématiquement avec la profondeur d'imagerie. Pour corriger ces aberrations, j'ai implémenté un système d'optique adaptative au microscope soSPIM afin de permettre une localisation précise et en 3D de molécules individuelles en profondeur. Enfin, au-delà des défis optiques, les procédures d'acquisition et de reconstruction présentent elles-mêmes de nombreuses difficultés. J'ai donc mis en place plusieurs outils permettant de corriger les dérives spatiales, d'automatiser les acquisitions et de reconstruire les volumes imagés (~20x20x20 μm^3) avec des résolutions nanométriques. Ces développements ont permis l'imagerie de cellules entières à 30 μm de profondeur avec des résolutions de 5 nm radialement (x, y) et 25 nm axialement (z). Ils forment ainsi une preuve de concept solide de la capacité du système soSPIM à l'imagerie par SMLM en profondeur. Ils ouvrent la voie à l'observation de nouvelles structures biologiques à des résolutions nanométriques jusqu'à présent inaccessibles.

Mots clés : Optique Adaptative, Microscopie à Feuille de Lumière, Microscopie par Localisation de Molécules Individuelles, Super-Résolution, Correction de Dérives, Faisceaux Non Diffractifs.

Single Molecule Localization Microscopy in depth using soSPIM and adaptive optics.

Abstract:

Advances in scientific knowledge are often correlated with the development of new instrumental techniques. Biology is no exception to the rule. The recent development of super-resolution fluorescence microscopy techniques, awarded by the Nobel Prize in Chemistry in 2014, has revolutionized the way biological samples are observed by allowing to overcome the resolution limit dictated by light diffraction (~ 200 nm) and previously considered insurmountable. Among these techniques, Single Molecule Localization Microscopy (SMLM) allows to image the organization of proteins inside cells with the best spatial resolutions (~ 10 nm) and gives the possibility to follow their dynamics over time. These new capabilities open the way to a better understanding of the cellular machinery, essential to better fight against its dysfunctions at the origin of many diseases.

However, the detection of single molecules for super-resolution imaging by SMLM is particularly challenging and requires both high optical sectioning and high signal collection efficiency. As a result, it is performed using specialized microscopy systems with extremely shallow sample penetration depths. The single-lens light sheet microscopy system developed in our team, named soSPIM, allows to overcome this limitation. By combining a deep optical sectioning with the use of a high numerical aperture objective, it allows the detection of individual molecules several tens of microns above a coverslip.

Imaging whole volumes, such as whole cells, at these depths, however, rises new challenges. In excitation, light diffraction imposes a significant trade-off between the fineness of sectioning that can be achieved and the field of view. To overcome this, I sought to implement non-diffractive light sheet illumination to the soSPIM system. In detection, the performance of SMLM imaging depends directly on the optical quality of the system. Defects, called optical aberrations, appear systematically with the imaging depth. To correct these aberrations, I have implemented an adaptive optics system in the soSPIM microscope to allow precise 3D localization of individual molecules at depth. Finally, beyond the optical challenges, the acquisition and reconstruction procedures themselves present many difficulties. I have therefore developed several tools to consider spatial drifts and acquisition automation, and to reconstruct imaged volumes ($\sim 20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$) with nanometric resolutions. These developments have allowed the imaging of whole cells at $30 \mu\text{m}$ depth with resolutions of 5 nm radially (x, y) and 25 nm axially (z). This work provides a solid proof of concept of the soSPIM system's in depth SMLM imaging capability and paves the way for the observation of new biological structures at previously inaccessible nanometer resolutions.

Key words: Adaptive Optics, Light-Sheet Microscopy, Single Molecules Localization Microscopy, Super-Resolution, Drift Correction, Non-Diffractive Beam

Remerciements

Pour commencer cette page de remerciement, je souhaite adresser ma sincère gratitude et le respect qui l'accompagne à Rémi Galland, mon directeur de thèse, ainsi qu'à Jean-Baptiste Sibarita, notre chef d'équipe. Rémi et JB ont placé leur confiance en moi pour mener à bien cette thèse et on fait tout le nécessaire pour que ce projet se déroule dans les meilleures conditions. En me formant à la microscopie, à la biologie, aux méthodes de traitement d'images, et de façon plus générale à la recherche scientifique, ils m'ont apporté tout le nécessaire à la réussite de mon travail. Leur franchise était un réel gage de respect et dans les moments de difficultés, le témoignage de leur confiance m'a aidé à retrouver la mienne.

Bien évidemment, je me dois de remercier l'ensemble de l'équipe qui m'a accueilli très chaleureusement. Si ses membres ont changé au cours de ces trois années, l'esprit est resté le même. Marine, Corey, Aurélien, nos échanges quotidiens, vos conseils avisés, votre soutien, votre bonne humeur, tous ces moments passés ensemble furent inspirants. Nos pauses café m'ont permis de reprendre mon souffle, alors que nos pauses CrossFit me l'ont fait perdre... Sarah et Tom, je ne vous remercierai jamais assez de votre éternelle bienveillance.

Je souhaite également remercier mes anciens enseignants, professeurs, maitres de stage et collègues. Nombreux sont ceux qui ont participé à ce parcours, en me transmettant leur passion pour la science, pour la physique, pour l'optique, mais aussi en m'ouvrant les yeux sur le monde qui m'entoure. À Éric : Kammthaar.

Bien sûr, rien de tout cela n'aurait été possible sans le soutien de ma famille et de mes proches. Vous avez toujours cru en moi et vous m'avez toujours témoigné votre confiance et votre soutien dans tout ce que j'ai entrepris. Papa, Maman, Mohamed, Youssef, ce que j'ai réussi aujourd'hui, je vous le dois en grande partie. Ines, Soel, Louisa, vos sourires me donnent foi en l'avenir. Nolwenn, merci pour ton amour, ton soutien, ta confiance, ton aide... Loulou, Meissa, Jojo, Coco, Romain, merci pour les bons moments, les discussions sérieuses, les débats absurdes. Les cours de physique entouré de tels amis étaient un réel plaisir.

Aussi, pour terminer ces remerciements, je souhaite m'adresser à tous ceux et celles dont les noms n'apparaissent pas, mais qui connaissent ma gratitude.

Abbreviations

AO	<i>Adaptive optics</i> , Optique Adaptative
DM	<i>Deformable Mirror</i> , Miroir Déformable
FRC	<i>Fourier Ring Correlation</i>
FWHM	<i>Full Width Half Maximum</i> , Largeur à Mi-Hauteur
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , Protéine Fluorescente Verte
GSDIM	<i>Ground State Depletion Microscopy</i>
HILO	<i>Highly Inclined and Laminated Optical sheet</i> , Feuille de Lumière Fortement Inclinée
LBS	<i>Line Bessel Sheet</i> , Feuille de Bessel Linaire
LLS	<i>Lattice Light Sheet</i> , Feuille de lumière Structurée
LLSM	<i>Lattice Light Sheet Microscopy</i> , Microscopie en Feuille de Lumière Structurée
LSBM	<i>Light-Sheet Bayesian Microscopy</i>
LSFM	<i>Light Sheet Fluorescence Microscopy</i> , Microscopie en Feuille de Lumière
PAINT	<i>Point Accumulation In Nanoscale Topography</i>
PALM	<i>PhotoActivation Localization Microscopy</i> , Microscopie de localisation par Photoactivation
PSF	<i>Point Spread Function</i> , Fonction d'Étalement de Point
RLSM	<i>Reflected Light Sheet Microscopy</i>
RMS	<i>Root Mean Square</i> , Moyenne Quadratique
SAF	<i>Supercritical Angle Fluorescence</i>
SH	<i>Shack-Hartman (wavefront sensor)</i> , (analyseur de) Shack-Hartman
SIM	<i>Structured Illumination Microscopy</i> , Microscopie par Illumination Structurée
SLM	<i>Spatial Light Modulator</i> , Modulateur Spatial de Lumière
SMLM	<i>Single Molecules Localization Microscopy</i> , Microscopie par Localisation de Molécules Individuelles
soSPIM	<i>Single-objective Selective Plane Illumination Microscopy</i>
SPIM	<i>Selective Plane Illumination Microscopy</i>
SR	Super-Resolution
SSPIM	<i>Structured Selective Plane Illumination Microscopy</i>
STED	<i>STimulated Emission Depletion</i> , Depletion par Emission Stimulée
STORM	<i>STochastic Optical Reconstruction Microscopy</i>
TIRF	<i>Total Internal Reflection Fluorescence</i> , Fluorescence en Réflexion Totale Interne
UV	Ultra-Violet

Table des Matières

CHAPITRE I : INTRODUCTION.....	12
I.1. FORMALISME, ET DESCRIPTION DE LA PROPAGATION DE LA LUMIERE.	12
I.1.1. <i>Optique géométrique</i>	13
I.1.2. <i>Optique ondulatoire</i>	16
I.2. INTRODUCTION A LA MICROSCOPIE OPTIQUE POUR LA BIOLOGIE.....	24
I.2.1. <i>Fonctionnement d'un microscope classique et moderne</i>	25
I.2.2. <i>Caractéristiques d'un microscope</i>	26
I.2.3. <i>Microscopie de fluorescence</i>	31
I.3. SUPER-RESOLUTION EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	35
I.3.1. <i>SIM : Microscopie par Illumination Structurée</i>	37
I.3.2. <i>Microscopie STED : Déplétion par Emission Stimulée</i>	38
I.3.3. <i>SMLM : Microscopie par localisation de molécules individuelles</i>	39
I.4. SECTIONNEMENT OPTIQUE POUR LA MICROSCOPIE PAR LOCALISATION DE MOLECULES INDIVIDUELLES EN PROFONDEUR	50
I.4.1. <i>Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF)</i>	51
I.4.2. <i>Microscope confocal</i>	52
I.4.3. <i>Multiphoton : focalisation temporelle</i>	53
I.4.4. <i>Microscopie en feuille de lumière</i>	54
I.5. LA TECHNOLOGIE soSPIM	59
I.5.1. <i>Dispositif microfabriqué</i>	60
I.5.2. <i>Boitier optique de façonnage et contrôle du faisceau d'excitation</i>	62
I.5.3. <i>Logiciel de contrôle</i>	64
I.5.4. <i>Capacités d'imagerie du soSPIM</i>	65
I.6. INTRODUCTION DU TRAVAIL DE THESE : OPTIMISATION DU SYSTEME D'ACQUISITION soSPIM POUR LA LOCALISATION DE MOLECULES INDIVIDUELLES SUR CELLULES ENTIERES	66
CHAPITRE II : OPTIMISATION DE L'ILLUMINATION POUR LA DETECTION DE MOLECULES INDIVIDUELLES EN PROFONDEUR.....	68
II.1. DIFFRACTION DU FAISCEAU GAUSSIEN : LIMITE AU SECTIONNEMENT OPTIQUE.....	68
II.2. FAISCEAUX « NON DIFFRACTIFS »	69
II.2.1. <i>Théorie des faisceaux non diffractifs</i>	69
II.2.2. <i>Méthodes de création et applications des faisceaux non diffractifs</i>	70
II.3. IMPLEMENTATION DE FAISCEAUX NON DIFFRACTIFS SUR LE SYSTEME soSPIM	77
II.3.1. <i>Système optique : conception et réalisation</i>	77
II.3.2. <i>Caractérisation expérimentale du système d'illumination</i>	79
II.4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	87
CHAPITRE III OPTIMISATION DE LA DETECTION : CORRECTION DES ABERRATIONS OPTIQUES	89
III.1. ABERRATIONS OPTIQUES EN MICROSCOPIE	89
III.1.1. <i>Formalisme de Zernike</i>	89
III.1.2. <i>Aberrations optiques : origines et conséquences</i>	91
III.1.3. <i>Méthodes de correction des aberrations</i>	94
III.2. OPTIQUE ADAPTATIVE	95
III.2.1. <i>Systèmes de modulation du front d'onde</i>	95
III.2.2. <i>Méthodes de mesures des aberrations</i>	97
III.2.3. <i>Techniques de correction des aberrations par optique adaptative : correction directe ou indirecte</i> 99	
III.3. IMPLEMENTATION DE L'OPTIQUE ADAPTATIVE SUR LE SYSTEME soSPIM.	102

III.3.1.	<i>Système et processus de correction</i>	102
III.3.2.	<i>Mesure et conséquences des aberrations liées à la profondeur d'imagerie</i> ...	104
III.3.3.	<i>Correction des aberrations optiques en profondeur, en conditions réelles</i> ...	110
III.3.4.	<i>Discussions, limites et perspectives</i>	113

CHAPITRE IV : OPTIMISATION DES PROCESSUS D'ACQUISITION ET DE RECONSTRUCTION

117

IV.1.	LES DERIVES SPATIALES EN MICROSCOPIE	118
IV.1.1.	<i>Origine et conséquences des dérives en microscopie</i>	118
IV.1.2.	<i>Méthodes de correction des dérives</i>	119
IV.1.3.	<i>Impact des dérives avec la technologie soSPIM</i>	120
IV.2.	ZTRACK : SOLUTION POUR LA CORRECTION DE DERIVE EN TEMPS REEL ET L'ACQUISITION SMLM AUTOMATIQUE DE CELLULES ENTIERES.....	122
IV.2.1.	<i>Solution de correction des dérives implémentée dans le système soSPIM</i>	122
IV.2.2.	<i>Processus d'acquisition automatisé par zTrack</i>	126
IV.3.	METHODE DE RECONSTRUCTION DE CELLULES ENTIERES.	127
IV.3.1.	<i>Méthode de localisation des molécules individuelles : PALMTracer</i>	127
IV.3.2.	<i>Artéfacts de reconstruction</i>	128
IV.3.3.	<i>Repositionnement des plans deux à deux</i>	129
IV.3.4.	<i>Validation des processus d'acquisition et de reconstruction</i>	131
IV.4.	IMAGERIE SMLM DE CELLULES ENTIERES.....	132
IV.4.1.	<i>Comparaison des méthodes dSTORM et DNA-PAINT</i>	132
IV.4.2.	<i>Imagerie et quantification sur cellules entières en profondeur</i>	136
IV.4.2.1.	<i>Imagerie des récepteurs membranaires PD1 et CD3</i>	136
IV.5.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....	139
IV.5.1.	<i>Conclusion</i>	139
IV.5.2.	<i>Perspectives</i>	139
CONCLUSIONS		142
BIBLIOGRAPHIE		145

Introduction

Afin de mieux comprendre les fonctions des cellules vivantes, il est nécessaire d'observer et de déchiffrer les mécanismes moléculaires sous-jacents. La microscopie optique de fluorescence est un outil puissant, qui permet l'observation des protéines dans leur environnement natif, la cellule. Elle est toutefois soumise à une limite fondamentale : la résolution spatiale. En effet, le phénomène de diffraction de la lumière implique une limite à la résolution spatiale que tout système optique peut atteindre et qui a longtemps été considérée comme infranchissable. Pourtant, des travaux récents, dont certains récompensés par le prix Nobel de Chimie en 2014, ont permis le développement de nouvelles techniques de microscopie dites de super-résolution, permettant d'outrepasser cette limite. Parmi les trois grandes familles de méthodes de microscopie de super-résolution, la Microscopie par Localisation de Molécules Individuelles (SMLM, de l'anglais « Single Molecules Localization Microscopy ») permet d'atteindre les meilleures résolutions (≈ 10 nm) et de suivre au cours du temps la dynamique de molécules individuelles. Elle consiste à isoler dans le temps et l'espace les molécules fluorescentes marquant les structures que l'on veut observer. Il devient alors possible de localiser ces molécules isolées avec une précision 10 à 100 fois meilleure que ne le permet la microscopie optique classique.

Pour pouvoir atteindre de telles résolutions, la SMLM requiert toutefois des conditions d'imagerie contraignantes. En effet, la précision de localisation des molécules fluorescentes est directement liée à la quantité de photons captée par l'objectif de microscope, à la quantité de bruit de fond, ainsi qu'à la qualité optique du système. Aussi, les techniques de microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF, pour Total Internal Reflection Fluorescence) ou par faisceau hautement incliné (HILO, Highly Inclined and Laminated Optical Sheet) sont longtemps restées les méthodes de prédilection pour l'imagerie par SMLM. En effet, elles procurent un fort sectionnement optique en confinant l'illumination sur les premiers microns au-dessus de la lamelle de microscope, ce qui diminue fortement le bruit de fond provoqué par une illumination hors focus. Elles utilisent également des objectifs à forte ouverture numériques qui permettent de collecter de façon optimale le signal de fluorescence. Enfin, grâce la qualité des objectifs modernes, elles sont peu soumises aux aberrations optiques. Cependant, le sectionnement optique apporté par ces techniques d'imagerie limite intrinsèquement leur profondeur d'imagerie au premier micron au-dessus de la lamelle. Observer plusieurs dizaines de microns en profondeur à l'échelle de cellules entières constitue donc un défi majeur de l'imagerie par SMLM.

La microscopie à feuille de lumière (SPIM, pour Selective Plane Illumination Microscopy) s'est rapidement avérée être une méthode de choix pour l'imagerie d'échantillons 3D, car elle procure un sectionnement optique en profondeur. De nombreuses équipes ont donc travaillé au développement de systèmes innovants adaptés à de nombreux échantillons et questions biologiques. Cependant, les architectures classiques de SPIM utilisent au moins deux objectifs positionnés à 90° l'un de l'autre : l'un pour la création de la feuille de lumière et l'autre pour la collecte du signal de fluorescence. Ces architectures imposent d'importantes contraintes mécaniques et limitent en particulier l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique, les rendant inadaptées pour l'imagerie par SMLM en profondeur. Dans ce contexte, notre équipe a développé le système soSPIM (Single Objective Single Plane Illumination Microscopy). Celui-ci utilise un seul objectif combiné à des dispositifs microfabriqués, intégrant des miroirs à 45° pour réfléchir le faisceau d'excitation et créer ainsi une feuille de lumière perpendiculaire à l'axe de l'objectif. Cette architecture simple objectif rend possible l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique, afin de maximiser la quantité

de photons détectés lors de l'imagerie tout en bénéficiant du sectionnement optique procuré par une illumination en feuille de lumière.

Mon projet de thèse s'inscrit dans la continuité de ces développements. Il vise à implémenter au système soSPIM diverses solutions permettant l'imagerie de cellules entières par SMLM, plusieurs dizaines de microns en profondeur, avec des résolutions nanométriques. Pour décrire les travaux réalisés au cours de mes trois années de doctorat, cette thèse se divise en quatre chapitres :

Le premier chapitre est une introduction générale permettant de développer l'ensemble des phénomènes physiques auxquels j'ai fait appel pour mener à bien mes travaux de thèse. Une première partie concernera certains principes fondamentaux de l'optique, et me permettra d'introduire le fonctionnement d'un microscope optique, ses caractéristiques principales et ses limites. Je développerai également le phénomène de diffraction, source de nombreuses limites en microscopie optique, que ce soit au niveau de l'illumination, ou de la détection du signal. Je détaillerai ensuite le fonctionnement des techniques de microscopie de super-résolution, et plus particulièrement la SMLM, et discuterai des méthodes actuelles permettant d'imager en profondeur à l'aide de cette technique. J'exposerai alors le principe de fonctionnement de l'architecture soSPIM, ses capacités et ses limites. Enfin, j'introduirai les trois défis principaux auxquels j'ai dû répondre au cours de ma thèse, afin d'adapter le système soSPIM à l'imagerie par SMLM en profondeur : (1) la qualité du sectionnement optique, (2) la correction des aberrations apparaissant avec la profondeur d'imagerie et (3) la gestion des acquisitions longue durée et de la reconstruction des volumes imagés avec des résolutions nanométriques.

Le second chapitre concerne le premier défi que j'ai relevé au cours de mes travaux de recherche, à savoir l'amélioration de la qualité du sectionnement optique dans le système soSPIM. Nous verrons que le phénomène de diffraction de la lumière implique la nécessité de faire un compromis entre la finesse du sectionnement optique et l'étendue du champ de vue imagé. Ce compromis limite le sectionnement optique lors de l'imagerie de grand champ de vue, diminuant la précision de localisation qu'il est possible d'atteindre en imagerie par SMLM. Nous verrons cependant qu'il existe des faisceaux, dits « non diffractifs », dont les propriétés particulières permettent d'étendre significativement le champ de vue, tout en maintenant un sectionnement optique optimal. Je détaillerai alors le système que j'ai mis en place pour permettre ce type d'illumination avec la technologie soSPIM, et présenterai les résultats obtenus. Bien que nous ayons pu obtenir un sectionnement particulièrement fin grâce à ce type de faisceau, je montrerai que l'architecture spécifique du système soSPIM a limité l'application de ces développements.

Dans un troisième chapitre, nous nous intéresserons à la qualité du signal détecté. Nous verrons qu'avec la profondeur d'imagerie apparaissent des défauts que l'on appelle aberrations optiques. Ces aberrations ont pour conséquence de déformer le signal transmis par le microscope et ont un impact important sur la précision et la justesse de localisation des molécules individuelles. Après avoir quantifié l'évolution de ces aberrations et de leur impact sur l'imagerie par SMLM, je développerai la solution que nous avons mise en place, basée sur l'utilisation d'un système d'optique adaptative. Je montrerai que cette méthode permet de supprimer la plupart des aberrations optiques apparaissant avec la profondeur, et ainsi de retrouver les résolutions optimales généralement atteintes à la surface de la lamelle. Enfin, j'aborderai les limites de cette implémentation et présenterai les perspectives d'amélioration que nous envisageons.

Pour finir, je développerai dans un quatrième chapitre les derniers défis relevés au cours de cette thèse. Nous verrons que, comme tout microscope, le système soSPIM est

soumis à des dérives spatiales se produisant au cours des acquisitions. C'est en particulier le cas lors des acquisitions de SMLM, qui peuvent durer de quelques minutes à plusieurs heures. De plus, l'architecture particulière du soSPIM implique la nécessité de corriger ces dérives en temps réel, là où les systèmes standards s'accommodent d'une correction numérique post-acquisition. Après avoir quantifié ces dérives, je développerai la solution que nous avons développée. Elle met à profit les dispositifs soSPIM, qui permettent de disposer de marqueurs fiduciaires sur l'ensemble du volume afin de suivre leurs déplacements en temps réel. Je montrerai ensuite comment j'ai aussi utilisé ces marqueurs fiduciaires pour reconstruire précisément l'ensemble du volume d'acquisition avec des résolutions nanométriques. Enfin, je présenterai les images de super-résolution de cellules entières obtenues au cours de mes travaux de recherche, lesquelles ont permis une étude de la répartition de récepteurs membranaires à la surface de cellules immunitaires.

Chapitre I : Introduction

Dans cette thèse, je vais développer l'ensemble des solutions que nous avons mises au point afin de répondre aux nombreux défis que posent l'imagerie de super-résolution par localisation de molécules individuelles de volumes importants ($\sim 20 \times 20 \times 20 \mu\text{m}^3$) en profondeur. Ce premier chapitre vise à introduire l'ensemble des bases scientifiques nécessaires à la compréhension de mon travail. Je commencerai par rappeler certains fondements de l'optique ainsi que le principe de fonctionnement des microscopes classiques et modernes. Je détaillerai en particulier certaines techniques de microscopie de fluorescence largement utilisées en biologie, et discuterai de leurs avantages et de leurs limites. Une des limites fondamentales en microscopie optique de fluorescence étant la résolution spatiale, j'introduirai dans une seconde partie les techniques de microscopie dites de super-résolution et comment elles ont révolutionné la façon d'observer des échantillons biologiques. Je détaillerai plus particulièrement les techniques de microscopie par localisation de molécules individuelles (ou Single Molecules Localization Microscopy SMLM), dont j'ai cherché au cours de ma thèse à étendre la capacité à imager des objets biologiques en profondeur. La troisième partie de ce chapitre sera consacrée à la présentation des architectures de microscopie optique optimisées pour la microscopie de super-résolution SMLM. Je développerai plus spécifiquement méthodes permettant l'imagerie SMLM en profondeur, et en particulier celles utilisant une excitation par feuille de lumière. Enfin, la quatrième partie sera dédiée à la description exhaustive du système d'imagerie à feuille de lumière à un seul objectif développé au laboratoire, nommé soSPIM¹, et utilisé dans le cadre de mon projet.

I.1. Formalisme, et description de la propagation de la lumière.

Selon la situation, la lumière peut être définie comme une particule ou comme une onde. Ces deux descriptions qui semblent contradictoires sont pourtant toutes deux vraies. De nombreuses expériences permettent de mettre en évidence ces deux aspects de la lumière : les phénomènes d'interférence et de diffraction observés avec l'expérience des fentes d'Young prouvent que la lumière se comporte comme une onde, alors que le fonctionnement des lasers et le phénomène de fluorescence valident l'hypothèse de l'aspect corpusculaire de la lumière. On parle de « dualité onde-corpuscule ». Dans ce travail de thèse, c'est essentiellement l'aspect ondulatoire de la lumière qui sera exploité afin de décrire les phénomènes de propagation de faisceaux lumineux, la formation d'images en microscopie de fluorescence, ou encore le phénomène des aberrations optiques. L'aspect corpusculaire de la lumière sera quant à lui considéré lorsqu'il s'agira de décrire le phénomène de fluorescence qui sera détaillé en section I.2.3.1.

Dans cette partie, je détaillerai les moyens permettant de décrire le phénomène de propagation de la lumière que j'ai utilisés afin de concevoir un système optique de façonnage de faisceau laser (Chapitre II), et que j'ai pris en compte pour implémenter une méthode de corrections des aberrations optiques (Chapitre III). Il existe pour ce faire deux formalismes : l'optique géométrique et l'optique ondulatoire. L'optique géométrique est un formalisme plus simple et généralement suffisant pour décrire le phénomène de propagation d'un faisceau lumineux, mais n'est valide que sous certaines conditions et approximations. L'optique ondulatoire procure quant à elle un cadre bien plus complet. Elle permet de détailler

l'ensemble des phénomènes ayant lieu lors de la propagation d'une onde lumineuse, de la description des phénomènes d'interférence et de diffraction de la lumière, à la formalisation des aberrations optiques.

1.1.1. Optique géométrique

Historiquement, l'optique géométrique est la première théorie qui a été formalisée afin de décrire les phénomènes de propagation de la lumière. Ce formalisme constitue un outil puissant lorsqu'il s'agit de concevoir des systèmes optiques simples grâce au concept de rayon de lumière. Ces rayons correspondent à la direction de propagation de l'énergie lumineuse. Cette description simplifiée sera utilisée lorsqu'il s'agira de détailler le système optique de façonnage de faisceaux que j'ai mis en place au cours de mes travaux.

Il est important de noter que l'optique géométrique ne s'oppose pas à la description ondulatoire de la lumière. Bien au contraire, l'ensemble des règles qui y sont décrites peuvent être retrouvées par l'optique ondulatoire en se limitant aux conditions de Gauss, c'est-à-dire dans l'approximation paraxiale*. Cependant, de nombreux aspects liés à la nature ondulatoire de la lumière sont éludés. L'optique géométrique procure donc une vision simplifiée, qui permet d'obtenir rapidement des prédictions précises selon certaines conditions, mais dont la portée est plus restreinte. Ce formalisme ne permet pas, par exemple, de décrire les phénomènes interférentiels, la diffraction, ou tout phénomène lié à la phase de la lumière, qui seront développés dans la section 1.1.2 portant sur l'optique ondulatoire.

1.1.1.1. Lois de Snell-Descartes

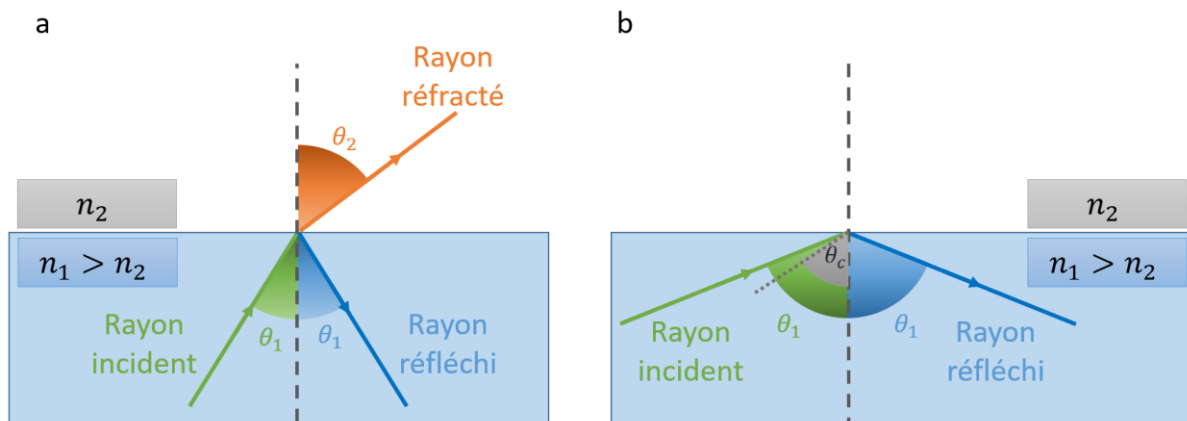


Figure 1.1 : Lois de Snell-Descartes. (a) À l'interface entre deux milieux d'indice de réfraction différents, le rayon incident se divise en deux rayons : le rayon réfléchi conserve l'angle d'incidence, alors que le rayon transmis subit une réfraction décrite par les lois de Snell-Descartes. Les rayons incident, réfléchi et réfracté se situent tous dans le même plan et forment respectivement un angle θ_1 , θ_1 et θ_2 par rapport à la normale du dioptre. (b) Lorsque le rayon lumineux rencontre un dioptre vers un milieu d'indice plus faible, au-delà d'un angle critique θ_c la totalité de l'énergie du rayon est réfléchi, on parle alors de réflexion totale.

Selon le principe de Fermat, pour joindre deux points de l'espace, la lumière considérera toujours le chemin le plus court et sa vitesse de propagation ne dépendra que de son milieu de propagation :

Équation I.1

$$v_i = \frac{c}{n_i}$$

* Approximation paraxiale : les rayons lumineux restent proches de l'axe optique. Cela implique que les angles étudiés sont petits, et que les dimensions des objets et des images sont petites comparées aux distances de propagations.

Avec v_i la vitesse de propagation de la lumière dans le milieu, c la vitesse de la lumière dans le vide et n_i l'indice de réfraction du milieu.

Le principe de Fermat implique aussi que le chemin emprunté par la lumière ne dépend pas de son sens de propagation, nommé aussi principe du retour inverse de la lumière. La vitesse finie de propagation de la lumière associée au principe de Fermat permet de démontrer les lois de Snell-Descartes. Celles-ci décrivent le comportement de la lumière lors de la traversée d'un dioptre entre deux milieux d'indices de réfraction différents (Figure I.1-a). Le rayon incident est alors réfléchi et/ou réfracté selon trois règles : (i) Les rayons incident, réfléchi et réfracté ainsi que la normale à la surface au point d'incidence se situent sur le même plan, (ii) l'angle de réflexion est égal à l'angle d'incidence θ_1 , (iii) le rayon réfracté forme un angle θ_2 avec la normale tel que :

Équation I.2

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2)$$

Avec n_1 et n_2 les indices de réfraction des milieux formant le dioptre.

On remarque également que dans le cas où $n_2 < n_1$, il existe un angle critique θ_c à partir duquel le rayon réfracté ne peut plus exister (Figure I.1-b) :

Équation I.3

$$\theta_c = \sin^{-1}\left(\frac{n_2}{n_1}\right)$$

Si l'angle du rayon incident θ_1 est supérieur à cet angle critique θ_c , le rayon ne peut être réfracté et la totalité de son énergie est réfléchi : on parle de réflexion totale (Figure I.1.b). Ce phénomène est utilisé pour concevoir des guides d'onde tels que les fibres optiques, et est également à la base de certaines techniques de microscopie, telles que la microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF : Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy, voir section I.4.1).

I.1.1.2. Lentilles sphériques minces

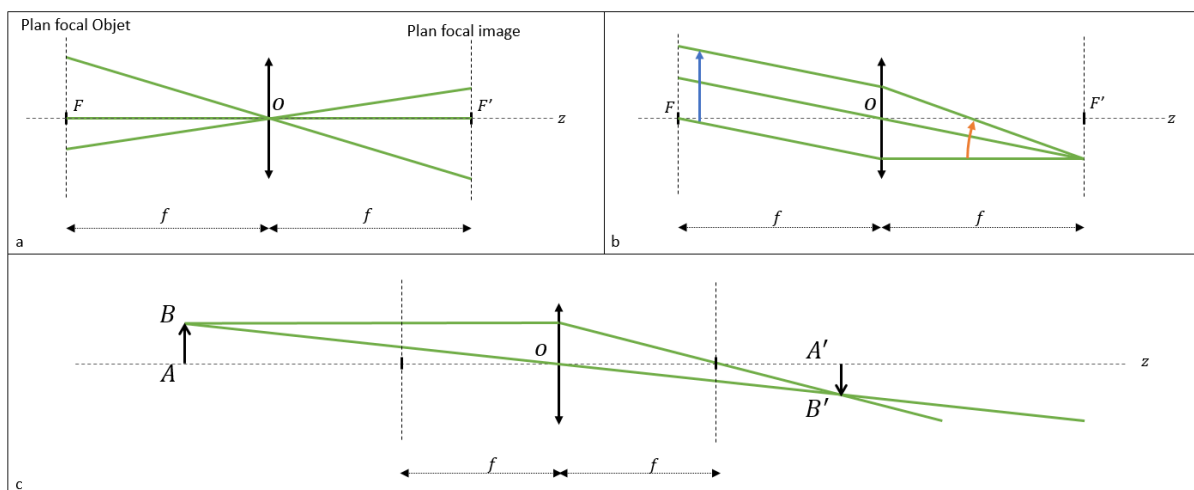


Figure I.2 — Relations de conjugaison pour une lentille convergente. (a) Les rayons lumineux qui passent par le centre optique O ne sont pas déviés. (b) Les rayons parallèles traversant une lentille sont déviés pour se croiser sur le plan focal. On note qu'une translation sur un plan focal (flèche bleue) équivaut à une rotation sur l'autre plan focal (flèche orange) et réciproquement. (c) Exemple de formation d'une image par une lentille convergente : $\overrightarrow{A'B'}$ est l'image de \overrightarrow{AB} par la lentille. z est l'axe optique, O est le centre optique, F et F' sont respectivement le foyer objet et le foyer image de la lentille et f sa distance focale.

Lorsque l'ensemble des rayons lumineux émis par un point et traversant un système optique se croise en un unique point, on dit que le système est stigmatique : l'image d'un point par le système est un autre point. Le seul système rigoureusement stigmatique pour tout point de l'espace est le miroir plan. Toutefois, dans le cadre de l'optique géométrique et en se limitant à l'étude de systèmes dans les conditions de Gauss, on considère un stigmatisme approché pour certains éléments. C'est le cas des lentilles minces, pour lesquelles on admet que l'image d'un point A est un autre point A' . On dit alors que les points A et A' sont conjugués l'un de l'autre. La Figure I.2 représente les différentes règles de construction permettant de prédire le comportement des faisceaux traversant une lentille mince. Par construction géométrique, on peut montrer la relation de conjugaison suivante :

Équation I.4

$$\frac{1}{OA'} - \frac{1}{OA} = \frac{1}{OF'}$$

Où A' est l'image du point A par la lentille, O est le centre optique et F' le foyer image. Cette relation permet de prédire la position de l'image d'un objet par une lentille.

Pour la conception des montages optiques utilisés lors de mes expériences, je me suis plus particulièrement intéressé au cas spécifique où l'objet est situé sur le plan focal objet d'une lentille. Dans cette situation, après la lentille, les rayons provenant d'un point de l'objet se retrouvent parallèles entre eux. Les rayons ne se croisent donc plus, on dit alors que l'image est projetée à l'infini et que le faisceau est collimaté. À l'inverse, un objet situé à l'infini verra son image se former sur plan focal image de la lentille.

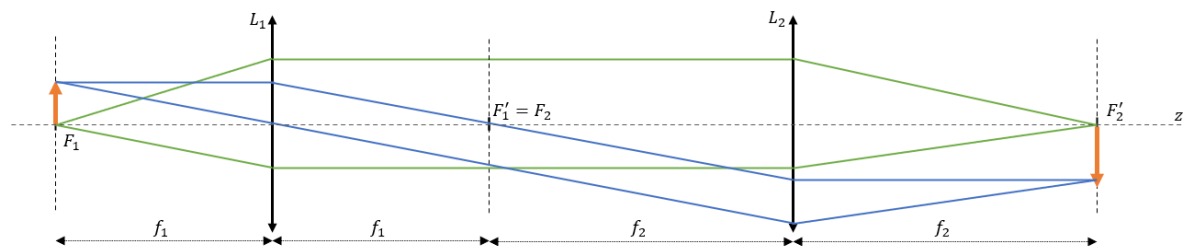


Figure I.3 — Système optique afocal. Le plan focal image de la lentille L_1 est superposé au plan focal objet de la lentille L_2 . Le plan focal objet de la lentille L_1 est ainsi conjugué du plan focal image de la lentille L_2 . Le plan focal intermédiaire est appelé plan de Fourier (voir section I.1.2.5).

La Figure I.3 représente un système afocal, aussi appelé montage 4f lorsque les lentilles le constituant ont les mêmes distances focales. Dans ce cas, les plans focaux des lentilles qui le constituent sont confondus. Le plan focal commun aux deux lentilles est communément appelé plan de Fourier, dont les propriétés seront détaillées en section I.1.2.5. Une propriété essentielle de ces systèmes est qu'il devient possible de conjuguer alternativement les plans focaux image et objet des lentilles à travers l'agencement consécutif de plusieurs de ces montages afocaux. Ils constitueront la brique élémentaire de mes constructions optiques, me permettant de reporter virtuellement les plans focaux objet et image de l'objectif de microscope. Ces plans seront en particulier utilisés pour y positionner des éléments optiques ayant pour but de façonner le faisceau d'excitation (Chapitre II), ou d'agir sur les aberrations optiques du signal collecté (Chapitre III).

Une dernière notion à noter est le grossissement du système. Nous nous limiterons aux cas des montages afocaux avec l'objet situé dans le plan focal objet. Dans cette situation, on peut montrer par construction géométrique que le grossissement γ vaut :

Équation I.5

$$\gamma = \frac{f_2}{f_1}$$

Avec f_1 et f_2 représentant les distances focales respectives de la première et deuxième lentille constituant le montage afocal.

I.1.2. Optique ondulatoire

I.1.2.1. Formalisme

L'optique ondulatoire offre une description plus fine et détaillée du phénomène de propagation de la lumière que l'optique géométrique en permettant par exemple de formaliser des phénomènes tels que les interférences ou la diffraction de la lumière. Ce formalisme permet également de décrire les phénomènes liés à la polarisation de la lumière (orientation des champs électriques et magnétiques). Toutefois, la prise en compte de cette polarisation n'étant pas utile pour les développements décrits dans cette thèse, nous nous en affranchirons et considérerons uniquement l'approximation scalaire de la lumière.

Quelques développements mathématiques sont nécessaires pour appréhender l'optique ondulatoire. Considérons une onde plane monochromatique se propageant dans un milieu transparent homogène et isotrope dans la direction z . Il s'agit d'une onde progressive périodique, de longueur d'onde (période spatiale) λ et de période temporelle T . Aux coordonnées (x, y, z) , le champ électromagnétique $E(x, y, z, t)$ vaut :

Équation I.6

$$E(x, y, z, t) = \sqrt{2}E_0 \cos(\omega t - kz + \phi_0)$$

Dans cette formule, E_0 est l'amplitude, k le nombre d'onde, ω la pulsation et ϕ_0 la phase à l'origine. Les coordonnées spatiales sont données par x , y et z , avec z la direction de propagation de l'onde plane, et t le temps. Le terme $\phi = (\omega t - kz + \phi_0)$ définit la phase de l'onde. La longueur d'onde λ , la fréquence ν , la pulsation ω , le nombre d'onde k et la vitesse de la lumière dans le vide c sont liés par les équations suivantes :

Équation I.7

$$\nu = 2\pi\omega$$

Équation I.8

$$\lambda = \frac{2\pi}{k}$$

Équation I.9

$$\nu = \frac{c}{\lambda}$$

Pour faire le lien entre l'optique géométrique et l'optique ondulatoire, on peut introduire le théorème de Malus stipulant que les rayons lumineux sont en tout point perpendiculaires aux surfaces d'onde, nommées également surfaces équiphases, définies comme l'ensemble des points de phase ϕ égale (Figure I.4).

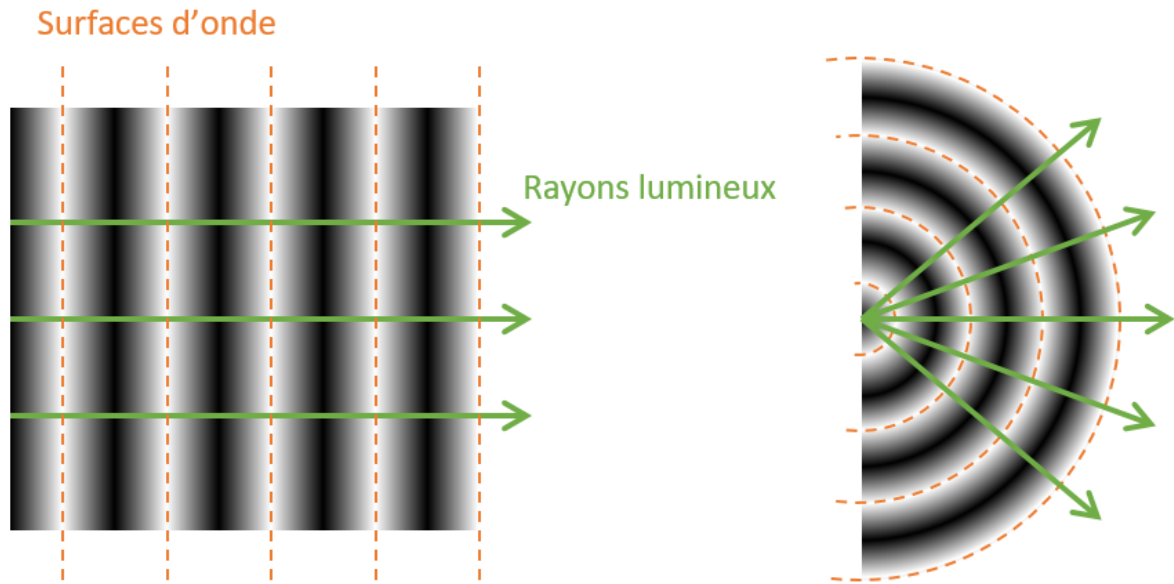


Figure I.4 : Lien entre l'optique ondulatoire et l'optique géométrique. D'après le théorème de Malus, dans un milieu isotrope les surfaces d'onde (orange) sont perpendiculaires aux rayons lumineux (vert), qui représentent la direction de propagation de l'énergie. À gauche est représentée le cas d'une onde plane, et correspond à des rayons lumineux se propageant de façon parallèle les uns aux autres. On parle de faisceaux collimatés. À droite est représenté le cas d'une onde sphérique produite par un point source.

On peut également introduire la notation complexe suivante pour décrire la propagation d'une onde plane :

Équation I.10

$$\underline{E}(x, y, z, t) = E_0 e^{i(\omega t - kz + \phi_0)}$$

Cette notation permet de simplifier bon nombre de calculs, en particulier pour décrire les phénomènes de diffraction ou d'interférences. On retient dans ce cas que le champ réel correspond à la partie réelle du champ complexe :

Équation I.11

$$E = \text{Re}(\underline{E})$$

Et que l'intensité lumineuse est définie par :

Équation I.12

$$I = \underline{E} \underline{E}^*$$

Où \underline{E}^* désigne le complexe conjugué de \underline{E} . Dans le cas de notre onde plane monochromatique, l'intensité vaut donc :

Équation I.13

$$I = E_0^2$$

On peut noter que pour une onde plane ainsi décrite, l'intensité est la même en tout point de l'espace ce qui implique une énergie totale infinie. L'onde plane monochromatique correspond donc à une abstraction mathématique. En réalité, une onde n'est jamais parfaitement plane, car elle est toujours limitée spatialement, et n'est jamais parfaitement monochromatique. Cependant, toute onde réelle quelconque peut être décomposée en une somme d'ondes planes monochromatiques. Il s'agit donc d'une abstraction puissante permettant de décrire les situations réelles à l'aide d'outils mathématiques (section I.1.2.5).

I.1.2.2. Interférences

Comme toutes ondes, la lumière est sujette aux interférences. Si deux ondes électromagnétiques arrivent en un point de l'espace, le champ électromagnétique en ce point est la somme des champs des deux ondes :

Équation I.14

$$\underline{E}_{tot}(x, y, z, t) = \underline{E}(x, y, z, t) + \underline{E}'(x, y, z, t)$$

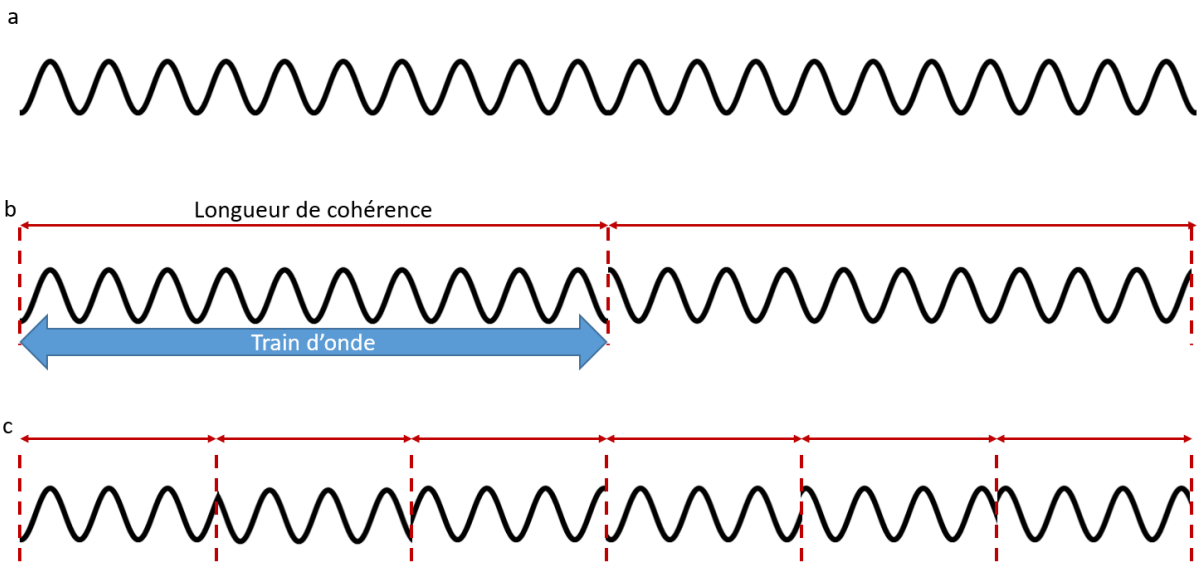
L'intensité en ce point de l'espace vaut alors :

Équation I.15

$$I = (\underline{E} + \underline{E}')(\underline{E} + \underline{E}')^*$$

Pour pouvoir observer des interférences entre deux ondes électromagnétiques, il est nécessaire de réunir plusieurs conditions :

- Fréquences identiques : Deux ondes de fréquences f_1 et f_2 interférant provoquent un phénomène de battement de fréquence $f_b = f_1 - f_2$. Les fréquences des ondes lumineuses sont de l'ordre de 10^{15} s, soit plusieurs ordres de grandeur en dessous des détecteurs les plus rapides. En général, on considère que l'on ne peut observer des interférences que dans le cas où $f_1 = f_2$, c'est-à-dire que l'intensité résultante est constante dans le temps*.
- Cohérence : l'Équation I.2 présente un terme de phase ϕ_0 constant. Il s'agit d'une simplification, et en réalité une onde lumineuse présente des sauts de phase comme le montre la Figure I.5. Pour pouvoir observer des interférences, il faut que la différence de phase soit constante dans le temps, et donc que les trains d'ondes des deux ondes soient synchronisés. On parle alors de cohérence temporelle, la cohérence spatiale étant mentionnée lorsqu'on compare deux points de l'espace plutôt que du temps. Notons que la cohérence spatiale et la cohérence temporelle décrivent le même phénomène : la longueur de cohérence d'une onde correspond à la distance parcourue par cette onde pendant le temps de cohérence.



* Il est possible d'observer un phénomène de battement dans le cas où les ondes sont de fréquences (et longueur d'onde) très proches, comme dans le cas du doublet jaune du sodium (589,5924 nm et 588,9950 nm) SS

Figure I.5 — Cohérence d'une onde. Représentation graphique de la cohérence. Les trains représentent la distance sans saut de phase. Plus une source est cohérente, plus les trains d'onde sont grands. Les interférences ne peuvent être observées que si les trains d'onde sont synchronisés.

Lorsque ces deux conditions sont réunies, on dit que les sources et les ondes sont synchrones. Généralement, ces conditions sont obtenues en utilisant une source primaire unique divisée en deux sources secondaires. Dans cette situation, la fréquence des deux ondes est identique, et les deux ondes sont cohérentes si la différence de trajet optique est plus petite devant longueur de cohérence. L'intensité est alors décrite par l'équation suivante :

Équation I.16

$$I = E_0^2 + E'_0{}^2 + 2E_0E'_0 \cos(\Delta\phi)$$

Où $\Delta\phi$ est la différence de phase entre les deux ondes, provoquée par la différence de chemin optique. Notons également que l'amplitude des deux ondes a un impact sur le contraste de la figure d'interférence : deux ondes de même amplitude ($E'_0 = E_0$) induisent un contraste maximal.

I.1.2.3. Diffraction des faisceaux gaussiens

Lors de sa propagation, la lumière ne suit jamais une ligne droite comme le suggère l'optique géométrique. Même dans le cas d'un laser parfait où le front d'onde est plan en sortie de cavité laser, autrement dit lorsque les rayons sont parfaitement parallèles entre eux, le faisceau s'étale spatialement au cours de sa propagation (Figure I.7). Ce phénomène, appelé diffraction, s'explique par le principe d'Huygens-Fresnel : tout point atteint par une onde se comporte comme une source secondaire émettant une onde sphérique de même fréquence, de même phase, et d'amplitude proportionnelle à l'onde incidente (Figure I.6). Les sources secondaires interfèrent entre elles lors de la propagation de l'onde et sont à l'origine de ce phénomène de diffraction.

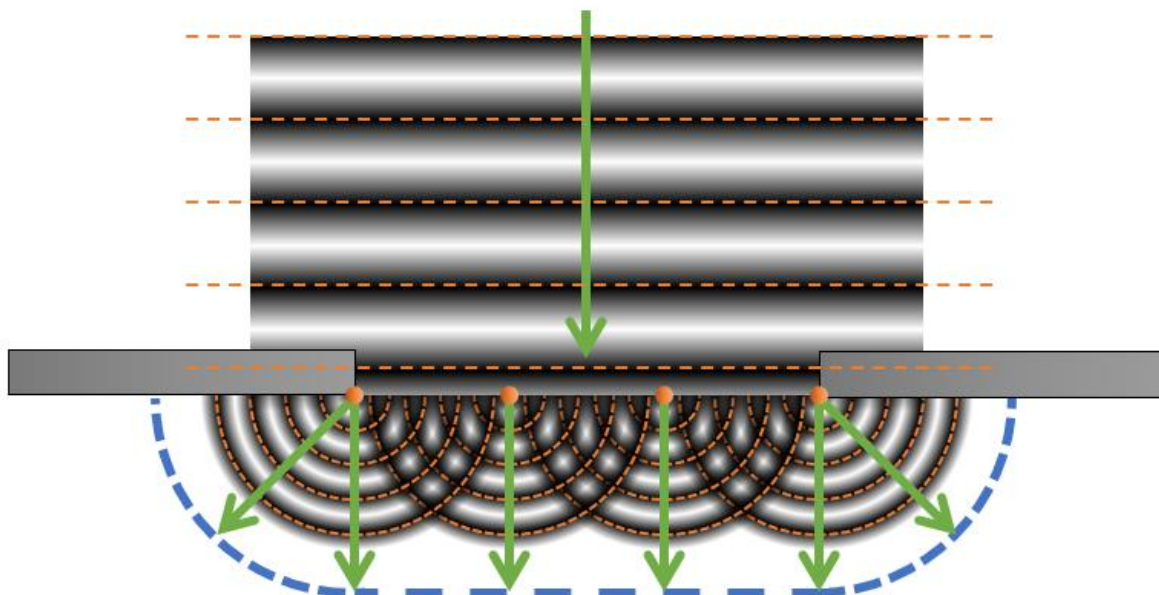


Figure I.6 — Principe d'Huygens-Fresnel. Lorsque l'onde plane atteint l'ouverture, chaque point de l'ouverture agit comme une source ponctuelle. L'onde résultante est la somme de toutes les participations. Les flèches vertes représentent la direction de propagation de l'onde. Les tirets orange représentent les fronts d'onde de chaque onde, tandis que les tirets bleus représentent le front d'onde total résultant.

La diffraction de Fraunhofer est un cas particulier de ce principe de propagation permettant d'étudier le comportement de la lumière en champ lointain, c'est-à-dire à l'infinie.

En pratique, lorsque l'on se situe dans les conditions de Gauss, c'est-à-dire lorsque les distances de propagations sont grandes devant les dimensions des objets considérés, on considère que la diffraction de Fraunhofer est une approximation justifiée.

Les faisceaux gaussiens constituent un cas particulièrement intéressant dans le cadre de mes travaux : mathématiquement ils sont une solution aux équations régissant la propagation des ondes dans le cadre de l'approximation paraxiale, tandis que physiquement ils peuvent être créés au moyen d'un filtrage spatial. Ainsi un faisceau laser en sortie de fibre monomode sera considéré comme gaussien. En ce qui concerne la diffraction des faisceaux gaussiens (Figure I.7), on peut montrer que le profil latéral de l'intensité lumineuse évolue au cours de la propagation selon l'axe z suivant cette formule :

Équation I.17

$$I(r, z) = I_0 \left(\frac{w_0}{w(z)} \right)^2 \exp \left(\frac{-2r^2}{w^2(z)} \right)$$

Avec :

Équation I.18

$$w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda z}{\pi w_0^2} \right)^2}$$

Et

Équation I.19

$$z_0 = \frac{\pi w_0^2}{\lambda}$$

Où

- I_0 est l'intensité à l'origine : $I_0 = I(0,0)$
- $r = \sqrt{x^2 + y^2}$
- $w(z)$ représente la largeur du faisceau et est définie comme la distance à laquelle l'amplitude du champ est divisée par e ce qui correspond à une division de l'intensité du faisceau par e^2
- w_0 est la largeur minimale du faisceau, aussi appelée « focus » ou « waist » (anglicisme signifiant « taille »). Par extension, le terme waist décrit en général l'endroit où le faisceau est le plus fin.
- Et z_0 est la longueur de Rayleigh. Elle correspond à la distance à laquelle la largeur du faisceau est multipliée par $\sqrt{2}$: $w(\pm z_0) = w_0\sqrt{2}$. On utilise aussi souvent les expressions « paramètre confocal » ou « profondeur de champ » qui font référence au double de la longueur de Rayleigh

Lors de la propagation d'un faisceau gaussien, une propriété importante à prendre en considération est sa longueur de Rayleigh z_0 . Cette longueur délimite la zone où le faisceau est le plus concentré, et on considère souvent que dans cette zone le faisceau est collimaté, c'est-à-dire que l'ensemble des rayons sont parallèles entre eux. On note en particulier que plus le faisceau est fin et plus la longueur de Rayleigh est petite, donc plus le faisceau diverge rapidement. Nous verrons dans le Chapitre II l'impact que peut avoir cette propriété, en particulier pour les techniques de microscopie par feuille de lumière que j'ai utilisées dans mon travail de thèse afin de permettre la microscopie de super-résolution en profondeur.

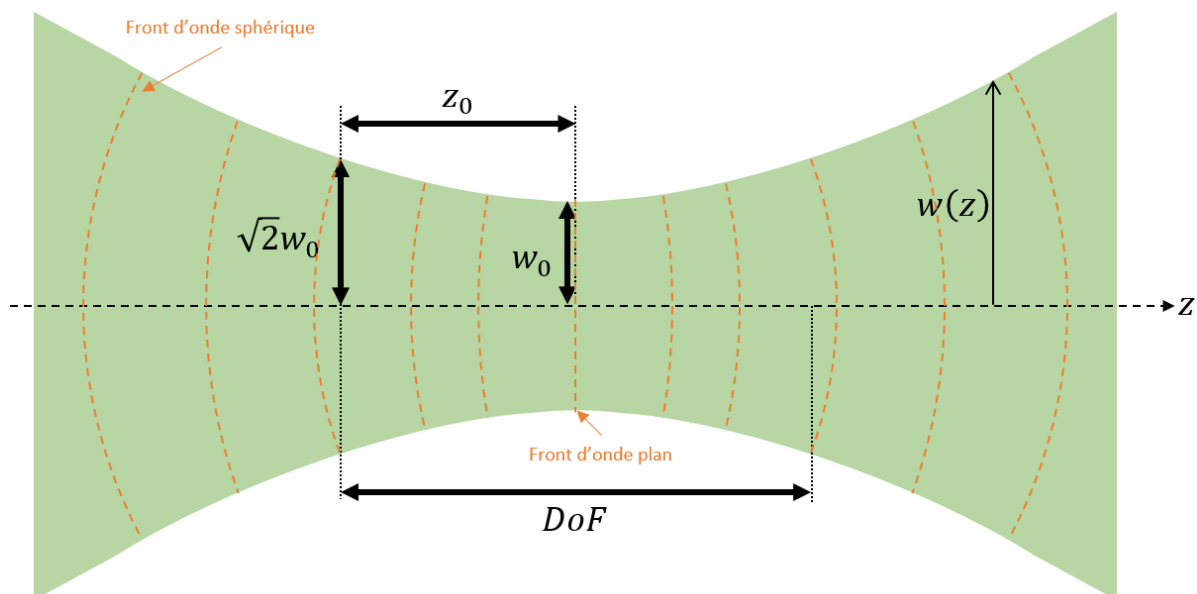


Figure I.7 — Effet de la diffraction sur un faisceau gaussien. Alors que le front d'onde est parfaitement plan au niveau du waist, il est déformé au cours de la propagation pour devenir de plus en plus sphérique, provoquant l'étalement du faisceau.

I.1.2.4. Diffraction par une ouverture circulaire

Lorsque l'on conçoit un système optique, les dimensions des éléments optiques sont particulièrement importantes. Les lentilles et miroirs que doit traverser le faisceau sont systématiquement dimensionnés de telle sorte que ce dernier ne soit pas rogné. Les dimensions des éléments optiques n'interviennent donc pas dans la propagation de la lumière. Cette affirmation n'est cependant pas applicable en imagerie. En effet, l'élément observé émet de la lumière dans toutes les directions, et seule une fraction de cette lumière est captée par un élément optique tel qu'un objectif de microscope. Ainsi, les dimensions de l'objectif revêtent une importance cruciale sur les performances du système d'imagerie : l'objectif agit comme une ouverture circulaire permettant de collecter une quantité plus ou moins importante de lumière, ce qui impacte directement le processus de formation de l'image. Il est donc nécessaire de connaître l'effet de ces ouvertures sur la propagation d'une onde lumineuse.

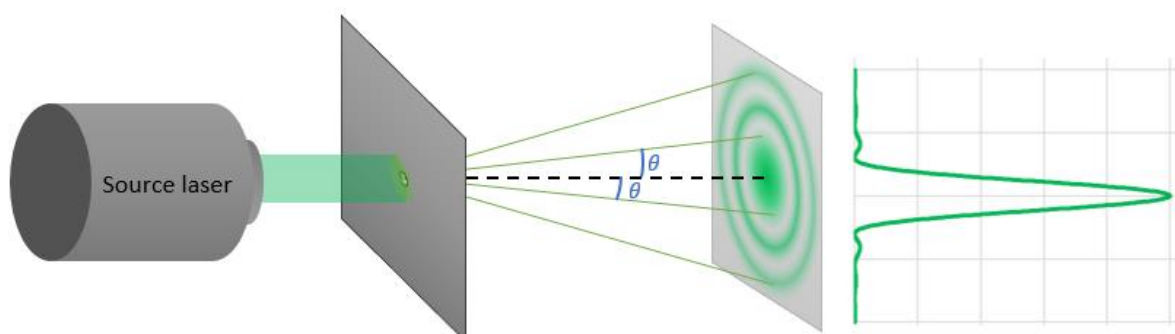


Figure I.8 : Diffraction par une ouverture circulaire. Une ouverture circulaire crée à grande distance une tache d'Airy, dont le profil est donné par une fonction de Bessel.

Lorsqu'une onde traverse une ouverture circulaire suffisamment petite, elle crée sur un écran lointain une figure de diffraction (Figure I.8). Cette figure de diffraction peut être décrite par la diffraction de Fraunhofer. En coordonnées polaires, on montre que l'intensité diffractée par une ouverture circulaire de diamètre d dépend de l'angle θ entre le point considéré, le centre de l'ouverture et l'axe de propagation, et peut être exprimé par :

Équation I.20

$$I = I_0 \left(\frac{2 J_1(\pi x_b)}{\pi x_b} \right)^2$$

Avec :

- $x_b = \frac{d \sin \theta}{\lambda}$
- J_1 est la fonction de Bessel du premier ordre (représentée en Figure I.8)
- I_0 est l'intensité au centre de la figure de diffraction

Cette figure de diffraction est également appelée tache d'Airy, en référence à George Biddell Airy qui décrit le phénomène en 1835. La première annulation de l'intensité a lieu pour $x_b \approx 1,22$ soit :

Équation I.21

$$\theta_0 \approx 1,22 \frac{\lambda}{d}$$

La taille de cette tache de diffraction a une grande importance en microscopie, car elle limite la résolution spatiale des systèmes optiques, comme nous le verrons en section I.2.2.3.

I.1.2.5. Optique de Fourier

Lors de la propagation d'une onde dans un milieu d'indice n , celle-ci subit une variation de phase, en fonction d'une grandeur appelée chemin optique. On peut définir le chemin optique \mathcal{L} entre les points A et B par l'équation suivante :

Équation I.22

$$\mathcal{L} = \int_A^B n(z) dz$$

Avec ici z la distance parcourue lors de la propagation, et $n(z)$ l'indice de réfraction le long de l'axe de propagation. On note que dans un milieu homogène, $n(z)$ est constant, et ce chemin optique \mathcal{L} est alors l'indice n multiplié par la distance AB . Ainsi, lors de la propagation de l'onde, celle-ci subit une évolution de la phase ϕ de la quantité ψ :

Équation I.23

$$\psi = \frac{2\pi}{\lambda} \mathcal{L}$$

Une lentille sphérique présente une surface sphérique. Ainsi, lorsqu'une onde la traverse, le chemin optique subit au centre de la lentille est différent du chemin subit aux extrémités (Figure I.9). Cette différence de chemin optique a pour effet d'introduire un terme de phase variant de façon quadratique en fonction de la distance avec l'axe optique :

Équation I.24

$$\mathcal{L}' = \mathcal{L}_0 - \frac{1}{2f'} \rho^2$$

Ici, $\mathcal{L}_0 = \mathcal{L}_1 + \mathcal{L}_2 + \mathcal{L}_3$ représente le chemin optique subit au centre, et $\mathcal{L}' = \mathcal{L}'_1 + \mathcal{L}'_2 + \mathcal{L}'_3$ le chemin optique subit à distance $\rho = \sqrt{x^2 + y^2}$, tel que présenté en Figure I.9. Un premier résultat de ce terme quadratique de phase est qu'une onde sphérique dont le centre se trouve sur le plan focal de la lentille est transformée en une onde dont le front d'onde est plan après la lentille, ce qui correspond à ce qui est décrit en optique géométrique (I.1.1.2).

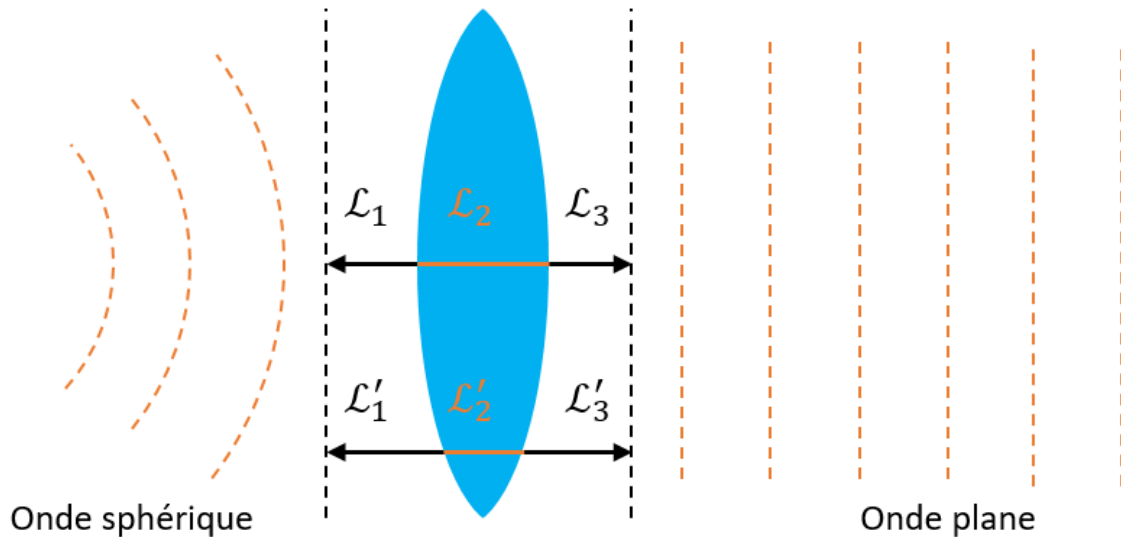


Figure I.9 — Effet d'une lentille sphérique sur une onde sphérique. Le chemin optique $\mathcal{L} = \mathcal{L}_1 + \mathcal{L}_2 + \mathcal{L}_3$ subit par l'onde au centre de la lentille est plus petit que le chemin optique $\mathcal{L}' = \mathcal{L}'_1 + \mathcal{L}'_2 + \mathcal{L}'_3$. Cette différence de chemin optique a pour effet de transformer une onde sphérique en onde plane, et inversement.

Une autre conséquence de cette propriété des lentilles sphériques est que celles-ci ont pour effet d'effectuer une transformée de Fourier spatiale². De façon générale, la transformée de Fourier $\mathcal{F}_{f(t)}$ d'une fonction $f(t)$ est définie par l'équation suivante :

Équation I.25

$$\mathcal{F}_{f(t)}(v_t) = \hat{f}(v_t) = \int_{-\infty}^{+\infty} f(t) e^{2i\pi x v_t} dt$$

Ici, t est la variable dans laquelle est définie la fonction f (souvent le temps), et v_t son équivalent dans le domaine spectral (dans ce cas, la fréquence temporelle). Physiquement, la fonction $\hat{f}(v_t)$ décrit la répartition du spectre. Ainsi, une transformée de Fourier dans le domaine temporel permet d'extraire les fréquences (temporelle) constituant un signal. C'est un outil largement utilisé en traitement de signal, car il permet de décomposer tout signal en un spectre de fréquence, et de traiter chaque fréquence indépendamment des autres.

En optique de Fourier, la transformée de Fourier effectuée par la lentille entre les deux plans focaux n'est pas effectuée dans le temps, mais dans l'espace (x, y) . Elle permet d'extraire les fréquences spatiales d'une image, filtrées à travers une ouverture circulaire limitant spatialement la propagation de l'onde (I.1.2.4). Appliqué sur une onde plane monochromatique, on obtient la « fonction d'étalement de point » du système, ou PSF (Point Spread Function) :

Équation I.26

$$PSF = |\mathcal{F}[P(k_x, k_y) e^{2i\pi k_z z}]|^2$$

Avec

- $P(k_x, k_y) = A(k_x, k_y) e^{i\Phi(k_x, k_y)}$ est la fonction de pupille arrière représentant le champ électrique de l'onde au plan focal de la lentille,
 - o $A(k_x, k_y)$ représente l'amplitude de ce champ électrique, avec $(k_x + k_y)^2$ limité par l'ouverture circulaire de la lentille. Dans le cas d'un objectif de

microscope, $(k_x + k_y)^2 \leq \left(\frac{NA}{\lambda}\right)^2$, avec NA l'ouverture numérique de l'objectif, décrit plus loin dans ce chapitre (I.2.2.3),

○ $\Phi(k_x, k_y)$ représente la phase, ou le front d'onde, de ce champ électrique

- $k_z = \sqrt{\left(\frac{n}{\lambda}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2}$ est la composante du nombre d'onde k dans la direction de propagation de l'onde z .
- k_x et k_y sont les composantes latérales du nombre d'onde, et définissent les fréquences dites spatiales. Ainsi, l'espace (k_x, k_y) est conjugué à l'espace (x, y) dans l'espace de Fourier.

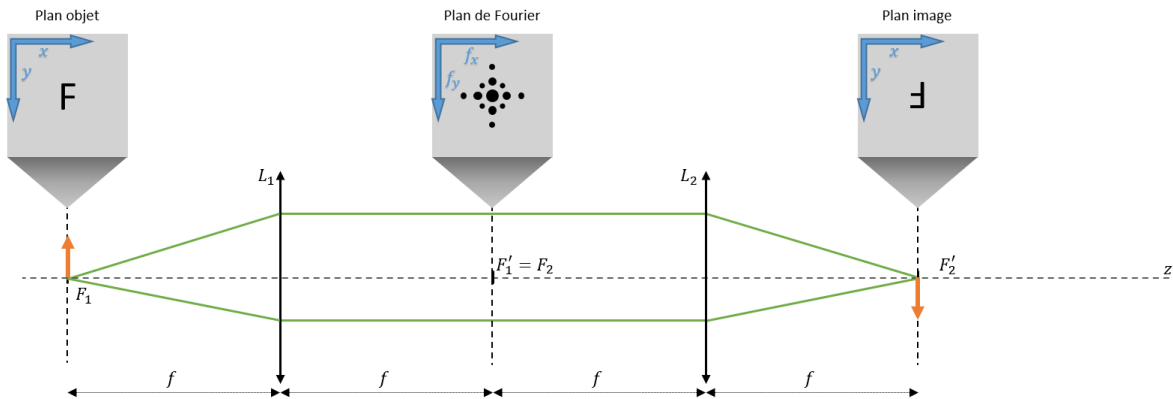


Figure I.10 — Montage afocal et plan de Fourier Au plan focal image d'une lentille, on observe la transformée de Fourier de l'objet situé au plan focal objet. En positionnant un masque sur ce plan, on peut agir directement sur le domaine spectral, et filtrer certaines fréquences spatiales.

Puisqu'une lentille a pour effet d'effectuer une transformée de Fourier spatiale, il est possible de visualiser les fréquences spatiales dans le plan image d'une lentille. Cette propriété est généralement mise à profit grâce aux montages afocaux (Figure I.10). Dans cette situation, le plan intermédiaire est appelé plan de Fourier, car il permet d'interagir physiquement avec le spectre fréquentiel de l'onde. On peut alors y introduire un masque filtrant certaines fréquences pour façonner la lumière (Chapitre II), ou un système d'optique adaptative pour modifier la phase de l'onde dans le but de corriger les aberrations optiques (Chapitre III).

I.2. Introduction à la microscopie optique pour la biologie

La cellule est l'élément structurel de base de tout être vivant. Elle est composée d'un ensemble de protéines et biomolécules réparties dans différentes organelles. On considère que leur organisation spatiale et temporelle et leurs nombreuses interactions sous-tendent la très grande diversité de fonctions cellulaires. Or, de nombreuses maladies sont liées à des dysfonctionnements du comportement des cellules provenant d'une altération de l'organisation spatio-temporelle des biomolécules, ainsi que des interactions entre ces biomolécules. Décrire et comprendre ces réseaux d'interactions souvent complexes, et donc les mécanismes de fonctionnement de cellules, constitue donc la première étape à l'élaboration de traitements contre ces maladies.

Dans cette perspective, la microscopie optique a l'avantage unique d'être une technique d'imagerie non invasive, permettant l'observation d'échantillons biologiques dans des conditions similaires à leur environnement natif. Elle a donc la capacité de permettre

d'observer directement les organisations et interactions entre constituants cellulaires afin de les déchiffrer, les comprendre, et à terme en corriger de potentiels dysfonctionnements. Au cours de cette partie, je détaillerai les principes de fonctionnement et les caractéristiques principales (I.2.2) d'un microscope optique pour l'observation d'échantillons biologiques.

Toutefois, les cellules vivantes sont transparentes et les techniques de microscopie classiques n'offrent que peu de contraste sur de tels objets. Il a donc fallu développer de nouvelles approches afin de pouvoir observer les cellules. Par ailleurs, afin de déterminer le rôle précis des biomolécules, il est nécessaire de pouvoir observer l'organisation et le comportement de sous-populations de celles-ci. Au sein d'une cellule, environnement dense et complexe, cela requiert la capacité de cibler différentes populations de biomolécules de manière spécifique. Nous verrons que l'avènement de la microscopie optique de fluorescence a révolutionné la microscopie pour la biologie en procurant aux observations une forte spécificité et un contraste important (section I.2.2.2).

Enfin, je mettrai en évidence la limite de résolution spatiale imposée par le phénomène de diffraction de la lumière. Cette limite restreint la capacité de tout microscope optique à sonder l'organisation et les interactions existantes entre les constituants des cellules en dessous d'une certaine dimension. Je décrirai alors les développements récents permettant de dépasser cette limite au cours de la partie I.3.

I.2.1. Fonctionnement d'un microscope classique et moderne

Un microscope classique est composé de deux éléments optiques pouvant être assimilés à des lentilles : un objectif et un oculaire. La Figure I.11.a présente le fonctionnement de ce type de microscope : une image intermédiaire agrandie est produite par l'objectif, puis l'oculaire projette l'image finale à l'infini qui peut alors être observée par un œil sans accommodation. Dans le cas des microscopes modernes utilisés dans cette thèse (Figure I.11.b), l'objectif est conçu pour être corrigé de toute aberration optique (nous développerons cet aspect plus tard, dans le Chapitre III) et projeter l'image à l'infini. Une lentille de tube est ensuite ajoutée pour constituer un système afocal (voir section I.1.1.2) et former une image agrandie de l'échantillon positionné sur le plan focal objet de l'objectif (appelé couramment plan objet). Grâce à ce système afocal, le plan focal arrière de l'objectif (aussi appelé pupille arrière) correspond au plan de Fourier (voir section I.1.2.5). Cette configuration optique avec des objectifs corrigés à l'infini offre plusieurs avantages : (i) les objectifs corrigés à l'infini sont interchangeables sur tout microscope adapté à l'infini, (ii) elle simplifie l'ajout de divers éléments optiques (polariseur, filtre, prisme de Wollaston...) sur le trajet optique de détection sans modifier l'image finale, et (iii) elle permet d'accéder facilement aux plans objet pour observer l'image agrandie de l'échantillon. Une autre propriété essentielle de ces microscopes modernes est qu'il devient possible de positionner des lentilles de manière à former de nouveaux systèmes afocaux après la lentille de tube, ce qui permet de reporter successivement le plan objet et le plan de Fourier de l'objectif. Cette faculté nous intéresse particulièrement, car elle offre la possibilité d'intervenir physiquement sur ces plans. Cela facilite le façonnage des faisceaux d'excitation (Chapitre II) ou encore la correction des aberrations optiques en détection (Chapitre III) afin d'en améliorer les capacités d'imagerie.

En microscopie moderne, nous utilisons maintenant des caméras pour permettre d'enregistrer et sauvegarder les images agrandies des échantillons observés, et plus uniquement des observations à l'œil nu à l'aide des oculaires (certains microscopes modernes sont même dépourvus d'oculaires). Cela permet de réutiliser ces images pour les traiter dans le but d'améliorer leurs contenus, et extraire des informations quantitatives sur les questions

biologiques étudiées. Ces caméras sont positionnées au niveau du plan image intermédiaire afin de permettre l'acquisition d'images nettes des échantillons observés.

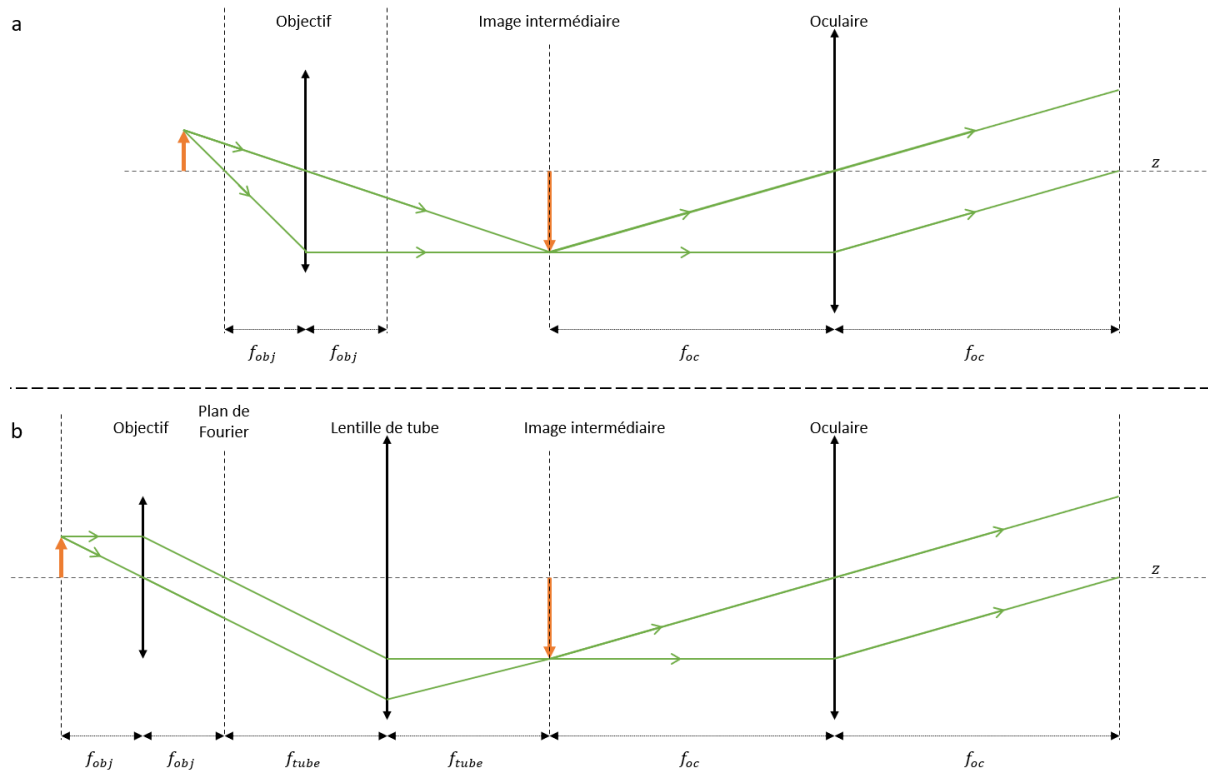


Figure I.11 - Schéma optique microscope. (a) Microscope optique classique. L'objectif produit une image intermédiaire positionnée sur le plan focal de l'oculaire. L'oculaire projette l'image finale à l'infini. L'œil peut observer l'image finale sans accommodation. (b) Microscope optique corrigé à l'infini basé sur le principe des montages afocaux. L'échantillon se situe sur le plan focal objet de l'objectif et une première image est projetée à l'infini. Une lentille de tube positionnée de manière à former un système afocal avec l'objectif produit une image sur son plan focal image. Un oculaire est positionné à distance focale, pour projeter une image finale à l'infini, observable à l'œil sans accommodation. Dans les deux cas, une caméra peut également être positionnée au niveau du plan image intermédiaire pour enregistrer une image numérique.

I.2.2. Caractéristiques d'un microscope

I.2.2.1. Grossissement

Le grossissement d'un microscope correspond à sa capacité à former une image agrandie des objets observés. Il est défini comme le rapport entre la taille de l'image et la taille de l'objet, tel que présenté en Figure I.11 :

Équation I.27

$$\gamma = \frac{A'B'}{AB}$$

Par construction géométrique (Figure I.11), on peut montrer que dans le cas d'un microscope moderne utilisant des objectifs corrigés à l'infini, le grossissement est donné par le rapport entre la distance focale de la lentille de tube et celle de l'objectif :

Équation I.28

$$\gamma = \frac{f_{tube}}{f_{obj}}$$

Notons que les objectifs commerciaux sont vendus pour le système du fabricant, où la lentille de tube est prédéfinie. La distance focale de l'objectif n'est alors pas indiquée, et le

fabricant communique directement le grossissement de l'objectif, qui correspond au cas où ce dernier est utilisé avec le microscope (et la lentille de tube) du fabricant.

Le grossissement ne doit pas être confondu avec la résolution du système optique qui dépend elle de l'ouverture numérique de l'objectif (ci-dessous, 1.2.2.3). Pour une observation à l'œil, à travers un oculaire, plus le grossissement est fort, plus les objets observés apparaissent grands. Si l'observation se fait par l'intermédiaire d'une caméra, l'objet observé est échantillonné par les pixels de la caméra. Plus le pixel est petit et plus l'échantillonnage est fin. On peut alors considérer que le grossissement d'un microscope a pour effet non pas de grossir l'objet, mais de réduire virtuellement la taille des pixels de la caméra et donc d'augmenter l'échantillonnage effectué par la caméra. Ainsi pour une caméra dotée de pixels de $6,5 \mu\text{m}$ de côté, un grossissement de 60x ou 100x correspondra un échantillonnage de $0,108 \mu\text{m}$ ou de $0,065 \mu\text{m}$ respectivement. En fonction de la résolution du microscope, il est donc plus pertinent de considérer cet échantillonnage (couple caméra – objectif) et non uniquement le grossissement de l'objectif au risque de sur- ou sous-échantillonner l'image formée. Cela est particulièrement important pour les techniques d'imagerie de super-résolution par localisation de molécules individuelles comme nous le verrons dans la partie 1.3.3.

1.2.2.2. Contraste et spécificité

Pour pouvoir observer convenablement un objet microscopique, le grossissement du microscope ne suffit pas, il faut également être capable de faire ressortir les structures que l'on désire observer par rapport au signal de fond. Or en biologie, la plupart des objets tels que les cellules sont transparents et sont donc très difficilement observables. Pour pouvoir les distinguer et observer ses constituants, il est donc nécessaire d'apporter un contraste à l'image soit en utilisant des propriétés intrinsèques de l'objet, des propriétés physiques de la lumière, ou encore en introduisant directement un agent de contraste, tel qu'un colorant, à l'objet étudié.

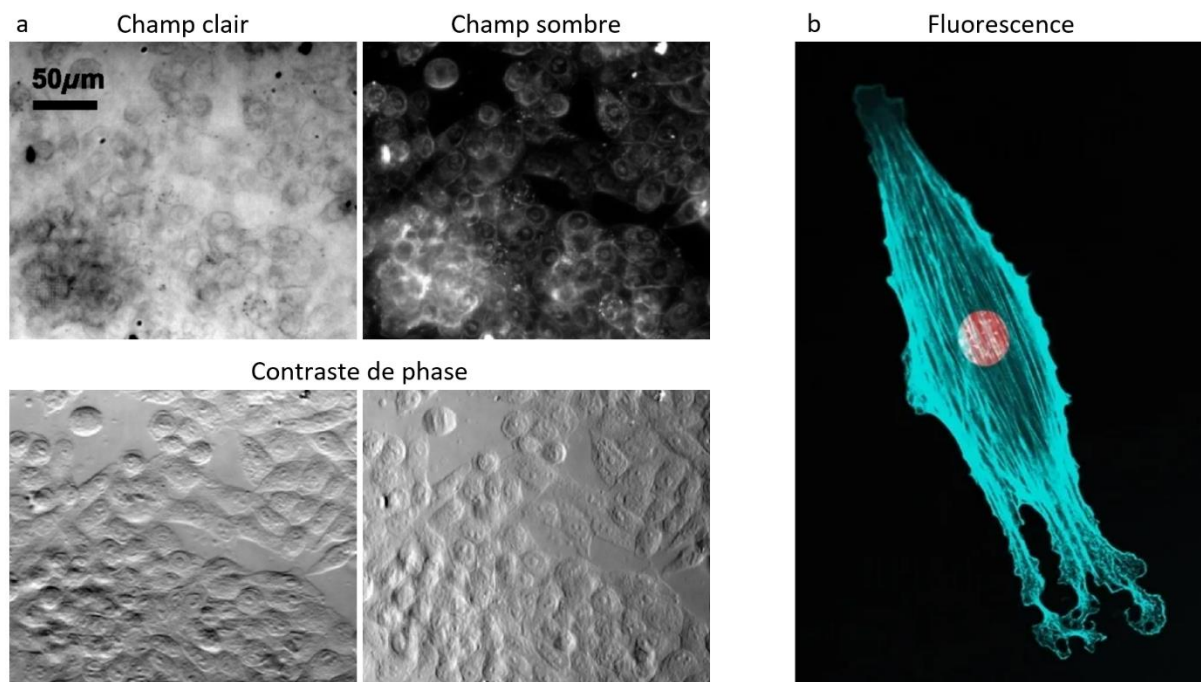


Figure 1.12 — Techniques de contraste en microscopie. (a) Techniques de contraste non invasives : microscopie à champ clair et sombre, et à contraste de phase. Adapté de Liu et al. 2014³. (b) Technique de contraste invasive : microscopie de fluorescence. Adapté de Renz, 2013⁴.

La technique de microscopie la plus simple est la microscopie dite « en champ clair » ou l'échantillon est illuminé entièrement à l'aide d'une source blanche uniforme. Dans ce cas, c'est essentiellement la capacité de l'échantillon à absorber la lumière qui va définir le contraste final de l'image. Les cellules et la majorité de leurs constituants étant transparents, cette technique ne permet pas de les observer convenablement. Depuis l'avènement de la microscopie optique, plusieurs techniques ont donc été développées afin d'améliorer ce contraste pour l'observation d'échantillons biologiques.

On peut tout d'abord citer les techniques qui ne nécessitent pas d'interventions sur l'échantillon (Figure I.12). Parmi elles, la microscopie en champ sombre permet de détecter uniquement la lumière diffusée par l'échantillon. Dans ce cas, le fond de l'image est sombre, et les structures diffusantes sont plus contrastées. Toutefois, la plupart des constituants d'une cellule ne sont pas diffusants ce qui limite fortement leur observation. D'autres techniques utilisant les propriétés de la lumière ont ensuite été introduites et ont révolutionné en leur temps le domaine de la microscopie pour la biologie. Il s'agit du « contraste de phase » inventé par Frederik Zernike dans les années 1930^{5,6}, qui lui a valu le prix Nobel en 1953, et du « contraste interférentiel » développé entre autres par Normarski dans les années 1950⁷. Ces deux techniques exploitent les variations de phases introduites par l'objet observé dans la lumière qui les traverse. Ainsi, on n'observe plus l'absorption de la lumière, mais les variations de phase de l'onde transmise induites par les différences d'indices de réfraction des objets traversés. Des objets transparents, tels que les cellules, peuvent alors devenir fortement contrastés à condition qu'elles possèdent un indice de réfraction différent de leur environnement. Ces techniques permettent même d'observer des organelles intracellulaires, car elles ont un indice de réfraction propre différent du milieu cellulaire (le cytoplasme) dans lequel elles baignent. Un intérêt majeur de ces techniques dites « de phase » est qu'elles permettent d'obtenir un important contraste sur des objets transparents tout en utilisant une énergie lumineuse très faible. Cela en fait des outils incomparables pour imager le vivant de façon très peu invasive. Toutefois, ces méthodes n'offrent pas de spécificité sur les objets imagés. C'est-à-dire que deux constituants cellulaires différents, par exemple deux organelles ou complexes protéiques différents, ayant le même indice de réfraction, auront le même contraste ou signature sur l'image réalisée. Ces techniques ne permettent donc pas de suivre spécifiquement certaines populations de biomolécules.

Une autre approche pour obtenir un contraste élevé en microscopie est d'introduire directement un agent de contraste à l'intérieur de l'échantillon. Si cet agent de contraste est en plus couplé à des techniques de marquage ciblées, cela permet d'apporter une spécificité en plus du contraste. On peut ainsi observer précisément une ou plusieurs populations de molécules, ce qui est crucial si l'on cherche à déchiffrer leurs rôles et fonctions exactes. Dans le cas de la microscopie de fluorescence, chacune des molécules que nous désirons observer est marquée à l'aide d'une sonde fluorescente, ou d'un fluorophore. Grâce au développement des protéines fluorescentes encodées génétiquement⁸, la microscopie de fluorescence est compatible avec l'imagerie du vivant, et elle est aujourd'hui la technique la plus largement utilisée en biologie. Nous reviendrons plus précisément sur le principe de la microscopie de fluorescence et des techniques de marquage associées dans la section I.2.3.

Enfin, pour maximiser le contraste, en particulier en microscopie de fluorescence et pour les objets tridimensionnels, il est aussi nécessaire de minimiser, voire prévenir, le signal provenant de molécules situées en dehors du plan objet de l'objectif. En effet, ce signal dit hors focus produit un fond diffus lumineux en arrière-plan qui a pour effet de réduire le contraste des structures qui sont sur le plan imagé, et donc d'affecter notre capacité à les discerner. Pour cela, il est nécessaire d'accroître la capacité du système optique à détecter

et/ou exciter uniquement le signal provenant d'objets qui se situent sur le plan focal objet de l'objectif. On parle alors de sectionnement optique. Nous introduirons les techniques d'imagerie dites 3D permettant un tel sectionnement optique en section I.4, où l'on discutera plus précisément de leur utilisation pour la microscopie de super-résolution en profondeur.

I.2.2.3. Résolution

La résolution est une caractéristique fondamentale d'un microscope puisqu'elle définit sa capacité à résoudre les structures fines des objets observés. Pour tout système optique, elle est définie comme la distance minimale entre deux points pour qu'ils puissent être distingués l'un de l'autre. On a introduit en section I.1.2.4 le phénomène de diffraction de la lumière, et son effet dans le cadre d'une ouverture circulaire. Un objectif de microscope étant limité en taille, il se comporte comme une ouverture circulaire, ce qui explique que l'image d'un point à travers un objectif est une figure de diffraction proche de la tâche d'Airy décrite par l'Équation I.20. Les dimensions de cette figure de diffraction dépendent de deux paramètres de l'objectif : (i) son angle de collection maximum θ_{max} qui dépend de la taille de son ouverture circulaire et de sa distance de travail, et (ii) l'indice de réfraction n de son milieu d'immersion. Ces deux paramètres sont regroupés dans ce que l'on appelle ouverture numérique (ou Numerical Aperture, NA), qui décrit la capacité de l'objectif à collecter le signal lumineux provenant de l'échantillon (Figure I.13.b) :

Équation I.29

$$NA = n \sin \theta_{max}$$

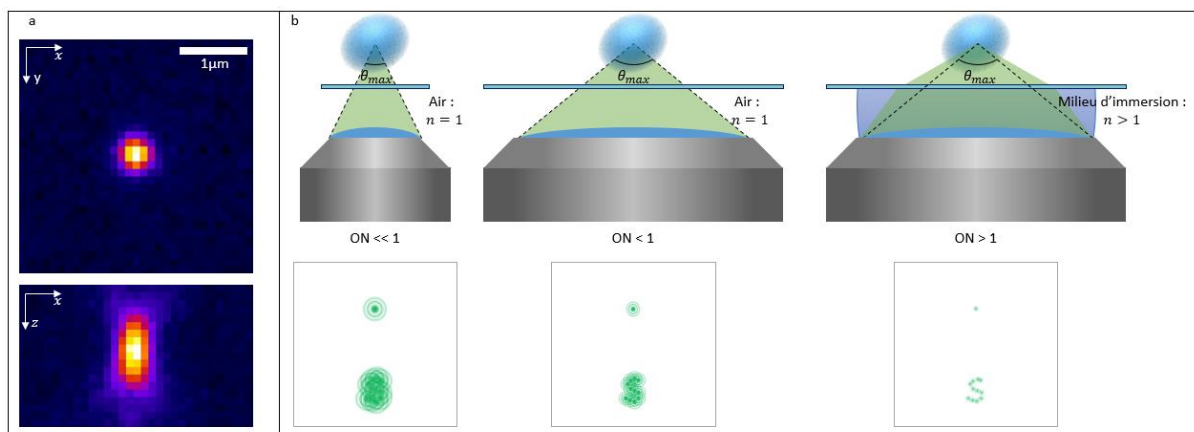


Figure I.13 — PSF d'un objectif de microscope. (a) Exemple de PSF d'un objectif à forte ouverture numérique. (b) : Représentation de l'ouverture numérique d'un objectif. Gauche : une ouverture numérique faible ne permet pas de capter suffisamment de photons pour résoudre la structure observée. Centre : un angle de collection plus grand permet une plus grande ouverture numérique et une meilleure résolution. Droite : En utilisant un objectif à immersion, il est possible de collecter plus de photons. L'ouverture numérique peut alors dépasser 1, ce qui permet d'augmenter le pouvoir de résolution du microscope.

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.1.2.4, la tâche d'Airy est la solution mathématique à la diffraction par une ouverture circulaire, et correspond à la figure de diffraction qui serait obtenue par un microscope parfait. Dans les conditions réelles, la figure de diffraction est légèrement différente et plus étalée qu'une tâche d'Airy, et est bien souvent approximée par une fonction gaussienne. Cette figure de diffraction correspond à la fonction d'étalement de point (ou PSF, de l'anglais Point Spread Function) du microscope, soit à la figure produite par un émetteur ponctuel.

En imagerie, tout objet peut être considéré comme la somme des points qui le constitue. Cela signifie que lors de la propagation à travers un système optique, chaque point d'un objet participe indépendamment à la formation de l'image finale en produisant une tache

correspondante à la PSF du système. Physiquement, on peut aisément visualiser cette propriété en microscopie de fluorescence, où chaque émetteur ponctuel (fluorophore) produit comme image une tache de diffraction, et où l'image finale est formée par la superposition de ces PSF. Ainsi, l'image I d'un objet O produite par un microscope est donnée par le produit de convolution :

Équation I.30

$$I = O \otimes PSF$$

Ce mécanisme de formation d'une image en microscopie optique implique une limite forte : deux points de l'objet trop proches l'un de l'autre ne peuvent être distingués du fait de leur étalement respectif sur le plan image (Figure I.13). La résolution du microscope est ainsi limitée par la taille de sa PSF. Pour quantifier cette résolution, on peut utiliser différents critères, comme le critère de Rayleigh⁹ (Figure I.14) ou le critère d'Abbe¹⁰. Le critère de Rayleigh stipule que deux pics sont distinguables si le maximum du second est positionné au minimum du premier. Dans le cas d'une tache d'Airy, d'après l'Équation I.21, cela correspond à une distance de :

Équation I.31

$$r_{Rayleigh} = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

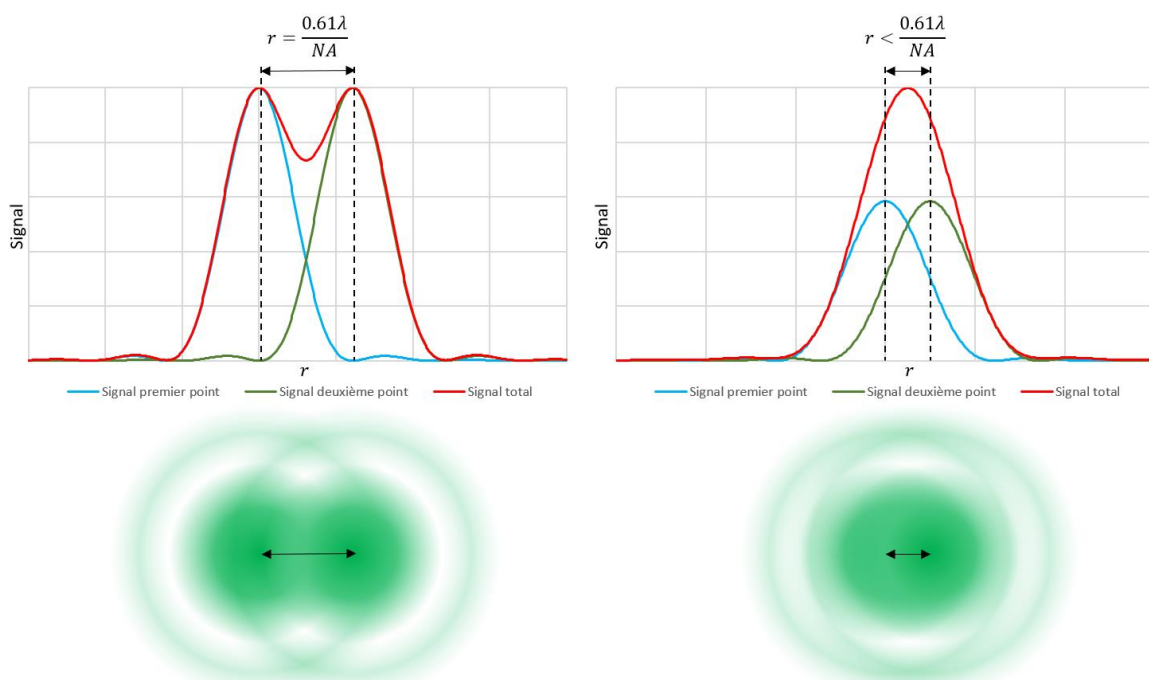


Figure I.14 — Critère de Rayleigh. À gauche : Selon le critère de Rayleigh, deux taches d'Airy sont distinguables si elles sont espacées d'au moins $0.61 \lambda/NA$. À droite : si les deux points sont trop proches, leur signal respectif ne peut être distingué.

La PSF d'un objectif s'étale également le long de l'axe z (Figure I.13.a), et limite donc la résolution axiale Δz d'un microscope. Selon le même critère, on obtient que la résolution axiale d'un microscope est donnée par l'équation suivante :

Équation I.32

$$\Delta z = 2n \frac{\lambda}{NA^2}$$

À ce jour, les objectifs à très forte ouverture numérique atteignent une valeur de 1,49, ce qui permet une résolution latérale maximale de l'ordre de 200 nm, pour une résolution axiale de l'ordre de 650 nm. Si cette résolution permet d'observer la répartition d'organelles et de complexes macro moléculaire au sein des cellules, elle ne permet pas de résoudre la distribution précise des protéines et autres biomolécules (Figure I.18). Pour dépasser cette limite imposée par les lois de propagation de la lumière, différentes techniques dites de super-résolution ont été récemment développées et récompensées d'un prix Nobel. Ces techniques seront exposées plus tard, en section I.3.

I.2.3. Microscopie de fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui permet à une molécule excitée par une particule de lumière, ou photon, d'émettre à son tour un photon d'énergie légèrement différente. La microscopie de fluorescence utilise cette propriété pour permettre l'imagerie de structures naturellement transparentes avec un fort contraste : seules les structures marquées vont émettre un signal sur un fond noir. De plus, des techniques de marquage de plus en plus avancées permettent de cibler uniquement certaines biomolécules d'intérêt, et ce même à l'intérieur d'échantillons vivants, apportant une spécificité unique à l'imagerie de fluorescence. Le milieu cellulaire étant extrêmement dense, et peuplé de plusieurs milliers de biomolécules différentes, cette spécificité est indispensable pour pouvoir observer une population précise de biomolécule, afin d'en étudier le rôle au sein d'une machinerie cellulaire extrêmement complexe.

I.2.3.1. La fluorescence

La fluorescence est un phénomène qui fait intervenir la nature corpusculaire de la lumière, à travers les interactions entre les particules de lumière, appelées photons, et la matière. Elle correspond à l'émission spontanée de lumière décrite par A. Einstein et N. Bohr en 1913. Les interactions possibles entre un photon et une molécule sont décrites à l'aide du diagramme de Jablonski (Figure I.15). Le phénomène de fluorescence est initié par l'absorption d'un photon par le fluorophore (molécule fluorescente). Cette absorption n'est possible que si ce photon a une énergie égale à l'écart entre un niveau excité et le niveau fondamental de la molécule en question. L'énergie d'un photon dépend de sa longueur d'onde λ , et est définie par :

Équation I.33

$$E_{\text{photon}} = h\nu = \frac{hc}{\lambda}$$

Où h est la constante de Planck : $h \approx 6.63 \cdot 10^{-32} \text{ J.s}$.

La molécule ainsi excitée va ensuite se relaxer pour revenir à son état d'énergie fondamental. La première étape de cette relaxation est non radiative, c'est-à-dire sans émission de photon (émission de chaleur, vibrations), et implique une faible diminution de l'énergie du fluorophore. L'émission de photon a lieu après cette relaxation non radiative. Suivant le temps et les processus de dé-excitation considérés, on parlera de fluorescence ou de phosphorescence. La différence principale entre ces deux phénomènes d'émission de lumière réside dans leur temps caractéristique de relaxation. Dans le cas de la fluorescence, ce temps est de l'ordre de la femtoseconde, alors que dans le cas de la phosphorescence il est de l'ordre de la milliseconde à la seconde. Dans ce travail, nous ne considérerons que la fluorescence, soit des phénomènes qui sont perçus comme instantanés aux échelles de temps observées (supérieurs à la milliseconde).

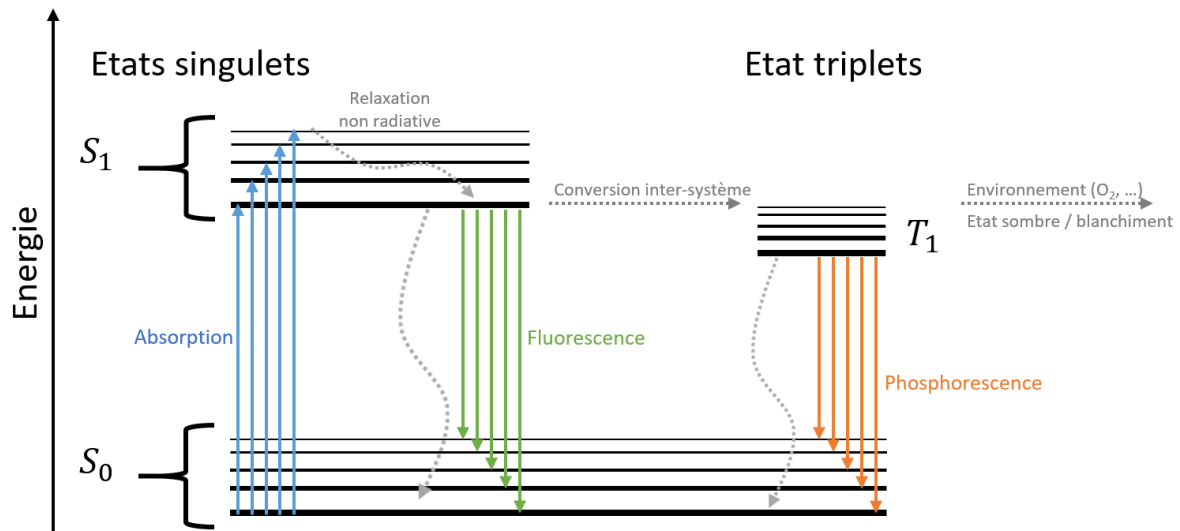


Figure I.15 — Diagramme de Jablonski. Ce diagramme résume l'ensemble des interactions possibles entre un photon et une molécule. Le photon peut être absorbé (bleu) et exciter la molécule. La molécule excitée a la possibilité de se relaxer, suivant la situation, l'aide de (i) des relaxations non radiatives (gris), (ii) l'émission d'un nouveau photon par fluorescence (vert) ou (iii) phosphorescence (orange). Certaines interactions avec l'environnement peuvent mener à un blanchiment de la molécule, qui perd alors ses capacités de fluorescence.

Lors de l'émission du photon de fluorescence, l'écart d'énergie entre le niveau excité atteint après relaxation non radiative et le niveau fondamental est plus petit que lors de l'absorption. Cela implique que le photon émis est légèrement moins énergétique que le photon absorbé. Selon l'Équation I.33, cela se traduit par une lumière de longueur d'onde plus élevée pour l'émission que pour l'absorption : il y a un décalage du spectre vers le rouge. Ce décalage de la longueur d'onde entre la lumière d'excitation et celle d'émission est appelé déplacement de Stokes (Figure I.16). Ce déplacement est fondamental puisqu'il rend possible l'utilisation de la fluorescence comme méthode de contraste en microscopie optique. En effet, grâce à un jeu de filtre judicieusement choisi, le décalage de Stokes donne la possibilité de filtrer la lumière d'excitation et de détecter uniquement la lumière émise par les fluorophores (Figure I.16). On se positionne alors dans une configuration de microscopie à champ sombre, où seule la lumière ayant interagi avec les fluorophores présents dans l'échantillon est détectée ce qui permet d'obtenir des images extrêmement contrastées (Figure I.12).

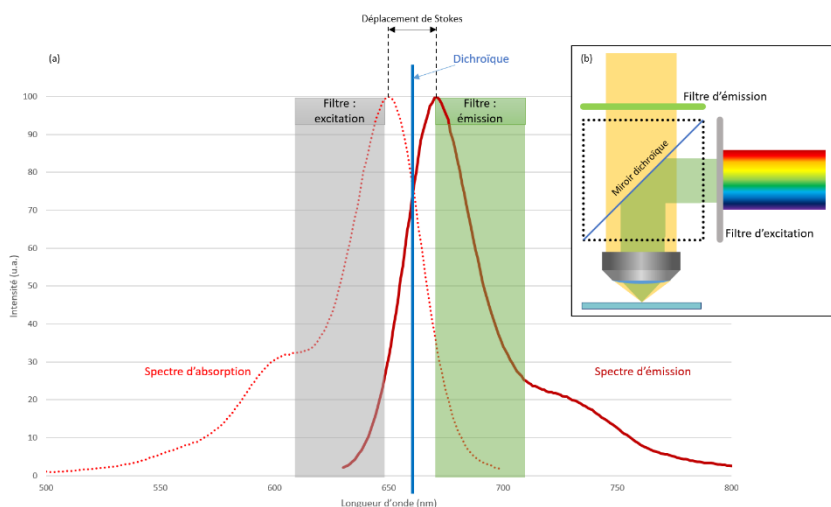


Figure I.16 : Principe de la microscopie de fluorescence. (a) Déplacement de Stokes : le spectre d'émission d'une molécule est décalé vers les longueurs d'onde plus élevées, vers les couleurs rouges, par rapport à son spectre d'absorption. L'exemple utilisé dans cette figure est le fluorophore « Alexa Fluor 647 », avec les filtres d'excitation et d'émission correspondants (Cy5). (b) À l'aide d'un miroir dichroïque et d'une combinaison de filtres judicieusement choisis, le faisceau d'excitation est filtré puis réfléchi vers l'échantillon.

Le signal de fluorescence émis par l'échantillon, de longueur d'onde légèrement plus élevée, est ensuite filtré par le filtre d'émission avant d'être transmis vers la caméra.

On remarque également sur le diagramme de Jablonski l'existence d'autres niveaux d'énergie tel que des niveaux dits « triplets ». Ces niveaux ne sont pas aisément accessibles, car ils nécessitent une conversion intersystème. Une fois dans un état triplet, le fluorophore peut difficilement retourner dans un de ses états singulets (tel que l'état fondamental S_0), ce qui se traduit par un temps de relaxation plus long (de quelques millisecondes, à plusieurs secondes). Les fluorophores situés sur un de ces états triplets sont généralement plus réactifs et peuvent plus facilement interagir avec leur environnement, tel que les molécules d'oxygène provoquant leur oxydation. Ce type d'interaction résulte le plus souvent en une perte irréversible de la capacité du fluorophore à absorber et émettre des photons, ce que l'on nomme photoblanchiment. En microscopie, cela se traduit par une perte du signal de fluorescence et donc de contraste. Nous verrons plus tard (I.3.3.1.3) qu'un contrôle fin de ces états triplets peut aussi être utilisé dans certaines approches d'imagerie de super-résolution afin de faire clignoter les fluorophores dans le but de les isoler temporellement.

Dans des conditions normales (température ambiante, environnement aqueux...), un fluorophore ne peut subir qu'un certain nombre de cycles d'absorption et d'émission de photons. Ce nombre de cycles correspond à un « budget de photon » limité que le fluorophore est capable d'émettre avant de blanchir de façon irréversible. Cette caractéristique est une limitation importante en microscopie de fluorescence puisque cela va limiter la durée d'observation possible d'un fluorophore et imposer une limite à sa brillance. Cela induit des compromis importants sur les performances de l'imagerie, par exemple entre la résolution spatiale, la résolution temporelle, et le temps d'observation.

Enfin, le processus d'émission de fluorescence décrit ici (c.-à-d. basé sur l'absorption d'un seul photon) est linéaire avec l'intensité de la lumière d'excitation jusqu'à un certain seuil au-delà duquel on observe phénomène de saturation. En effet, le processus d'émission d'un photon n'est pas instantané et tant que ce photon n'est pas émis, le fluorophore ne peut absorber d'autres photons. Cette saturation a pour conséquence d'imposer une limite haute à la vitesse à laquelle il est possible de collecter l'ensemble du budget de photon d'un fluorophore afin d'en extraire le maximum d'information en un minimum de temps. Cela peut contraindre par exemple la vitesse d'acquisition de certaines méthodes de microscopie.

I.2.3.2. Spécificité : marquages fluorescents pour la biologie

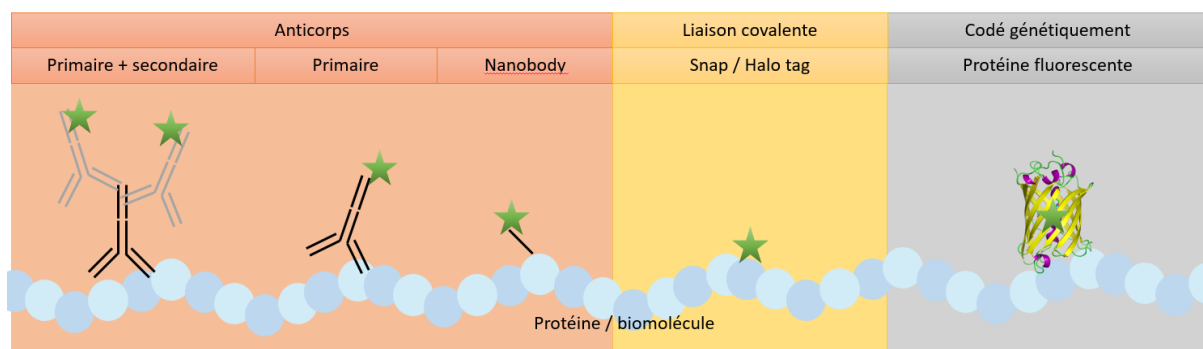


Figure I.17 — Techniques de marquage fluorescent. La technique d'immunomarquage (orange) consiste à utiliser l'affinité caractéristique des anticorps pour une protéine cible. Il est possible d'utiliser un anticorps primaire ciblant la protéine d'intérêt, puis un secondaire conjugué à un fluorophore, ou de conjuguer directement l'anticorps primaire à un fluorophore. Des nanobody peuvent également être utilisés pour réduire la taille des marqueurs. Il est également possible de marquer la protéine d'intérêt par chimie clic (Snap tag, ou Halo tag) (jaune). Dans ce cas une liaison covalente fixe le fluorophore à la biomolécule d'intérêt. Enfin, les protéines fluorescentes (gris) génétiquement encodées permettent de marquer les protéines d'intérêts directement pendant leur expression par la cellule vivante.

Une autre propriété fondamentale de la microscopie de fluorescence est sa capacité à cibler de façon extrêmement spécifique une population de biomolécules ou protéines. En

utilisant par exemple les propriétés d'affinité de certaines molécules vis-à-vis d'autres molécules (anticorps, toxine) ou la capacité de cloner des protéines fluorescentes dans le génome des cellules, il est possible aujourd'hui d'imager quasiment n'importe quelle protéine ou complexe protéique de façon spécifique, et ce dans leur environnement natif, les cellules. Ainsi, les biologistes possèdent une très large gamme d'outils de marquage différents pour étudier l'organisation et la fonction des protéines à l'intérieur de cellules vivantes ou fixées¹¹. Les grandes familles sont présentées en Figure I.17, et nous allons en exposer brièvement les principes ici.

I.2.3.2.1. Immunomarquage

Les techniques d'immunomarquage¹¹ (Figure I.17, orange) consistent à utiliser les propriétés d'affinité que possèdent les anticorps vis-à-vis de leur antigène. Un marqueur fluorescent (fluorophore ou fluorochrome) est conjugué à un anticorps ciblant la protéine d'intérêt. L'anticorps va alors se fixer à la protéine cible, et rendre cette dernière fluorescente. Bien souvent, on utilise plutôt un couple d'anticorps primaire et secondaire. Dans ce cas, l'anticorps primaire produit par une espèce standard (lapin, souris, rat...) cible la protéine d'intérêt. L'anticorps secondaire quant à lui contient le marqueur fluorescent, et cible l'espèce standard, conférant une plus grande souplesse de marquage possible. Cette technique de marquage offre de nombreux avantages. Elle est très simple d'utilisation, et il est aujourd'hui possible de produire des anticorps pour presque toutes les protéines, procurant un choix quasi infini de structures pouvant être imagées grâce à la combinaison d'anticorps primaire-secondaire. De même, pour chaque espèce standard, il existe aussi un large choix d'anticorps secondaires, procurant un large éventail de couleurs possibles, ou encore de fluorophores différents compatible avec des techniques d'imagerie avancées (STORM, DNA-PAINT...). Enfin les anticorps secondaires étant généralement polyclonaux et conjugués à plusieurs fluorophores les techniques d'immunomarquage implique le plus souvent que chaque protéine d'intérêt est marquée par plusieurs fluorophores. Cela mène à une amplification du signal et donc à un meilleur contraste, mais au détriment d'une stœchiométrie peu, voire pas contrôlée, c'est-à-dire un ratio marqueur/protéine très variable, et donc une quantification difficilement accessible du nombre de protéines réellement détectées.

La limite principale s'adressant à cette technique est qu'il n'est pas possible pour un anticorps de traverser la membrane cellulaire. Ainsi, lorsque l'on veut imager des protéines intracellulaires, cette technique est limitée aux échantillons de cellules dites « fixées ». Un agent chimique (paraformaldéhyde, glutaraldéhyde, méthanol...) est utilisé pour figer les cellules à un instant t de leur développement. Les cellules ne sont plus vivantes, mais leur forme et leur structure sont préservées pendant le processus de fixation. On peut alors perméabiliser la membrane cellulaire, pour permettre aux anticorps de la traverser. Il est tout de même possible de garder la membrane intacte si on se limite à l'imagerie des récepteurs membranaires. Enfin, la grande taille des anticorps (de l'ordre de 15 nm) peut également être problématique lorsqu'ils doivent pénétrer des échantillons denses (sphéroïdes, organismes...), ou lors de l'imagerie de super-résolution, où la distance entre le fluorophore et la protéine peut fausser la mesure des dimensions des structures imagées. Pour résoudre ce problème, de récents travaux ont abouti au développement des nanobody¹². Ces très petits anticorps de camélidés (de l'ordre de 2 nm) permettent de positionner le fluorophore beaucoup plus proche de la protéine cible qu'un anticorps entier, et sont moins soumis aux problèmes de diffusion dans les échantillons denses.

I.2.3.2.2. Protéines fluorescentes

Une autre stratégie de marquage consiste à utiliser un gène codant pour une protéine intrinsèquement fluorescente. Les travaux d'Osamu Shimomura⁸, Martin Chalfie¹³ et Roger Tsien¹⁴, récompensés par le prix Nobel de chimie en 2008, ont permis de découvrir et développer la GFP (Green Fluorescent Protein), une protéine produite par une méduse et naturellement fluorescente. Ces travaux ont fondamentalement révolutionné la microscopie de fluorescence pour la biologie, en permettant de suivre et d'observer l'expression de protéines directement au sein de cellules vivantes. De nombreux dérivés de cette protéine ont par la suite été développés pour en améliorer les performances optiques (stabilité, brillance, couleurs) et de qualité d'expression au sein des cellules (efficacité de repliement, impact sur la fonction de la protéine marquée). De nouvelles protéines fluorescentes photoactivables ou photoconvertibles ont ensuite été mises au point¹⁵ ouvrant de nouvelles applications telles que la microscopie de super-résolution par photo-activation (PALM^{16,17}) sur cellules vivantes que nous détaillerons en section I.3.3.

Cette méthode est le plus souvent utilisée en injectant un plasmide (généralement par transfection ou électroporation, mais aussi par infection à l'aide de virus modifiés) dans les cellules d'intérêt, comprenant le gène codant pour la protéine que l'on désire imager associé à celui codant pour la protéine fluorescente. Lors de la transcription de ce plasmide par la machinerie cellulaire, la protéine d'intérêt est alors exprimée avec la protéine fluorescente directement fusionnée dessus. Cette méthode permet de marquer chaque protéine exprimée à l'aide d'une seule protéine fluorescente ouvrant la voie à des études de stœchiométrie des protéines. Toutefois l'insertion de plasmides par ces approches n'offre qu'un marquage transitoire qui décroît au cours des divisions cellulaires successives, et implique une surexpression de la protéine étudiée pouvant altérer ses fonctions. Pour contourner ces problèmes, il est possible de modifier de façon permanente le génome même de la cellule suivant différentes approches. En particulier, la technique CRISPR-Cas9¹⁸, pour laquelle Emmanuelle Charpentier a été récompensée du prix Nobel de Chimie en 2020, permet de modifier directement et relativement facilement le génome d'une cellule vivante. Il est ainsi possible de marquer des protéines de façon stable à leur niveau d'expression endogène, améliorant grandement la validité des résultats obtenus.

Une limitation relative de cette technique est que les protéines fluorescentes sont généralement moins brillantes que les molécules organiques. Pour contourner cette limite, des méthodes récentes utilisant des fragments protéiques enzymatiques pouvant être codés génétiquement offrent la possibilité de lier des fluorophores organiques bien plus brillants aux protéines d'intérêt de façon covalente et à l'intérieur de cellules vivantes. Ces méthodes reposent sur l'expression de « tags »^{19,20} lors de la transcription des protéines, et de leur réaction avec des fluorophores organiques couplés aux substrats appropriés. Ces approches combinent les avantages des marquages sur cellules vivantes par modification de leur génome avec l'utilisation des fluorophores organiques (brillance, stabilité, palette de couleurs, propriétés photo-physiques avancées...).

I.3. Super-résolution en microscopie de fluorescence

Grâce aux différentes techniques de marquage introduites dans la section précédente, il est possible d'imager spécifiquement presque toutes les protéines présentes dans les cellules par microscopie de fluorescence. On peut ainsi observer leur répartition spatio-temporelle, et en déduire leur rôle dans le fonctionnement de la cellule. Cependant, la résolution en microscopie de fluorescence souffre d'une limite fondamentale due au

phénomène de diffraction de la lumière (section I.2.2.3). Ainsi, la résolution latérale maximale de 200 nm limite notre capacité à visualiser de nombreuses structures et complexes protéiques (Figure I.18). Pour observer ces structures pouvant mesurer de quelques nanomètres (récepteurs membranaires, pore nucléaire, etc.) à plusieurs dizaines ou centaines de nanomètres (nanodomains, particules virales, réseaux protéiques, etc.), il est nécessaire de dépasser cette limite de résolution. Jusqu'au début du siècle, aller au-delà de cette limite n'était possible qu'au moyen de la microscopie électronique ou de techniques de microscopie en champ proche, plus complexes, contraignantes et pour la plupart incompatibles avec le vivant. Bien qu'il s'agisse d'une limite imposée par les lois de la physique, les travaux de plusieurs groupes de recherche ont récemment permis de contourner ces lois et de s'affranchir de cette limite de résolution en microscopie de fluorescence. En particulier, les travaux pionniers de Eric Betzig¹⁶, Stefan W. Hell²¹ et William Moerner²² pour le développement de différentes techniques de super-résolution ont été récompensés par le prix Nobel de chimie en 2014.

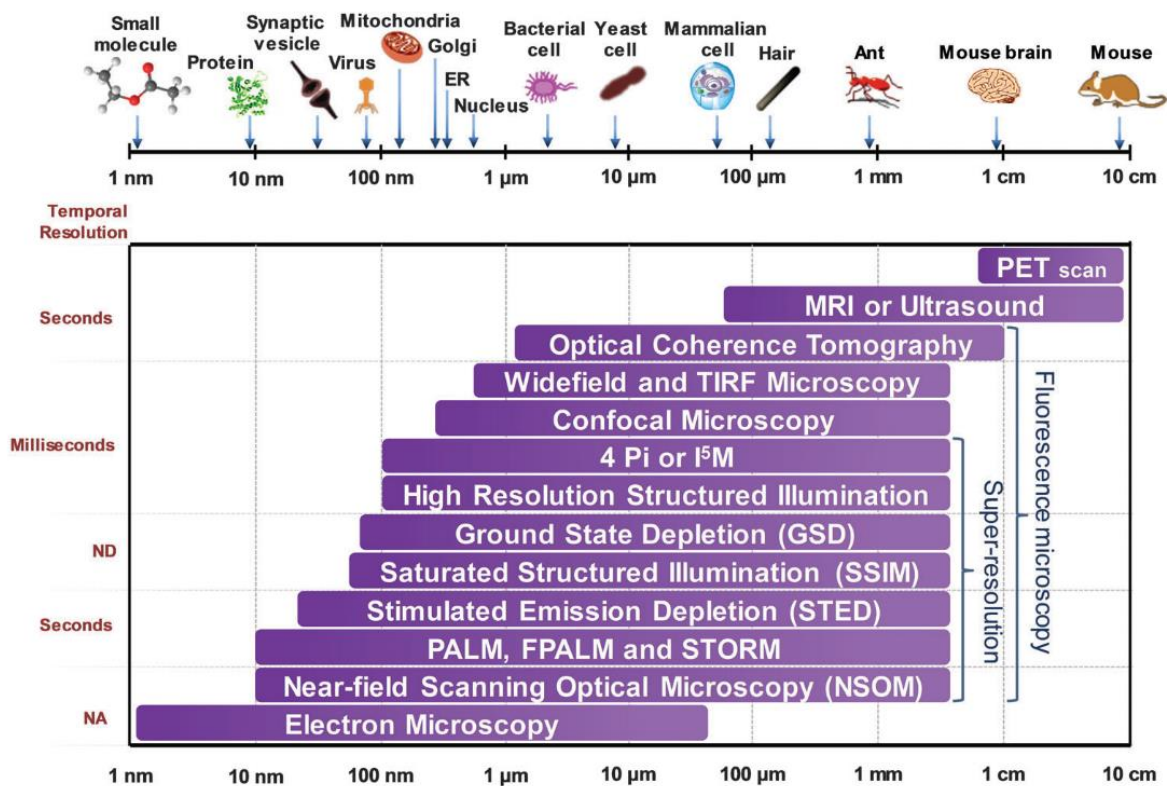


Figure I.18 — Comparaison de différentes techniques d'imagerie pour la biologie. Adapté de Yang et al., 2016²³.

Cette section vise à introduire les trois principales familles de techniques de super-résolution : la Microscopie par Illumination Structurée (SIM : Structured Illumination Microscopy), la microscopie par Déplétion STimulée de l'Emission (STED : STimulated Emission Depletion) et la microscopie par localisation de molécules individuelles (SMLM : Single Molecules localization Microscopy). Après avoir exposé le fonctionnement de ces méthodes, je porterai une attention plus particulière sur la microscopie par localisation de molécules individuelles (SMLM) dont j'ai cherché à accroître les performances au cours de mon travail de thèse. Nous verrons dans un premier temps qu'il existe de nombreuses stratégies différentes offrant la possibilité de réaliser une imagerie par SMLM, et je développerai leurs avantages et inconvénients. Dans un second temps, nous verrons que la résolution en imagerie par SMLM est directement liée à la quantité de photons collectés ainsi qu'au bruit environnant, et qu'il

est donc nécessaire d'utiliser des architectures de microscope permettant à la fois un fort sectionnement optique, et une importante capacité à collecter la lumière.

I.3.1. SIM : Microscopie par Illumination Structurée

En Microscopie de super résolution par Illumination Structurée, ou SIM, un signal d'excitation spatialement structurée est utilisé afin d'illuminer l'échantillon. La convolution des fréquences spatiales contenues dans cette structuration du signal d'excitation avec celles de l'échantillon lui-même permet, par effet de moiré, de déplacer des fréquences spatiales de l'échantillon normalement inobservables, car trop élevées, dans la bande passante du microscope²⁴ (Figure I.19.a-d). En faisant varier l'orientation et la phase de la structuration de l'illumination (Figure I.19.e), puis à l'aide d'un traitement informatique approprié, il devient possible de reconstruire des images dont la résolution dépasse la limite imposée par la diffraction de la lumière et atteindre des résolutions spatiales de l'ordre de 100 nm latéralement et 300 nm axialement. Bien que plus modeste que les gains en résolutions des techniques STED ou SMLM, l'imagerie SIM présente les avantages de nécessiter moins d'images et de puissances laser. Elle est donc plus adaptée à l'observation d'échantillons vivants, et ce même à des fréquences temporelles très élevées, jusqu'à 266 Hz²⁵. Il a par la suite été proposé d'utiliser le principe de saturation de la fluorescence²⁶, ou d'activation de sondes photoactivables²⁷, afin d'accroître encore le gain en résolution spatiale des techniques SIM, en théorie de façon illimitée, en pratique jusqu'à quelques dizaines de nanomètres. Toutefois ce gain est réalisé au détriment d'une puissance laser plus importante et de l'acquisition d'un plus grand nombre d'images, et donc d'une compatibilité avec le vivant moindre.

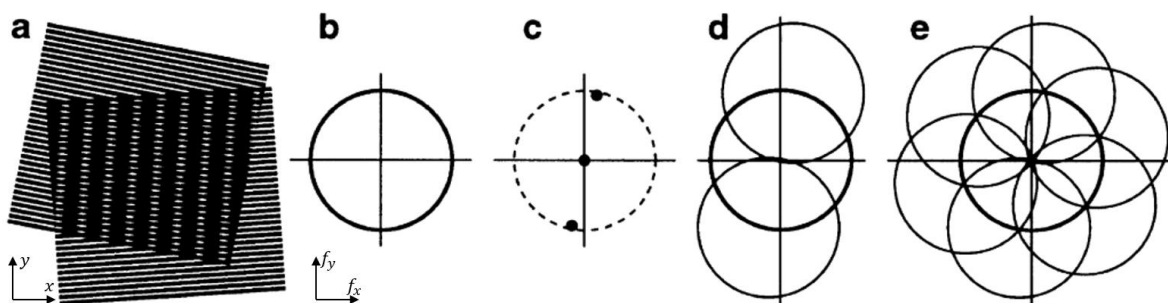


Figure I.19 — Principe de l'imagerie SIM. Adapté de Gustafsson, 2000²⁴. (a) La superposition de deux structures périodiques crée une figure appelée « figure de moiré ». (b) Représentation de la limite de résolution dans l'espace de Fourier : un objectif de microscope ne permet pas de transmettre les fréquences plus grandes qu'une valeur définie par son ouverture numérique. (c) Représentation des fréquences spatiales de l'illumination structurée dans l'espace de Fourier. (d) La convolution des fréquences spatiales de la structuration de l'illumination avec celles de l'objet induit la création de plusieurs copies des informations fréquentielles de l'objet dans l'espace de Fourier. Cela déplace des fréquences spatiales initialement inobservables dans l'espace de transmission de l'objectif induisant un gain en résolution spatiale dans la direction de structuration de l'illumination. Pour traiter cette information supplémentaire, un minimum de trois images est nécessaire pour une orientation de l'illumination, en faisant varier la phase de la structuration. (e) En faisant varier l'orientation de la structuration de l'illumination, il devient possible d'augmenter la résolution spatiale de manière quasi isotrope en 2D, avec un minimum de 3 orientations.

Une caractéristique importante des méthodes d'imagerie SIM est qu'elles ne nécessitent pas le recours à des marqueurs fluorescents ou stratégies de marquage spécifiques contrairement à l'imagerie SMLM. Par ailleurs, le traitement informatique réalisé pour reconstruire les images permet d'effectuer un sectionnement optique informatique en éliminant le signal hors focus. Toutefois, ce dernier avantage doit être nuancé, car s'il est effectif sur des échantillons fins, le bruit de photons associé au signal hors focus d'échantillons plus épais ou densément marqué peut drastiquement impacter la qualité de reconstruction de l'image super-résolue et mener à d'importants artéfacts. D'autre part, la structuration de

l'illumination est généralement fortement détériorée en profondeur du fait de la diffusion du signal et des aberrations optiques limitant la capacité à imager à l'intérieur d'échantillons épais et complexes. Depuis une dizaine d'années, des méthodes combinant le principe de structuration des méthodes SIM avec le sectionnement optique des méthodes d'imagerie confocale ont été développées et permettent un doublement effectif de la résolution spatiale plusieurs dizaines de microns en profondeur à l'intérieur d'un échantillon ²⁸.

I.3.2. Microscopie STED : Déplétion par Emission Stimulée

La technique de super-résolution proposée par Stefan W. Hell et appelée STED²¹ pour STimulated Emission Depletion, propose d'exploiter le phénomène d'émission stimulée pour dépasser la limite de diffraction. La microscopie STED est une technique d'imagerie par balayage laser : un faisceau d'excitation est concentré en un point de l'échantillon par l'objectif.

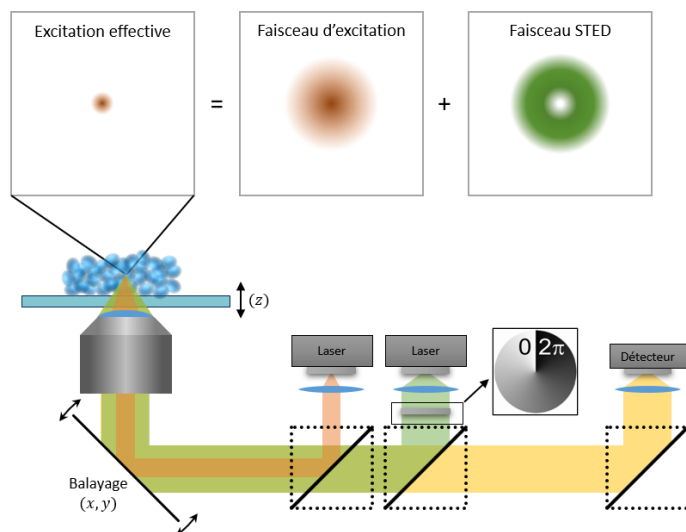


Figure I.20 — Microscopie STED. Un faisceau de déplétion (ou faisceau STED) de forme torique est créé à l'aide, par exemple, d'une lame de phase. Ce faisceau est superposé au faisceau d'excitation, ce qui permet de réduire le volume effectivement fluorescent sous la limite de diffraction en supprimant le signal de fluorescence en périphérie du signal d'excitation. L'échantillon est balayé par cette superposition de faisceaux pour créer une image de super-résolution, en 2 ou 3 dimensions.

Le signal de fluorescence est collecté par l'objectif et transmis à un détecteur ponctuel. Une image 2D de l'échantillon peut alors être reconstruite en balayant la zone d'observation à l'aide du laser d'excitation. Il existe de nombreuses techniques de microscopie de fluorescence par balayage laser, telles que le microscope confocal (voir section I.4.2) ou le microscope par excitation 2 photons ²⁹, mais toutes sont limitées par le phénomène de diffraction : la surface d'excitation produite par l'objectif ne peut être plus petite que la PSF de l'objectif, déterminée par longueur d'onde du faisceau d'excitation et l'ouverture numérique de l'objectif. Pour contourner cette limite, la microscopie STED²¹ associe au

faisceau d'excitation un faisceau de déplétion (Figure I.20). Ce faisceau de forme torique est formé à l'aide d'un masque de phase. Il empêche l'émission de fluorescence par les molécules situées en périphérie du faisceau d'excitation en les relaxant grâce au phénomène d'émission stimulée induisant un signal lumineux filtrable, car différent du signal de fluorescence. En modulant la puissance du faisceau de déplétion, il est possible de moduler la taille de sa zone effectivement fluorescente, et ainsi dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction de la lumière. Il est également possible de façonner le faisceau de déplétion en 3 dimensions, ce qui permet de dépasser la limite de diffraction dans la direction axiale^{30,31}. Cette technique permet d'obtenir une résolution nanométrique, au prix de montages optiques complexes utilisant un à plusieurs masques de phase et plusieurs faisceaux lasers colinéaires et synchronisés entre eux. Les acquisitions peuvent également être relativement longues puisqu'il s'agit d'une technique d'imagerie par balayage laser. Toutefois des versions parallélisées utilisant des réseaux de faisceaux d'excitation et de déplétion ont été développées pour augmenter la vitesse d'acquisition^{32,33}. Une autre limite à l'utilisation du STED est l'utilisation de puissances laser élevées, pouvant induire une forte phototoxicité, ou un blanchiment rapide des fluorophores. D'autres méthodes basées sur ce concept de

contrôler spatialement la capacité des molécules à émettre de la fluorescence ont été développées afin de réduire la quantité de lumière utilisée. C'est le cas des méthodes RESOLFT^{34,35} (REversible Saturable Optical Fluorescence Transitions) qui mettent à profit des états « sombres » de fluorophores ou protéines photoconvertibles, et permettent d'utiliser des puissances laser bien moins élevées qu'en microscopie STED ouvrant la voie à l'imagerie d'échantillons vivants.

I.3.3. SMLM : Microscopie par localisation de molécules individuelles

Notre équipe est spécialisée dans cette troisième famille de techniques de super-résolution et dont j'ai cherché à améliorer les performances au cours de mon travail de thèse : l'imagerie par localisation de molécules individuelles (ou SMLM pour Single Molecule Localization Microscopy)^{16,17,36}. Cette section a pour but de développer son fonctionnement, ses avantages et ses limites. Nous verrons en particulier que les performances en termes de résolution spatiale des méthodes SMLM sont définies par plusieurs paramètres incluant la puissance du signal de fluorescence, le bruit environnant, ou encore la qualité de la PSF du système optique. Cela m'amènera à introduire les défis que j'ai relevés dans cette thèse pour permettre l'imagerie par SMLM en profondeur, allant de la difficulté d'obtenir un sectionnement optique en profondeur sur un large champ de vue tout en préservant l'efficacité de collection du signal de fluorescence, à la correction des aberrations optiques apparaissant avec la profondeur d'imagerie.

I.3.3.1. Concept et fonctionnement de la SMLM

I.3.3.1.1. Concept : Étalement dans le temps de l'information spatiale

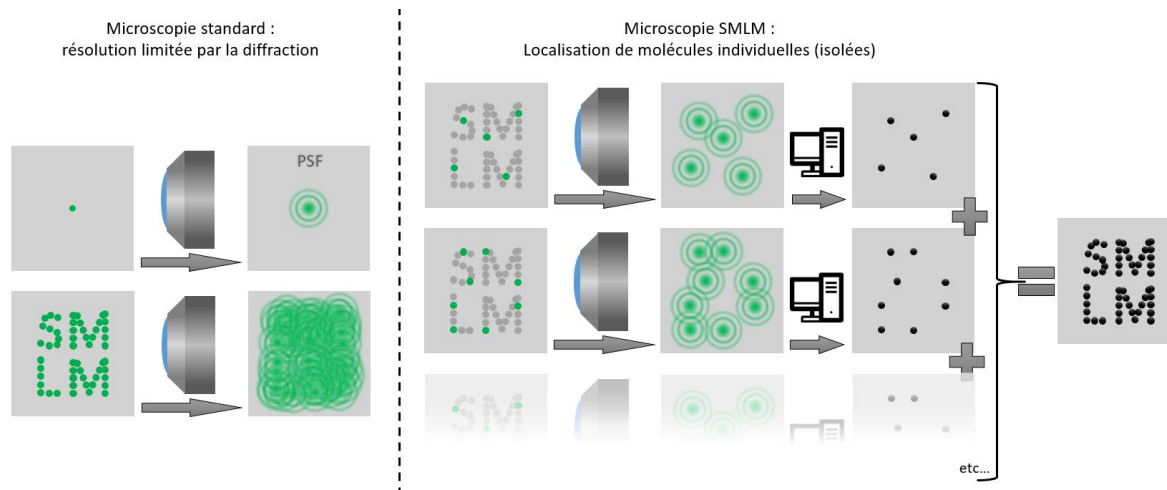


Figure I.21 — Principe de la technique de SMLM. Gauche : En microscopie de fluorescence classique, les PSF produites par chaque point source se superposent. L'image finale est le produit de convolution entre la structure observée et la PSF de l'objectif, ce qui résulte en une image « floue » dont la résolution est limitée par la diffraction. (Droite) En : en SMLM, les molécules fluorescentes isolées sont localisées informatiquement les unes après les autres avec une précision bien supérieure à la limite de résolution. La somme de toutes les localisations permet de reconstruire l'image de super-résolution.

Nous avons vu en section I.2.2.3 que la microscopie conventionnelle ne pouvait résoudre des structures plus petites que la taille de la PSF de l'objectif, soit ~ 200 nm dans le meilleur des cas. En imagerie par SMLM, plutôt que d'observer simultanément toutes les molécules fluorescentes d'une structure, cette information spatiale est étalée dans le temps. L'idée originale d'Eric Betzig et William E. Moerner^{16,22}, présentée en Figure I.21, est de ne permettre

qu'à une fraction des fluorophores présents dans l'échantillon d'émettre simultanément pendant un temps donné, de manière à ce que leurs images soient spatialement isolées les unes des autres, c.-à-d. distantes de plus que la taille de la PSF. Ces molécules étant toutes plus petites que la limite de diffraction de l'objectif, chacune de leurs images correspond à la PSF du microscope. Il devient alors possible de localiser informatiquement le centre de chaque PSF détectée, avec une précision bien meilleure que la limite de diffraction. Les approches de suivi de particules uniques, telles que le QD-SPT (Quantum Dot Single Particle Tracking)³⁷, utilisaient déjà ce principe de localisation précise de molécules isolées, et la SMLM est une application de cette localisation à l'ensemble des émetteurs d'une structure entière, plutôt qu'à un petit nombre de biomolécules.

L'essentiel de la microscopie par localisation de molécules individuelles peut se résumer en deux étapes : (i) isoler quelques fluorophores et (ii) les localiser précisément. Ce processus doit être répété jusqu'à ce que, idéalement, l'ensemble des molécules fluorescentes présentes dans l'échantillon aient été localisées et que la structure observée soit entièrement reconstruite. Ce processus peut impliquer typiquement plusieurs millions de localisations distribuées dans plusieurs dizaines de milliers d'images pour une protéine d'intérêt dans une cellule. Contrairement aux approches de STED et SIM, dites déterministes, les techniques de SMLM sont stochastiques, c'est-à-dire qu'on ne contrôle ni l'endroit ni l'instant d'apparition des événements de fluorescence. Il existe trois grandes familles de techniques permettant le clignotement des molécules développé ci-après, et le Tableau I.1 recense les principales caractéristiques de ces techniques.

Famille	Technique	Marquage	Avantages	Limitations
Photo-activation	(f)PALM ^{16,17}	Protéine fluorescente	Faible photo toxicité Compatible vivant Permet le suivi de particules ³⁸ Quantification possible ³⁹	Peu brillant Photoblanchiment Surexpression Altération des fonctions des protéines
		SNAP/HALO tag ⁴⁰		Surexpression Altération des fonctions des protéines
Contrôle des propriétés chimiques	STORM ³⁶	Immunomarquage Paire de fluorophores organiques	Forte brillance	Utilisation de couples de fluorophores
	GSDIM ⁴¹	Immunomarquage Fluorophore organique	Simple d'utilisation Forte brillance	Très sujet au blanchiment
	dSTORM ⁴²	Immunomarquage Fluorophore organique	Forte brillance Plus table que GSDIM Vitesse d'acquisition	Puissances laser élevées Toxicité du buffer
Cinétique d'accroche des molécules	PAINT ⁴³	Fluorophores organiques en solution	Budget de fluorophores « infini » Forte brillance Compatible vivant	Vivant : Limité à la membrane Fort bruit de fond
	uPAINT ⁴⁴	Marqueurs avec affinité spécifique (Anticorps, peptides ⁴⁵ ...) Fluorophores organiques en solution	Budget de fluorophores « infini » Forte brillance Compatible vivant Permet le suivi de particules uniques	Sur échantillon vivant : Limité à la membrane Fort bruit de fond Accumulation de matériel
	DNA-PAINT ⁴⁶	Immunomarquage : Anticorps, aptamères ⁴⁷ ... + imageurs en solution	Budget de fluorophores « infini » Forte brillance Cinétique ajustable	Nécessite un milieu fortement salin (peu compatible avec le vivant) Fort bruit de fond

Tableau I.1 — Différentes méthodes de microscopie par localisation de molécules individuelles.

I.3.3.1.2. Photo-activation des fluorophores.

Une première famille de techniques utilise un signal lumineux pour activer la fluorescence des molécules au cours du temps. Les techniques (f)PALM ((fluorescence) PhotoActivation Localization Microscopy)^{16,17} (Figure I.22) sont basées sur l'utilisation de protéines fluorescentes photoactivables, ou photoconvertibles. Ces protéines fluorescentes présentent la propriété de ne pas émettre de signal au repos dans la bande spectral d'observation. Après activation (ou conversion) à l'aide d'un faisceau lumineux, différent de celui d'excitation, elles deviennent fluorescentes dans le canal d'observation et peuvent être détectées. En ajustant l'intensité du faisceau d'activation, il est possible de n'activer (ou convertir) qu'une infime quantité de molécules afin de se placer dans un régime où les molécules fluorescentes sont isolées spatialement les unes des autres. Les fluorophores activés ne restent fluorescents que très peu de temps et sont rapidement photoblanchis après avoir été détectés, permettant de répéter le processus pour imager les molécules suivantes. L'intérêt principal de cette technique est la possibilité de l'utiliser sur des cellules vivantes, car les protéines fluorescentes photoactivables sont directement exprimées par les cellules après modification de leur génome (I.2.3.2.2). Cette technique permet également de suivre des protéines au cours du temps dans des cellules vivantes en détectant un même fluorophore sur plusieurs images consécutives. Appelée spt-PALM (pour single particle tracking PALM)³⁸ ce suivi permet d'étudier, en plus de leur organisation spatiale, les propriétés dynamiques de protéines à l'échelle nanométrique et avec des résolutions temporelles de l'ordre de la dizaine de millisecondes.

Un avantage des techniques PALM est que les protéines ne sont marquées que par un unique fluorophore chacune, ce qui ouvre la voie à des études de stœchiométrie³⁹. Leur principale limite réside toutefois dans le fait que les protéines fluorescentes sont généralement peu brillantes, ce qui limite la résolution finale de l'image (voir section I.3.3.3). Aussi, les méthodes de marquage par chimie-clic compatible avec le vivant et le développement de nouveaux fluorophores organiques photoactivable⁴⁰ permettent aujourd'hui de fortement améliorer les performances de ces techniques basées sur l'activation lumineuse des fluorophores. Enfin, l'utilisation de protéines fluorescentes peut induire une surexpression de la protéine, ou une altération de ses fonctions. Ce dernier point est aujourd'hui mitigé du fait des nouvelles techniques de modification du génome telles que les techniques CRISPER-Cas9¹⁸ permettant de marquer les populations endogènes de protéines.

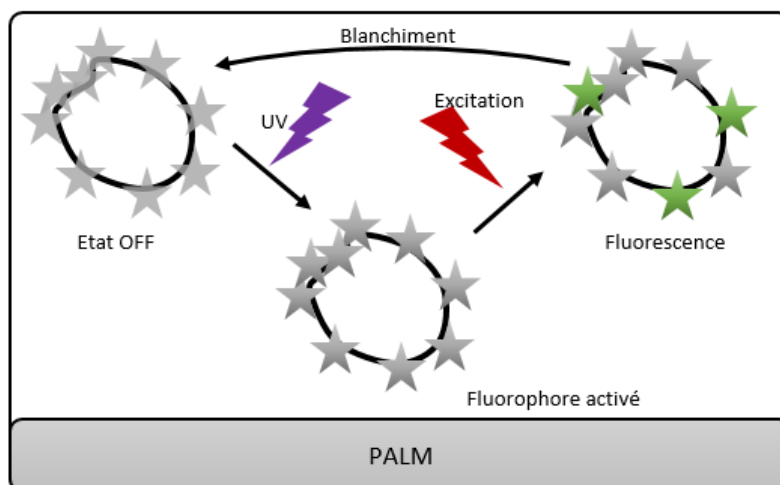


Figure I.22 — PALM. Des fluorophores photoactivables (ou photo-convertibles) marquent la biomolécule d'intérêt. À l'aide d'un premier faisceau (généralement UV), une fraction des fluorophores est activée et peut émettre de la fluorescence afin d'être localisée. Un second faisceau, d'une autre longueur d'onde, permet d'exciter les fluorophores pour engendrer le signal de fluorescence, puis de blanchir les fluorophores activés afin de faire place à un nouveau cycle d'activation et de détection.

I.3.3.1.3. Contrôle des propriétés chimiques des fluorophores

Dans une seconde famille de techniques d'imagerie par SMLM, le clignotement des fluorophores est obtenu grâce à un contrôle de leurs propriétés chimiques. Le GSDIM⁴¹ et le dSTORM⁴² sont deux techniques de cette famille et repose sur l'existence d'états triplets des molécules introduits en section I.2.3.1 (Figure I.15). En effet, les fluorophores situés dans cet état ne sont plus fluorescents, et sont donc considérés comme étant dans un état noir (OFF ou non fluorescent), en opposition aux états « brillants » (ON) où la fluorescence est possible. Ces techniques consistent donc à faire en sorte de faire passer la grande majorité des fluorophores dans cet état OFF, et de ne laisser que quelques fluorophores revenir dans un état brillant de façon stochastique au cours du temps pour être détectée. Contrairement au GSDIM, la technique dSTORM repose sur l'utilisation d'un tampon chimique qui favorise la transition des fluorophores vers leur état triplet et stabilise ces états dans le temps. Ce tampon est également utilisé afin de supprimer l'oxygène de l'environnement par réaction enzymatique ce qui diminue les chances de photoblanchiment des fluorophores, et augmente ainsi le nombre de molécules détectables pour une acquisition. Ce tampon chimique est toutefois toxique et la transition des fluorophores vers leur état triplet requiert des puissances laser relativement importantes (de l'ordre de 1 à 10 kW/cm²). Par conséquent, cette technique d'imagerie n'est pas compatible avec l'imagerie de cellules vivantes. Le GSDIM quant à lui n'utilise pas de tampon chimique ce qui le rend extrêmement sensible au blanchiment et n'est donc jamais utilisé en pratique, au profit du dSTORM.

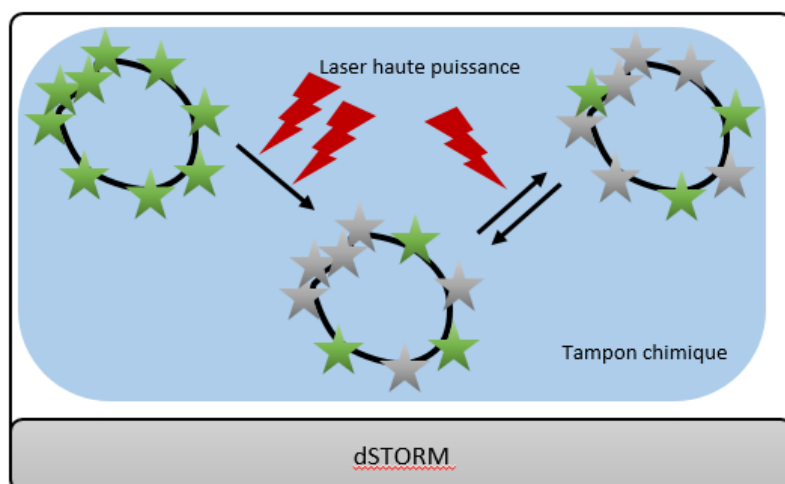


Figure I.23 — dSTORM. Les états noirs (non fluorescents) des fluorophores sont stabilisés à l'aide d'un tampon chimique, qui réduit également la probabilité de blanchiment. Les molécules sont en grande majorité passées dans un état noir à l'aide d'une excitation intense. Une petite quantité de fluorophores repassent de façon stochastique vers un état brillant pendant une courte durée avant de retourner à l'état noir ou de blanchir.

L'avantage principal de cette famille de techniques d'imagerie par SMLM est de reposer sur l'utilisation de fluorophores organiques extrêmement brillants et donc de permettre d'atteindre des résolutions spatiales supérieures aux techniques PALM. Elles bénéficient aussi de l'amplification des techniques d'immunomarquage utilisées pour marquer les protéines d'intérêts permettant la localisation répétée, et donc plus précise, d'une même cible, mais au dépend de mesures de stœchiométrie des protéines plus complexes et moins fiables. Un second avantage de ces techniques, consécutif à l'utilisation de sondes brillantes et stables, est qu'elles permettent des vitesses d'acquisitions relativement rapides, de l'ordre de 50 Hz à plusieurs kHz dans certaines configurations⁴⁸⁻⁵⁰, autorisant des séquences d'acquisition plus courtes pour un même nombre de localisations. Toutefois, la composition des tampons utilisés dépend en partie du fluorophore considéré. Cela rend plus difficile l'imagerie multicolore de plusieurs populations de protéines marquées par différents fluorophores aux propriétés chimiques distinctes. Il est cependant possible de combiner plusieurs techniques d'imagerie par SMLM (ex. : dSTORM et PALM) ou d'utiliser des fluorophores proches⁵¹ pour permettre une imagerie de plusieurs populations de protéines

différentes. Enfin, l'utilisation de fortes intensités laser pour permettre de transférer les fluorophores vers un état triplet non fluorescent tout en optimisant la collection de leur budget de photons peut s'avérer délicate et entraîner un blanchiment prématuré des fluorophores avant leur détection. Nous verrons par la suite que cela peut être particulièrement problématique pour l'imagerie SMLM de volume important (IV.4).

I.3.3.1.4. Cinétique d'accroche des molécules fluorescentes sur les protéines cibles

Enfin, une troisième famille de techniques (PAINT⁴³, uPAINT⁴⁴, DNA-PAINT⁵²) exploite la cinétique des molécules fluorescentes en solution, s'accrochant continuellement aux structures d'intérêt, pour les faire clignoter. Ces techniques nécessitent un sectionnement optique important afin de s'affranchir du signal de fond qu'engendrerait l'excitation des molécules présentes dans la solution, et de ne détecter que les molécules s'étant accrochées à leurs protéines cibles. Leur avantage commun est d'utiliser des fluorophores organiques très brillants permettant d'optimiser les performances de l'imagerie SMLM.

La méthode PAINT⁴³ exploite l'adsorption, spécifique ou non, de fluorophores dans la membrane de cellules. En contrôlant leur cinétique d'adsorption à travers leur concentration dans la solution et leur blanchiment après détection, il est possible de se placer dans un régime de détection de molécules individuelles pour permettre la localisation de chacun de ces événements d'absorption. La méthode uPAINT⁴⁴ repose sur le même principe, mais utilise quant à elle des fluorophores conjugués à un anticorps afin de cibler spécifiquement une population de protéines membranaires à la surface de cellules. Plus généralement, ce type d'approche peut être utilisée avec toutes molécules (anticorps, peptides, aptamères...) possédant une certaine affinité et spécificité pour la structure à imager. Une limite importante de ces méthodes utilisant des processus d'accroche non transitoires est que les fluorophores s'accumulent progressivement aux structures ciblées, entraînant à terme leur déformation et pouvant nécessiter le développement d'algorithmes pour prendre en compte cela⁴⁵.

Plus récemment une autre approche exploitant la reconnaissance et l'accroche transitoire de brins d'ADN complémentaires entre eux a été proposée. Cette technique, appelée DNA-PAINT⁴⁶, repose sur un immunomarquage des structures d'intérêt (section I.2.3.2.1). Toutefois, ici l'anticorps secondaire n'est pas conjugué à un fluorophore, mais à un brin d'ADN appelé « brin d'accroche ». Il n'y a donc pas de fluorescence en l'état, et pour pouvoir procéder à l'imagerie, une solution d'imageurs est nécessaire. Ces imageurs sont des fluorophores conjugués au brin d'ADN complémentaire au brin d'accroche. Pendant l'imagerie, les imageurs diffusant en solution vont s'accrocher de manière transitoire aux brins d'accroche. La cinétique d'accrochage et de décrochage des imageurs dépend de trois principaux paramètres : la taille et la séquence des brins d'ADN, la concentration de la solution en imageur, et la concentration saline de la solution d'imagerie.

Le principal avantage de cette technique réside dans le fait que les fluorophores en solution sont en quantités si grandes qu'on peut les considérer comme infinies. Combiné au caractère transitoire de la liaison entre les brins d'ADN, cela rend cette méthode insensible au photoblanchiment. C'est un avantage considérable, car cela permet de localiser autant de molécules que nécessaire pour s'assurer une densité de localisation suffisante pour permettre une reconstruction fidèle de la structure d'intérêt (voir section I.3.3.3). Nous verrons par la suite que cet avantage est aussi crucial pour l'imagerie SMLM de gros volumes (IV.4.1). Un autre avantage de cette méthode est qu'elle peut permettre l'imagerie multicolore de très nombreuses cibles sur une même cellule grâce à la méthode Exchange-PAINT^{46,53}. Pour cela chaque structure cible est marquée à l'aide d'un brin ADN d'accroche orthogonale aux autres.

En introduisant séquentiellement leur imageur respectif, pouvant être tous conjugués au même fluorophore, il devient possible d'imager tour à tour chacune des structures marquées. Un dernier avantage de la méthode DNA-PAINT est d'offrir un moyen de quantification du nombre de brins d'accroches, et donc de protéines, détectés en un point. En effet la mesure de la fréquence d'accrochage et de décrochage des imageurs sur une position est proportionnelle à la concentration en imageur et aux nombres de brins d'accroche présents sur cette position. Cela offre donc une solution pour réaliser des études de stœchiométrie de protéines⁵⁴.

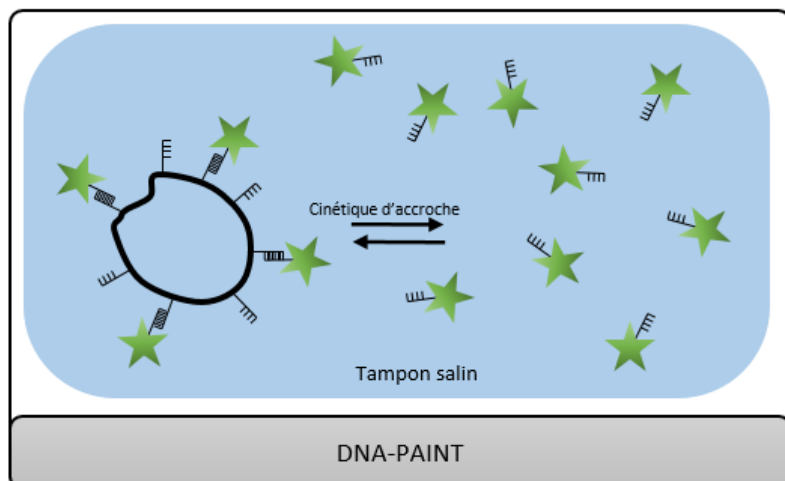


Figure I.24 — DNA-PAINT. Les fluorophores sont en solution, conjugués à un brin d'ADN (imageurs). Le brin d'ADN complémentaire est fixé sur la protéine cible par immunomarquage. Les imageurs peuvent alors s'attacher de manière transitoire à leur cible, et le clignotement vient de la cinétique d'accrochage et décrochage des imageurs.

Toutefois, une limitation importante de la méthode DNA-PAINT est sa vitesse d'acquisition fixée par la cinétique d'accrochage et de décrochage des brins imageurs sur les brins d'accroche. Si cette cinétique est optimisée grâce à l'utilisation de buffer à forte concentration saline, elle reste relativement lente, de l'ordre de plusieurs centaines de millisecondes. Or le temps d'exposition de la caméra doit être adapté à cette cinétique afin d'optimiser le nombre de photons par événement de localisation et permettre d'atteindre des résolutions inférieures à 5 nm. Ainsi les vitesses d'acquisitions en DNA-PAINT sont habituellement de l'ordre de 5 à 10 Hz, bien inférieur aux techniques de type dSTROM.

I.3.3.2. Technique de localisation

Une fois les molécules isolées les unes des autres et détectées, l'étape suivante consiste à localiser précisément leur position. De nombreuses méthodes de localisation existent, basées sur différents modèles mathématiques. Pour en savoir plus, la revue publiée récemment par D. Sage et al.⁵⁵ propose un comparatif de différentes méthodes existantes aujourd'hui. Nous ne développerons ici que la méthode utilisée au cours de cette thèse, intégrée aux logiciels WaveTracer⁵⁶ et PALMTracer développé dans mon équipe. Le processus de localisation comporte ici deux étapes : (1) une segmentation par transformation en ondelette sur l'image brute afin de réduire le bruit et détecter rapidement les molécules individuelles en fonction d'un seuil défini par l'utilisateur, suivi de (2) la localisation précise de ces molécules soit en calculant leur centroïde, ou mieux par ajustement gaussien (Figure I.25) qui permet d'atteindre de meilleures précisions de localisation.

I.3.3.2.1. Localisation 2D en temps réel par ajustement gaussien

Pour reconstruire une structure par SMLM, il est théoriquement nécessaire de détecter toutes les molécules présentes dans l'échantillon au moins une fois, mais il est inutile de les détecter plusieurs fois. En pratique, pour une cellule, il est courant de localiser un million d'émetteurs ponctuels ou plus répartis sur plusieurs dizaines de milliers d'images. Les acquisitions SMLM peuvent donc être très longues (de quelques minutes à plusieurs heures

en fonction de la technique) et il est impossible de visualiser les structures avant d'effectuer l'acquisition complète et la reconstruction des images. La possibilité de reconstruire les

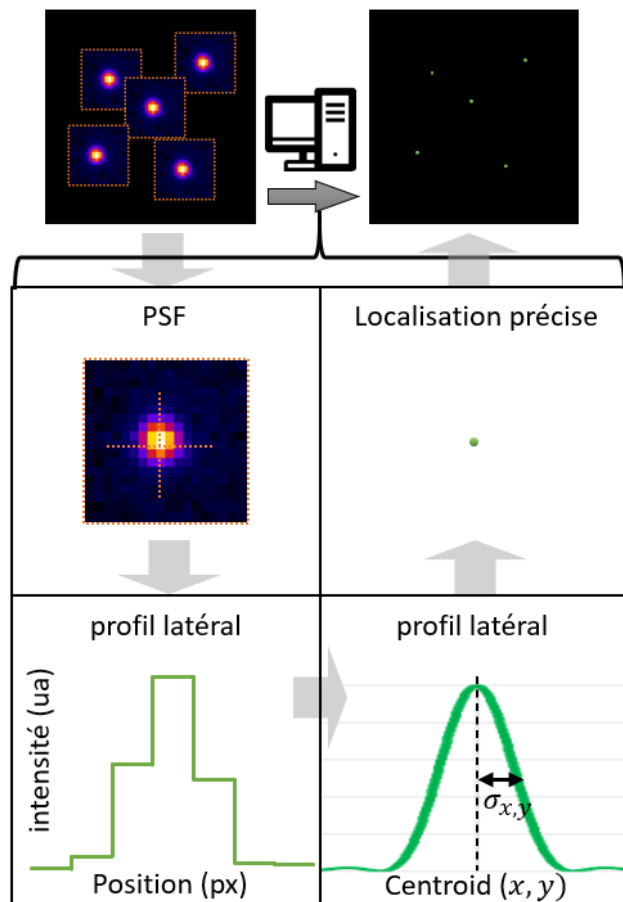


Figure I.25 : Principe de localisation à l'aide d'un ajustement gaussien. Pour chaque événement (pic d'intensité), un fit gaussien est effectué sur le profil latéral de l'image. Ce profil gaussien permet d'obtenir la position (maximum de la courbe), mais également l'écart-type σ , utile au calcul de la précision de localisation (section I.3.3.3) et la localisation axiale (section I.3.3.2.2).

de molécules ont été détectées pour reconstruire la structure, évitant des acquisitions inutilement longues et volumineuses.

La principale limite des méthodes de localisation par ajustement gaussien est que ce modèle n'est pas toujours valide pour représenter la PSF du système d'imagerie. En effet, si en règle générale la PSF des microscopes présente un profil proche d'une fonction gaussienne, la présence d'aberrations optiques peut fortement les déformer rendant ces techniques de localisation invalides. Nous verrons que cela peut être particulièrement problématique pour l'imagerie SMLM en profondeur ou les aberrations optiques peuvent être importantes (Chapitre III).

I.3.3.2.2. Localisation de super-résolution en 3D

Le principe de localisation présentée ci-dessus permet de localiser les molécules en 2D sur le plan focal de l'objectif, mais ne permet pas d'obtenir une information sur la position dans de la molécule dans l'axe de l'objectif. La PSF d'un objectif de microscope sans aberrations est symétrique selon l'axe de l'objectif (axe z). La largeur de la PSF produite par une molécule en dehors du plan focal peut donc nous renseigner sur la distance de cette

molécule vis-à-vis du plan objet, mais à cause de cette symétrie, il est impossible de déterminer si la molécule est au-dessus ou en dessous de ce plan objet (Figure I.26.a.) Il est donc nécessaire de rompre cette symétrie afin de permettre une localisation précise des molécules individuelles en 3D. Pour ce faire, quatre grandes familles de techniques ont été proposées et sont présentées en Figure I.26.

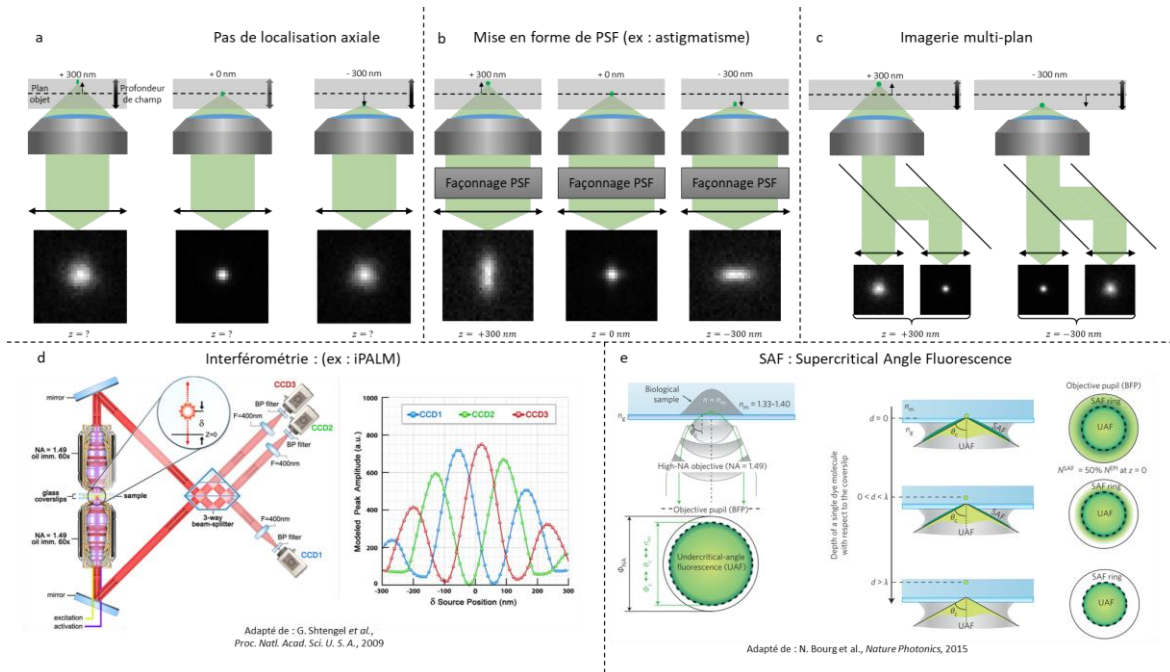


Figure I.26 — Techniques de localisation axiale des molécules. (a) La PSF d'un objectif corrigé à l'infini (sans aberrations) présente une symétrie axiale : sans modifications, il est impossible de différencier une molécule située au-dessus ou en dessous du plan objet. (b) L'imagerie multiplan consiste à observer deux plans simultanément légèrement défocalisés l'un par rapport à l'autre : l'information contenue dans les deux images permet de retrouver la position axiale de l'évènement. (c) Les techniques de mise en forme de la PSF consistent à encoder la position axiale de la molécule dans la forme de la tache de diffraction. (d) Adapté de Shtengel et al. 2009⁵⁷. Les techniques d'interférométrie permettent d'utiliser la phase de l'onde émise par chaque émetteur, laquelle évolue en fonction de la position axiale de l'émetteur. (e) Adapté de Bourg et al., 2015⁵⁸. La méthode SAF exploite la grande ouverture numérique des objectifs utilisés en SMLM afin de collecter une fraction de champ évanescent émis par les molécules qui dépend de leur position axiale vis-à-vis de la lamelle.

Une première famille de technique, dite multiplan⁵⁹ consiste à simultanément imager plusieurs plans de l'échantillon défocalisé de quelques centaines de nanomètres l'un par rapport à l'autre. La combinaison de l'information contenue dans ces différents plans permet de déterminer la position 3D exacte de la molécule (Figure I.26.c) par rapport à ces plans. Une détection sur plus de deux plans, jusqu'à 9 plans simultanément⁶⁰, permet d'étendre l'épaisseur du volume d'imagerie sur laquelle il est possible de localiser les molécules, jusqu'à 4 μm , mais au prix d'un champ de vue plus réduit. Cette méthode est particulièrement intéressante pour le suivi de particules en 3 dimensions sur échantillons vivants, car elle permet l'acquisition de volumes entiers de manière très rapide.

Une seconde famille de technique exploite des processus d'interférences pour localiser les molécules en 3 D. Ces techniques utilisent la phase de l'onde émise par chaque molécule, celle-ci étant dépendante de la position axiale. Pour pouvoir mesurer cette phase, Shtengel et al.⁵⁷ ont proposé une architecture de microscope dit « 4 pi », utilisant deux objectifs positionnés de part et d'autre de l'échantillon. Un système de prismes permet ensuite de faire interférer le signal de chaque molécule avec lui-même pour accéder à ses propriétés de phase (Figure I.26.c). Si cette approche permet d'atteindre des résolutions inférieures à 10 nm dans les 3 directions de l'espace⁶¹, elle est très complexe à mettre en œuvre. Plus

récemment, P. Bon a proposé un système beaucoup plus simple à mettre en place utilisant un simple masque de phase sur la voie de détection d'une architecture standard de microscope, mais au prix d'une résolution axiale inférieure ⁶².

Une troisième façon de déterminer la position axiale des molécules est de directement l'encoder dans la forme de la PSF^{63,64} (Figure I.26.b). Pour mettre en forme cette PSF, un élément optique est inséré sur le chemin de détection. En fonction de l'élément optique, diverses formes de PSF sont possibles. Une lentille cylindrique permet de générer des PSF de formes elliptiques, dont le degré et l'axe d'ellipticité dépendent de la position axiale des molécules détectées ⁶³. Des masques de phase plus complexes permettent de créer des PSF de formes variées (tétrapode ⁶⁵, double hélice⁶⁴, ou courbée⁶⁶) dont la forme et l'orientation dépendent de la position axiale de la molécule. Ces formes, plus complexes à mettre en place et à analyser, ont été développées pour améliorer la précision de localisation axiale (PSF courbées) ou bien permettre une détection sur une plus large profondeur (jusqu'à 20 μm avec la forme tétrapode). Toutefois, ces PSF sont relativement larges et ont donc plus facilement tendance à se superposer lors de l'acquisition de structures densément marquées. Il est alors nécessaire d'ajuster les paramètres d'acquisition pour réduire la densité de molécules détectées par images au détriment du temps d'acquisition total. Enfin, il est intéressant de noter que l'utilisation d'éléments optiques actifs, tels que des miroirs déformables ou des modulateurs spatiaux de lumières, offre la possibilité de créer différentes formes de PSF sur un même système, et donc d'adapter le type de PSF utilisé en fonction des conditions et types d'acquisitions.

La dernière famille, plus récente, concerne les techniques basées sur des mesures d'intensité relatives. L'une de ces techniques, appelée SAF (pour Supercritical Angle Fluorescence) (Figure I.26.e), met à profit la grande ouverture numérique des objectifs utilisés pour la SMLM. Ces objectifs, dont l'ouverture numérique est supérieure à 1, sont capables de capter une partie du champ évanescent émis par les molécules avec un angle supercritique, lorsqu'elles sont à proximité avec la lamelle de verre. En mesurant la quantité de cette énergie, il devient possible de déduire la position axiale des molécules détectées ^{58,67}. Cette technique offre l'avantage de pouvoir déterminer une position axiale absolue, car l'énergie transmise par SAF dépend directement de la distance entre l'émetteur et la lamelle. La limite principale de cette technique est que, comme pour la microscopie TIRF, il n'est possible d'utiliser la méthode SAF que sur quelques centaines de nanomètres au-dessus de la lamelle. Pour contourner cette limite, il a récemment été proposé de combiner la méthode SAF avec des méthodes de mise en forme de PSF, permettant d'obtenir des localisations axiales absolues sur une épaisseur de quelques microns⁶⁸. Une autre méthode basée des mesures d'intensité a également été récemment proposée par Sandrine Lévêque-Fort et son équipe⁶⁹. Cette méthode, nommée ModLoc pour « Modulation Localization », emploie une variation spatio-temporelle de l'illumination dans le but de localiser les molécules. L'échantillon est illuminé à l'aide de franges inclinées. Le déplacement rapide de ces franges provoque une modulation de l'intensité d'excitation des molécules qui dépend de leur position axiale. En mesurant la modulation du signal de fluorescence de chaque molécule au cours du temps, il est alors possible de remonter à leur position axiale.

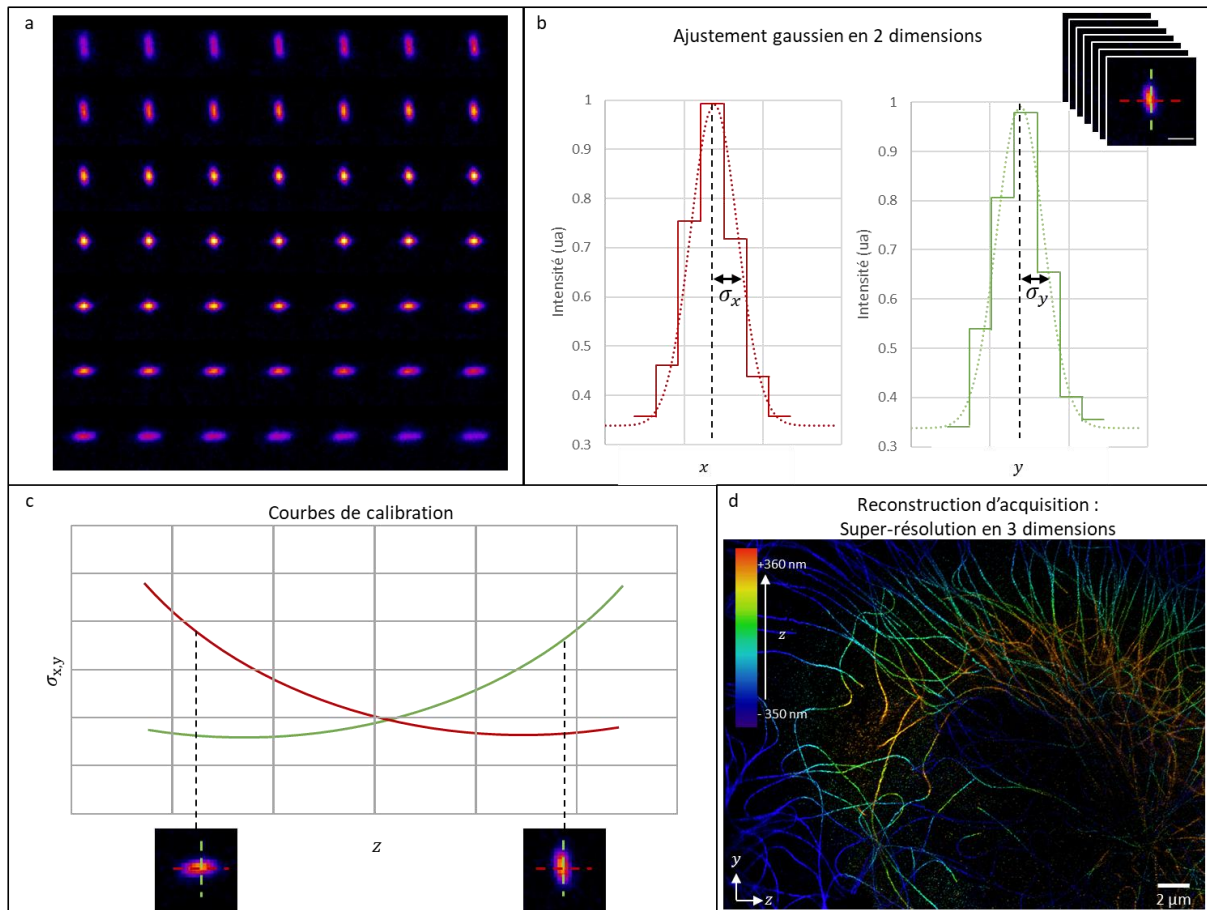


Figure I.27 — Localisation 3D par astigmatisme. (a) Une pile d'images en z est acquise sur une bille de dimensions inférieure à la limite de résolution (pas en z entre les images : 25 nm) (b) Un ajustement gaussien 2D du profil de la PSF pour chaque position axiale permet d'extraire ses écarts-types σ_x et σ_y . (c) Les courbes de calibrations σ_x et σ_y en fonction de z permettent de retrouver la position axiale des événements de détection des molécules individuelles lors du traitement des acquisitions de SMLM. Une recherche de moindre erreur est effectuée sur les deux courbes pour retrouver la localisation axiale de chaque molécule, et permettre la (d) reconstruction d'une image de super-résolution en 3 dimensions. Cette image acquise par la méthode DNA-PAINT représente les filaments de tubuline, qui constitue le cytosquelette d'une cellule COS accrochée à une lamelle de microscope. La couleur représente la profondeur des molécules détectées sur une épaisseur de 0.7 μm .

Dans notre cas, c'est une mise en forme de la PSF par aberration astigmatique qui est utilisée. Cette méthode est la plus simple à mettre en place, et les algorithmes de localisations par ajustement gaussien que nous utilisons permettent de traiter ce type de déformation. Afin de déterminer la position axiale des molécules détectées, on utilise une mesure de référence, ou calibration, des déformations de PSF induites par l'astigmatisme introduit en détection. La Figure I.27 présente ce processus de calibration. Une pile d'images d'une bille plus petite que la limite de résolution (dans notre cas de 100 nm) est acquise, avec un pas dans la direction axiale z suffisamment petit (ici 25 nm). Pour chaque image de cette pile, un ajustement gaussien en deux dimensions est effectué afin d'extraire les écarts-types de la PSF σ_x et σ_y dans les deux directions du plan. Cette étape de calibration permet d'associer à chaque couple (σ_x, σ_y) une profondeur z . Ainsi, lors du traitement d'une acquisition SMLM, un ajustement gaussien en deux dimensions sur les PSF des molécules détectées permet d'extraire les couples (σ_x, σ_y) de ces molécules et d'en déterminer leur position axiale à partir de la courbe de calibration. Avec cette méthode, il est possible d'atteindre des précisions de localisation axiale de 20 nm en fonction du nombre de photons collectés.

I.3.3.3. Résolution en SMLM

En imagerie SMLM, la notion de résolution spatiale finale de l'image dépend de deux paramètres principaux : la précision à laquelle les molécules détectées sont localisées (Figure I.28 A et B), et la densité de localisations composant l'image reconstruite (Figure I.28 C).

Lorsque l'on détecte et localise une même molécule sur plusieurs images consécutives, on observe une distribution de localisations autour d'une position moyenne. Cette distribution reflète une incertitude sur notre capacité à localiser la molécule (Figure I.28), et définit ce qu'on appelle la précision de localisation. En général, on définit la précision de localisation comme étant l'écart-type de la distribution de localisation, et la résolution comme la largeur à mi-hauteur (FWHM). Ce paramètre est capital pour la détermination de la résolution spatiale en imagerie SMLM. Dans le cas d'une localisation réalisée par ajustement gaussien sur la PSF détectée, cette précision a été décrite par Russel E. Thompson dans un article publié en 2002 dans le *Biophysical Journal* ⁷⁰ :

Équation I.34

$$\langle(\Delta x)^2\rangle = \frac{\sigma^2 + a/12}{N} + \frac{8\pi\sigma^4 b^2}{a^2 N^2}$$

Dans cette formule, $\langle(\Delta x)^2\rangle$ désigne la précision de localisation dans la direction radiale, σ désigne la largeur à mi-hauteur de l'ajustement gaussien, N est le nombre de photons collectés, a représente la taille de pixel de la caméra, et b est proportionnel au bruit de fond. Par cette formule, on comprend qu'il y a trois points clefs pour maximiser la précision de localisation lors de l'imagerie par SMLM.

- Le nombre de photons captés est particulièrement important. Ainsi, les objectifs utilisés pour la SMLM doivent posséder une grande ouverture numérique (supérieure à 1) afin de collecter un maximum de signal.
- Le second élément à optimiser est le bruit de fond. Les caméras scientifiques modernes ont un bruit électronique très faible, et l'essentiel du bruit de fond pouvant impacter la précision de localisation provient du signal de molécules fluorescentes excitées en dehors du plan imagé. Pour diminuer au maximum ce bruit de fond, les méthodes d'imagerie SMLM nécessitent donc l'utilisation de système d'imagerie procurant un fort sectionnement optique. Ces systèmes seront présentés dans la section suivante et je discuterai de leur utilisation possible pour l'imagerie de SMLM en profondeur.
 - La taille et la forme de la PSF forment le troisième élément à optimiser. Plus la PSF est large et plus l'incertitude sur la localisation est grande. En profondeur, les aberrations optiques ont pour effet d'élargir et déformer la PSF du système. Nous verrons dans le troisième chapitre qu'il est nécessaire de corriger ces aberrations optiques pour maintenir une résolution maximale, en particulier lors de l'imagerie en profondeur.

Pour obtenir une résolution élevée en SMLM, la densité de molécules détectées est tout aussi importante que la précision de localisation. La précision de localisation nous assure que chaque molécule est minutieusement localisée, mais pour reconstruire fidèlement l'ensemble de la structure, il est nécessaire de localiser suffisamment de molécules (Figure I.28 C). Cette densité de détection dépend non seulement de la densité et la qualité du marquage réalisé, mais également de l'acquisition elle-même. Il est en effet nécessaire de s'assurer que la durée de la séquence d'acquisition permet de détecter le maximum, si ce n'est l'ensemble, des marqueurs présents sur la structure imagée.

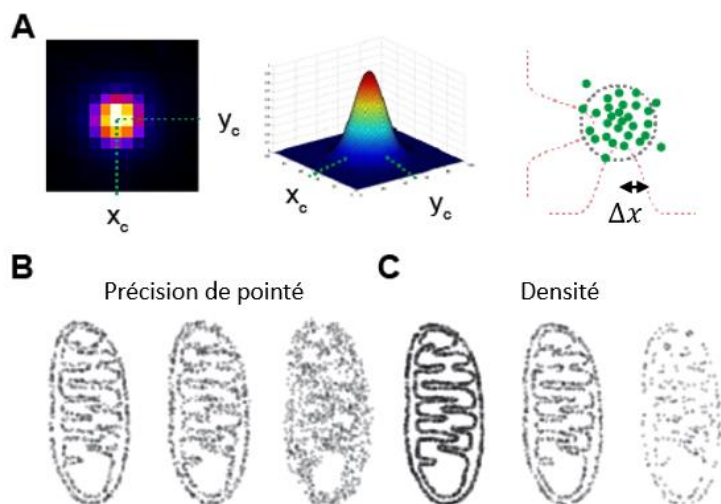


Figure I.28 — Précision de localisation. (A) Principe de l'ajustement gaussien pour la localisation d'une molécule individuelle. Droite : l'écart-type de la distribution de localisations répétées d'une même molécule permet de définir la précision de localisation. La résolution finale de l'image reconstruite, et donc la capacité à résoudre fidèlement des détails fins d'une structure complexe, est déterminée par (B) la précision de localisation, mais également (C) la densité de localisations. (B et C adaptés Baddeley and Bewersdorf 2018⁷¹).

d'autant plus vrai lorsque l'observation se fait en 3 dimensions, car le nombre de molécules nécessaires pour échantillonner convenablement la structure augmente de façon exponentielle avec la dimension de l'image⁴⁵. Cela peut impliquer des acquisitions particulièrement longues de plusieurs dizaines d'heures. Pour les techniques telles que le PALM ou le dSTORM, cela est particulièrement contraignant, car le photoblanchiment des émetteurs limite le nombre de localisations qu'il est possible d'atteindre. Les techniques PAINT ont un avantage certain sur ce plan, puisque le nombre virtuellement infini de fluorophores disponible permet de s'assurer que le blanchiment des fluorophores n'est plus une limite, mais au prix de temps d'acquisition pouvant être extrêmement longs.

Que ce soit la densité de localisation, ou la précision, c'est ici deux défis majeurs pour l'imagerie SMLM en profondeur. Concernant la densité de marquage, nous verrons dans le dernier chapitre que nous avons choisi d'utiliser la méthode d'imagerie DNA-PAINT afin de limiter les effets du blanchiment précoce des fluorophores (c.-à-d. avant leur détection) et nous assurer un grand nombre de localisations. Concernant la précision de localisation, l'impact des aberrations optiques pour l'imagerie en profondeur sera étudié dans le Chapitre III. Nous avons également introduit l'importance du sectionnement optique pour permettre d'optimiser la résolution des images SMLM. Les sections I.4 et I.5 suivantes ont pour but de présenter les différentes méthodes de sectionnement optique possibles pour l'imagerie par SMLM en profondeur, et en particulier la technologie soSPIM¹ développé au sein de l'équipe et que j'ai cherché à optimiser au cours de mon travail de thèse.

I.4. Sectionnement optique pour la microscopie par localisation de molécules individuelles en profondeur

L'excitation en champ large est la méthode d'illumination la plus simple et la plus communément utilisée en microscopie de fluorescence. L'ensemble de l'échantillon est illuminé avec une lumière dans une certaine bande spectrale et projetée par l'objectif. Le signal de fluorescence généré est ensuite collecté par le même objectif puis filtré, selon un

On peut expliquer cette nécessité par le théorème de Nyquist-Shannon⁷², qui établit que, pour résoudre une structure, l'échantillonnage doit être au moins deux fois plus fin que la résolution visée. Si ce théorème est appliqué de manière empirique, pour obtenir une structure résolue à 20 nm près, un fluorophore doit être détecté au moins tous les 10 nm⁷³. Ce n'est pas tout à fait exact en imagerie, car ce critère s'applique en réalité aux signaux périodiques, et il a été montré qu'en microscopie l'échantillonnage doit être beaucoup plus fin^{45,71,74}. C'est

montage en épifluorescence permettant de limiter la collection du signal d'excitation. Cette méthode est très simple à implémenter, mais l'illumination de l'échantillon entier apporte deux inconvénients majeurs : l'excitation des fluorophores en dehors du plan objet génère un bruit de fond important impactant drastiquement le contraste de l'image réalisée, et induit leur photoblanchiment de manière précoce. Ces inconvénients sont particulièrement problématiques pour l'imagerie par SMLM et plus particulièrement d'objets 3D. En effet, le bruit de fond détériore fortement la précision de localisation des molécules individuelles, et leur photoblanchiment prématuré va réduire la densité de molécule qui contribuera à l'image super-résolue finale. Pour permettre l'imagerie par SMLM en profondeur, il est donc nécessaire de restreindre la détection, mais aussi idéalement l'illumination, au plan imagé.

Dans ce chapitre, je présenterai les différentes techniques de sectionnement optique existantes et discuterai de leurs avantages et inconvénients pour l'imagerie par SMLM en profondeur. En particulier, je présenterai les différentes solutions utilisant une excitation par feuille de lumière qui ont été proposées à ce jour.

1.4.1. Microscopie de fluorescence par réflexion totale interne (TIRF)

Nous avons vu en section 1.1.1.1 que si la lumière rencontre un dioptre vers un milieu d'indice de réfraction plus faible, il existe un angle d'incidence critique à partir duquel la lumière ne peut plus traverser le dioptre, et est totalement réfléchi. C'est cette propriété qui est utilisée dans en microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne, dite TIRF (Figure I.29) en tirant parti du fait que les lamelles de microscope en verre ont un indice de réfraction supérieur à celui du milieu d'imagerie, proche de l'eau. Ce phénomène n'est bien sûr possible qu'avec des objectifs à immersion, dont l'indice du milieu d'immersion est égal (ou supérieur) à celui de la lamelle utilisée et dont l'ouverture numérique est suffisante pour permettre la création de rayons ayant un angle supérieur à l'angle critique considéré.

Si au-delà de cet angle critique le faisceau d'excitation est totalement réfléchi, une onde évanescente est aussi créée dans le milieu de faible indice grâce à un phénomène appelé effet tunnel. Cette onde dont l'énergie décroît de façon exponentielle avec la profondeur z permet de confiner le signal d'excitation à la surface de la lamelle sur une épaisseur de l'ordre de la centaine de nanomètres.

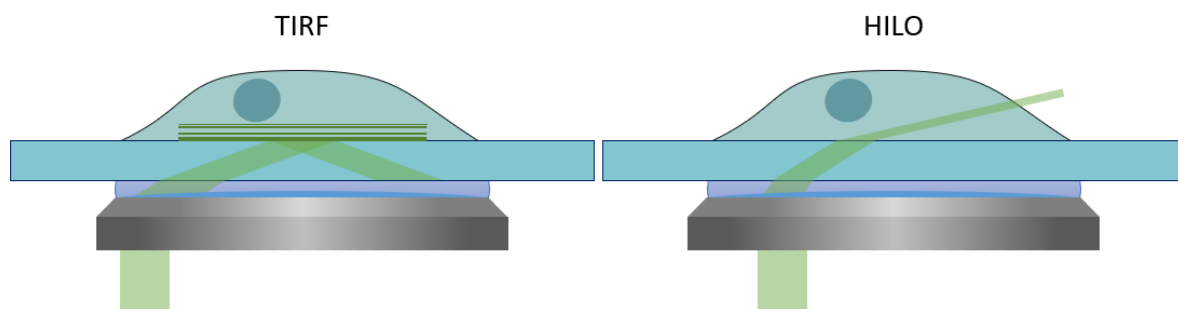


Figure I.29 : Microscopie TIRF et HILO. Gauche : la microscopie TIRF consiste à utiliser le phénomène de réflexion totale (section 1.1.1.1) à l'aide d'un objectif à très forte ouverture numérique. Le faisceau incident avec un angle très élevé est totalement réfléchi, et ne traverse pas l'interface lamelle-échantillon. Seule l'onde évanescente permet d'illuminer jusqu'à 100 nm au-delà de l'interface. Droite : la microscopie HILO consiste à illuminer l'échantillon avec un faisceau très incliné. Ce type d'illumination permet d'exciter une épaisseur plus importante, jusqu'à 2 μm au-dessus de la lamelle.

Cette technique est probablement la plus efficace en termes de sectionnement optique. Ici, seules les quelques premières centaines de nanomètres de l'échantillon sont excitées procurant un contraste inégalé des structures situées à l'interface avec la lamelle. Mais sa

force est également sa principale faiblesse : la microscopie TIRF ne permet pas d'imager plus profond que cette épaisseur. Une extension de la microscopie TIRF permet de réduire cette limite. En microscopie par faisceau hautement inclinée (HILO : Highly Inclined and Laminated Optical sheet)⁷⁵ l'angle d'incidence du faisceau d'excitation est tout juste inférieur à l'angle limite, ce qui implique que le faisceau d'excitation pénètre l'échantillon avec un angle particulièrement élevé (Figure I.29.b). Le sectionnement optique n'est pas aussi fort qu'en microscopie TIRF, et il est possible d'imager jusqu'à 1 à 2 μm au-dessus de la lamelle. Ceci est particulièrement utilisé pour les méthodes de localisation 3D (section I.3.3.2.2) qui permettent de localiser les molécules sur des épaisseurs de 1 à 4 microns.

La grande majorité des systèmes d'imagerie par SMLM à l'état de l'art utilisent ces types d'illuminations, car ils procurent un fort sectionnement optique permettant de s'affranchir du signal hors plan focal. De plus, ils reposent sur l'utilisation d'objectifs à très forte ouverture numériques, assurant une collection du signal optimal. Ils offrent donc les meilleures performances possibles pour l'imagerie par SMLM. Toutefois, leur profondeur d'imagerie restreinte rend impossible l'observation de nombreux processus cellulaire ayant lieu plusieurs microns à l'intérieur des cellules, ou encore l'imagerie des cellules entières à des échelles nanométriques.

I.4.2. Microscope confocal

La microscopie confocale⁷⁶ est une technique de microscopie à balayage. Son fonctionnement est représenté en Figure I.30 : un faisceau d'excitation est concentré en un point de l'échantillon par l'objectif. Sur le chemin de détection, un « pinhole » est conjugué au plan objet de l'objectif devant un détecteur ponctuel. Ce pinhole permet de filtrer spatialement la lumière afin de rejeter les photons émis par des objets situés hors du plan focal imagé. Le faisceau d'excitation est scanné en 2 dimensions pour reconstituer une section de l'échantillon observé, ou en 3 dimensions pour pouvoir reconstituer l'ensemble d'un volume. Le sectionnement optique en microscopie confocale se fait donc en détection à travers le filtrage du signal de fluorescence collecté et permet d'obtenir un contraste extrêmement élevé du plan imagé et une résolution axiale légèrement supérieure à une détection plein champ. Ces avantages font de la microscopie confocale une des méthodes les plus utilisées pour observer des échantillons 3D bien que sa profondeur d'imagerie soit limitée par la diffusion induite par l'échantillon, affectant à la fois le faisceau d'excitation, et le signal de fluorescence.

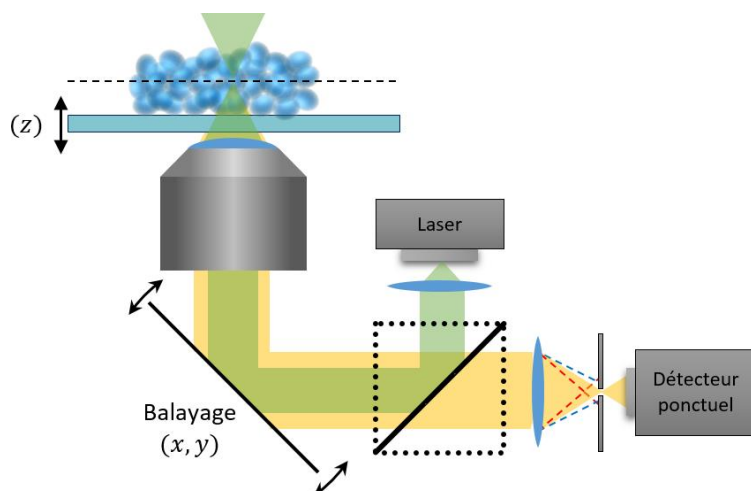


Figure I.30 — Microscope confocal. Le faisceau d'excitation (vert) est concentré en un point de l'échantillon. Le plan objet est conjugué avec un « pinhole » (ou trou d'épingle) qui permet de filtrer les rayons provenant d'émetteurs situés hors du plan focal (pointillés bleus et rouges). L'imagerie est faite en balayant le laser sur l'ensemble de l'échantillon et en acquérant le signal de fluorescence pour chacune des positions du laser.

Toutefois, le filtrage spatial du signal collecté et la nécessité de balayer l'ensemble de l'échantillon pour acquérir une image 2D rendent cette méthode inadaptée à la SMLM. Le premier point réduit drastiquement la sensibilité du système qui est cruciale pour la détection de molécules individuelles, et le second point rend le temps nécessaire à l'acquisition d'une

image entière incompatible avec le clignotement rapide des molécules fluorescentes. De plus, le pic d'intensité reçu par le fluorophore lors d'une excitation par balayage n'est pas optimal, et peut induire un photoblanchiment prématuré des fluorophores. Une amélioration du microscope confocal, le « spinning disk » utilise de nombreux pinholes disposés sur un disque tournant, afin de paralléliser et d'accélérer le processus acquisition. Cela a permis l'imagerie SLM en profondeur grâce à l'utilisation de sondes particulièrement brillantes (Quamton Dots, fluorophores organiques) afin de compenser la faible sensibilité induite par le filtrage du signal en détection⁷⁷⁻⁷⁹. Cependant, pour chaque section imagée l'ensemble du volume de l'échantillon est excité, induisant une phototoxicité accrue sur l'échantillon et un blanchiment précoce des sondes sur les plans hors focus.

1.4.3. Multiphoton : focalisation temporelle

La microscopie deux photons est à l'origine une technique d'imagerie par balayage. Elle exploite un phénomène d'absorption non linéaire de l'énergie lumineuse par les fluorophores, l'absorption multiphotons, où plusieurs photons dont la somme des énergies est égale à l'énergie d'excitation du fluorophore se combinent temporellement pour exciter ce dernier (Figure I.31). La probabilité d'absorption de deux photons augmente de manière non linéaire avec l'intensité lumineuse, et des densités énergétiques très élevées sont donc nécessaires pour que ce phénomène ait lieu. Pour cette raison, cette technique utilise des lasers impulsifs permettant de concentrer l'énergie lumineuse dans le temps. La méthode originelle de microscopie deux photons consiste à balayer l'échantillon avec un faisceau focalisé : les fluorophores ne peuvent être excités qu'au point de focalisation du faisceau d'excitation où la densité en énergie est suffisante. Cela procure un sectionnement optique intrinsèque sans nécessiter de filtrage spatial en détection, contrairement à la technique confocale. Par ailleurs, les longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation multiphoton sont bien plus grandes qu'en excitation classique à 1 photon, et se situent dans le domaine proche infrarouge du spectre (700 à 1500 nm). Cela offre un avantage crucial pour l'imagerie en profondeur, car ces longueurs d'onde se situent dans ce qui est appelé la fenêtre optique du vivant dans laquelle l'absorption des tissus, en particulier de l'hémoglobine, est la plus faible ce qui permet une meilleure pénétration du faisceau d'excitation. Cela fait de la microscopie multiphotons la méthode choisie pour observer en profondeur (jusqu'à quelques mm) à l'intérieur d'échantillons vivants voir *in vivo*. Cependant, la plus faible efficacité d'excitation des fluorophores par processus multiphoton et la nécessité de balayer l'échantillon avec le faisceau rend cette méthode d'excitation multiphoton incompatible avec la SLM.

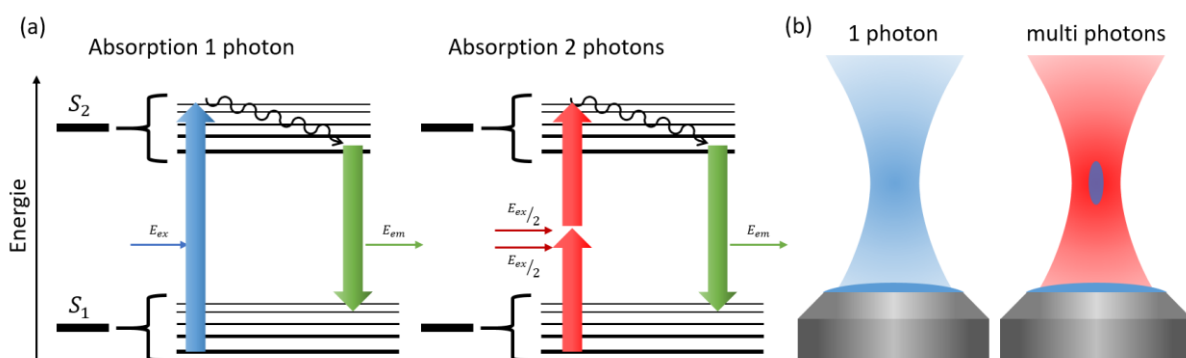


Figure I.31 – Excitation 2 photons. (a) Diagramme de Jablonski : l'excitation multiphoton consiste à absorber simultanément plusieurs photons pour exciter un fluorophore. L'énergie totale de tous les photons contribue à l'excitation, et donc leur somme doit être égale à l'écart d'énergie entre le niveau excité et fondamental. (b) Comparaison entre une excitation 1 photon et multiphoton : Dans le cas de l'excitation 1 photon, tout le faisceau peut exciter les molécules et provoquer la fluorescence. Dans le cas l'excitation multiphoton, seules la partie où la

densité d'énergie la plus haute permet l'absorption multiphoton. L'excitation est donc confinée spatialement au point focal du faisceau d'excitation.

Une autre solution pour atteindre les densités d'énergie nécessaire au phénomène d'excitation multiphoton est de concentrer une impulsion lumineuse non plus dans l'espace, mais dans le temps⁸⁰ (Figure I.32). Un réseau de diffraction positionné sur le plan conjugué au plan objet permet d'étaler les impulsions d'un laser dans le temps. L'objectif a ensuite pour effet de compresser ces impulsions dans le temps, ainsi leur puissance est maximale uniquement sur le plan objet. Cette technique permet de limiter axialement la zone qui est effectivement excitée par effet 2 photons et offre donc un sectionnement optique (Figure I.32) tout en conservant une excitation plein champ du plan imagé.

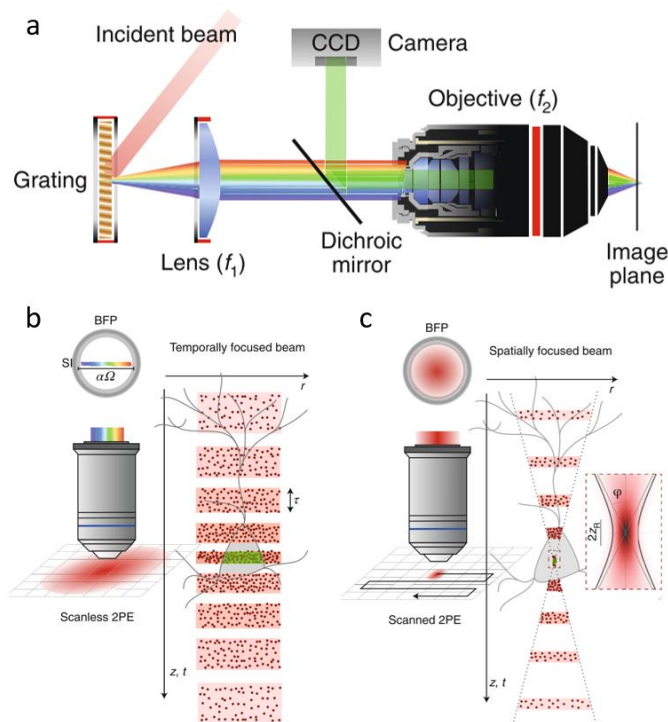


Figure I.32 — Focalisation temporelle.

Adapté de Papagiakoumou, et al.⁸¹. (a) Le faisceau impulsionnel est dispersé par un réseau de diffraction, provoquant un étalement de l'impulsion dans le temps. (b) Après l'objectif, l'impulsion est focalisée dans le temps, avec une focalisation maximale au niveau du plan objet. L'absorption multiphoton ne peut avoir lieu que sur le plan focal. Contrairement à (c) la méthode habituelle d'imagerie multiphotons qui consiste à balayer un faisceau focalisé dans l'espace, ici l'ensemble du plan peut être excité simultanément, ce qui permet la microscopie en champ large, optimale pour la SMLM.

Cette méthode permet donc d'utiliser le phénomène d'excitation multiphoton en microscopie champ large afin de confiner le signal d'excitation au plan focal imagé et de s'affranchir des limites temporelles des techniques à balayage. Grâce à cela, il a été montré que l'on pouvait confiner l'activation de protéines fluorescentes photoactivables ou photoconvertibles, jusqu'à plusieurs micromètres à l'intérieur de cellules, ce qui permet l'imagerie par SMLM en profondeur^{80,82}. La limite principale de cette technique réside dans l'utilisation de laser impulsionnels particulièrement puissants, et de systèmes optiques sophistiqués, dont la mise en place et l'entretien sont complexes. De plus, les résolutions obtenues restent limitées de par la relative faible brillance des protéines fluorescentes utilisées.

I.4.4. Microscopie en feuille de lumière

La dernière famille de méthodes de sectionnement optique en microscope que je vais présenter est la famille des techniques utilisant une illumination par feuille de lumière (LSFM pour Light Sheet Fluorescence Microscopy, ou SPIM pour Single Plane Illumination Microscopy). Comme nous le verrons, l'illumination par feuille de lumière offre un sectionnement optique intrinsèque, et une excitation et une détection en champ large, permettant d'optimiser les processus d'excitation et de collection du signal de fluorescence. Cela en fait une technique ayant un très fort potentiel pour permettre l'imagerie SMLM en profondeur.

1.4.4.1. Principe de la microscopie en feuille de lumière

Le principe de la microscopie de fluorescence en feuille de lumière (LSFM ou SPIM) est de confiner l'excitation des molécules fluorescentes au plan observé à l'aide d'un faisceau formant une fine feuille de lumière, et de détecter le signal généré perpendiculairement à cette dernière. La première implémentation de cette méthode remonte à 1902, avec l'ultramicroscope, développé par Richar Adolf Zsigmondy⁸³. Ce système lui a permis d'effectuer les études sur les solutions colloïdales qui lui ont valu le prix Nobel de Chimie en 1925. Cependant, la LSFM ne sera adaptée à la biologie qu'en 2004 par Jan Huiskens⁸⁴.

Dans cette partie, on appellera z l'axe de l'objectif de détection, x sera l'axe de propagation du faisceau d'excitation, et y sera l'axe orthogonal aux deux autres.

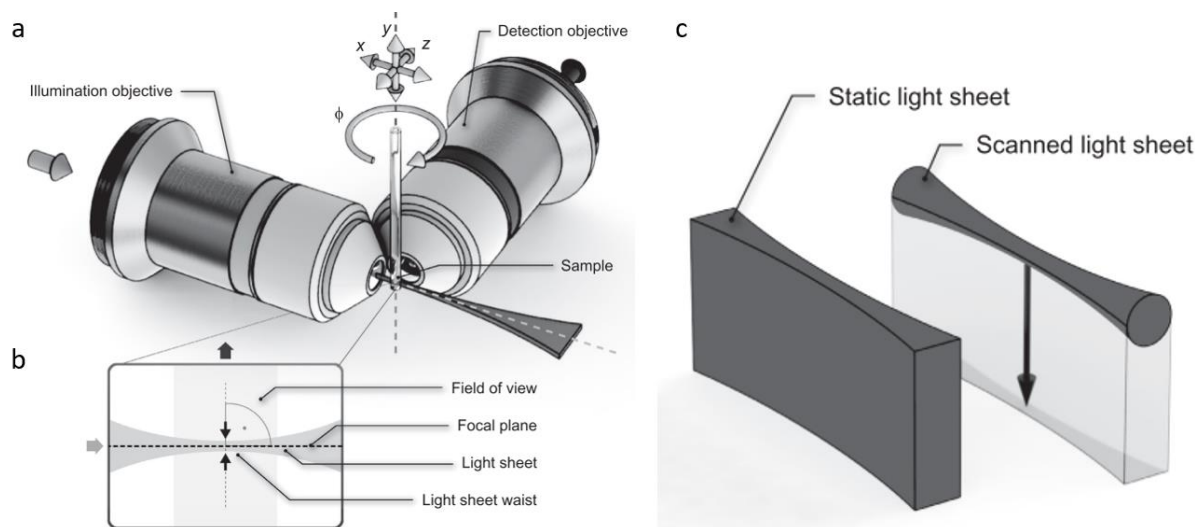


Figure 1.33 — Principe de la microscopie par illumination en feuille de lumière. Adapté de ⁸⁵. (a) système standard de microscope à feuille de lumière : un objectif d'illumination est positionné à 90° de l'objectif de détection pour créer une fine feuille de lumière. (b) la feuille de lumière est alignée sur le plan objet de l'objectif de détection. Le faisceau étant limité par le phénomène de diffraction, un compromis est fait entre l'épaisseur (waist) et la profondeur de champ de la feuille de lumière. (c) une feuille de lumière peut être créée de 2 façons. L'utilisation d'une lentille cylindrique permet de créer une feuille de lumière statique, tandis que le balayage rapide d'un faisceau focalisé, en comparaison du temps d'intégration de la caméra, permet d'obtenir une feuille de lumière virtuelle.

L'architecture de microscope à feuille de lumière la plus communément utilisée consiste à positionner deux objectifs, l'un d'excitation et l'autre de détection, à 90° l'un de l'autre (Figure 1.33.a). La feuille d'excitation est alors formée soit à l'aide d'une lentille cylindrique créant une feuille de lumière statique⁸⁴, ou en balayant un faisceau focalisé selon l'axe y à l'aide d'un système de miroir vibrant pour former une feuille de lumière virtuelle vis-à-vis du temps d'intégration plus long de la caméra⁸⁶ (Figure 1.33.c). Comparée à la feuille de lumière statique, la feuille de lumière créée par balayage d'un faisceau laser offre une plus grande flexibilité. Elle permet d'implémenter des techniques avancées telles que l'utilisation de faisceaux non diffractifs⁸⁷ comme nous le développerons dans le second chapitre de cette thèse, la détection par ligne confocale afin d'améliorer la résolution axiale du système^{88,89}, ou des méthodes de modulation de l'illumination afin d'améliorer le contraste des images réalisées^{90,91}. En revanche, la lentille cylindrique est bien plus facile à intégrer que les miroirs scannant, et l'ensemble du champ peut être éclairé simultanément, ce qui permet de réduire considérablement la puissance instantanée reçue par les fluorophores et donc les effets photo-toxiques de l'excitation.

Depuis leur première application pour biologie il y a une quinzaine d'années, les techniques de LSFM se sont avérées être des outils extrêmement puissants pour l'observation d'une très grande variété d'échantillons 3D complexes et vivants, allant de cellules

individuelles à des organes ou organismes entiers. En effet, le fait de découpler bras d'excitation du bras de détection présente de nombreux avantages. En premier lieu, l'utilisation d'une fine feuille de lumière confinée sur le plan objet de l'objectif de détection offre un sectionnement optique intrinsèque déterminé par l'épaisseur de cette feuille de lumière. Ce confinement de l'excitation permet de réduire drastiquement ses effets phototoxiques comparé aux approches de microscopie traditionnelles (plein champ, confocale,...), faisant des techniques de LSFM des outils idéaux pour l'imagerie d'échantillons vivants⁹². Une excitation perpendiculaire à la direction de collection du signal permet aussi d'améliorer la profondeur de pénétration puisque le signal d'excitation aura moins de milieux à traverser. La microscopie par feuille de lumière est aussi unique par la diversité des architectures, adaptées à un large choix de cibles et de questions biologiques. Certains systèmes permettent d'atteindre des résolutions isotropes dans les 3 dimensions de l'espace, soit en permettant de faire tourner l'échantillon sur lui-même pour une imagerie multivue⁹³, soit en multipliant les chemins d'excitation et de détection à l'aide de 3⁹⁴ ou même 4 objectifs^{95,96} différents. Enfin, l'efficacité d'excitation et de collection des méthodes de microscopie par feuille de lumière leur permet de suivre des phénomènes 3D extrêmement rapides ce que les méthodes à balayage ne sont pas capables de faire⁹⁷.

Le sectionnement optique en profondeur couplé à une excitation et une détection en champ large rend les méthodes de LSFM très prometteuses pour permettre l'imagerie par SMLM en profondeur. En effet, ces propriétés ouvrent la perspective de pouvoir détecter des molécules individuelles en profondeur tout en s'affranchissant du signal hors focus afin de maximiser la capacité à les localiser précisément. Cependant, les architectures multiobjectifs classiques induisent des contraintes mécaniques fortes sur l'encombrement et le positionnement des objectifs. Ainsi ces architectures ne permettent pas l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique en détection, ces derniers étant particulièrement volumineux et possédant des distances de travail réduites. Ce point est limitant pour l'imagerie par SMLM puisque l'ouverture numérique détermine le nombre de photons que peut collecter un objectif, et donc influe sur la précision de localisation qu'il est possible d'atteindre, voire la capacité à simplement détecter des molécules individuelles. De nombreuses équipes, dont l'équipe « imagerie Quantitative de la Cellule » dont je fais partie, ont donc cherché des solutions afin de tirer profit des nombreux avantages des techniques de LSFM pour permettre par l'imagerie SMLM en profondeur de volume entier.

1.4.4.2. Système de microscopie à feuille de lumière optimisé pour la SMLM

La première démonstration de microscopie par localisation de molécules individuelles a été réalisée en 2011 par Francesca Cella Zanacchi à partir d'une architecture classique à deux objectifs positionnés à 90° l'un de l'autre⁹⁸. Cette première étape a permis de confirmer l'intérêt qu'offre l'illumination par feuille de lumière pour la SMLM en profondeur, en procurant un fort sectionnement optique et en optimisant la collection du signal de fluorescence par une détection plein champ. Cependant, les contraintes mécaniques liées à l'architecture multiobjectif utilisée ont limité l'ouverture numérique de l'objectif de détection (0,8), limitant la résolution finale qu'il a été possible d'atteindre (section 1.3.3.3). Depuis cette première démonstration, de nombreuses architectures ont été développées, compatibles avec des objectifs à plus forte ouverture numériques et donc optimisées pour la SMLM. Ces techniques peuvent être classées en trois familles que je vais développer dans les paragraphes suivants.

1.4.4.2.1. Objectif sur mesure

Une solution aux contraintes mécaniques liées à l'utilisation de deux objectifs positionnés à 90° l'un de l'autre est d'utiliser des objectifs fabriqués sur mesure. En confectionnant un objectif dont les dimensions ont été adaptées, B.-C. C. Chen a montré qu'il est possible de positionner un objectif d'excitation perpendiculaire à un objectif à forte ouverture numérique (1,1)⁹⁹. En tirant profit à la fois du sectionnement optique d'une excitation par feuille de lumière, de l'efficacité de collection d'un objectif à forte ouverture numérique et d'une stratégie de marquage de type PAINT, ce montage permet la réalisation d'image par SMLM de cellules entières de qualité impressionnantes. Cette solution proposée par l'équipe d'Eric Betzig est particulièrement intéressante du fait qu'en plus de permettre l'illumination en feuille de lumière compatible avec la SMLM, il propose une solution innovante d'illumination utilisant un faisceau non diffractif (Lattice Light Sheet). Cette illumination permet de confiner encore plus le signal d'excitation axialement tout en conservant un grand champ de vue, offrant de meilleures performances pour l'imagerie par SMLM, et permettant également l'imagerie SIM en profondeur.

Le système a montré son efficacité d'imagerie, sur une très large gamme d'échelles spatiales et temporelles. Il a ainsi été possible d'observer l'embryogenèse en 3 dimensions chez la drosophile, ou le ver *C. elegans*, les mouvements rapides d'une cellule protozoaire, ou l'interaction entre une cellule T et une cellule cible à des fréquences d'acquisition de plusieurs volumes par seconde. Les performances pour l'imagerie SMLM ont également été démontrées, cette méthode permettant la localisation de molécules individuelles, dans des échantillons épais, jusqu'à $20\ \mu\text{m}$ de profondeur⁴⁵. Très récemment, l'équipe de Markus Sauer a également utilisé cette architecture de microscope pour observer la répartition de récepteurs membranaires autour de cellules T¹⁰⁰.

Cependant, ces performances remarquables viennent au prix d'un système très compliqué à mettre en place et à utiliser, en particulier du fait d'un système optique complexe pour la création de la feuille de lumière non diffractive, et de la proximité des deux objectifs rendant la mise en place et la manipulation des échantillons très difficile.

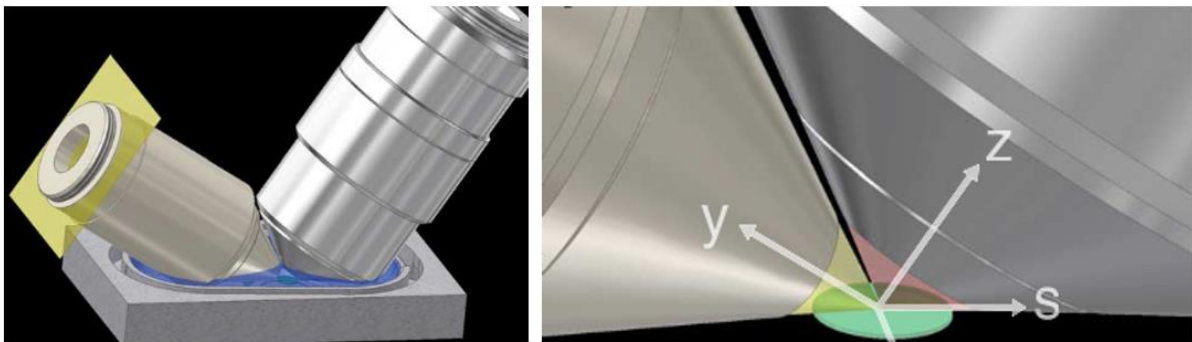


Figure 1.34 — Conception d'objectif sur mesure pour le microscope Lattice Light Sheet. Adapté de ⁹⁹. L'objectif d'excitation conçu sur mesure permet d'utiliser un objectif de détection ayant une forte ouverture numérique (1.1). Le système utilise des supports également faits sur mesure pour permettre le positionnement précis de l'échantillon dans la zone d'imagerie confinée entre les deux objectifs.

1.4.4.2.2. Augmentation de l'angle ou de la distance entre les objectifs

Pour s'affranchir des contraintes mécaniques, une solution est d'agrandir l'angle entre l'objectif d'excitation et celui de détection, et de dévier la feuille de lumière pour qu'elle se retrouve perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif de détection. Pour cela, le Reflected Light Sheet Microscope (RLSM)¹⁰¹⁻¹⁰³ utilise un miroir à 45° réfléchissant un faisceau produit par

un objectif d'illumination positionné à 180° de l'objectif de détection afin de créer une feuille de lumière perpendiculaire à l'axe optique de ce dernier (Figure I.35.a). Cette approche permet de s'affranchir des contraintes mécaniques des montages standards. Il devient alors possible d'utiliser n'importe quel objectif pour la détection et en particulier des objectifs à forte ouverture numérique. De plus, ce montage est compatible avec l'utilisation de lamelles de microscope classiques. D'autres groupes ont proposé d'utiliser un prisme (LSBM^{104,105} (Figure I.35.b), TILT3D¹⁰⁶ (Figure I.35.c)) pour dévier la feuille de lumière produite par un objectif d'excitation positionné au-dessus de celui de détection, et donc de réduire les contraintes mécaniques et permettre l'imagerie par SMLM. Dans le cas du système TILT3D, la feuille de lumière est légèrement inclinée, et illumine une plus grande épaisseur de l'échantillon. Cependant, l'utilisation de PSF à large profondeur de champ, tels que la PSF double-hélice, permet la localisation des molécules sur cette grande épaisseur.

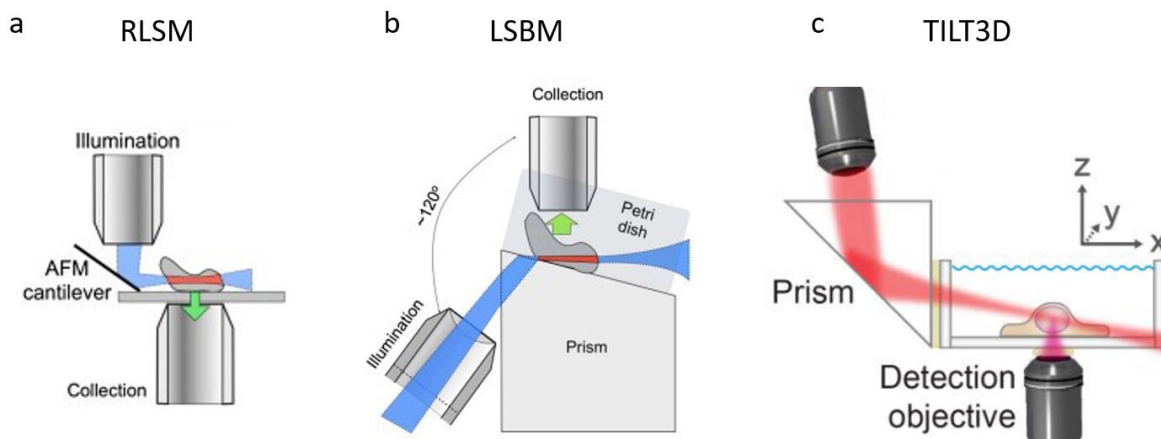


Figure I.35 — Systèmes SPIM sans angle droit. Adapté de Hu et al., 2013¹⁰⁴ et de Gustavsson et al., 2018¹⁰⁶. À gauche, le RLSM utilise une pointe d'AFM pour réfléchir une feuille de lumière produite par l'objectif d'illumination à 180° . Au centre, le LSBM¹⁰⁴, utilise un objectif à 120° . Un prisme permet de redresser la feuille de lumière à 90° de l'objectif de détection positionné au-dessus de l'échantillon. À droite, le TILT3D utilise également un prisme pour cette fois réfléchir le faisceau provenant de l'objectif d'illumination au-dessus de l'échantillon. La feuille de lumière est légèrement inclinée par rapport au plan focal de l'objectif de détection positionné sous l'échantillon.

I.4.4.2.3. Systèmes mono-objectifs

Enfin, une dernière solution proposée pour l'utilisation d'objectif à forte ouverture numérique en SPIM est de n'utiliser qu'un seul objectif. Là encore, plusieurs architectures sont possibles. L'une d'elles consiste à mettre à profit la grande ouverture numérique des objectifs de détection utilisés pour illuminer l'échantillon de manière oblique. Une paire d'objectifs distants sert alors à redresser l'image, permettant de la projeter sur une caméra (Figure I.36). Cette idée originalement proposée par Christopher Dunsby¹⁰⁷ a depuis été améliorée et offre aujourd'hui des capacités d'imagerie impressionnantes en termes de vitesse, de champs de vue et de modularité. Les technologies SCAPE¹⁰⁸ et SCAPE 2.0⁹⁷ par exemple utilisent un miroir pour scanner et « dés Scanner » le faisceau d'excitation et le signal collecté respectivement, permettant l'acquisition très rapide de volumes, jusqu'à 300 volumes par seconde. Toutefois, ce type de montages à illumination oblique souffre d'une perte d'ouverture numérique en détection, au niveau du couple d'objectifs utilisé pour redresser l'image. Cela peut être compensé en utilisant des objectifs à immersion pour maximiser le nombre de photons collectés par le dernier objectif¹⁰⁹, ou en utilisant un unique objectif avec un miroir pour redresser l'image, comme pour le système obSTORM¹¹⁰ qui a montré la possibilité de réaliser des acquisitions de SMLM à l'échelle de cellules entières.

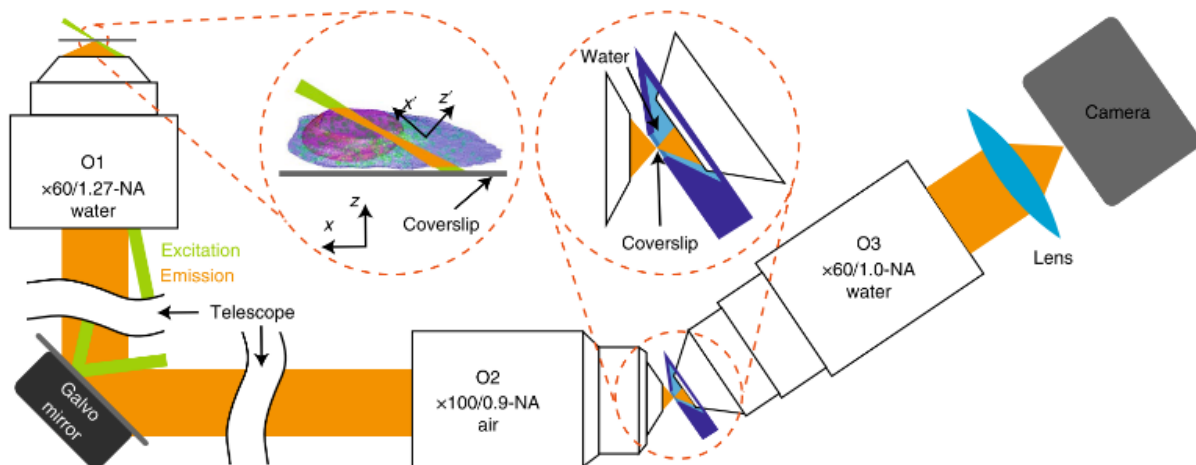


Figure I.36 — Système Oblique Plane Microscope. Adapté de ¹¹⁰. L'OPM consiste en l'utilisation d'un unique objectif à forte ouverture numérique, permettant une illumination très inclinée. Une paire d'objectifs distants permet de redresser l'image.

Une autre méthode récemment publiée, nommée socSPIM¹¹¹ utilise une pointe AFM comme miroir. Ce miroir positionné à 45° de l'objectif, au-dessus de l'échantillon, permet de réfléchir le faisceau d'excitation arrivant par ce même objectif. Cette méthode est basée sur le même concept que le système soSPIM (single-objective SPIM)¹ développé par notre équipe, que j'ai utilisé au cours de ma thèse, et que je développerai dans la section suivante. Elle a l'avantage d'être entièrement compatible avec les objectifs à forte ouverture numérique et de ne pas nécessiter pas de redressement de l'image, contrairement aux systèmes à feuille oblique qui induisent une perte de signal. Elle permet ainsi l'imagerie par SMLM en profondeur. De plus, les dimensions de la pointe AFM rendent le système compatible avec les plaques 96 puits, très utilisées en biologie pour multiplier la quantité d'échantillons observés par expériences, et varier les conditions expérimentales.

I.5. La technologie soSPIM

Je vais à présent présenter le système soSPIM ¹ développé au sein de mon équipe, et que j'ai utilisé et optimisé pour l'imagerie par SMLM en profondeur au cours de mes travaux. L'idée de ce système est de s'affranchir des contraintes mécaniques des architectures multiobjectifs standards grâce à l'utilisation d'un seul et unique objectif pour l'illumination et la détection. Pour ce faire, l'objectif d'excitation est remplacé par un miroir à 45° directement intégré dans des dispositifs d'imagerie microfabriqués. Un faisceau émis à travers l'objectif et réfléchi par le miroir à 45° se retrouve perpendiculaire à l'axe optique de ce même objectif créant ainsi une feuille de lumière n'excitant qu'une tranche de l'échantillon à observer. Le même objectif peut alors être utilisé pour collecter le signal de fluorescence généré (Figure I.37).

Le système soSPIM se base sur 3 composants principaux : (i) des dispositifs microfabriqués présentant des miroirs à 45° permettant de réfléchir le faisceau laser pour créer une feuille de lumière, (ii) un système de façonnage et de positionnement de ce faisceau laser, et (iii) un logiciel permettant de synchroniser les mouvements de la feuille de lumière avec le déplacement axial de l'objectif et le processus d'acquisition de la caméra assurant une imagerie 3D optimale. Ce système a été breveté et permet de transformer tout microscope inversé standard en un microscope à feuille de lumière (Figure I.37).

Dans les sections suivantes, je vais passer en revue les caractéristiques des trois composants principaux constituant la technologie soSPIM avant de donner une vision d'ensemble de ces capacités d'imagerie.

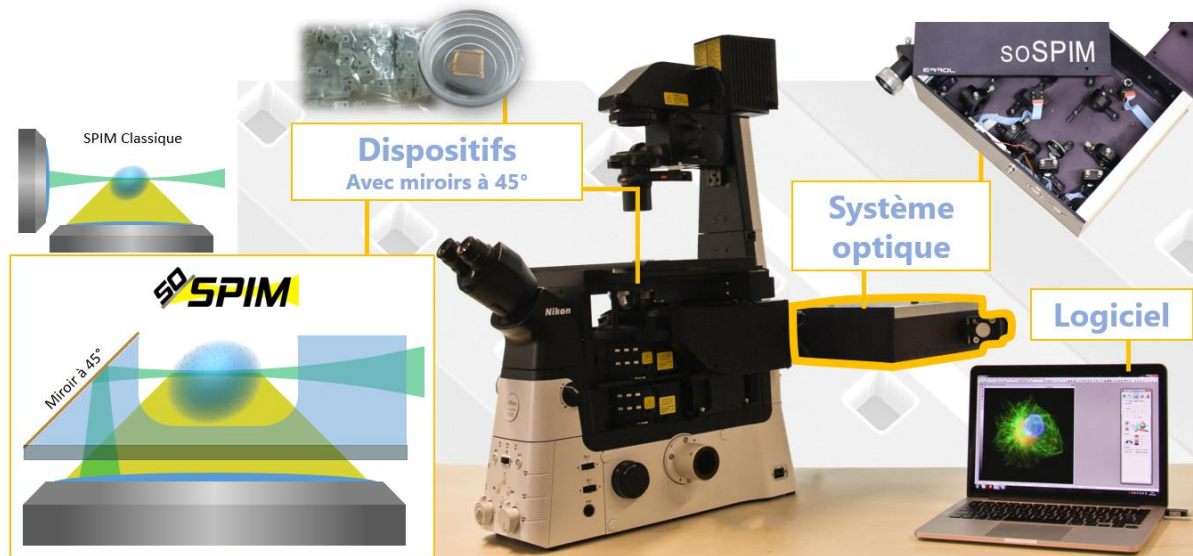


Figure I.37 : Principe du soSPIM. Des miroirs à 45° intégrés dans des dispositifs microfabriqués permettent de s'affranchir du second objectif et de n'utiliser qu'un seul objectif pour l'excitation et la collection du signal de fluorescence. Cette technologie est composée de 3 composants principaux, les dispositifs microfabriqués, un système de contrôle du faisceau d'excitation et un logiciel, qui permettent de transformer tout microscope inversé standard en un microscope à feuille de lumière soSPIM.

1.5.1. Dispositif microfabriqué

Une caractéristique intéressante de l'architecture soSPIM est qu'elle permet d'imager une large gamme d'échantillons de tailles et de morphologies variées, de la cellule individuelle au petit organisme entier, simplement en adaptant la taille du miroir à 45° utilisé pour créer la feuille de lumière (Figure I.43). Dans cette optique, différents types de dispositifs ont été développés afin de couvrir une large gamme de tailles d'échantillons. Le premier type de dispositifs à avoir été développé (Figure I.38), et que nous désignerons par dispositifs standards, sont adaptés aux petits échantillons, tels que les cellules individuelles et les petits agrégats. Ces dispositifs présentent des lignes de miroirs à 45°, chacune faisant face à de nombreux puits permettant la culture cellulaire. Ces structures sont formées dans un polymère dont l'indice de réfraction est similaire au milieu d'imagerie, ce qui garantit une propagation optimale de la feuille de lumière à travers le dispositif et les échantillons. Les miroirs de ces dispositifs ont une hauteur de 40 μm et les puits peuvent avoir des dimensions variables en fonction de l'échantillon à imager, allant de 20x20 μm à 60x300 μm voire au-delà, puisque nous continuons de travailler à l'amélioration de notre système pour l'adapter à de nouveaux échantillons. J'ai principalement utilisé ces dispositifs au cours de ma thèse pour l'imagerie par SMLM de cellules entières.

Des dispositifs adaptés à de plus gros échantillons ont également été développés. Ces dispositifs appelés « *JeWells* » sont formés d'un réseau de puits en formes de pyramides tronquées. Chaque face de ces puits est un miroir à 45° qui peut permettre de créer une feuille de lumière. Ils ont une profondeur de 100 à 150 μm et présentent une ouverture de 75 à 500 μm de côté afin de permettre la culture d'échantillons plus volumineux tels que des sphéroïdes ou des organoïdes. Enfin, des procédés de fabrication de plus gros dispositifs de taille millimétrique ont également été mis au point afin de permettre l'imagerie de gros échantillons, tels que des embryons entiers de drosophile (Figure I.43).

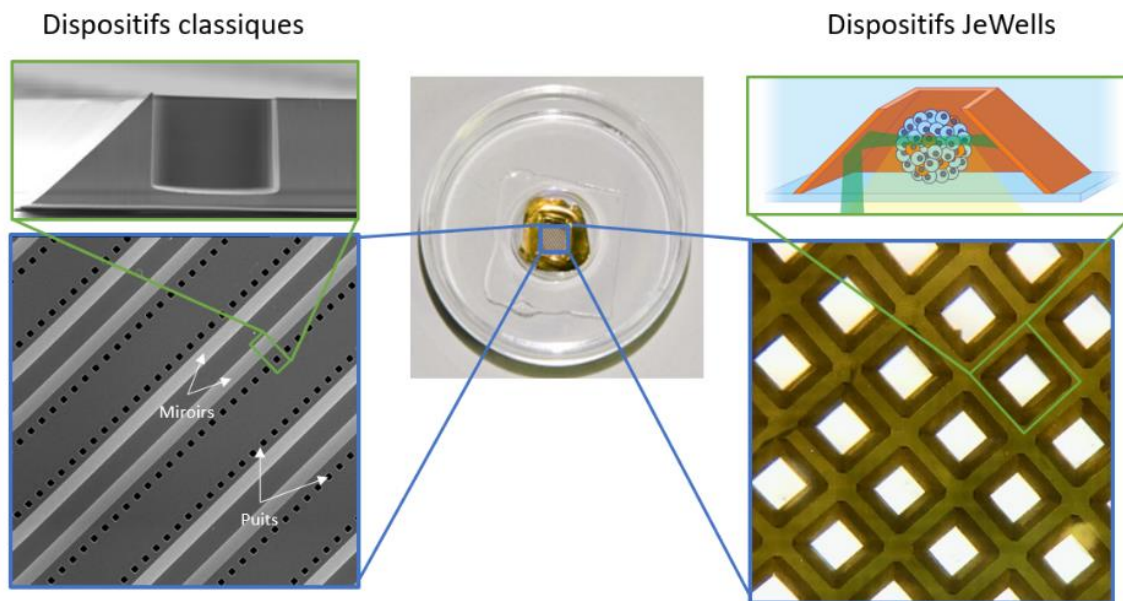


Figure I.38 — Deux exemples de dispositifs soSPIM : les dispositifs standards et JeWells. À gauche, les dispositifs standards présentent plusieurs lignes de miroirs à 45° faisant chacun face à plusieurs dizaines de puits. Ces dispositifs présentent des miroirs de $40\ \mu\text{m}$ de haut et des puits mesurant $20 \times 20\ \mu\text{m}^2$ à $60 \times 300\ \mu\text{m}^2$. Ils sont adaptés aux petits échantillons d'une à quelques cellules. À droite, les dispositifs nommés JeWells sont formés d'un réseau de puits en forme de pyramides tronquées. Chaque face de la pyramide est un miroir à 45° ayant une profondeur de 100 à $150\ \mu\text{m}$ et pouvant réfléchir le faisceau laser.

La fabrication des dispositifs standard et *JeWells* exploitent toutes deux des techniques de réplcation d'un moule primaire réalisé en Silicium par des techniques de lithographie à base de PDMS et de polymère réticulable aux UV. Ici, je détaillerais uniquement la fabrication des dispositifs standards utilisés au cours de ma thèse. Cette fabrication se fait en plusieurs étapes, représentées sur la Figure I.39. Succinctement, une méthode de gravure anisotrope est utilisée afin de graver dans un moule en silicium des surfaces à 45° . Ces surfaces forment les futurs miroirs des dispositifs. La gravure se faisant selon un plan cristallographique du silicium, elle permet de s'assurer que la surface des miroirs créés est parfaitement lisse et à 45° . Une gravure ionique réactive profonde permet ensuite de former des puits de tailles variables le long des surfaces à 45° . Ces structures sont ensuite reproduites sur lamelle dans un polymère par lithographie UV. Enfin, des étapes successives de métallisation, de protection des surfaces à 45° et de gravure du métal déposé permettent de rendre les surfaces à 45° réfléchissantes alors que le reste du dispositif demeure transparent. Le choix du polymère utilisé pour la reproduction des structures du moule primaire sur la lamelle de verre est crucial : il doit être biocompatible afin de permettre la culture d'échantillons vivants et avoir un indice de réfraction similaire à celui du milieu d'imagerie, soit de l'eau. En effet, l'interface entre le polymère et la zone de culture (puits) n'étant par fabrication pas parfaitement lisse, il est nécessaire de s'en affranchir optiquement afin de garantir une propagation optimale du faisceau laser. Cela est réalisé en ajustant les indices de réfraction entre les deux côtés de cette interface grâce à l'utilisation des polymères UV MY-134 ou BIO-134 de l'entreprise MyPolymer qui répondent à ces exigences^{112,113}.

Il est toutefois à noter que si le polymère que nous avons sélectionné est optimal pour l'imagerie dans l'eau (ou milieu d'indice égal), son indice de réfraction peut poser problème lors de l'utilisation de certains milieux d'imagerie tels que les tampons d'imagerie dSTORM, qui ont un indice de réfraction plus élevé (Chapitre III).

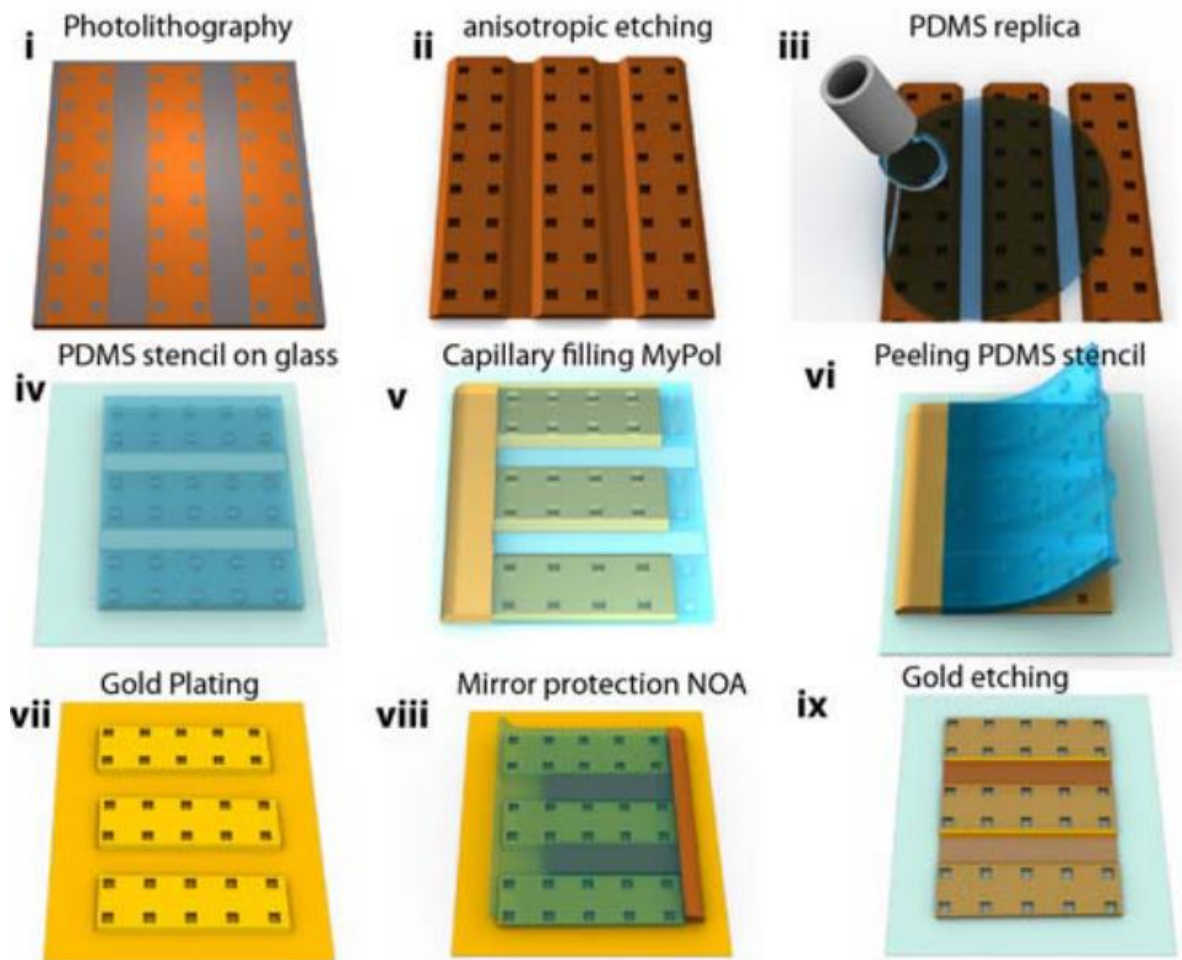


Figure 1.39 — Étapes de fabrication des dispositifs (classiques) soSPIM. Adapté de Galland et al. 2015 ¹. (i-ii) Un moule primaire en silicium est produit par gravure anisotrope. Cette méthode permet de créer des surfaces de taille micrométrique à 45° et parfaitement lisses. (iii-iv) Un moule intermédiaire en PDMS est ensuite réalisé par répliquant le moule primaire. (v-vi) les structures finales sont produites sur une lamelle de microscope en répliquant le moule intermédiaire en PDMS par lithographie UV. Le polymère utilisé pour cette étape est sélectionné pour ses propriétés optiques (transparence, et indice de réfraction). (vii-ix). La structure est ensuite entièrement recouverte de métal, puis les surfaces à 45° sont protégées par une seconde couche de polymère UV. Une gravure des surfaces non protégées permet de supprimer le métal des puits pour les rendre compatible avec l'imagerie optique.

1.5.2. Boîtier optique de façonnage et contrôle du faisceau d'excitation

Afin de permettre le positionnement de la feuille de lumière en 3D au niveau de l'échantillon après réflexion sur un miroir à 45° la technologie soSPIM utilise un boîtier optique de façonnage et de contrôle du faisceau d'excitation. Ce boîtier optique, présenté dans la Figure 1.40, est composé de 3 éléments principaux : deux miroirs galvanométriques (MGX & MGY), une lentille à focale variable (LFV), et un miroir d'ajustement de l'assiette de la feuille de lumière (MA). Par convention, on continuera de nommer z l'axe de l'objectif, et x est l'axe de propagation de la feuille de lumière, après réflexion sur le miroir. Ainsi, dans nos schémas et explications, les miroirs seront toujours alignés selon l'axe y .

Les deux miroirs galvanométriques MGX et MGY sont tous deux positionnés de telle sorte à être conjugués avec la pupille arrière de l'objectif à l'aide de montages afocaux. Ainsi, en pivotant, les miroirs font varier la position du faisceau laser sur le plan objet de l'objectif sans en modifier son angle. Ce point est extrêmement important dans notre cas, car il permet

de s'assurer que la feuille de lumière créée soit toujours perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif, quelle que soit la position du miroir. Les mouvements des deux miroirs permettent

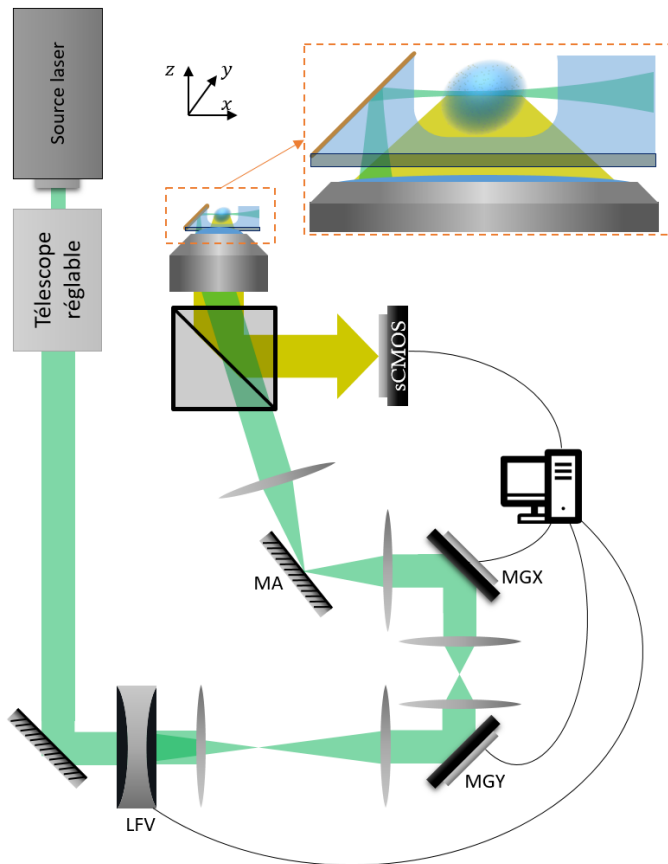


Figure I.40 — Système optique de positionnement du faisceau. Le faisceau laser est dimensionné à l'aide d'un télescope réglable. Les lentilles sont toutes positionnées de telle sorte à former des systèmes afocaux. Ainsi, les plans focaux des lentilles sont successivement conjugués au plan objet et à la pupille arrière de l'objectif. La lentille à focale variable (LFV) et les miroirs galvanométriques (MGX, MGY) sont positionnés sur des plans conjugués à la pupille arrière, tandis que le miroir d'assiette est conjugué au plan focal objet. Un logiciel permet de contrôler l'acquisition, ainsi que l'ensemble du système optique.

déplacer selon l'axe z ce qui provoque un déplacement du waist du faisceau selon l'axe x n'assurant plus un sectionnement optique optimal au niveau de l'échantillon. C'est le rôle du second élément de la lentille à focale variable : l'élément dynamique. Ce dernier est constitué d'un liquide entre deux membranes souples. Contrôlée par un signal électrique, la membrane se déforme pour changer la puissance de la lentille, analogiquement à la cornée d'un œil. Grâce à cette lentille, il est possible de déplacer le waist du faisceau le long de l'axe x pour le maintenir sur l'échantillon lors de son imagerie 3D afin de garantir un sectionnement optique optimal sur l'ensemble de son volume (Figure I.41).

de déplacer le faisceau laser sur le plan objet de l'objectif, ce qui permet à la fois la création de la feuille de lumière par un balayage rapide le long de l'axe y , et le positionnement axial de la feuille de lumière par un déplacement du faisceau laser selon l'axe x (Figure I.42).

La lentille à focale variable est composée de deux éléments : un statique et un dynamique. L'élément statique est une lentille divergente, dont la fonction est de reporter le waist du faisceau laser. Sans cette lentille, un faisceau collimaté à la pupille arrière de l'objectif est alors focalisé sur le miroir du dispositif microfabriqué. La feuille de lumière au niveau de l'échantillon est donc fortement divergente n'assurant pas de sectionnement optique. Il est donc nécessaire de déporter le waist du faisceau pour atteindre la position de l'échantillon situé dans les puits, et assurer un sectionnement optique optimal (Figure I.41). De plus, au cours de l'imagerie, pour pouvoir changer la profondeur de la feuille de lumière, l'objectif doit se

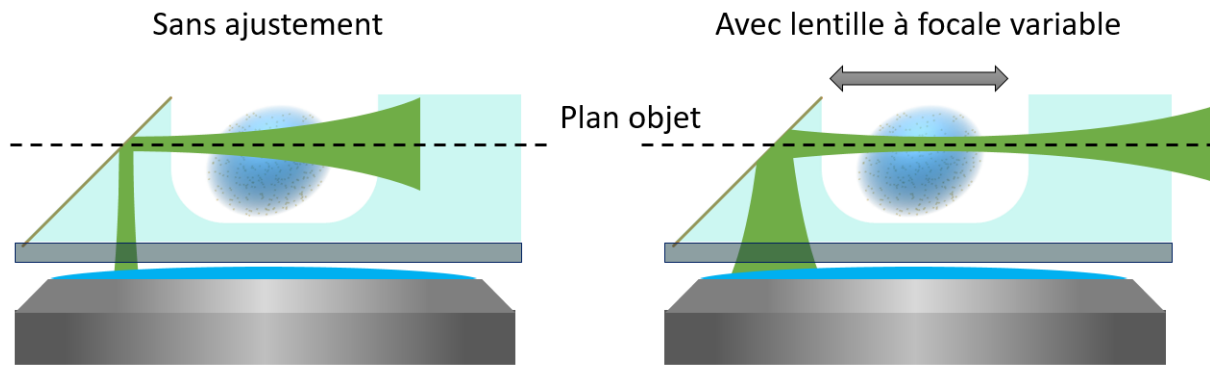


Figure I.41 : Positionnement du waist à l'aide de la lentille à focale variable. À gauche, sans ajustement de la position du waist, le laser est focalisé sur le miroir, il n'y a pas de sectionnement optique au niveau de l'échantillon. À droite, à l'aide de la lentille à focale, il est possible de positionner précisément le waist du faisceau sur l'échantillon

Enfin un dernier élément permet de compenser de petites déviations de l'angle des miroirs des dispositifs d'imagerie. En effet, bien que les dispositifs soient fabriqués de sorte à avoir des miroirs parfaitement à 45° , cet angle n'est pas toujours maintenu jusqu'au microscope. L'angle entre le miroir du dispositif et l'objectif peut légèrement varier, que ce soit à cause de certaines étapes de fabrication, du support de l'échantillon, ou du microscope lui-même. Pour s'assurer que la feuille de lumière reste toujours perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif après réflexion sur le miroir, il peut donc être nécessaire de corriger son assiette. Pour cela, un miroir (MA, Figure I.40) est conjugué au plan objet de l'objectif. Cette conjugaison permet de reporter les variations d'angle induites par le miroir directement sur le plan objet, sans déplacer le faisceau latéralement. Ce miroir permet ainsi de compenser de légères variations de l'angle des miroirs de 45° des dispositifs soSPIM pour garantir une imagerie par feuille de lumière optimale.

I.5.3. Logiciel de contrôle

Enfin, le troisième composant du système soSPIM est le logiciel. Ce logiciel permet le contrôle de toute la partie matérielle du soSPIM et la synchronisation des processus d'acquisition pour permettre l'imagerie 3D d'échantillons épais. Ce logiciel a été développé pour fonctionner sous l'environnement d'acquisition MetaMorph (Molecular Device). Cette approche permet d'utiliser toutes les fonctions déjà incluses dans MetaMorph, telles que le contrôle du microscope et la gestion des caméras, et de se focaliser uniquement sur la synchronisation du boîtier optique soSPIM avec le processus d'acquisition.

La fonction du logiciel est donc de créer la feuille de lumière, puis de synchroniser son mouvement en 3D avec la position de l'objectif et le processus d'acquisition de la caméra. Une première calibration permet de lier l'espace des miroirs galvanométriques avec celui des caméras. Grâce à cette calibration, le logiciel peut positionner le faisceau précisément dans le plan objet, et donc sur le miroir à 45° , en faisant varier l'angle des miroirs galvanométriques

Une seconde étape est ensuite requise afin de synchroniser le mouvement de la feuille de lumière selon l'axe z avec le déplacement de l'objectif. Pour faire varier la profondeur de la feuille de lumière, le faisceau se déplace selon x , et la position du waist est ajustée grâce à la lentille à focale variable. Une simple étape de calibration permet lier ces déplacements aux mouvements de l'objectif : à l'aide de deux points de mesure en haut et en bas du miroir, le programme calcule les fonctions liant le déplacement de l'objectif (plan imagé) aux déplacements des miroirs galvanométriques (plan excité), et au changement de puissance de la lentille à focale variable (position du waist). Une fois cette synchronisation effectuée, le logiciel adapte automatiquement et en temps réel le positionnement du faisceau laser en

fonction de la profondeur imagée (Figure I.42). L'utilisation des fonctions d'acquisition rapide du logiciel MetaMorph combinées à cette synchronisation permet alors de réaliser l'acquisition optimale de volumes 3D à la vitesse d'acquisition de la caméra utilisée en garantissant une superposition parfaite des plans excités et imagés.

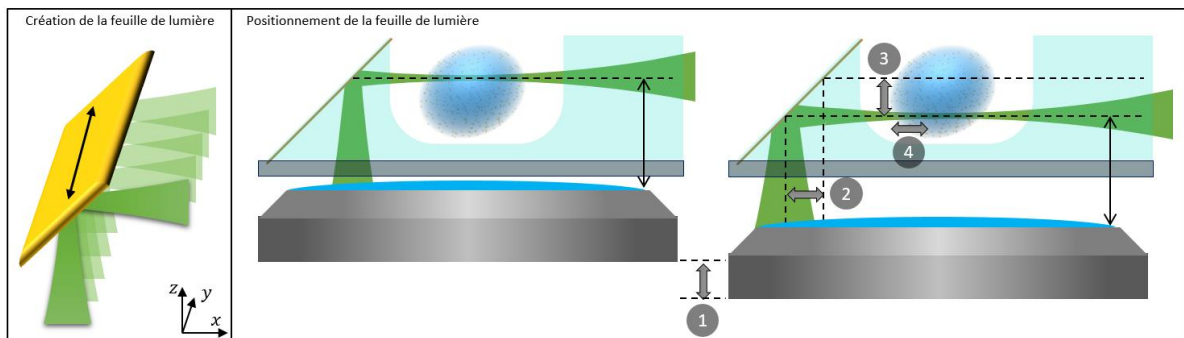


Figure I.42 — Création et synchronisation de la feuille de lumière. La feuille de lumière est créée en balayant un faisceau laser selon l'axe du miroir à 45° (axe y). Pour suivre le déplacement axial de l'objectif (axe z) (1), la feuille de lumière est déplacée selon l'axe x (2) à l'aide des miroirs galvanométriques. Après réflexion sur le miroir à 45°, cela se traduit par un déplacement en profondeur (axe z) de la feuille de lumière (3). Le déplacement de l'objectif selon l'axe z (1) induit également un déplacement du waist selon l'axe x , qui est compensé à l'aide de la lentille à focale variable (4).

I.5.4. Capacités d'imagerie du soSPIM

Le système soSPIM représente donc une solution complète pour l'imagerie en feuille de lumière à l'aide d'un seul et unique objectif, compatible avec tout microscope inversé standard. L'adaptabilité des dispositifs soSPIM permet d'imager en 3D une large gamme d'échantillons de tailles très variables allant de la cellule individuelle aux petits animaux (Figure I.43). Les dispositifs soSPIM sont par ailleurs compatibles avec la culture cellulaire réduisant grandement les manipulations entre la culture, le montage et l'imagerie des échantillons. Combiné à la faible phototoxicité et la rapidité des systèmes d'imagerie par feuille de lumière, cela a permis d'imager la propulsion amiboïde de lymphocytes à des vitesses de 1 volume par seconde sur des centaines de points temporelles, pour en étudier les caractéristiques¹¹⁴. Le sectionnement optique du soSPIM combiné à l'efficacité de collection d'un objectif à forte ouverture numérique a d'autre part permis d'utiliser cette technologie pour réaliser de l'imagerie de Spectroscopie par Corrélation de Fluorescence (FCS) 3D afin de suivre les dynamiques rapides de facteur de transcription à l'intérieur de noyaux cellulaires entiers¹¹⁵. Enfin, le développement récent des dispositifs *JeWells* présentant des centaines de puits arrangés selon une grille précise et compatibles avec la culture d'échantillons 3D tels que des sphéroïdes ou des organoïdes, ouvre la possibilité de mettre en place des stratégies de criblage au débit en 5 dimensions (espace, temps, couleur) (Figure I.43.b). Cela ouvre des perspectives de développements prometteuses dans de nombreux domaines comprenant la toxicologie, la recherche de cibles thérapeutiques, la médecine personnalisée ou encore la médecine régénérative.

Enfin, le sectionnement optique en profondeur procurée par une excitation par feuille de lumière combinée à l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique offre la possibilité de détecter des molécules individuelles pour l'imagerie par SMLM, plusieurs dizaines de micromètres au-dessus de la lamelle (Figure I.43). C'est autour de cet objectif que le travail de thèse s'est orienté.

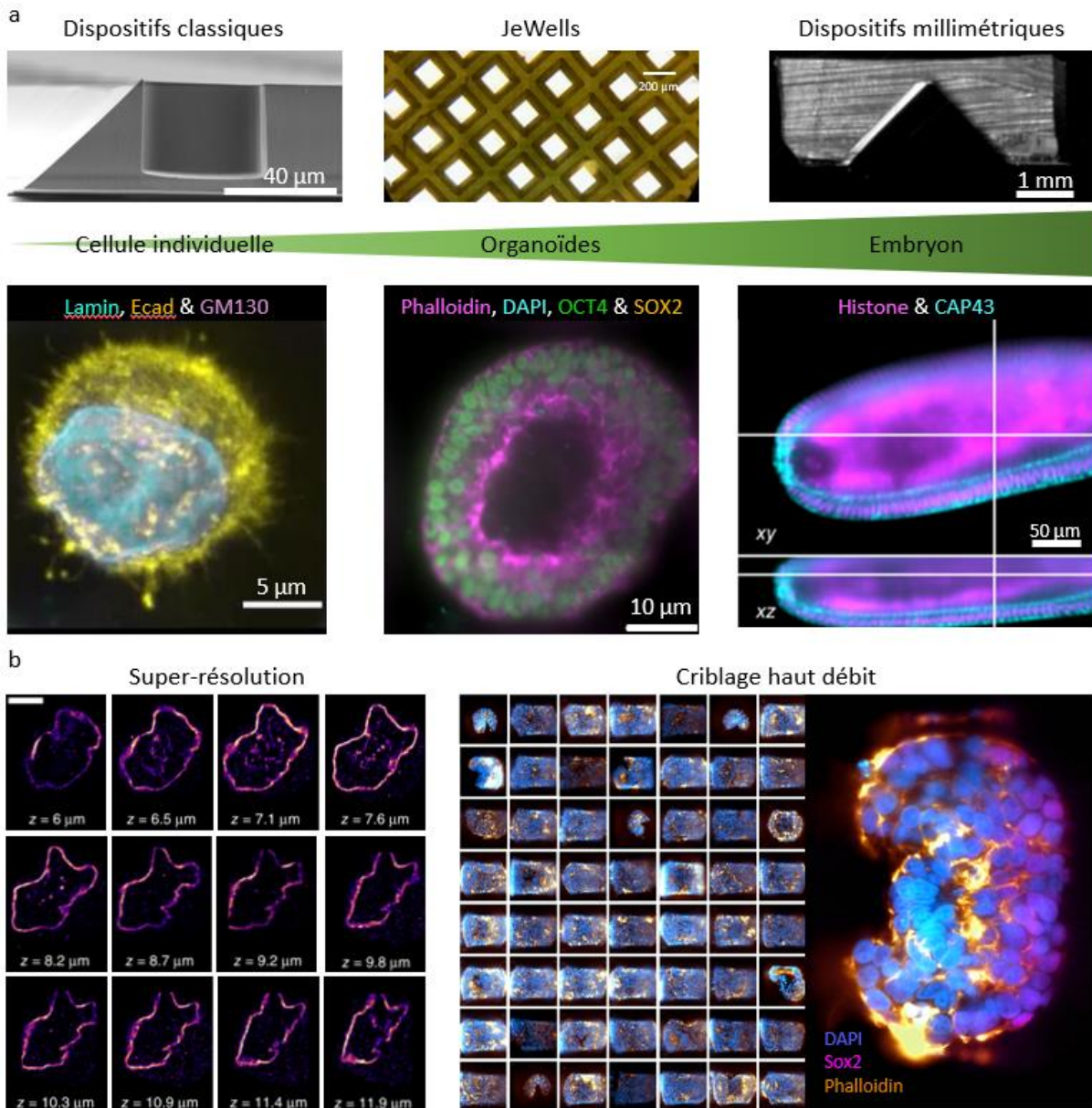


Figure I.43 — Capacités d'imagerie du système soSPIM. (a) adaptation des dispositifs à l'échantillon : À gauche, les dispositifs classiques permettent l'imagerie de petits échantillons, d'une à quelques cellules (≈ 10 à $50 \mu\text{m}$). Au milieu, les échantillons « JeWells » permettent l'imagerie de plus gros échantillons, tels que les sphéroïdes et organoïdes ($\approx 100 - 300 \mu\text{m}$). À droite, des miroirs de taille millimétrique permettent l'imagerie de petits animaux, comme ici un embryon entier de drosophile ($\approx 0.5 - 1 \text{ mm}$). (b) Exemple de capacité d'imagerie de la technologie soSPIM. À gauche : imagerie SMLM du signal de lamin sur le noyau entier d'une cellule en suspension acquis par la méthode dSTORM (adapté de Galland et al., 2015¹). À droite : La fabrication de dispositifs soSPIM contenant des centaines de puits compatibles avec la culture cellulaire 3D ouvre la voie au criblage haut débit d'échantillons complexes. Ici 96 organoïdes de neuroectoderme ont été imagés en 3D et en 3 couleurs en moins d'une heure.

1.6. Introduction du travail de thèse : Optimisation du système d'acquisition soSPIM pour la localisation de molécules individuelles sur cellules entières

La technologie soSPIM représente un outil offrant de nombreux avantages pour permettre l'imagerie par SMLM en profondeur. En effet, des premiers résultats^{1,115} ont prouvé que la forte ouverture numérique combinée au sectionnement optique permis par la technologie soSPIM ouvre la possibilité de réaliser des acquisitions de SMLM en profondeur.

Toutefois, cette preuve de concept a également révélé plusieurs défis de taille qu'il est nécessaire de surmonter afin de développer un système stable et performant permettant une imagerie SMLM 3D avec des résolutions nanométriques à l'échelle de cellules entières.

Le premier défi concerne l'illumination de l'échantillon. Les échantillons imagés dans le cadre de ce travail de thèse sont des cellules entières individuelles, mesurant entre 10 et 20 μm de diamètre, et se trouvant en suspension à une profondeur de 5 à 40 μm au-dessus de la lamelle de microscope. Pour une imagerie SMLM optimale en profondeur il est nécessaire d'utiliser une feuille de lumière dont l'épaisseur correspond à la profondeur de champ de l'objectif, et ce sur l'ensemble du volume à imager afin de détecter les molécules individuelles avec le meilleur contraste possible. Or cela n'est pas compatible avec l'utilisation de faisceaux gaussiens dont la propagation est dictée par les lois de la diffraction de la lumière que nous avons introduites dans ce chapitre (section I.1.2.3). En effet, ce phénomène implique qu'il est nécessaire pour ces faisceaux de faire un compromis entre l'épaisseur de la feuille de lumière, et sa profondeur de champ. Dans le Chapitre II, nous verrons que le façonnage du faisceau d'excitation peut permettre de dépasser ce compromis et de réaliser des feuilles de lumières suffisamment fines sur le volume total des cellules ciblées. Je décrirais alors comment j'ai cherché à implémenter ce type de faisceaux sur le système soSPIM, et discuterai des avantages et des limites de cette implémentation.

Le second défi concerne la détection, et la qualité d'imagerie en profondeur. Nous verrons dans le Chapitre III qu'avec cette profondeur d'imagerie apparaissent des aberrations optiques. Ces aberrations déforment le front d'onde de la lumière, ce qui impacte la forme de la PSF et l'intensité du signal, et donc la précision de localisation. Pour pouvoir optimiser le système soSPIM pour l'imagerie par SMLM en profondeur, j'ai donc implémenté une solution de correction des aberrations basée sur l'utilisation d'un système d'optique adaptative dont je décrirai les performances.

Enfin, les derniers défis à relever concernent les processus d'acquisition et de reconstruction des images. L'imagerie par SMLM implique des temps d'acquisition pouvant être très longs, puisqu'il faut localiser suffisamment de molécules pour reconstruire fidèlement les structures imagées. Ainsi l'acquisition d'un unique plan en DNA-PAINT peut prendre jusqu'à 40 minutes, et lorsqu'il s'agit d'imager le volume d'une cellule entière les acquisitions peuvent durer plus de 10 heures. Or, au cours de l'acquisition, des dérives spatiales peuvent avoir lieu, et le déplacement de l'échantillon peut avoir des effets dramatiques sur l'acquisition, en particulier avec la géométrie d'excitation du système soSPIM. D'autre part, la reconstruction de volumes entiers avec des résolutions nanométriques soulève de nombreux problèmes, de la gestion du volume de données au recalage précis des différentes sections acquises entre elles. Dans le Chapitre IV, je détaillerai les stratégies mises en place permettant à la fois la correction des dérives spatiales en temps réel, et l'automatisation de l'acquisition SMLM sur plusieurs plans. Puis j'exposerai le processus de reconstruction des images de super-résolution de volumes entiers que j'ai développé avant de présenter les résultats d'imagerie par SMLM de cellules entières obtenus.

Chapitre II : Optimisation de l'illumination pour la détection de molécules individuelles en profondeur

L'illumination de l'échantillon est un point fondamental pour la qualité d'imagerie en microscopie. Nous avons vu dans le chapitre d'introduction un ensemble de techniques permettant d'apporter un sectionnement optique, ouvrant la voie à une imagerie en profondeur et en 3D (section I.4 et I.5). Nous avons également vu que ce sectionnement optique est nécessaire pour permettre une imagerie optimale de super-résolution par localisation de molécules individuelles, car les performances ce type d'imagerie sont extrêmement tributaires de la capacité à réduire le signal hors focus (section I.3.3.3).

Le développement des techniques de microscopie par feuille de lumière depuis une quinzaine d'années offre aujourd'hui des solutions très avantageuses en termes de sectionnement optique, d'efficacité d'excitation, et d'efficacité de collection du signal, comparé aux autres méthodes d'imagerie 3D. En particulier, la technologie soSPIM que nous avons mise au point au laboratoire permet de tirer profit (1) des avantages d'une excitation par feuille de lumière et (2) des objectifs à forte ouverture numérique garantissant une collection optimale du signal de fluorescence. Cette combinaison permet ainsi au système soSPIM de détecter des molécules individuelles en profondeur plusieurs dizaines de micromètres au-dessus de la lamelle¹.

Cependant, la technologie soSPIM, comme la plupart de systèmes de microscopie par feuille de lumière, repose sur l'utilisation de faisceaux gaussiens. Or ce type de faisceau présente une limite fondamentale liée à la diffraction de la lumière, imposant un important compromis entre l'épaisseur et la longueur de la feuille de lumière (section I.1.2.3). Ce compromis est particulièrement problématique pour optimiser la détection de molécules individuelle sur des champs de vue égaux ou supérieurs à une cellule individuelle.

Dans ce chapitre, nous allons étudier les solutions qui ont été développées afin de dépasser cette limite de diffraction pour le faisceau d'illumination. Nous verrons qu'il est possible de créer des faisceaux qui permettent d'agrandir de façon importante le champ de vue, tout en conservant une épaisseur pouvant être compatible avec la détection de molécules individuelles en profondeur. Je décrirai alors les travaux que j'ai réalisés pour implémenter ce type de faisceaux sur le système d'imagerie soSPIM, et discuterai des limites pratiques d'une telle implémentation.

II.1. Diffraction du faisceau gaussien : limite au sectionnement optique

Dans le chapitre précédent, nous avons introduit le phénomène de diffraction (section I.1.2.3), et en particulier son application aux faisceaux gaussiens. Le faisceau gaussien est

une représentation mathématique idéale, mais il est tout de même facile de créer un faisceau dont le comportement est très proche de ce dernier. Pour cela, on peut filtrer un faisceau spatialement cohérent tel qu'un faisceau laser, à l'aide d'un diaphragme ou d'une fibre monomode. Appliqués à la microscopie à feuille de lumière, les faisceaux gaussiens permettent de créer des feuilles de lumières soit à travers l'utilisation de lentilles cylindriques soit par balayage rapide du faisceau.

Toutefois, la diffraction de la lumière impose une limite forte aux feuilles de lumières qu'il est possible de créer. Une excitation en profondeur idéale pour permettre l'imagerie par SMLM requiert de confiner le signal d'excitation sur une épaisseur équivalente à la profondeur de champ de l'objectif. Dans ce cas, l'ensemble des molécules excitées seront détectables et localisables par le système d'imagerie et il n'y aura pas de molécules excitées hors focus qui induirait un signal de fond pouvant impacter la précision de localisation du système, ou un photoblanchiment des fluorophores avant leur détection. Or, du fait de la diffraction, plus le diamètre d'un faisceau gaussien est petit, et plus sa profondeur de champ est limitée (1.1.2.3), ce qui réduit drastiquement le champ de vue d'imagerie. Dans le cadre de ce projet de thèse, notre objectif est de pouvoir observer par imagerie SMLM des cellules entières (10 à 20 μm de diamètre), voire de petits ensembles de cellules (jusqu'à 50 μm de diamètre), à l'aide d'un objectif à immersion à eau d'ouverture numérique 1.27 et dont la profondeur de champ est d'environ 1 μm .

La théorie de la diffraction de la lumière nous indique qu'un faisceau gaussien dont le diamètre (FWHM) au niveau du son waist est de 1 μm a une profondeur de champ inférieure à 3 μm pour les longueurs d'onde visibles. Ces dimensions ne sont donc pas compatibles pour l'imagerie des cellules de plus de 10 μm , et encore moins pour des échantillons plus larges tels que de petits ensembles de cellules. Il y a donc un compromis à faire entre le champ de vue qu'il est possible d'imager et le sectionnement optique. Pour nous affranchir de ce compromis, nous avons donc cherché à mettre en place une illumination par faisceaux non diffractifs permettant de dépasser cette limitation usuelle des faisceaux gaussiens ^{116,117}.

II.2. Faisceaux « non diffractifs »

II.2.1. Théorie des faisceaux non diffractifs

Dans deux articles publiés dans la fin des années 80 ^{116,117}, Jim Durnin met en avant l'existence d'une solution dite « non diffractive » aux équations de propagation des ondes. Cette solution implique l'existence de faisceaux dont le profil d'intensité reste constant au cours de leur propagation, contrairement aux faisceaux gaussiens dont le profil d'intensité diverge. Ces faisceaux particuliers, appelés faisceaux non diffractifs, sont produits lorsque plusieurs rayons lumineux cohérents entre eux et formant tous un angle θ avec l'axe optique interfèrent (Figure II.1).

La première application des faisceaux non diffractifs en microscopie a été la manipulation de particules à l'aide de pinces optiques ¹¹⁸⁻¹²⁰ car ils permettent le piégeage de particule sur des profondeurs importantes facilitant la manipulation des pièges optiques. De par leurs diverses propriétés, ces faisceaux ont ensuite rapidement intéressé la communauté de la microscopie par feuille de lumière. En premier lieu, si ces faisceaux sont capables de conserver leur profil tout au long de leur propagation, il devient alors en théorie possible de créer des feuilles de lumière aussi fines que possible et sur des longueurs aussi grandes que désirées. Cela implique une résolution axiale optimale sur un champ de vue infini, ainsi qu'une phototoxicité réduite. Bien sûr nous verrons qu'en pratique ces faisceaux sont spatialement

limités et donc ne permettent pas la création de feuilles de lumière infiniment longues¹²¹. Toutefois, ils permettent de dépasser le compromis entre l'épaisseur et la longueur des faisceaux gaussiens, et plusieurs équipes les ont utilisés afin d'augmenter le champ de vue de l'imagerie tout en optimisant le sectionnement optique de microscope à feuille de lumière^{87,99,122–125}.

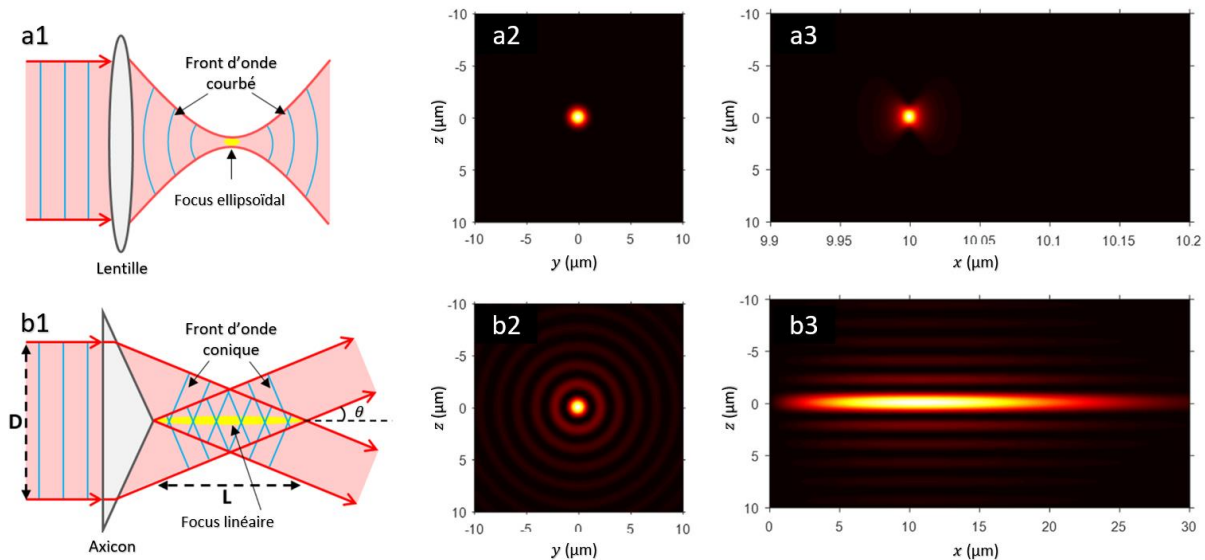


Figure II.1 : Comparaison entre un faisceau gaussien et un faisceau de Bessel. Adapté de Yu et al.¹²⁶. (a1 et b1) : Schéma de comparaison entre la formation d'un faisceau gaussien et un faisceau de Bessel. (a1) Dans le cas du faisceau gaussien, le faisceau est focalisé sur une zone ellipsoïdale. Le front d'onde est alors courbé, et varie en fonction de la propagation du faisceau. (b1) pour le faisceau de Bessel, un faisceau de forme conique est créé, ici à l'aide d'un axicon, et produit un faisceau dont la zone d'intensité maximale est linéaire. Le front d'onde est de forme conique. (a2) et (b2) représente la distribution transverse d'intensité des faisceaux Gaussiens (a2) et de Bessel (b2). (a3 et b3) représentent la distribution d'intensité lumineuse sur l'axe de propagation. L'axe z est l'axe de l'objectif de détection, et les faisceaux se propagent selon l'axe x , pour conserver les conventions précédentes.

Par ailleurs, en plus de ne pas s'étaler au cours de sa propagation, ce type de faisceau possède une autre propriété très intéressante pour améliorer la qualité des images en microscopie par feuille de lumière : ses capacités d'auto-reconstruction. En effet, la présence d'obstacle (particule absorbantes, zone de densité plus importantes) sur le trajet du faisceau d'excitation en microscopie par feuille de lumière créé un effet d'ombrage se traduisant par la présence de franges noires le long de la propagation de la feuille de lumière. S'il existe des solutions pour réduire ces ombrages en faisant par exemple légèrement pivoter le faisceau d'excitation⁹⁴, les faisceaux non-diffractif représente une solution très élégante et efficace à ce problème. En effet, après avoir rencontré un obstacle opaque, là où un faisceau classique produit une ombre ou une figure de diffraction, un faisceau non diffractif se reconstruit puisque son profil est créé par l'interférence de plusieurs ondes planes provenant de directions différentes (II.2.2.1). L'utilisation de faisceaux non diffractifs permet ainsi de limiter ce problème d'ombrage et d'améliorer la qualité de l'imagerie à l'intérieur d'échantillons complexes^{89,127–131}.

II.2.2. Méthodes de création et applications des faisceaux non diffractifs

II.2.2.1. Création et dimensionnement d'un faisceau de Bessel

Le faisceau non diffractif le plus communément utilisé en microscopie par feuille de lumière est le faisceau dit de Bessel dont le profil transverse correspond à une fonction de

Bessel d'ordre 0 (Figure II.1-b). Ce faisceau est l'application directe des développements de J. Durnin. Il correspond au résultat des interférences produites par un faisceau conique dont tous les rayons forment un angle θ avec l'axe optique. Pour créer un tel faisceau conique, plusieurs solutions existent, dont deux pouvant être très facilement implémentées (Figure II.2). La première solution consiste à positionner un masque annulaire (anneau de Durnin) à distance focale d'une lentille sphérique (Figure II.2.a). Cette solution n'est pas optimale, car une grande partie de l'énergie du faisceau utilisé est perdue par le masque. Une autre solution permettant de mieux conserver l'énergie transmise consiste à positionner une lentille conique, aussi appelée axicon, face à un faisceau collimaté (Figure II.2.b). On remarque cependant que dans les deux cas le faisceau a une étendue finie contrairement à la solution théorique de J. Durnin. En effet pour se retrouver dans les conditions théoriques et obtenir un faisceau infini, il faudrait dans le premier cas un anneau d'épaisseur infinitésimale couplée à une lentille de diamètre infini, ou dans le second cas, un axicon de diamètre infini. De même, le profil des faisceaux réels ainsi créés n'est jamais parfaitement défini par une fonction de Bessel : l'épaisseur de l'anneau, ou les défauts de planéité de l'axicon, induisent la création de rayons ayant une distribution d'angles par rapport à l'axe optique contrairement au cas théorique. Ainsi, lorsque les dimensions du système sont finies, M.A. Mahmoud et al.¹³² ont montré que, en utilisant un anneau de diamètre moyen R_{av} et d'épaisseur $\Delta R = R_{max} - R_{min}$, la profondeur de champ du faisceau l_{nd} est donnée par :

Équation II.1

$$l_{nd} = \frac{1.4\lambda f^2}{\pi R_{av}\Delta R}$$

Concernant le profil transverse de ce type de faisceau, il évolue en fonction du rapport $\Delta R/R_{av}$: plus ce rapport s'éloigne de 0, c'est à dire plus l'anneau est épais, plus le faisceau s'éloigne du faisceau de Bessel idéal, en produisant des franges moins nombreuses et plus épaisses. La largeur à mi-hauteur de la frange centrale, qui nous intéresse plus particulièrement pour la création de feuilles lumière, évolue également avec le rayon moyen R_{av} : plus l'anneau est grand (correspondant à un faisceau de plus grande ouverture numérique ayant un plus grand angle θ par rapport à l'axe optique) et plus les franges sont fines, dont la frange centrale.

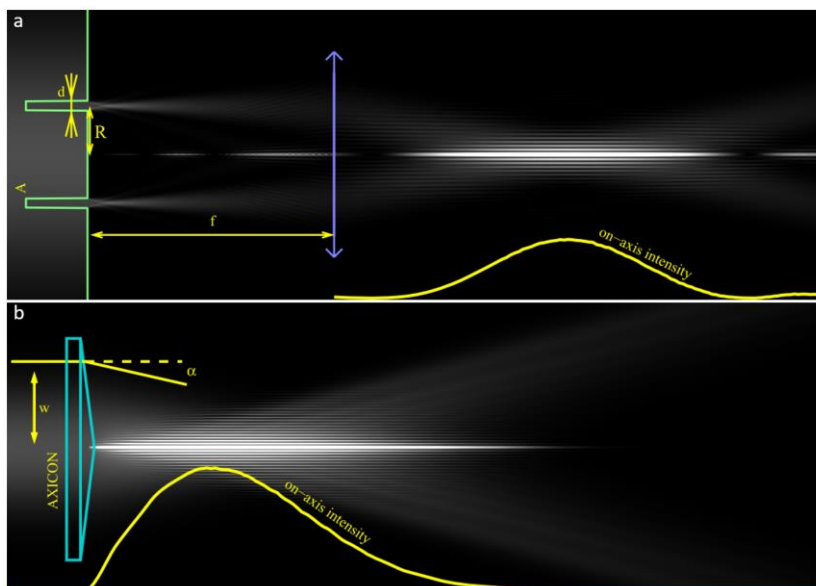


Figure II.2 : Deux méthodes de création de faisceaux de Bessel. Adapté de Čizmar & Dholakia¹³³. (a) création d'un faisceau de Bessel à l'aide d'un anneau de Durnin positionné à distance focale d'une lentille sphérique. (b) création d'un faisceau de Bessel à l'aide d'un axicon.

II.2.2.2. Implémentations des faisceaux non diffractifs en SPIM

II.2.2.2.1. Imagerie de gros échantillon

Le faisceau de Bessel est particulièrement intéressant pour ses propriétés de propagation, mais le profil transverse présentant des franges secondaires n'est pas optimal pour la microscopie. En effet, le but de l'illumination en feuille de lumière est de permettre un sectionnement optique, et donc de confiner l'illumination dans le plan objet. Ici, les franges secondaires peuvent participer à l'excitation de fluorophores hors plan focal, surtout si elles contiennent une quantité d'énergie importante comparé à la frange centrale. L'efficacité du sectionnement optique est donc réduite, ce qui implique du bruit hors focus, et peut induire un photoblanchiment prématuré des fluorophores et une phototoxicité accrue. Pour permettre une utilisation optimale, plusieurs implémentations différentes de faisceaux de Bessel ont été proposées.

Une première méthode consiste à appliquer le principe de la « détection linéaire confocale »^{89,130}. Le principe est similaire à celui du microscope confocal (section I.4.2) : un filtrage spatial est effectué en détection pour supprimer le signal hors focus non désiré. Ici, un faisceau de Bessel est balayé le long du plan focal pour illuminer l'échantillon. Le filtrage ainsi que la détection se font le long d'une ligne, là où en microscopie confocale il s'agit d'une détection et d'un filtrage ponctuel. Le filtrage peut être fait de façon physique, à l'aide d'une fente et de miroirs scannant, synchronisés avec le balayage en excitation, mais il peut également être fait de façon électronique, grâce aux caméras sCMOS récentes disposant d'un « rolling shutter ». Dans ce cas, c'est la ligne de pixels actifs de la caméra qui est synchronisée avec le balayage du faisceau de Bessel et qui agit comme filtre spatiale. Ces méthodes de filtrages permettent de mettre à profit les faisceaux de Bessel pour obtenir un sectionnement optique sur un large champ de vue, tout en supprimant le bruit de fond induit par les franges secondaires. Cependant, les fluorophores hors plan sont tout de même illuminés, ce qui peut impliquer leur blanchiment prématuré, ou une phototoxicité accrue.

Une autre solution pour s'affranchir totalement des franges secondaires consiste à combiner un faisceau de Bessel avec le phénomène excitation multiphotons. L'excitation multiphotons n'ayant lieu que dans la zone d'intensité maximale (voir section I.4.3) les franges secondaires ne participent pas à l'excitation. Cette méthode a permis d'observer des échantillons sur des champs de vue allant jusqu'à 60 μm , avec une résolution isotrope de l'ordre de 300 nm^{87,134}.

Enfin, une dernière méthode pour s'affranchir des franges secondaires est la microscopie par illumination structurée (SIM). Plusieurs équipes ont montré qu'il était possible d'utiliser des faisceaux de Bessel pour créer des illuminations sous forme de réseaux de lumière^{87,99,134,135}. En particulier, le microscope « Lattice Light Sheet » (LLS)^{99,135}, ou encore le système SSPIM¹³⁶, sont deux systèmes basés sur l'utilisation d'un modulateur spatial de lumière (SLM) pour permettre la mise en forme de divers faisceaux, y compris des faisceaux de Bessel et des feuilles de lumières structurées, ou « lattice light sheet » (LLS). Ces systèmes ont montré leur intérêt par la multitude d'applications possibles, allant de la microscopie en illumination structurée pour l'observation d'échantillons vivants à haute résolution temporelle, ou l'optimisation de l'épaisseur et du champ de vue de feuille de lumière pour la microscopie SMLM en profondeur, que nous verrons dans la section suivante.

Outre les faisceaux de Bessel, ou leurs dérivés tels que les LLS, il existe également d'autres types de faisceaux non diffractifs, tels que les faisceaux d'Airy. Ces faisceaux sont créés au moyen d'un masque de phase cubique, et ont un comportement très particulier : ils sont déviés au cours de leur propagation mais leur profil d'intensité reste constant. La Figure

II.3 représente une comparaison entre un faisceau gaussien, un faisceau de Bessel et un faisceau d’Airy de même section. Comme le montre cette figure, les faisceaux d’Airy ont l’avantage de permettre un champ de vue beaucoup plus grand que les faisceaux de Bessel ou Gaussien. Leur forme spécifique, et en particulier l’absence de symétrie, implique cependant la nécessité de traitement de l’image. Certaines équipes ont montré qu’à l’aide d’algorithmes de déconvolution il était possible d’obtenir une meilleure résolution axiale en utilisant un faisceau d’Airy plutôt qu’un faisceau de Bessel. Ils ont démontré la possibilité d’atteindre des résolutions axiales de l’ordre de $1\ \mu\text{m}$ sur un champ de vue atteignant plus de $150\ \mu\text{m}$ de long, alors qu’un faisceau gaussien équivalent procure un champ de vue inférieur à $3\ \mu\text{m}$, et un faisceau de Bessel entre 30 et $50\ \mu\text{m}$ ^{124,137}. Cependant, ce type de faisceau peut s’avérer complexe à mettre en place, et le sectionnement optique n’est effectif qu’après déconvolution des images acquises, ce qui en pratique rend cette méthode inutilisable pour la SMLM.

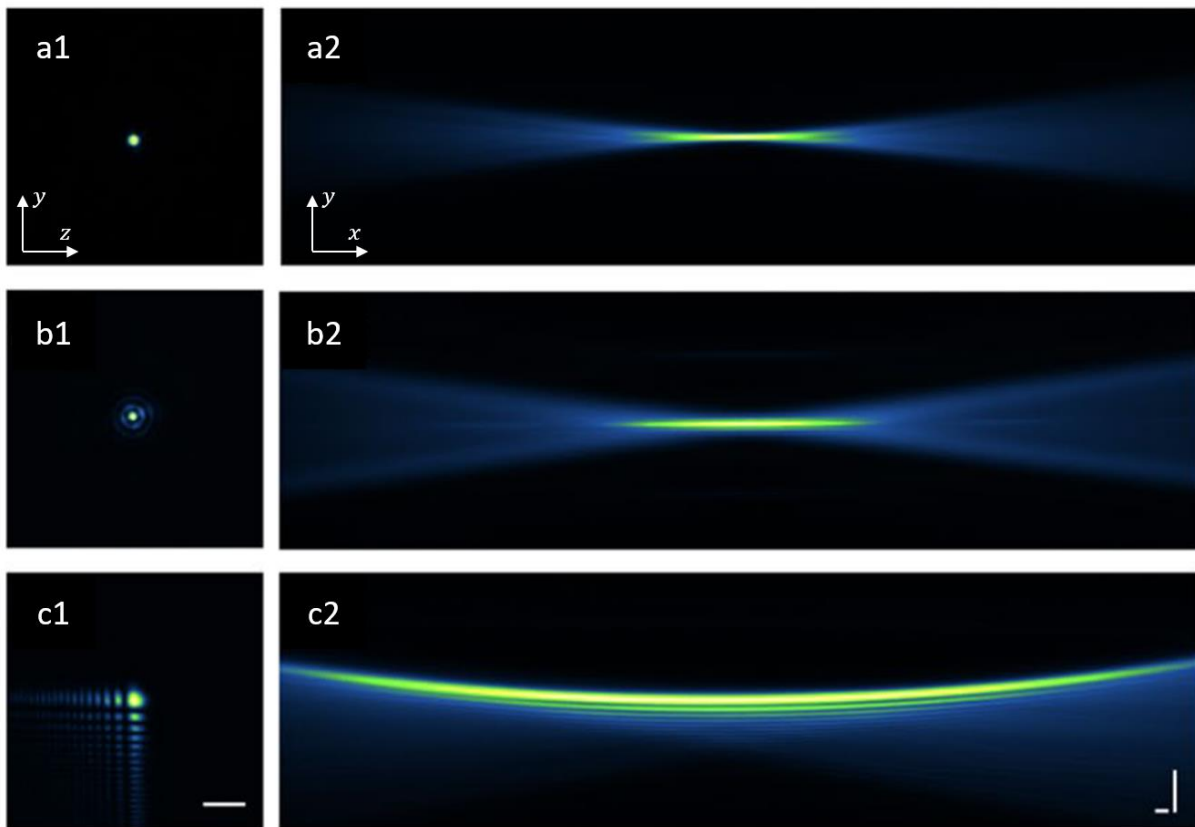


Figure II.3 : Comparaison entre faisceau gaussien, faisceau de Bessel et faisceau d’Airy. Adapté de M. Aakhte et al.¹³⁶. Exemple de profils d’intensité obtenus pour un faisceau gaussien (a), un faisceau de Bessel (b) et un faisceau d’Airy (c), ayant tous la même épaisseur. (a1, b1 et c1) : profils transverses des trois faisceaux. On note la forme particulière du faisceau d’Airy, dépourvu de symétrie circulaire. (a2, b2 et c2) : profil d’intensité le long de la propagation du faisceau, selon l’axe x . Le faisceau d’Airy dispose d’une profondeur de champ beaucoup plus grande, mais avec une forme courbée, de nombreuses franges secondaires et une absence de symétrie nécessitant une déconvolution des images pour rendre le sectionnement effectif.

II.2.2.2.2. Implémentation pour l’imagerie par SMLM

L’utilisation de faisceaux non diffractifs pour la SMLM a déjà montré son efficacité par le passé. Plusieurs équipes ont implémenté diverses architectures utilisant différents faisceaux non diffractifs. L’objectif dans le cas de la SMLM n’est pas d’augmenter la résolution axiale grâce à un sectionnement optique particulièrement fin, mais de supprimer l’illumination hors focus tout en permettant une imagerie sur des champs de vues compatible avec l’imagerie de cellules ou petits agrégats cellulaires entiers. L’utilisation de faisceaux de Bessel

permet de créer des feuilles de lumière procurant un sectionnement optique (correspondant à l'épaisseur de la frange centrale) égal à la profondeur de champ de l'objectif sur de plus grands champs de vue que des faisceaux Gaussiens d'épaisseurs équivalentes. La difficulté réside ici dans la présence des franges secondaires des faisceaux de Bessel, pouvant contenir jusqu'à 80% de l'énergie totale du faisceau. Ces franges secondaires induisent une illumination hors focus, ce qui produit un bruit de fond impactant drastiquement les précisions de pointées qu'il est possible d'atteindre.

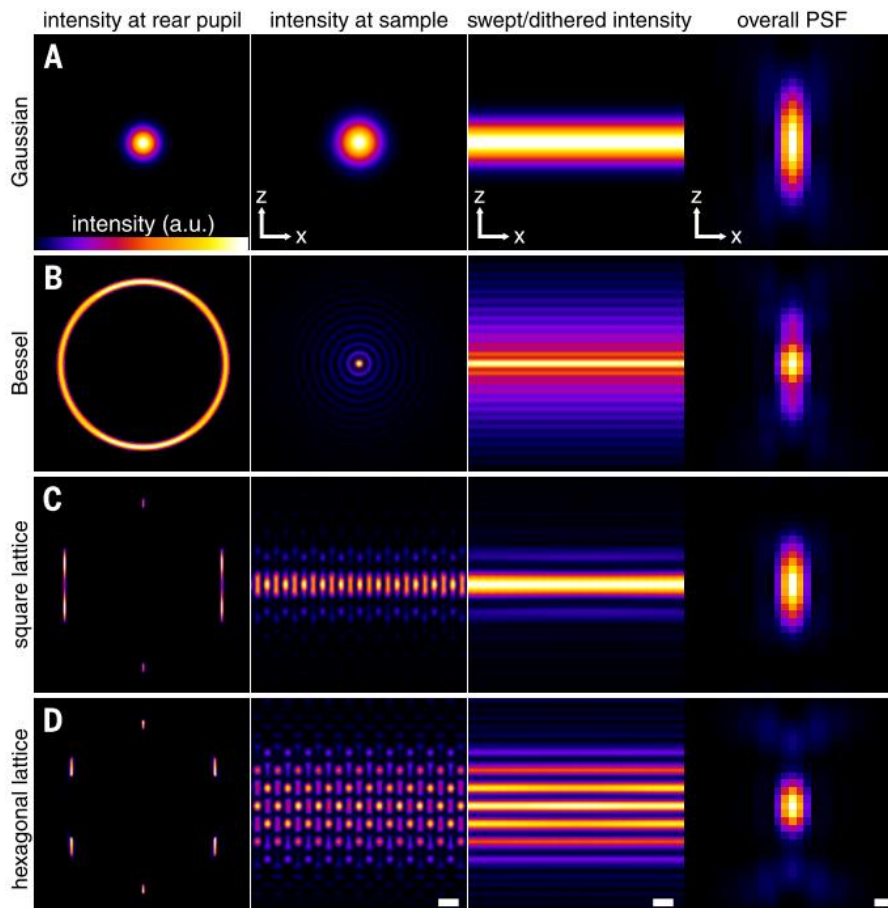


Figure II.4 — Exemples de faisceaux d'excitations possibles avec le microscope LLS. Adapté de B.-C. C. Chen et al.⁹⁹. (A) Un faisceau dont le profil d'intensité est de forme Gaussienne à la pupille arrière de l'objectif d'illumination reste gaussien sur le plan objet. Le faisceau est balayé latéralement pour créer la feuille de lumière. (B) si le profil à la pupille arrière prend la forme d'un anneau d'intensité constante, l'objectif produit un faisceau de Bessel, de symétrie circulaire. Les franges secondaires produisent une quantité importante d'illumination hors focus lors du balayage du faisceau pour créer une feuille de lumière. (C) et (D) Une structuration du pattern d'illumination sur la pupille arrière de l'objectif permet de créer des LLS présentant moins de franges secondaires, et de symétrie planaire. Un

balayage plus réduit permet de produire une feuille de lumière ayant une illumination homogène le long de l'axe x. Le lattice carré (C) est optimisé pour confiner l'excitation la frange centrale et est optimal pour l'imagerie par SMLM, tandis que le lattice hexagonal (D) présente une PSF globale plus fine, augmentant ainsi la résolution axiale.

L'équipe d'Eric Betzig a proposé une solution à cette limitation. Ils ont démontré que la création de plusieurs faisceaux de Bessel juxtaposés de plus en plus proches les uns des autres a pour effet de réduire la présence de ces franges secondaire par interférences destructives entre les faisceaux. En poussant plus loin ce concept ils sont arrivés à la possibilité de créer des réseaux de lumière non-diffractifs possédant très peu de franges secondaire grâce à l'interférence de plusieurs faisceaux convergeant sur l'axe optique selon des directions bien particulières. Ce concept à été implémenté dans leur microscope « Lattice Light Sheet » (LLS)^{99,135}. Un Modulateur Spatial de Lumière (SLM) positionné sur un plan conjugué au plan objet permet de façonner de nombreuses formes de faisceaux dont ces réseaux de lumière. Le faisceau façonné par le SLM est projeté sur un anneau positionné au plan de Fourier permettant de filtrer les ordres supérieurs de diffraction créé par le SLM. Cela créé un motif d'illumination répartie le long d'un anneau au niveau de la pupille arrière de l'objectif selon le même principe que les faisceaux de Bessel, définissant les orientations des faisceaux qui interféreront entre eux au niveau de l'échantillon. En utilisant un SLM, ce

système a l'avantage de pouvoir adapter le faisceau au type d'imagerie désiré. Il est en particulier possible de créer différents faisceaux structurés (LLS) ouvrant la voie à une imagerie par structuration de l'illumination SIM (Figure II.4). Ces faisceaux structurés peuvent également être balayés latéralement pour créer des feuilles de lumières de différentes épaisseurs et contenant plus ou moins de franges secondaires. Le pattern « lattice carré » (Figure II.4.C) permet par exemple la création d'une feuille de lumière dont la frange centrale est plus épaisse, mais qui ne présente que deux franges secondaires peu intenses diminuant ainsi la phototoxicité de l'illumination hors du plan imagé. Il est particulièrement intéressant pour l'imagerie d'échantillons vivants ou permettre l'imagerie par SMLM. En dimensionnant convenablement la feuille de lumière en fonction du système, il est même possible d'optimiser le sectionnement optique en positionnant les franges secondaires de la feuille de lumière au minimum de détection de l'objectif dans la direction axiale afin de s'affranchir totalement des signaux de fluorescences excités par ces franges. Le motif « lattice hexagonal » (Figure II.4.D) permet quant à lui d'optimiser la résolution axiale à l'aide d'un faisceau dont la frange principale est plus fine mais au prix de plus nombreuses franges secondaires.

Une autre méthode plus simple de création de différentes feuilles de lumière non diffractives équivalentes au balayage de faisceaux non-diffractifs (Bessel ou LLS) a été proposée plus récemment par Bo-Jui Chang¹³⁸. Les méthodes classiques pour créer une feuille de lumière non diffractive consistent à produire un faisceau non diffractif en créant un motif annulaire sur le plan de Fourier de l'objectif, puis à balayer le faisceau produit dans le plan image pour obtenir une feuille de lumière. Le théorème de synthèse de champ (Figure II.5) démontré dans cet article affirme que le profil de l'intensité moyenne au plan objet est équivalent dans les deux situations suivantes : (1) en illuminant l'ensemble de la pupille et en balayant l'échantillon selon un axe, ou (2) en illuminant une ligne de la pupille arrière, et en balayant cette ligne selon ce même axe. Ainsi, il est possible de remplacer le SLM utilisé dans le microscope LLS par une fente et un miroir scannant. La création de feuilles de lumière équivalentes aux LLS balayées peut alors être réalisée en contrôlant précisément l'activation du faisceau laser lors de son balayage sur la pupille arrière de l'objectif. L'un des avantages de cette méthode et que le plan image de l'objectif est constamment illuminé de manière uniforme, là où les méthodes par balayage de faisceaux induisent des pics d'intensité. Cela a pour effet de réduire la phototoxicité et le taux de photoblanchiment dans le cas de la synthèse de champ. Cependant, ce système n'est pas aussi polyvalent que le microscope LLS, car il n'est pas possible avec cette méthode de créer les feuilles de lumière structurées, pouvant être utilisées pour la microscopie par illumination structurée.

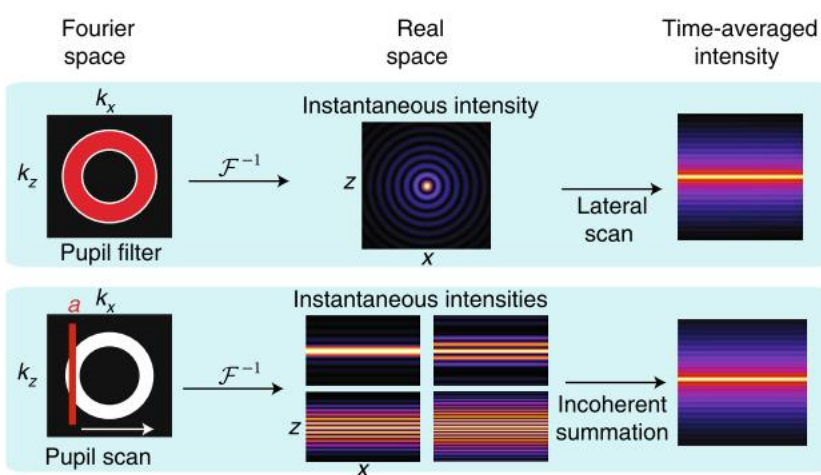


Figure II.5 : Schéma de la méthode par synthèse de champ. Adapté de ¹³⁸. Haut : le masque annulaire est totalement illuminé pour créer un faisceau non diffractif, ici un faisceau de Bessel. Ce faisceau est ensuite balayé sur l'échantillon et l'intégration au cours du temps par la caméra permet d'obtenir une feuille de lumière. Bas : Principe de la synthèse de champ : le masque annulaire est illuminé par une ligne balayée latéralement. Le balayage crée une multitude de feuilles de lumière au cours du temps. L'intégration de ces

différentes feuilles de lumières sur le temps de balayage produit un profil d'intensité équivalent au cas précédent.

Une dernière méthode de création de feuilles de lumière non diffractives a été proposée par Teng Zhao et al., en 2016¹²⁵ (Figure II.6). Dans cet article, les faisceaux proposés sont comparables aux LLS après balayage, soit des feuilles de lumières non diffractives avec une symétrie planaire mais non structurées. Là où le microscope LLS utilise un SLM pour permettre la création d'une grande variété de feuilles de lumière différentes, le système proposé par T. Zhao utilise une simple fente conjuguée au plan objet, et un masque annulaire conjugué à la pupille arrière de l'objectif. La présence de cette fente permet de rompre la symétrie circulaire du système, en créant un motif linéaire sur la pupille arrière. Ainsi, le faisceau produit après le masque annulaire n'est pas un faisceau de Bessel (faisceau à symétrie circulaire), mais ce qu'ils nomment une « feuille de Bessel linéaire » (LBS : Line Bessel Sheet) créée par l'interférence de deux ondes, idéalement planes, se propageant avec un angle θ et $-\theta$ par rapport à l'axe optique de l'objectif. En choisissant judicieusement le diamètre et l'épaisseur de l'anneau disposé à la pupille arrière, il devient possible de créer différents profils de feuilles de lumière. Deux formes sont proposées, pour deux applications : (1) un faisceau avec de nombreuses franges fines, que l'on peut comparer au « lattice hexagonal » balayé (Figure II.4.D) permettant d'obtenir une résolution axiale maximale, et (2) un faisceau présentant uniquement 3 franges, comparables au « lattice carré » balayé (Figure II.4.C), permettant de confiner l'excitation au plan focal et donc optimisé pour l'imagerie par SMLM. Cette méthode est beaucoup plus simple à implémenter que les deux précédentes puisqu'elle ne requiert ni SLM, ni synchronisation de l'activation d'un faisceau d'excitation avec son balayage sur la pupille arrière de l'objectif. De par cette simplicité instrumentale nous avons choisi de se baser sur cette approche pour réaliser une preuve de faisabilité de l'implémentation de feuilles de lumière non diffractives dans la configuration soSPIM.

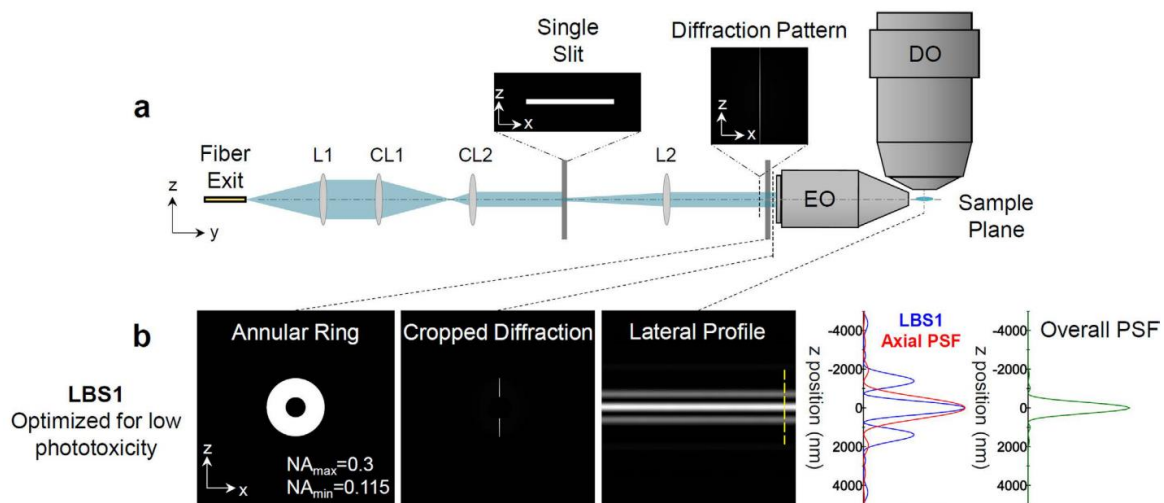


Figure II.6 : Création d'un faisceau LBS à 3 franges. Adapté de ¹²⁵. (a) montage optique simplifié. La lentille L2 permet de produire la transformée de Fourier de la fente sur l'anneau. L'anneau est positionné au plan de Fourier de l'objectif d'illumination (EO). (b) : de gauche à droite, l'anneau positionné sur le plan de Fourier, puis la figure produite par la combinaison de la fente et de l'anneau. La troisième vignette représente le profil latéral de la LBS. Les graphiques représentent l'effet d'atténuation de la PSF de détection sur les franges secondaires : la PSF globale résultante ne présente qu'une frange.

II.3. Implémentation de faisceaux non diffractifs sur le système soSPIM

II.3.1. Système optique : conception et réalisation

II.3.1.1. Conception du système soSPIM avec illumination par LBS

Pour effectuer une preuve de concept de l'implémentation de faisceaux non diffractifs sur le système soSPIM, nous nous sommes orientés vers le Line Bessel Sheet (LBS) décrit dans les travaux de Teng Zhao¹²⁵. Cette architecture a l'avantage d'être relativement simple à mettre en place, tout en permettant de créer des profils de feuilles de lumière optimisés pour l'imagerie SMLM. C'est donc une méthode idéale pour effectuer de premiers essais, avant d'envisager des architectures plus complexes et polyvalentes telles les LLS ou la synthèse de champ. Comme dans la section précédente (II.2.2.2), ce montage permet diverses configurations de feuille de lumière. Celle qui nous intéresse particulièrement est celle présentant uniquement 2 franges latérales, car elle permet de limiter le signal hors focus. Bien que ces franges latérales participent à l'illumination hors focus, en dimensionnant judicieusement le système, il est possible de s'affranchir du signal qu'elles produisent. En effet, la PSF globale de détection d'un système est le produit entre la PSF d'excitation et la PSF d'illumination. Or, comme introduit par l'Équation 1.32 (section 1.3.3.3), la PSF axiale d'un objectif de microscope, soit la PSF de détection d'un microscope par feuille de lumière, possède un minimum à une distance $\Delta z_{Airy}/2$ de son centre :

$$\frac{\Delta z_{Airy}}{2} = n \frac{\lambda}{NA^2}$$

Cela veut donc dire qu'un microscope ne détecte pas le signal de molécules situées à cette distance du plan focale de son objectif. Dans notre cas, nous utilisons un objectif à eau d'ouverture numérique 1.27, dont la PSF possède donc un minimum selon l'axe z à une distance du plan focal comprise entre 0.4 et 0,6 μm en fonction de la longueur d'onde observée. Si les franges secondaires de la feuille de lumière se situent à cette distance du plan objet de l'objectif, alors le signal des molécules excités par ces franges ne sera pas détecté.

Pour dimensionner le système, nous nous sommes basés sur les résultats obtenus par Teng Zhao dans sa publication de 2016. Le nombre de franges secondaires est directement lié à l'épaisseur relative de l'anneau $\Delta R/R_{av}$: plus l'anneau est épais, plus on s'éloigne du faisceau de Bessel idéal, et moins les franges secondaires sont nombreuses. Un anneau d'épaisseur relative $\Delta R/R_{av}$ d'environ 0,9, permet d'obtenir une feuille de lumière présentant trois franges (Figure II.6), dont la frange centrale mesure 600 nm de largeur à mi-hauteur, et les franges secondaires se trouvent à environ 1,2 μm de distance l'une de l'autre. Cette distance est dans notre cas très proche de la distance entre les minimums de détection de notre objectif, estimée entre 0.8 et 1,2 μm . De plus, T. Zhao montre que cette feuille de lumière se maintient sur une profondeur de champ de 15 μm . En comparaison, pour un faisceau gaussien avec une largeur à mi-hauteur de 300 nm au niveau du waist, on obtient une profondeur de champ de moins de 1 μm .

Pour notre système, nous avons confectionné une grille de masques opaques de diverses dimensions inspirés de ceux proposés dans les travaux de Chen et al. sur le LLSM (Figure II.7). La diversité des masques sur cette grille nous a permis d'ajuster les paramètres du système et ainsi de tester différentes combinaisons produisant différents profils de feuilles de lumière afin d'explorer et de trouver expérimentalement la meilleure solution. Dans notre

cas, nous cherchons à obtenir un faisceau à 3 franges semblable à celui présenté en Figure II.6, ce qui implique une épaisseur relative du masque $\Delta R/R_{av}$ d'environ 0,9. L'image du masque annulaire est projetée sur la pupille arrière de notre objectif à l'aide d'une succession de montages afocaux (Figure II.8). En sélectionnant les lentilles constituant ces montages afocaux, il est alors possible d'ajuster le grossissement entre le masque réel et son image sur la pupille arrière, et donc d'ajuster le diamètre final de l'anneau R_{av} permettant de modifier les dimensions de la feuille de lumière créée.

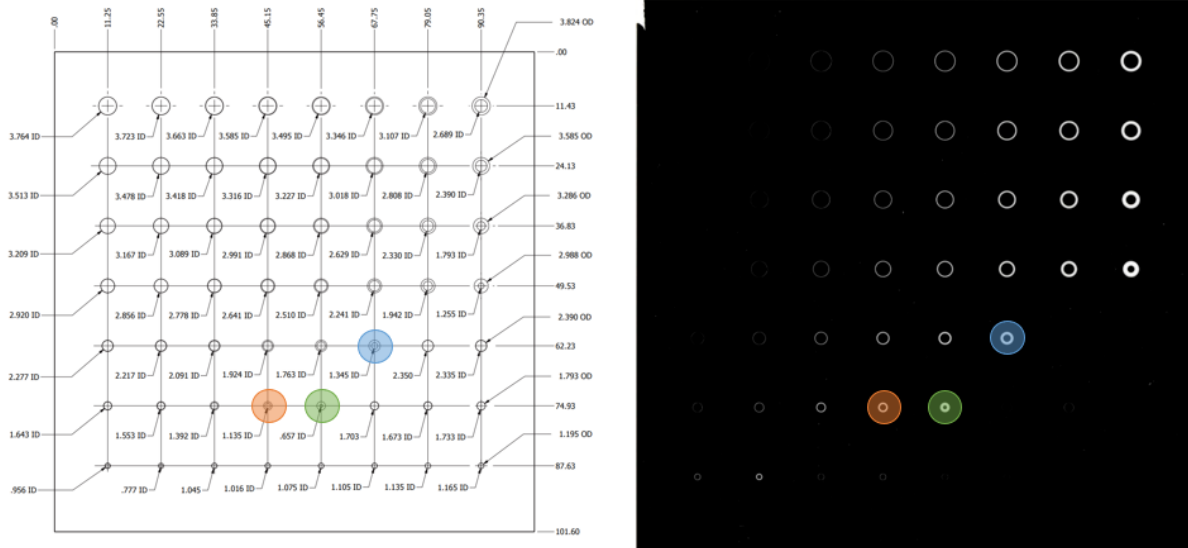


Figure II.7 — Grille de masques annulaires. À gauche, le dessin technique présentant les dimensions (diamètres intérieurs et extérieurs) des masques annulaires (en millimètres). À droite, une image des masques finaux. Les 3 masques mis en couleurs sont les masques dont l'utilisation a fourni les résultats présentés dans le Tableau II.1.

Rappelons qu'un objectif de microscope ne respecte pas les conditions de Gauss, en particulier les objectifs à forte ouverture numérique. De plus, les constructeurs fournissent peu d'information sur les propriétés optiques des objectifs, comme la position exacte de pupille arrière, ses dimensions, ou encore leur distance focale exacte. Pour ces raisons, il est difficile de déterminer théoriquement le rayon moyen du masque R_{av} optimal permettant de créer le profil exact de feuille de lumière désirée. J'ai donc adopté une approche expérimentale : à l'aide des ressources présentes au laboratoire je me suis rapproché le plus possible des conditions décrites dans l'article de Teng Zhao, pour ensuite adapter si nécessaire les dimensions du système à notre objectif, en utilisant d'autres masques annulaires, ou en modifiant le système optique à l'aide d'autres lentilles.

Pour pouvoir produire un faisceau non diffractif selon la méthode décrite par Teng Zhao, le montage optique doit permettre l'accès à la fois au plan de Fourier (ou pupille arrière) et au plan objet de l'objectif. Sur le plan de Fourier, un masque annulaire doit pouvoir être positionné, tandis que sur le plan objet c'est une fente. Le système optique (Figure II.8) est basé sur le même système que le système soSPIM présenté précédemment (I.5.2). L'ajout du module LBS (Figure II.8, cadre gris) permet de créer les faisceaux de type LBS ou de Bessel suivant si la fente (F) est insérée ou non sur le trajet optique. En position, cette fente permet de créer un faisceau dont la transformée de Fourier réalisée par la lentille LTF est une ligne. Le masque annulaire (M) conjugué au plan de Fourier de l'objectif permet de filtrer les fréquences spatiales indésirables, et ainsi créer le pattern d'illumination désirée sur la pupille arrière de l'objectif pour la création d'une LBS sur le plan objet. Au moyen des montages afocaux successifs, le masque M est conjugué aux différents éléments optiques du module optique soSPIM (lentille à focale variable (LFV) et miroir galvanométriques (GMX & GMY))

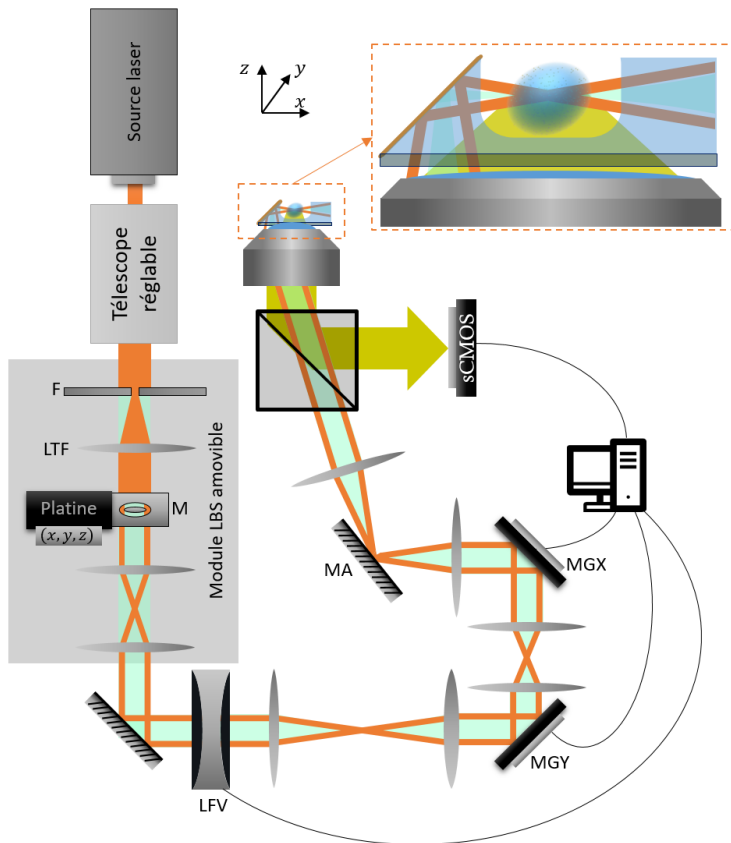


Figure II.8 : Montage optique soSPIM pour l'illumination par LBS.
 F : Fente. LTF : Lentille de Fourier. M : Marque annulaire. LFV : Lentille à focale variable. MGX / MGY : Miroir galvo, balayant l'axe X et Y respectivement. MA : Miroir d'ajustement de l'assiette de la geuille. F, et MA sont conjugués au plan objet de l'objectif, M, LFV, MGY et MGX sont conjugués à la pupille arrière de l'objectif.

faisceau gaussien. La fente et la lentille LTF peuvent également être basculées en laissant le masque en place, ce qui permet d'obtenir un faisceau de Bessel. Cela a permis la comparaison rapide de différents types de faisceau et à aider à l'alignement du système.

II.3.2. Caractérisation expérimentale du système d'illumination

II.3.2.1. Méthode de caractérisation

Afin de valider ou non les différentes configurations optiques testées (combinaisons de masques et de grossissements) pour la création de feuilles de lumière satisfaisant nos contraintes, je me suis basé sur la mesure de plusieurs paramètres. Ces paramètres doivent permettre d'évaluer la qualité des feuilles de lumière créées en vue de leur utilisation pour l'imagerie par SMLM sur le système soSPIM. Ces paramètres sont :

- Le nombre total de franges, de la feuille de lumière créée. Pour notre application, nous souhaitons minimiser ce nombre de franges, afin de limiter l'illumination hors focus, soit créer des feuilles de lumière ne possédant que 3 franges si possible
- Le sectionnement optique définit par :
 - o La largeur à mi-hauteur de la frange centrale,
 - o L'interfrange, soit la distance entre les franges. Nous souhaitons en effet positionner les franges sur le minimum de détection de l'objectif, qui a une profondeur de champ comprise entre 0.8 et 1,2 μm .

- Le paramètre confocal de la feuille de lumière, qui définit le champ de vue sur lequel le sectionnement optique est effectif.
- L'intensité relative des franges. Nous souhaitons que les franges secondaires soient le moins intenses possible, pour diminuer au maximum l'illumination hors focus et ainsi minimiser le blanchiment prématuré des fluorophores.

Excepté la profondeur de champ, tous les autres paramètres sont mesurables sur le profil transverse du faisceau. Étant donné la configuration du système soSPIM, pour observer ce profil latéral, il suffit de retirer les dispositifs soSPIM. Le faisceau n'est alors plus réfléchi par le miroir à 45°, se propage selon l'axe z , et le profil transverse peut être observé sur le plan objet (x, y) . Une lamelle de microscope sur laquelle est déposée une fine couche fluorescente (réalisée à base d'une solution de fluorescéine ou de GFP) peut alors être utilisée pour imager ce profil.

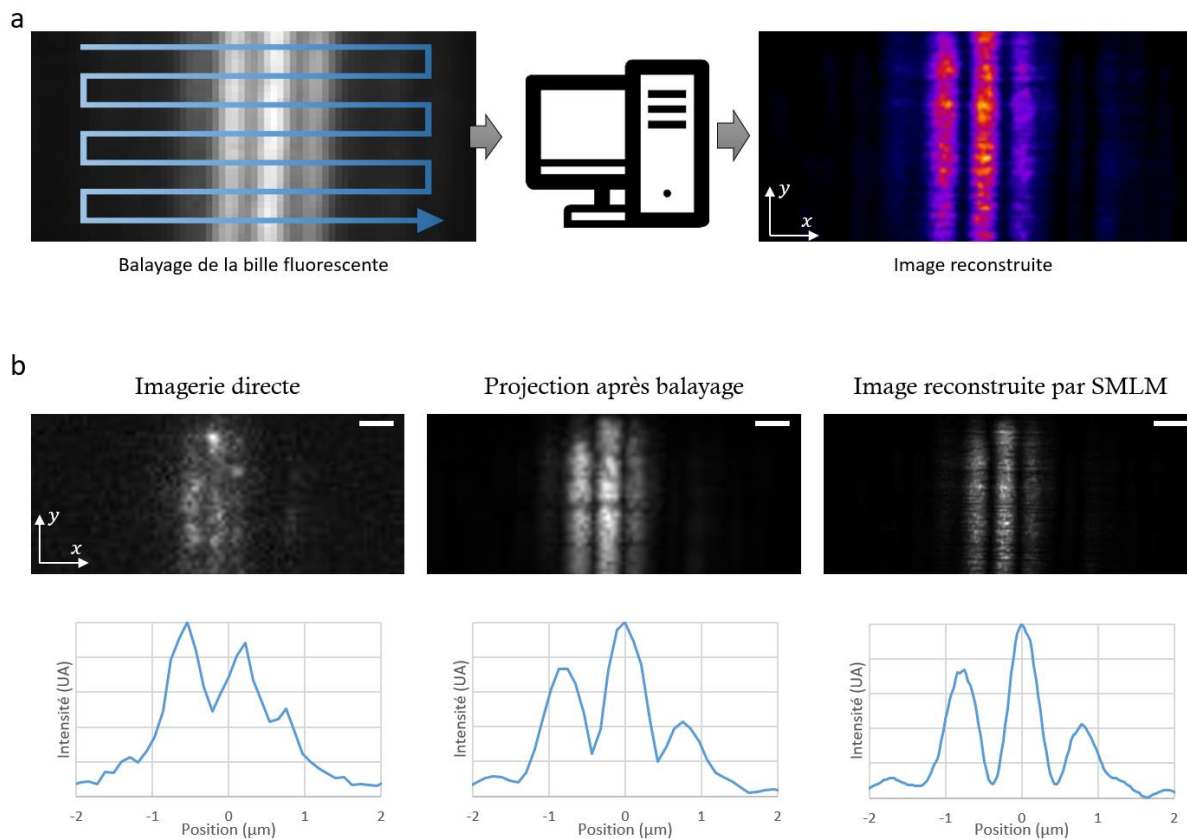


Figure II.9 — Imagerie des faisceaux LBS. (a) Principe d'imagerie du profil latéral des faisceaux LBS. Une bille fluorescente (TetraSpeck, $0.1 \mu\text{m}$) déposée sur lamelle est balayée le long du faisceau LBS. Les images sont ensuite analysées par les algorithmes de SMLM développés par notre équipe⁵⁶. À l'aide des localisations obtenues, et de l'intensité de fluorescence pour chaque localisation, une image de super-résolution est reconstruite, correspondant au profil transverse du faisceau. (b) comparaison entre les résultats par image directe du faisceau sur couche fluorescente fine (gauche), par projection maximale après balayage d'une bille fluorescente (centre) ou par reconstruction par algorithme SMLM (droite). Barre d'échelle : $1 \mu\text{m}$. En bas sont représenté le profil d'intensité obtenu pour chacune des méthodes de mesure.

Un défi toutefois pour mesurer ces paramètres (largeur des franges, distances interfranges) est qu'ils sont de dimensions proches de la limite résolution de l'objectif. L'image du profil de la feuille de lumière apparaît donc floutée par la PSF de l'objectif en détection empêchant la caractérisation directe et précise de ces paramètres. J'ai donc mis au point une approche expérimentale spécifique couplée à un traitement du signal pour y parvenir (Figure II.9). Cette approche utilise un concept similaire aux techniques d'imagerie de super-résolution SMLM que nous maîtrisons au laboratoire et pour lesquelles nous possédons les

outils d'analyse⁵⁶. Une séquence d'images est acquise pendant qu'une bille fluorescente est balayée sur l'ensemble du profil transverse (x, y) du faisceau. Cette séquence d'images est ensuite analysée comme une acquisition de SMLM : pour chaque image, la bille est détectée et précisément localisée par ajustement gaussien. Une image est ensuite reconstruite, à partir des localisations et de l'intensité du signal de la bille au cours du balayage. Cela permet de reconstruire le profil du faisceau étudié avec une résolution qui n'est plus limitée par l'ouverture numérique de l'objectif, mais par la précision de localisation des billes fluorescentes utilisées (~ 5 nm) et le pas de déplacement de la bille entre les images (54 nm). Il devient alors possible de mesurer précisément la largeur à mi-hauteur de la frange centrale, le nombre de franges, leur position et leur intensité relative.

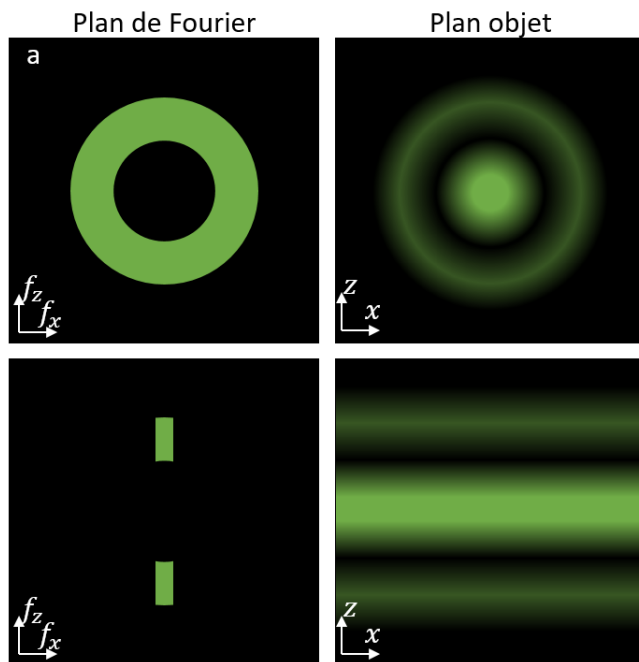
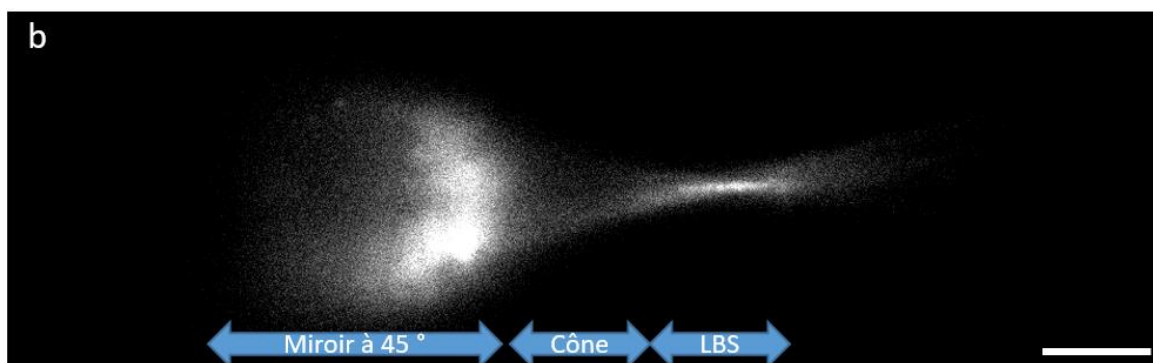


Figure II.10 — Méthode de mesure de la profondeur de champ. (a) Schémas représentant les deux configurations d'illumination possibles. À gauche, le profil d'intensité au niveau de la pupille arrière de l'objectif. À droite, le profil d'intensité au plan objet. En haut, sans fente (Figure II.8) l'ensemble de la pupille est illuminé, ce qui donne un faisceau de Bessel de symétrie circulaire. En bas, en utilisant la fente, seule une ligne verticale de l'anneau est illuminée, ce qui donne naissance à une LBS. Les dimensions de l'anneau définissent les dimensions de la feuille de lumière : dans les deux cas, les distances entre les franges sont identiques. (b) Image du faisceau de Bessel en configuration feuille de lumière. Au niveau du miroir, le faisceau s'étend sur la majorité de la surface de ce dernier. Le cône de lumière converge ensuite pour créer un faisceau de Bessel (ou LBS dans le cas d'utilisation d'une fente). Barre d'échelle : 10 μm



Pour pouvoir observer et mesurer le paramètre confocal du faisceau, il est nécessaire de pouvoir observer le profil de ce dernier selon l'axe (x, z) (Figure II.8). Pour cela, nous utilisons les dispositifs soSPIM permettant de créer une feuille de lumière perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif après réflexion sur le miroir à 45° . Toutefois, mesurer la profondeur de champ d'une feuille de lumière 2D n'est pas directement possible. La méthode généralement utilisée sur les architectures standards de microscope à feuille de lumière ayant 2 objectifs positionné à 90° l'un de l'autre, est de tourner de 90° la feuille de lumière, en tournant typiquement la lentille cylindrique ou la fente. Cette méthode est particulièrement difficile à appliquer au système soSPIM qui utilise un seul objectif et un miroir à 45° . Pour

contourner ce problème, j'ai choisi de mesurer cette grandeur sur un faisceau de Bessel correspondant à la feuille LBS créée. Si on illumine l'ensemble de l'anneau utilisé à la pupille arrière de l'objectif plutôt que le motif linéaire utilisé pour créer la LBS étudiée, on obtient un faisceau de Bessel dont la profondeur de champ est identique à celle de la LBS qui serait créée avec la fente (Figure II.10). Pour ce faire, il suffit de retirer la fente du montage optique (Figure II.8).




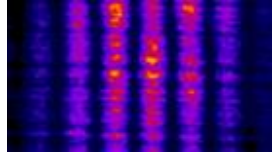
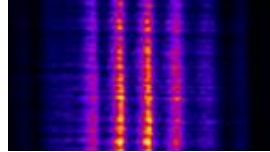
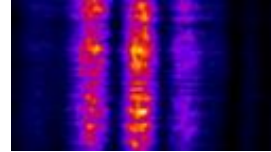
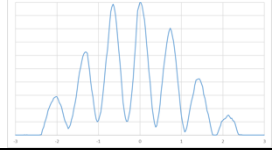
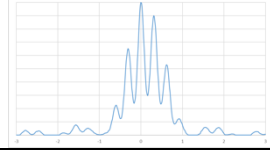
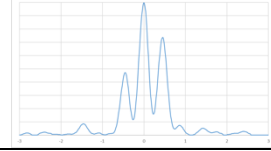
La Figure II.10.b représente le résultat obtenu lorsqu'on enlève la fente amovible F du chemin optique : on observe l'étendue du faisceau au niveau du miroir à 45°, puis le cône de lumière qui converge sur son axe de propagation et crée, par interférences, le faisceau de Bessel désiré. En mesurant le profil d'intensité au niveau de cette intersection, on peut donc en extraire la profondeur de champ.

Enfin, une dernière étape consiste à observer l'impact de ce type d'illumination sur la PSF finale du microscope. En effet, l'extension axiale de cette PSF nous renseignera sur l'épaisseur effective du sectionnement optique pour la détection de molécules individuelles en profondeur par notre système, en prenant en compte à la fois les propriétés de la feuille de lumière créée pour l'excitation, mais également la PSF de détection de l'objectif utilisé. Pour cela, une solution de billes fluorescentes est mélangée à de l'agarose et introduite dans des dispositifs soSPIM. L'échantillon est alors illuminé à l'aide de la feuille de lumière à caractériser en configuration soSPIM, et une pile d'images est acquise selon l'axe z en déplaçant l'objectif et la feuille de lumière de façon synchrone. Cette pile d'images permet d'obtenir une représentation de la PSF globale du système complet d'imagerie (feuille de lumière et détection) en 3 dimensions (Figure II.12).

II.3.2.2. Résultats

II.3.2.2.1. Caractérisation du faisceau

Parmi les masques disponibles, nous avons en identifié trois en particulier qui représentaient les meilleurs candidats suivant les calculs théoriques effectués à partir de valeurs estimées de la taille de la pupille arrière de l'objectif et de sa distance focale. Nous les avons donc testés tous les 3 et dont un ayant l'épaisseur relative $\Delta R/R_{av}$ recherchée (masque 'vert'). Les résultats des expériences sont présentés sur le Tableau II.1. Dans ce tableau, on note que comme prévu selon le diamètre et l'épaisseur du masque annulaire utilisé plusieurs profils de faisceaux peuvent être créés. En particulier, nous observons qu'un anneau avec $R_{av} = 2,04$ mm à la pupille arrière de l'objectif, et $\Delta R/R_{av} = 0,92$, on obtient un faisceau composé de 3 franges uniquement dont la frange centrale a une largeur à mi-hauteur de 450 nm (masque 'vert'). Par ailleurs nous mesurons un paramètre confocal pour ce faisceau de 12 μ m (Figure II.11). En comparaison, un faisceau gaussien dont le diamètre est de 500 nm au focus aurait un paramètre confocal inférieur à 1 μ m.

Masque (Figure II. 7)			
Image			
Profil transverse			
Rayon moyen R_{av} (mm)	2,44	3,11	2,04

Épaisseur $\Delta R/R_{av}$ (mm)	0,45	0,43	0,92
Nombre de franges	7	5	3
Interfrange	700 nm	560 nm	800 nm
Largeur à mi-hauteur : frange central	350 nm	200 nm	450 nm
Intensité relative : deuxièmes franges	0,85	0,80	0,55

Tableau II.1 — Exemple de résultats obtenus pour 3 différents masques. En ajustant les dimensions des masques, on peut faire varier le nombre de franges, leur épaisseur, leur intensité relative ou l'espacement entre les franges. Le rayon moyen est calculé pour la pupille arrière, en appliquant le grossissement produit par les lentilles du système optique.

Pour notre application de détection de molécules individuelles en profondeur, nous recherchons plus particulièrement ce type de profil avec les deux franges secondaires situées au niveau des minimums de la fonction de détection de notre objectif. Nous mesurons ici un espacement entre les franges de $0,8 \mu\text{m}$. La profondeur de champ de notre objectif est évaluée entre $0,8$ et $1,2$ suivant la longueur d'onde utilisée. Pour s'assurer que les franges secondaires sont bien positionnées au minimum de détection de l'objectif, il faudrait que l'interfrange soit d'environ $0,5 \mu\text{m}$. Pour se faire, nous pourrions augmenter l'angle d'incidence du cône de lumière, en augmentant le diamètre moyen R_{av} du masque. Cependant, cela impliquerait également une diminution de la taille de la frange centrale. Dans la configuration actuelle, sa largeur à mi-hauteur est de l'ordre de $0,5 \mu\text{m}$. Les molécules ne sont détectées que sur cette épaisseur et le risque, en affinant la feuille de lumière, est de devoir multiplier les sections d'imagerie en z pour avoir un recouvrement entre elles et permettre d'imager un volume complet de façon homogène. Cela augmenterait d'autant le nombre de sections à imager et donc le temps d'acquisition global déjà non-négligeable (0). Pour confirmer cela expérimentalement et prendre en compte la longueur d'onde qui sera utilisée pour nos acquisitions qui correspond au canal spectral du fluorophore Cy3 (excitation à 561 nm et détection entre 575 et 615 nm), nous avons directement mesuré la PSF global du système à l'aide de billes fluorescentes.

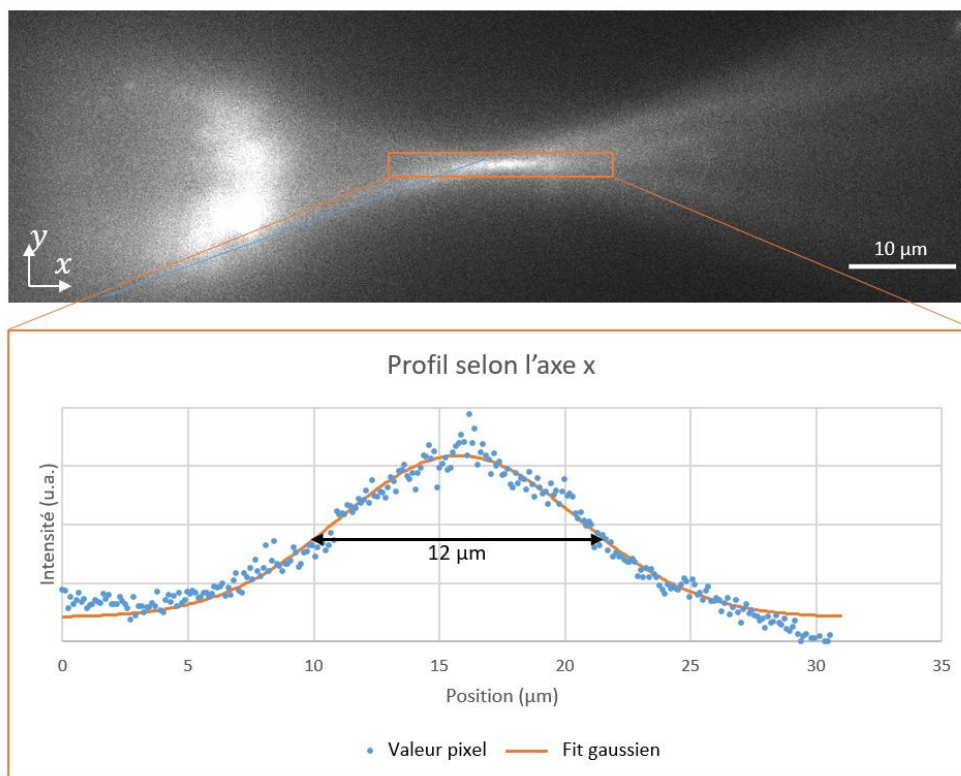


Figure II.11 — Mesure de la profondeur de champ. Ce faisceau est obtenu en retirant la fente du système optique (Figure II.10). La profondeur de champ obtenue est alors de $12 \mu\text{m}$ (Largeur à mi-hauteur).

II.3.2.2.2. Mesure de la PSF globale

La Figure II.12 représente les résultats de mesures des PSF globales du système selon (y, z) pour 2 des masques testés (repérées précédemment en 'bleu' et 'vert'). On remarque que dans la condition optimale, correspondant au masque 'vert' (Figure II.12.c) une illumination par faisceau de type LBS permet de réduire significativement la taille de la PSF dans la direction axiale avec une largeur à mi-hauteur mesurée de 470 nm. On remarque également que les franges secondaires ne sont pas observées, ce qui implique que celles-ci se trouvent suffisamment proches du minimum de détection de l'objectif pour être atténuées. Ce résultat n'est pas totalement en accord avec la théorie, qui voudrait que le minimum de détection de l'objectif se trouve entre 0.4 et 0.6 μm de distance du plan focal. Cela s'explique par le fait que la théorie s'applique pour un système idéal, dans des conditions optiquement parfaites, ce qui n'est jamais le cas en réalité, et la PSF de détection d'un objectif est toujours légèrement plus grande que ce que prédit la théorie. Ces résultats mettent en évidence l'apport des faisceaux de type LBS pour la microscopie en feuille de lumière : ici, nous pouvons obtenir un sectionnement optique plus fin que 500 sur un champ de vue de 12 μm . En comparaison, pour obtenir un champ de vue équivalent, un faisceau gaussien devrait avoir un waist de 1 μm soit un diamètre ($1/e^2$) de 2 μm et donc produirait plus de bruit de fond provenant de molécules excitées hors de la profondeur de champ de notre objectif.

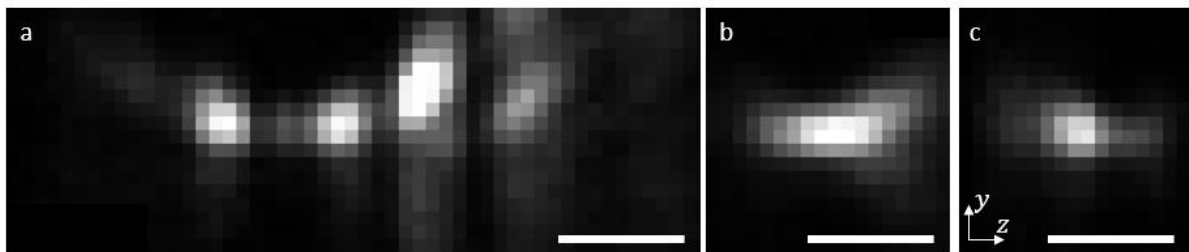


Figure II.12 : Trois exemples de PSF globales avec une illumination LBS. (a) PSF obtenue dans le cas 2 (masque bleu) du Tableau II.1. On observe l'effet de l'illumination par les franges successives de la feuille de lumière (PSF hachée) et le mauvais alignement de la feuille de lumière sur le plan focal (l'intensité est maximale hors focus). (b) PSF obtenue dans le cas 3 (masque vert) du Tableau II.1 avec un alignement imparfait : la largeur à mi-hauteur dans l'axe z est de 900. On devine également la présence d'aberrations optiques. (c) PSF obtenue dans le cas 3 (masque 'vert') avec un alignement optimisé de la feuille de lumière : on mesure une largeur à mi-hauteur d'environ 400 nm. Barre d'échelle : 1 μm .

Cependant les paramètres ne sont ici pas encore optimaux en regard de nos objectifs. En effet, afin de permettre l'imagerie de cellule entière voir de petits agrégats cellulaires, il faudrait avoir une feuille de lumière ayant au moins 20 μm de profondeur de champ. Aussi, le sectionnement optique de la feuille de lumière LBS créée à l'aide du masque 'vert' est bien plus fin que nécessaire car notre objectif n'est pas de réduire drastiquement la PSF globale, mais de limiter l'illumination en dehors de la profondeur de champ de notre objectif pour réduire le bruit lors d'acquisitions SMLM. Un ajustement des dimensions du système doit donc être réalisé afin de créer une feuille de lumière ayant une frange centrale légèrement plus épaisse mais possédant aussi un paramètre confocal plus grand. Bien sur, les paramètres d'une telle feuille de lumière doivent être déterminés avec précision afin de ne pas augmenter l'interfrange et donc potentiellement augmenter leur impact sur la PSF global du système. Une étude plus poussée des dimensions optimales pourrait permettre de trouver le meilleur compromis.

On remarque également sur la Figure II.12 que la forme de la PSF globale est dépendante de l'alignement du système, en particulier de la superposition précise de la frange centrale de la feuille de lumière sur le plan focal de l'objectif. En effet, la Figure II.12.b présente une PSF plus étendue en z que la Figure II.12.c. La différence expérimentale entre ces deux

figures provient d'un défaut de cette superposition. Cela met en évidence l'importance de l'alignement précis du faisceau d'excitation avec le plan observé et de la synchronisation de leur déplacement respectif selon l'axe z pour l'acquisition de volumes 3D.

II.3.2.3. Limites de l'implémentatoin de faisceaux non-diffractifs sur le système soSPIM

II.3.2.3.1. Forte sensibilité aux imperfections

Les faisceaux non diffractifs sont issus de l'interférence d'un ensemble d'ondes, idéalement planes, convergeant toutes suivant un angle unique θ par rapport l'axe de propagation du faisceau (Figure II.1). Les systèmes interférentiels comme ceux-ci requièrent que les ondes interférant ensemble soient cohérentes entre elles. Ils sont donc particulièrement sensibles à des petites variations pouvant déphaser ces ondes entre elles, ou casser leur cohérence relative. La technologie soSPIM repose sur l'utilisation de dispositifs microfabriqués présentant des miroirs à 45° , sur lesquels le faisceau laser est réfléchi afin de créer une feuille de lumière perpendiculaire à l'axe optique de l'objectif (section I.5). Deux principales sources d'imperfections sont alors susceptibles d'avoir un impact important sur la qualité de feuilles de lumière non diffractives : la qualité optique des miroirs à 45° et l'alignement du système optique.

Concernant les miroirs microfabriqués, les moindres imperfections en termes de planéité, ou d'homogénéité du revêtement métallique, peuvent directement impacter la qualité du faisceau non diffractif créé. Ces imperfections peuvent avoir plusieurs sources plus ou moins aisément corrigibles. Tout d'abord, la qualité du masque primaire en silicium est fondamentale pour assurer une planéité parfaite des surfaces à 45° . Or leur production est très sensible à de nombreux paramètres. Si ce savoir-faire est maîtrisé par nos collaborateurs à Singapour, les masques produits présentent parfois de légères imperfections aléatoirement réparties. Il serait donc nécessaire de trier les parties de masques de qualité suffisante pour ce genre d'application ce qui induirait de fortes contraintes lors de leur fabrication, difficilement envisageable pour une utilisation en routine. D'autre part, les techniques de réplication du masque primaire par lithographie utilisent des polymères UV non rigides. Si ces polymères permettent de reproduire fidèlement les structures voulues, et d'adapter leurs propriétés optiques et chimiques à nos applications (transparence, indice de réfraction, métallisation, cytocompatibilité), les nombreuses étapes de fabrication peuvent produire des contraintes mécaniques et mener à de légères imperfections sur les miroirs. Ces imperfections n'ont généralement que peu d'impact sur la création de feuilles de lumière Gaussienne, mais peuvent être beaucoup plus dommageables pour la formation de faisceau par interférences de plusieurs ondes entre elles. Un important travail mené en partie par Miguel Sambrano, ingénieur d'étude en microfabrication au sein de notre équipe, a permis de réduire de beaucoup ces imperfections depuis, mais ces dernières ont posé d'importants problèmes à l'époque de l'étude de faisabilité de ce type de faisceaux sur le système soSPIM.

Un autre défi que nous avons rencontré a concerné l'alignement du système optique. En effet comme le montre la Figure II.13, la LBS est une feuille de lumière statique qui ne nécessite pas de balayage selon l'axe du miroir (axe y , Figure II.13). Il est donc nécessaire de parfaitement aligner son axe à l'axe du miroir, contrairement à une feuille de lumière créée par balayage, où l'axe du miroir peut être facilement pris en compte grâce à la combinaison du mouvement des deux miroirs galvanométriques GMX et GMY. Or, le positionnement du miroir peut aisément varier d'une expérience à une autre car il dépend du positionnement précis du dispositif sur la platine du microscope (rotation autour de z), difficilement réalisable manuellement à la précision requise. Il est donc nécessaire d'ajuster l'orientation de l'axe de

la feuille de lumière optiquement. Cela peut se faire en agissant directement sur le système optique, c'est-à-dire en tournant la fente utilisée pour créer la forme linéaire (Figure II.8). Toutefois, cela peut facilement induire une perte de l'alignement du système modifiant le profil et/ou l'alignement de la feuille de lumière.

D'autre part, l'utilisation de miroirs à 45° pour la création d'une feuille de lumière effectivement perpendiculaire à l'axe optique de notre objectif nécessite de contrôler précisément l'angle du faisceau en sortie d'objectif (Figure II.13-b). Si cela peut être aisément réalisable à l'aide de faisceaux à symétrie circulaire (faisceau gaussien) grâce au miroir d'assiette implémenté dans le système optique soSPIM (MA - Figure II.8), cet alignement devient beaucoup plus délicat pour des feuilles planaires dont on ne peut percevoir le profil.

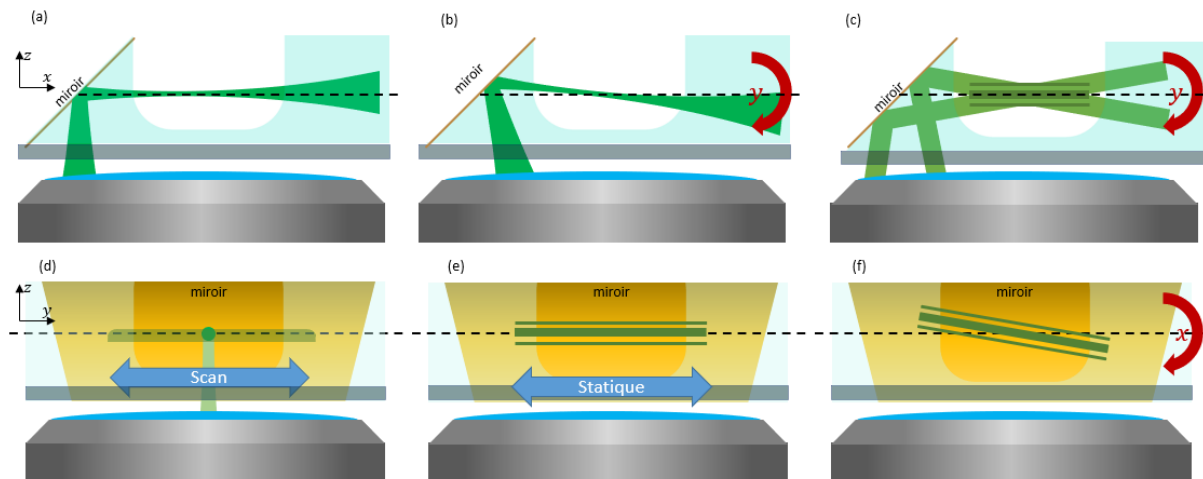


Figure II.13 : Alignement de la feuille de lumière avec soSPIM. (a,b) avec un faisceau gaussien, il est nécessaire d'orienter l'assiette autour de l'axe y (plan (x, z)), grâce au miroir MA (Figure I.37). (c) Cet ajustement est nécessaire pour tout type de faisceau, y compris les LBS. (d) lorsque l'on utilise une feuille de lumière créée par balayage d'un faisceau circulaire, l'orientation de la feuille de lumière autour de l'axe x (plan (y, z)) est déterminée par l'orientation du balayage réalisé par les 2 miroirs galvanométriques GMX et GMY, et aucun alignement n'est nécessaire. (e) dans le cas d'une feuille de lumière à symétrie planaire, comme les LBS, cette orientation autour de l'axe x est définie par l'orientation de la fente (Figure II.8). Il est donc nécessaire d'ajuster cette orientation en fonction du positionnement du dispositif soSPIM, sous peine d'obtenir une LBS non alignée avec le plan observe (f).

Pour pouvoir utiliser les feuilles de lumière LBS de manière stable et répétable, il est donc nécessaire de mettre en place des solutions motorisées, voire automatiques, d'alignement du système combinées à des moyens précis de contrôle de l'alignement des différentes parties du système optique. Toutefois, du fait de l'existence d'autres limites à l'utilisation de feuilles LBS sur la configuration soSPIM (II.3.2.3.2 ci-dessous) nous avons choisis de ne pas poursuivre dans cette direction.

II.3.2.3.2. Limite de la profondeur d'imagerie

Une dernière limitation importante à l'utilisation de feuille de lumière de type LBS concerne directement la taille limitée des miroirs utilisés pour l'imagerie soSPIM et la distance des échantillons vis à vis de ces miroirs. En effet, les miroirs à 45° des dispositifs microfabriqués couvrent uniquement l'épaisseur du puits : pour un dispositif soSPIM standard, le puits et le miroir font tous deux environ 40 μm de profondeur, et les échantillons disposés au milieu de puits sont situés à environ 40 μm du milieu des miroirs. Afin de positionner la feuille de lumière au niveau de l'échantillon pour assurer un sectionnement optique optimale il est donc nécessaire de défocaliser le faisceau d'excitation d'une distance de 40 μm en milieu de miroir. Il aura donc une certaine taille sur les miroirs en fonctions de son ouverture.

On a remarqué précédemment (Figure II.10) que dans les conditions testées, le faisceau de Bessel occupe l'ensemble du miroir pour pouvoir créer le cône de lumière : Ce dernier présente un angle d'ouverture de 35° , et une étendue du cône au niveau du miroir du dispositif de $30\ \mu\text{m}$ en positionnant la LBS au niveau de l'échantillon. En comparaison, pour obtenir une profondeur de champ équivalente ($12\ \mu\text{m}$), un faisceau gaussien de diamètre $2\ \mu\text{m}$ ($1/e^2$) aurait un angle d'ouverture de 18° , et s'étendrait sur environ $15\ \mu\text{m}$ au niveau du miroir. Cette différence d'ouverture pour la création de faisceaux LBS et gaussien ayant un même paramètre confocal limite drastiquement la profondeur d'imagerie en empêchant le déplacement axial de la feuille sans couper une partie des faisceaux par le haut ou le bas du miroir (Figure II.14). Ce problème est aussi présent dans une moindre mesure pour la création de faisceau gaussien. Toutefois, les faisceaux gaussiens n'étant pas créés par un phénomène d'interférence, le rognage d'une partie du faisceau impactera de façon moins importante les propriétés du faisceau créé que dans le cas des LBS. Cette limite pourrait être réduite en diminuant l'ouverture du faisceau utilisé pour créer la LBS. Pour ce faire, il faudrait réduire la taille du masque annulaire au plan focal arrière. Cela aurait également pour conséquence d'augmenter la profondeur de champ du faisceau, l'interfrange, et l'épaisseur de la frange centrale, ce que nous souhaitons éviter. En effet, un interfrange plus grand impliquerait l'impossibilité de positionner les franges secondaires sur le minimum de détection de l'objectif. Le signal produit par ces franges serait alors détecté par l'objectif, créant un bruit de fond que nous souhaitons éviter pour l'imagerie SMLM.

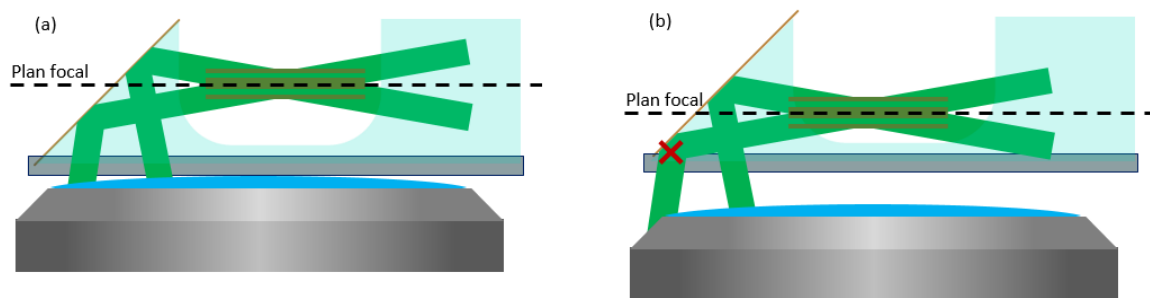


Figure II.14 : Limite de profondeur d'imagerie en illumination LBS. (a) lorsqu'on image le centre du puits, le cône de lumière occupe une part importante du miroir à 45° . (b) pour ajuster la profondeur illuminée en fonction de la profondeur observée, il est nécessaire de déplacer le faisceau sur le miroir à 45° . Dans le cas du LBS, cela limite zone d'imagerie.

II.4. Conclusions et perspectives

Nous avons montré qu'il était possible d'implémenter des faisceaux non diffractifs sur le système soSPIM, en particulier les faisceaux de type LBS, décrits par Zhao et al., en 2016¹²⁵. Nous avons pu créer une feuille de lumière à trois franges, dont la frange centrale a une épaisseur $450\ \text{nm}$ pour une profondeur de champ de $12\ \mu\text{m}$. La différence avec un faisceau gaussien classiquement utilisé est importante, puisqu'un faisceau gaussien dont le diamètre est de $500\ \text{nm}$ présente un paramètre confocal inférieur à $1\ \mu\text{m}$. Les franges secondaires de cette LBS peuvent également être positionnées de sorte à être drastiquement atténuées par la PSF de détection de l'objectif, limitant ainsi le bruit provoqué par l'illumination hors plan objet. Aussi, si les paramètres proposés par cette LBS peuvent encore être améliorés en particulier pour agrandir encore la taille du champ de vue, cette démonstration a permis d'illustrer l'intérêt de ce type de faisceau pour dépasser les compromis usuels à faire avec l'utilisation de faisceau gaussien.

Une limite importante à l'utilisation de ces faisceaux dans la configuration soSPIM s'est toutefois imposée à nous : les dimensions des miroirs à 45° des dispositifs microfabriqués ne

permettent pas à la LBS d'être balayée le long de l'axe y pour suivre le plan focal de l'objectif lors de l'imagerie de volumes conséquents. Pour contourner ce problème, deux solutions peuvent être envisagées. La première est de diminuer l'ouverture du faisceau créant la LBS. Cela permettrait d'augmenter légèrement le volume atteignable par la feuille de lumière, mais la marge de manœuvre de cet ajustement est très faible puisque ce paramètre est lié aux caractéristiques du faisceau désiré, telles que la profondeur de champ, l'épaisseur de la feuille de lumière, ou le positionnement des franges secondaires. Une autre solution serait d'adapter les dispositifs microfabriqués, en imaginant une conception permettant des miroirs à 45° plus grands. Cependant, cela impliquerait un positionnement des échantillons plus en profondeur ce qui aurait un impact sur la détection des molécules individuelles avec l'apparition d'aberrations optiques plus importantes comme nous le verrons dans le chapitre suivant.

Enfin, les faisceaux non diffractifs sont créés par interférences de plusieurs ondes et sont donc très sensibles aux imperfections. Or la méthode de fabrication actuelle des dispositifs soSPIM entraîne certaines imperfections sur la qualité des miroirs, et ce malgré l'expertise de nos collaborateurs. Des développements importants en termes de microfabrication devraient alors être faits afin d'améliorer la robustesse et la reproductibilité du processus de fabrication dans le but de les rendre compatible avec la création et l'utilisation de ce type de feuille de lumière en routine, ce qui n'est pas l'objectif de mon travail de thèse.

En mettant en perspective les contraintes imposées par ce type d'illumination, les développements supplémentaires nécessaires et l'apport du faisceau non diffractif pour notre application, il nous a semblé peu intéressant de poursuivre le travail dans cette direction. Le faisceau gaussien, bien qu'imparfait, permet un sectionnement optique satisfaisant pour l'imagerie par SMLM en profondeur, et nous avons donc décidé de réorienter nos développements vers les autres défis posés dans ce projet de recherche.

Les travaux menés jusqu'à cette étape ont cependant apporté quelques informations et outils qui pourront servir à de futurs projets. En effet, en plus de m'avoir permis de prendre en main le système optique bien au-delà d'une utilisation classique, une utilisation possible de ces découvertes serait l'implémentation de la microscopie super-résolue par illumination structurée (SIM) sur la configuration soSPIM. En effet, la structure périodique des faisceaux non diffractifs de type LLS peut être utilisée pour créer une illumination structurée, et les algorithmes de SIM permettent alors d'augmenter la résolution au-delà de la limite de diffraction, et d'augmenter le sectionnement optique^{87,99,134,135}. Toutefois, la géométrie des microscopes à feuille de lumière ne permet pas de faire tourner les motifs de structuration de ce type d'illumination dans le plan d'imagerie ce qui est nécessaire afin de permettre un gain en résolution selon les deux axes x et y . Les démonstrations réalisées jusqu'à présent permettent donc d'améliorer la résolution selon un axe uniquement perpendiculaire à la direction de propagation de la feuille de lumière. La configuration soSPIM pourrait permettre de dépasser cette limitation. En effet, il est tout à fait envisageable de créer des dispositifs d'imagerie présentant des miroirs orientés selon plusieurs angles autour du puits contenant l'échantillon à imager. Les dispositifs *JeWells* disposent ainsi de 4 orientations et des travaux menés par Rémi Galland ont montré la possibilité de fabriquer des dispositifs avec 6 orientations différentes. La combinaison de mes travaux avec ces dispositifs pourrait donc permettre d'améliorer la résolution selon les deux axes de l'image contrairement aux configurations standard des microscopes à feuille de lumière. Cela permettrait d'apporter au soSPIM la possibilité d'acquérir des images avec une résolution spatiale plus petite que la limite de diffraction, tout en conservant une résolution temporelle élevée et une faible phototoxicité, et donc d'observer en détail des dynamiques rapides sur des cellules vivantes.

Chapitre III : Optimisation de la détection - Correction des aberrations optiques

L'imagerie par SMLM requiert la localisation de molécules individuelles à partir de la forme de leur figure de diffraction créée sur le détecteur. La plupart des méthodes, dont la nôtre ⁵⁶, sont basées sur un ajustement gaussien de ces figures de diffraction. Ces méthodes sont d'autant plus précises que la figure est proche d'une fonction gaussienne. Dans la section I.3.3.3, nous avons également introduit l'équation de Thomson (Équation I.34) qui indique que la précision de localisation est fortement dépendante du nombre de photons collectés, et de la taille de la figure de diffraction. De manière générale, quelle que soit la méthode de localisation utilisée, le nombre de photons collecté est toujours déterminant dans la précision de localisation.

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'un des défis majeurs liés à l'imagerie en profondeur : les aberrations optiques. Les aberrations optiques représentent les défauts optiques du système d'imagerie, et ont pour effet de déformer sa PSF. En microscopie haute résolution comme en SMLM, la conséquence de ces aberrations est une réduction de la résolution d'imagerie. Dans ce chapitre, je vais dans une première partie introduire le concept d'aberration optique. Je décrirai les principales aberrations rencontrées en microscopie, leurs origines et leurs conséquences, en particulier pour la SMLM. Nous verrons que les aberrations sphériques, qui apparaissent avec la profondeur d'imagerie, réduisent significativement la résolution spatiale. J'exposerai alors les solutions pour mesurer ces aberrations, ainsi que celles permettant de les corriger, avant de développer la solution que nous avons implémentée sur notre microscope soSPIM : l'optique adaptative. Enfin, nous verrons les résultats obtenus grâce à cette solution de correction des aberrations, avant de discuter de ses limites.

III.1. Aberrations optiques en microscopie

III.1.1. Formalisme de Zernike

Dans la section I.1.2.5, nous avons introduit l'optique de Fourier, ainsi que l'effet d'une lentille sphérique sur une onde lumineuse. Nous avons vu en particulier que la PSF d'une lentille, ou d'un objectif de microscope, est définie comme la transformée de Fourier de sa fonction de pupille (Équation I.26) :

$$PSF = \left| \mathcal{F} \left[A(k_x, k_y) e^{i\Phi(k_x, k_y)} e^{2i\pi k_z z} \right] \right|^2$$

Ainsi, dans le cas d'un système idéal, un émetteur ponctuel émet une onde sphérique, qui, après traversée de l'objectif, devient une onde plane (ou inversement). Cependant, comme le montre la Figure III.1, une imperfection présente sur le chemin optique peut mener à une déformation du front d'onde. Cette déformation résulte de variations spatiales incontrôlées du chemin optique parcouru par la lumière au travers de cette imperfection. Dans l'Équation I.26, ces déformations se traduisent par une modification du terme de phase

$\Phi(k_x, k_y)$ et sont nommées aberrations optiques. Ainsi, en modifiant la phase d'un système, les aberrations optiques ont pour effet de déformer sa PSF.

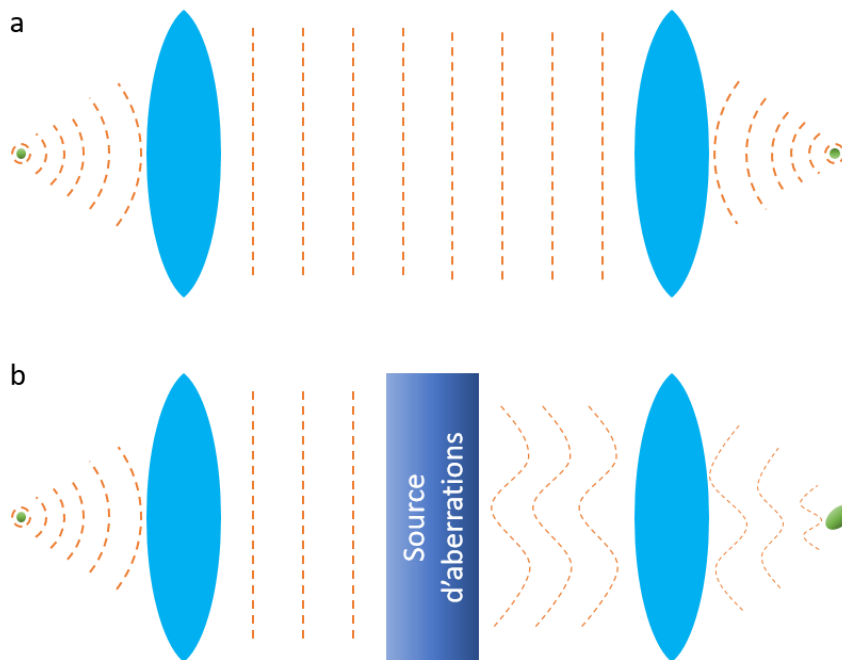


Figure III.1 – Effet d'une source d'aberrations sur une onde. Une imperfection du système a pour effet de modifier la phase de l'onde lumineuse. Le résultat est une onde dont le front d'onde est déformé, ce qui implique une déformation de la PSF du système

Le meilleur moyen de mesurer les aberrations d'un système est d'observer directement le front d'onde produit par un émetteur ponctuel, c'est-à-dire plus petit que la limite de diffraction. Sur le plan de Fourier, ce front d'onde doit être plan pour un système parfait. En cas de présence d'aberrations, ce front d'onde est déformé, et la fonction d'aberration est définie comme étant la distance optique entre la surface du front d'onde déformée et une surface plane. Pour quantifier et décrire ces déformations, plusieurs travaux ont été menés afin de décomposer cette fonction d'aberrations en déformations unitaires et orthogonales. C'est le cas de la représentation selon les polynômes de Zernike¹³⁹.

Ces polynômes sont appelés ainsi en référence à Frederik Zernike, qui en fit le développement en 1934^{5,6}. Ce sont des polynômes continus et orthogonaux sur un cercle d'unité. De plus, les aberrations les plus répandues sont décrites par les premiers polynômes de Zernike (Figure III.2). C'est la raison pour laquelle elle est aujourd'hui très largement utilisée, en particulier pour décrire la propagation des fronts d'onde à travers les systèmes optiques présentant une ouverture circulaire. On peut ainsi décomposer le front d'onde Φ de la façon suivante :

Équation III-1

$$\Phi(x, y) = \sum_k a_k z_k(x, y)$$

Avec z_k le polynôme de Zernike d'ordre k , et a_k le coefficient de Zernike associé à ce polynôme. Les coefficients a_k représente ainsi l'amplitude de chacune des aberrations présentes dans un système optique.

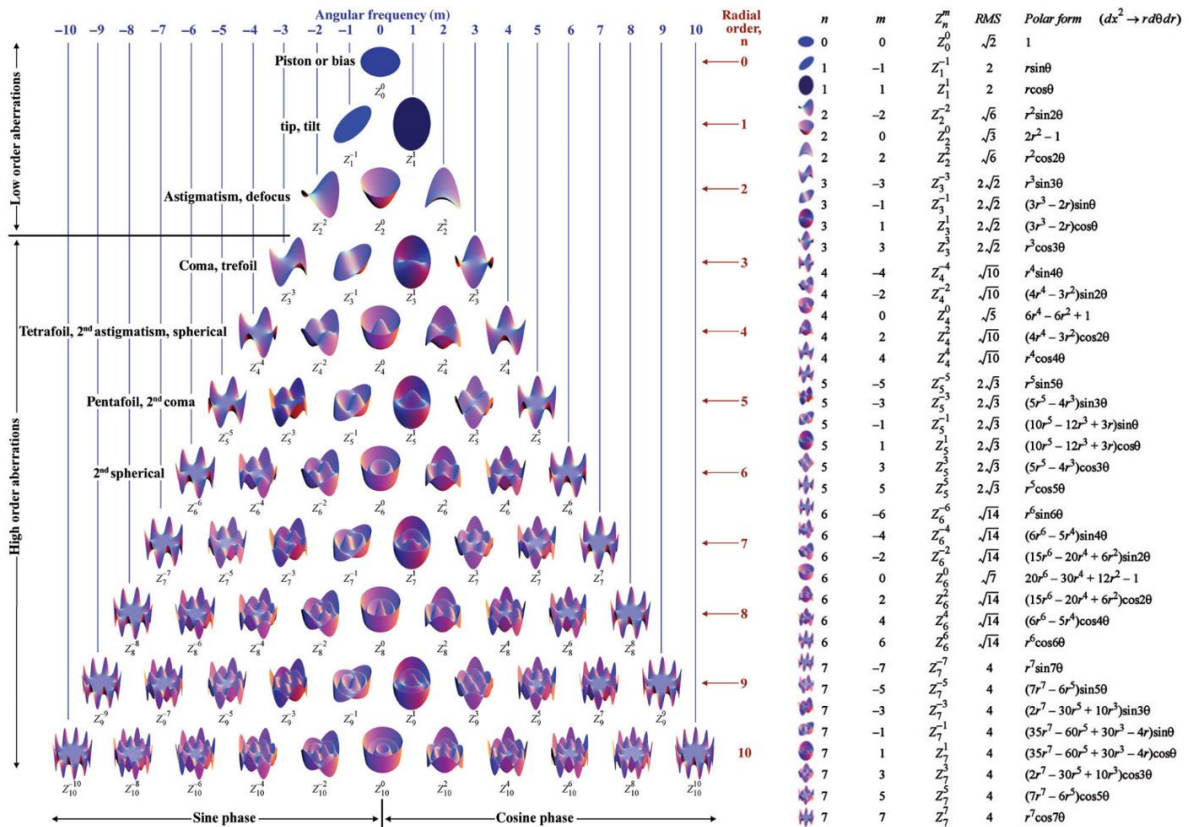


Figure III.2 — Surface d'onde associée à quelques polynômes de Zernike. Adapté de Lakshminarayanan et al. 2011¹³⁹. Cette figure représente la surface d'onde associée aux 10 premiers ordres des polynômes de Zernike. Ces polynômes forment une base orthonormée, permettant de décrire les surfaces d'onde. Les noms des aberrations les plus communes associées à certains de ces polynômes sont également indiqués, ainsi que les polynômes correspondants décrits en coordonnées polaires.

III.1.2. Aberrations optiques : origines et conséquences.

III.1.2.1. Principales aberrations optiques rencontrées en microscopie.

Les aberrations les plus couramment rencontrées en microscopie de fluorescence sont les aberrations sphériques, l'aberration comète (plus souvent appelé coma, par anglicisme) et l'astigmatisme. Elles sont représentées sur la Figure III.3(a-c). Cette figure représente également l'aberration chromatique Figure III.3.d bien que celle-ci ne nous concerne pas directement dans cette thèse. Elle est liée à la dispersion de vitesse de groupe des matériaux¹⁴⁰ due à la dépendance de l'indice de réfraction du milieu en fonction de la longueur d'onde, et n'est pas décrite par le formalisme de Zernike. Cette dispersion implique que le foyer d'une lentille sphérique est dépendant de la longueur d'onde. Les objectifs modernes sont achromatiques, c'est-à-dire corrigés des aberrations chromatiques grâce à la combinaison de nombreuses lentilles de formes et matériaux différents. Cependant, les résolutions atteintes par SMLM sont supérieures à la précision de cette correction, et l'aberration chromatique peut s'avérer problématique lorsque l'on utilise plusieurs fluorophores différents pour l'imagerie multicolore. Généralement, un ajustement des images par traitement informatique est suffisant pour traiter ces aberrations, bien que des systèmes utilisant des éléments dispersifs puissent nécessiter une correction physique^{141,142}.

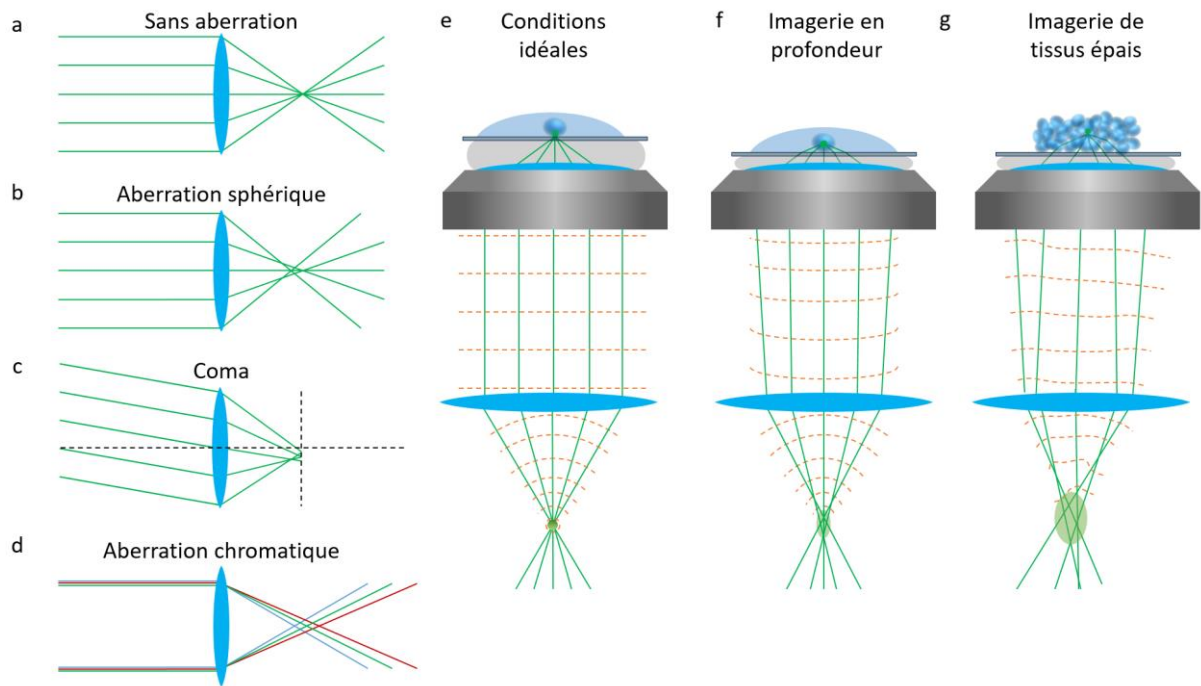


Figure III.3 — Aberrations optiques. (a-d) Exemples d'aberrations typiquement observées en microscopie optique. (a) Avec un système optique idéal, chacun des rayons lumineux qui traversent le système optique se croisent en un unique point. Le système est dit « stigmatique ». (b) L'aberration sphérique a pour effet de concentrer plus ou moins fortement les rayons provenant de la périphérie de la lentille. (c) Le coma est une aberration qui apparaît lorsque le système n'est pas convenablement aligné. (d) La plupart des matériaux ont un indice de réfraction dépendant de la longueur d'onde de la lumière. L'aberration chromatique est une conséquence de cette propriété : le plan focal est différent pour chaque longueur d'onde. (e) Les objectifs modernes sont corrigés à l'infini, ce qui signifie qu'ils ne présentent pas d'aberrations, lorsqu'on les utilise dans les conditions idéales. (e) Lorsque le milieu d'immersion de l'objectif et le milieu d'imagerie sont différents, des aberrations sphériques peuvent apparaître en profondeur. (g) Pour l'imagerie d'échantillons épais, tels que les tissus, l'échantillon lui-même participe à la perturbation de l'onde, ce qui crée également des aberrations.

Les aberrations sphériques (Figure III.3.b.) sont certainement les aberrations les plus fréquemment rencontrées en microscopie et sont caractéristiques des lentilles sphériques^{143,144}. Elles induisent une asymétrie de la PSF selon z , ainsi que l'étalement de son intensité dans le plan (x, y) . Elles résultent du fait que le plan focal varie suivant l'éloignement des rayons vis-à-vis du centre optique du système. Ces aberrations apparaissent donc principalement lorsque l'on s'éloigne des conditions de Gauss, ce qui est le cas des objectifs de microscope à forte ouverture numérique, capables de collecter les photons selon un très grand angle (jusqu'à 80° pour un objectif à huile d'ON 1.49). Une autre source importante d'aberrations sphériques, et particulièrement problématiques pour notre utilisation, provient des différences d'indices de réfraction entre le milieu d'imagerie et le milieu d'immersion de l'objectif. Les objectifs modernes sont corrigés des aberrations sphériques, mais cette correction n'est en général valable qu'à proximité de la lamelle. Ainsi, lors d'imagerie en profondeur, de quelques micromètres à plusieurs dizaines de micromètres au-dessus de la lamelle, on observera systématiquement l'apparition d'importantes aberrations sphériques (III.3.2). L'imagerie par SMLM en profondeur doit donc absolument prendre en compte ces aberrations, et si possible les corriger, afin de pouvoir atteindre les meilleures résolutions possibles.

L'aberration de coma (Figure III.3.c.) peut également être rencontrée en microscopie lorsque le système optique n'est pas parfaitement aligné. C'est le cas par exemple si la lamelle de microscope sur laquelle repose l'échantillon n'est pas correctement positionnée, et n'est pas perpendiculaire à l'axe optique. Elle est appelée ainsi du fait de la forme de PSF qu'elle

produit, semblable à une comète. Elle est plus fréquemment observée avec des objectifs à eau ou à silicone qu'avec des objectifs à huile, car l'écart d'indice entre le milieu d'immersion et la lamelle est plus important¹⁴⁵. Elle apparaît également sur les zones extérieures du champ de vue des objectifs, bien que les objectifs modernes soient en très grande partie corrigés de ce type d'aberrations.

Enfin, une dernière aberration fréquemment rencontrée en microscopie est l'astigmatisme. Elle provient du fait que la position du plan focal est différente selon l'axe (x ou y) et provoque un allongement latéral de la PSF en fonction de la position axiale z de l'émetteur ponctuel. Outre l'induction volontaire d'astigmatisme pour permettre une localisation 3D en SMLM (section I.3.3.2.2), cette aberration témoigne en général de la déformation cylindrique d'un élément optique. Elle peut ainsi apparaître dans les systèmes où des contraintes mécaniques sont appliquées sur les éléments optiques, tels que la lamelle de microscopie.

En plus de celles induites par les imperfections optiques du système d'imagerie, l'échantillon biologique lui-même peut produire des aberrations. En effet, les échantillons présentent une variété d'indices de réfraction, répartis de manière chaotique dans l'espace. Ainsi, lors de la traversée d'un échantillon biologique, l'onde lumineuse rencontre ces différents indices de réfraction, et subit donc un chemin optique $\mathcal{L}(n(x, y))$ spatialement variable. Dans l'équation Équation I.26 rappelée plus haut (III.1.1), cela implique une variation totalement imprévisible de la phase $\phi(k_x, k_y)$, aboutissant à une PSF qui peut être largement déformée. Ces distorsions de la phase sont fortement dépendantes de l'échantillon, et sont principalement observées en profondeur dans les tissus épais où la lumière doit traverser de nombreuses cellules¹⁴⁶. Pour leur prise en compte, on estime généralement que ces aberrations peuvent être considérées comme constantes à l'intérieur d'un volume dit « isoplanétique ». Toutefois, les dimensions de ce volume isoplanétique dépendent de la complexité de l'échantillon et ne sont pas facilement quantifiables.

III.1.2.2. Conséquences des aberrations pour la SMLM

En SMLM, les aberrations optiques ont un impact important sur la résolution finale. La Figure III.4 représente cet impact pour les trois principales aberrations rencontrées en microscopie. Le premier effet des aberrations optiques est d'étaler la PSF du système. Cet étalement, ainsi que la perte d'intensité associée, induit une diminution de la précision à laquelle il est possible de localiser des molécules individuelles (I.3.3.3).

D'autres aberrations comme le coma ont tendance elles à déplacer latéralement le maximum d'intensité de la PSF. Ce déplacement induit un biais latéral dans la localisation des molécules individuelles par rapport à leur position réelle soit une perte de justesse de localisation dans le plan d'imagerie. Les aberrations sphériques ont également tendance à déplacer le maximum d'intensité de la PSF, mais cette fois-ci selon l'axe de l'objectif, induisant une perte de justesse de localisation axiale. Nous reviendrons sur cela en section III.3.2.2.1.

Les déformations de PSF induites par les aberrations optiques ont également d'autres conséquences potentiellement très néfastes sur les performances d'imagerie par SMLM : pour les méthodes de localisation basées sur un modèle théorique fixe, telles que les méthodes utilisant un ajustement gaussien, cette déformation induit un écart entre la PSF expérimentale et le modèle. Comme nous le verrons en section III.3.2.2.1, les biais de localisation 3D induits par ces déformations peuvent être importants, et mener à l'apparition d'artefacts ou fausser la reconstruction des structures imagées^{147,148}. Afin d'atteindre les meilleures résolutions possibles en SMLM, il est donc nécessaire de corriger toutes les

sources d'aberrations impactant à la fois la précision et la justesse de localisations des molécules détectées.

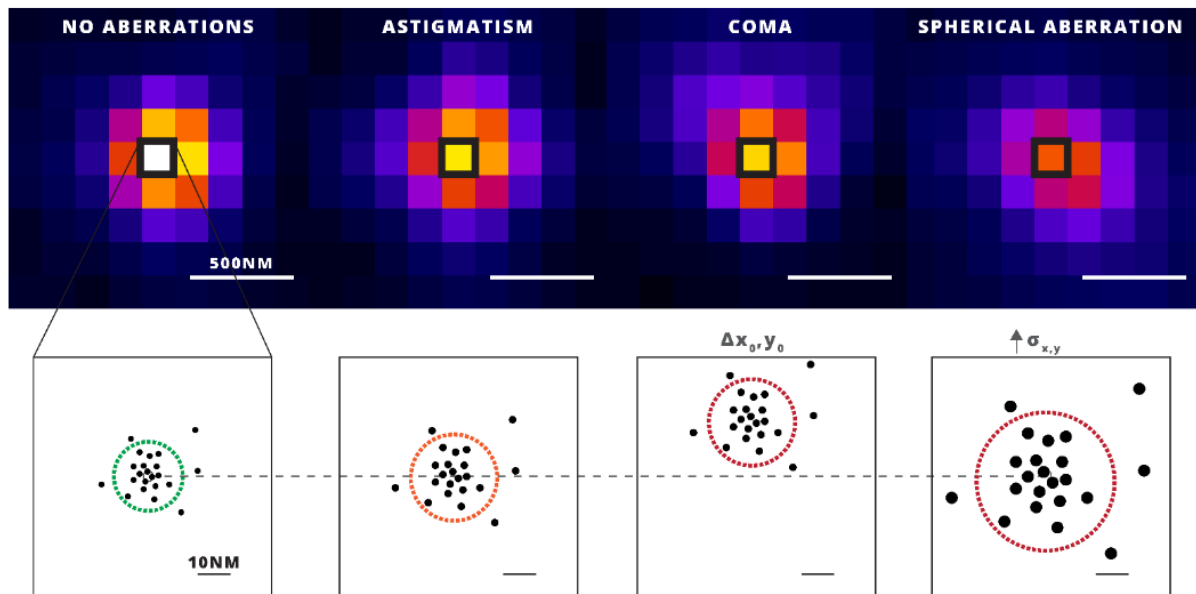


Figure III.4 — Effet des aberrations sur la précision et la justesse de pointe. Adapté de Butler, 2017¹⁴⁹. L'astigmatisme, parfois introduit volontairement pour pouvoir localiser les molécules en 3 dimensions, a pour effet de déformer et étaler la PSF, ce qui réduit la précision de localisation. L'aberration de coma a pour conséquence un déplacement latéral du maximum d'intensité, ce qui induit un biais de localisation, et donc une perte de justesse. L'aberration sphérique quant à elle induit un étalement latéral de la PSF du système, et réduit le nombre de photons collectés au plan focal objet, ce qui implique une perte de précision de localisation.

III.1.3. Méthodes de correction des aberrations

L'aberration de coma et l'astigmatisme peuvent tous deux être très fortement minimisés en positionnant avec soin la lamelle à imager sur le microscope pour prévenir tout angle ou déformation de la lamelle. Les aberrations sphériques sont quant à elles inhérentes à l'utilisation d'objectifs à forte ouverture numérique et à l'utilisation de lamelle de verre. Les objectifs modernes sont généralement équipés d'une bague de correction permettant de s'adapter à de faibles variations des conditions d'imagerie (épaisseur de lamelle, température...) en ajustant la correction des aberrations sphériques. Toutefois, ces aberrations évoluent avec la profondeur d'imagerie. Le système générera donc systématiquement d'importantes aberrations sphériques en profondeur, qu'il est nécessaire de prendre en compte et de corriger.

Pour minimiser ces aberrations sphériques et permettre une imagerie en profondeur au-dessus de la lamelle, nous avons opté pour l'utilisation d'un objectif à immersion à eau à forte ouverture numérique (WI 60x — NA 1.27). En effet, les milieux d'imagerie sont souvent des milieux aqueux dont l'indice de réfraction est proche de celui de l'eau. En faisant correspondre les indices du milieu d'imagerie avec celui du milieu d'immersion, nous limitons l'évolution des aberrations sphériques en fonction de la profondeur. Cependant, nous verrons que malgré la correspondance des indices de réfraction, nous observons toujours l'apparition d'aberration sphérique (III.3.2.1). Ainsi, nous avons dû mettre en œuvre une solution de correction des aberrations plus avancée (III.3.1).

En ce qui concerne les aberrations induites par l'échantillon, une solution pour les limiter consiste à « transparer » l'échantillon à observer. Le principe de la transparençation est d'altérer les propriétés optiques des tissus biologiques, dans le but de les rendre transparents et d'homogénéiser les indices de réfraction du tissu^{150,151}. Cette homogénéisation des indices

permet de fortement limiter les aberrations optiques induites par l'échantillon et d'améliorer la profondeur d'imagerie. Ce type d'approche est très utilisé pour l'imagerie de gros échantillons tels que des tissus entiers, des tranches de cerveau, des sphéroïdes ou des organoïdes. Toutefois, ces techniques de transparence altèrent l'échantillon ce qui les rend incompatibles avec l'observation d'échantillons vivants. Dans cette thèse, les échantillons que nous avons cherché à observer sont des cellules individuelles. Les aberrations qu'elles induisent sont donc négligeables et nous n'avons pas cherché à les corriger.

Les techniques permettant de limiter les aberrations provenant du système optique (bague de l'objectif, milieu d'immersion) ou des échantillons (transparence) présentées jusqu'ici sont des techniques passives et restreintes dans leur capacité de correction. Il existe une autre classe de méthodes permettant de corriger ces aberrations de façon active, c'est-à-dire pouvant évoluer au cours du temps et en fonction du système considéré : il s'agit des méthodes d'optique adaptative.

III.2. Optique Adaptative

Les systèmes d'optique adaptative sont constitués de deux éléments : un analyseur de front d'onde permettant la mesure des aberrations, et un modulateur de front d'onde dont on peut changer la forme ou les propriétés optiques pour les corriger. Cette technique, tirée de l'astronomie¹⁵², a fait son entrée en microscopie depuis les années 2000^{153,154}. Initialement, elle a été proposée pour l'imagerie en profondeur par microscopie confocale et 2 photons, où les aberrations induites par les échantillons eux-mêmes sont importantes. Aujourd'hui, l'utilisation de l'optique adaptative devient de plus en plus courante¹⁵⁵ avec l'arrivée de solutions commerciales, et son utilisation pour des techniques d'imagerie en champ large¹⁵⁶⁻¹⁵⁸, y compris pour en SPIM¹⁵⁹.

Son principe théorique est simple : si les aberrations à corriger sont connues, un modulateur de front d'onde peut introduire une distorsion du front d'onde inverse à ces aberrations, afin de les minimiser, voire de les annuler avant la formation de l'image. Ce concept permet en théorie de corriger toutes les aberrations, mais à condition de les connaître. Les dispositifs de modulation de front d'onde sont généralement assez simples et robustes dans leur utilisation, et la difficulté de l'utilisation de l'optique adaptative en microscopie réside principalement dans les méthodes de mesure des aberrations.

Dans cette section, je vais dans un premier temps exposer les principaux modulateurs de front d'onde utilisés en microscopie et décrire leurs avantages et limites. Nous verrons ensuite les méthodes possibles de mesures du front d'onde avant de développer la solution que nous avons choisi d'implémenter à notre système d'imagerie.

III.2.1. Systèmes de modulation du front d'onde

Les principaux systèmes de modulation du front d'onde utilisés en microscopie de fluorescence pour corriger des aberrations optiques sont les modulateurs spatiaux de lumière (ou SLM, de l'anglais Spatial Light Modulator) et les miroirs déformables (DM, de l'anglais Deformable Mirror).

Rigoureusement, SLM désignent l'ensemble des systèmes optiques permettant d'appliquer une modulation spatiale à la lumière, incluant même les rétroprojecteurs. Cependant, en microscopie lorsqu'on mentionne les SLM on fait référence aux systèmes électro-optiques principalement basés sur l'utilisation de cristaux liquides et qui permettent de modifier la phase d'une onde. Combinés à des séparateurs de faisceaux et des lames à retard, ils peuvent aussi servir à moduler l'intensité d'une onde lumineuse. Ces dispositifs ont de très

nombreuses applications en microscopie¹⁶⁰ en permettant de façonner très précisément la lumière que ce soit en excitation ou en détection. De façon non exhaustive, ils ont été utilisés en excitation pour : (1) façonner le faisceau d'excitation afin de réaliser des pinces optiques¹⁶¹ servant à piéger des cellules ou des billes, ou mesurer des forces de l'ordre du nano ou piconewton, (2) permettre l'excitation ciblée de volumes étendus, typiquement des neurones, en profondeur¹⁶², ou (3) réaliser des réseaux de diffraction et permettre une excitation multiphotons plein champ par focalisation temporelle⁸¹. En détection, les SLM ont été utilisés en imagerie par SMLM pour façonner la forme de la PSF afin d'y encoder la position axiale^{64,66,163} ou encore la couleur¹⁶⁴ des molécules individuelles. Enfin, ils sont aussi utilisés afin de corriger des aberrations optiques du système et des échantillons que ce soit en excitation^{159,165}, ou en détection¹⁶⁶. Les modulateurs spatiaux de lumière offrent l'avantage d'avoir une très grande résolution, avec des systèmes pouvant contenir plusieurs millions de pixels. Cela permet de corriger plusieurs zones simultanément pour l'imagerie de très grands champs de vue¹⁶⁶ ou la correction d'aberrations d'ordres supérieurs. Toutefois, les SMLM sont sensibles à la longueur d'onde et à la polarisation de l'onde incidente. Leur masque de phase doit donc être adapté pour chaque couleur et un contrôle de l'état de polarisation de l'onde incidente peut être nécessaire. Les SLM sont aussi généralement assez lents (≈ 60 Hz) en comparaison des DM, ce qui peut être un frein pour certaines applications où la correction des aberrations doit être fréquemment actualisée. Enfin, l'efficacité lumineuse de ces dispositifs n'est pas optimale, ce qui peut être particulièrement problématique en imagerie par SMLM, où toute perte de photons impacte la précision de localisation des molécules.

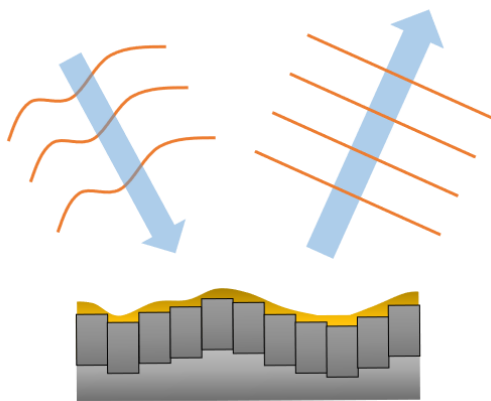


Figure III.5 – Principe de fonctionnement d'un miroir déformable. Le miroir déformable est constitué d'une membrane souple réfléchissante positionnée sur des actuateurs. La modification de la forme du miroir induit une variation latérale du chemin optique, qui se traduit par une déformation du front d'onde.

Les miroirs déformables (DM) sont constitués d'une membrane déformable et hautement réfléchissante positionnée sur des actuateurs ultras précis. Les mouvements de ces actuateurs sont généralement contrôlés par des systèmes piézoélectriques, électrostatiques, ou électromagnétiques. En déplaçant ces actuateurs, il est possible de modifier la forme de la membrane réfléchissante et donc d'induire une déformation de l'onde lumineuse réfléchie par le DM¹⁴⁸ (Figure III.5). Ces systèmes sont aujourd'hui de plus en plus présents en microscopie, essentiellement dans le but de corriger des aberrations et de mettre en forme la PSF du microscope^{146,155,167,168}. Les miroirs déformables ont été utilisés dans un premier temps en microscopie confocale et multiphotons, pour l'imagerie en profondeur où les aberrations provenant de l'échantillon déforment le faisceau

d'excitation, étalent spatialement la PSF, et réduisent ainsi la résolution. L'implémentation est en effet plus simple en microscopie par balayage, car le signal capté peut directement servir de métrique pour la correction des aberrations (III.2.2). Les DM ont également rapidement été implémentés sur les systèmes d'imagerie par SMLM, à la fois pour corriger les aberrations, et pour induire une déformation volontaire le PSF afin d'y encoder la position axiale des molécules¹⁶⁹.

Les DM présentent plusieurs avantages pour la correction des aberrations pour l'imagerie par SMLM. Tout d'abord, les DM utilisent une surface très fortement réfléchissante, insensible à la polarisation, et induisant très peu de perte de photons ce qui est un atout de

taille pour l'imagerie par SMLM. De plus, le chemin optique parcouru par la lumière est indépendant de la longueur d'onde, ce qui en fait des systèmes achromatiques. Enfin, ces dispositifs sont également très rapides et peuvent changer de forme à une vitesse atteignant plusieurs kilohertz pour certains systèmes commerciaux. Cependant, en comparaison des SLM, les miroirs déformables disposent d'une moins bonne résolution : les systèmes destinés à la microscopie possèdent uniquement quelques dizaines à une centaine d'actuateurs. Leur meilleure efficacité lumineuse les rend néanmoins plus intéressants pour l'imagerie par SMLM, et nous avons donc entrepris d'implémenter un système d'optique adaptative utilisant un miroir déformable à notre microscope soSPIM.

III.2.2. Méthodes de mesures des aberrations

III.2.2.1. Analyseur de front d'onde

Pour mesurer les aberrations, la méthode classique consiste à utiliser un analyseur de front d'onde. L'analyseur de Shack-Hartmann (SH) est l'analyseur de front d'onde le plus répandu¹⁷⁰ (Figure III.6). Il est constitué d'une matrice de microlentilles, positionnée à distance focale d'une caméra CCD. Cette matrice a pour effet d'échantillonner l'onde incidente, de telle sorte que chaque microlentille observe un front d'onde suffisamment petit pour être considérée comme plan. Lorsque chacune des microlentilles focalise une section d'onde sur la caméra, la déviation du point créé sur la caméra par rapport au centre optique de la microlentille indique le degré et l'orientation d'inclinaison de la section d'onde associée. En regroupant les informations obtenues par chaque microlentille, il devient possible de reconstruire la forme précise du front de l'onde incidente à l'analyseur SH.

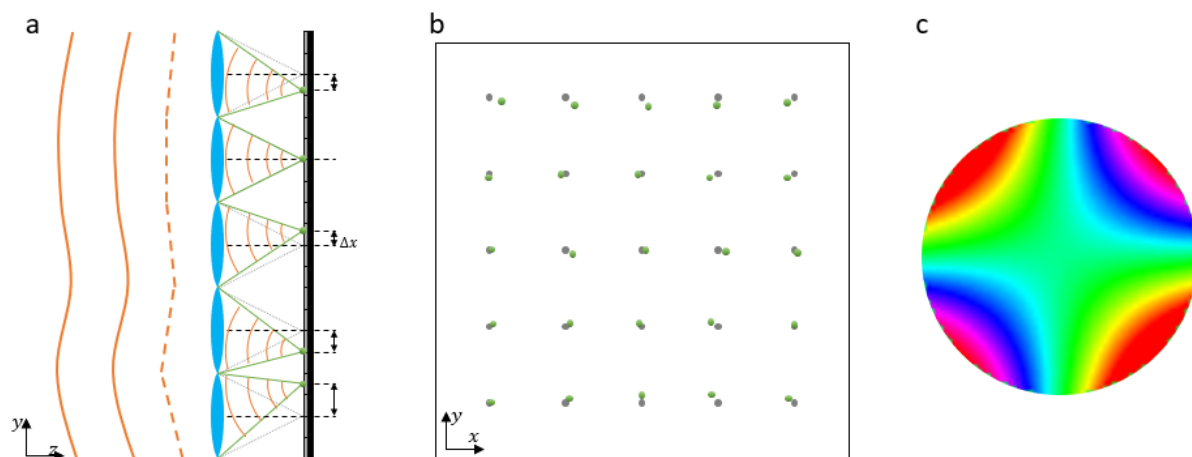


Figure III.6 – Fonctionnement de l'analyseur de Shack-Hartmann. (a) Une matrice de microlentilles permet de segmenter le front d'onde mesuré. Chaque section d'onde est, par approximation, localement plane. Ainsi, chaque microlentille concentre cette onde plane en un point image. (b) La position $(\Delta x, \Delta y)$ de chaque point est déterminée par l'inclinaison des sections d'onde associées. Ainsi, en traitant l'information provenant de toutes les images produites par les microlentilles, on peut remonter à (c) la forme du front d'onde complet.

En microscopie, l'analyseur SH est positionné sur le plan de Fourier du système. En mesurant le front d'onde du signal émis par une source ponctuelle, il permet d'obtenir de manière directe le terme de phase $\phi(k_x, k_y)$ de la fonction de pupille du microscope (Équation I.26), soit les aberrations présentes dans le système. Une telle source ponctuelle est appelée étoile guide, en référence aux étoiles lointaines utilisées pour la même application en astronomie. En microscopie, les étoiles guides peuvent être de diverses sortes. Elles peuvent être réalisées en introduisant dans l'échantillon des objets pouvant être considérés comme ponctuels car plus petits que la limite de diffraction de l'objectif, tel que des billes fluorescentes^{156,157}. Cependant, la mesure précise des déformations du front d'onde par un

analyseur requiert généralement des sources très brillantes, et il n'est pas forcément possible d'introduire de telles billes dans tous les échantillons biologiques. Une autre solution est de directement créer des sources ponctuelles dans l'échantillon à imager à l'aide d'une source lumineuse : ce sont les étoiles guides induites par laser. En microscopie deux photons, le confinement du laser d'excitation crée une source de lumière (fluorescence) de dimensions limitées par la diffraction qui peut donc être directement utilisée comme étoile guide^{171,172}. Ce type d'étoile guide induite par laser a également été implémenté en microscopie par feuille de lumière pour la correction des aberrations optiques provoquées par l'échantillon biologique^{159,173}. En microscopie confocale, il est également possible d'utiliser la rétrodiffusion du faisceau d'excitation par l'échantillon¹⁷⁴⁻¹⁷⁶, bien qu'il soit alors plus difficile d'interpréter les mesures, car cette rétrodiffusion combine les aberrations provenant du système d'excitation et de collection.

Un analyseur de front d'onde pouvant fonctionner à plusieurs kilohertz, cette méthode est la plus précise mais aussi la plus rapide pour corriger les aberrations. Cependant, le besoin de disposer d'étoiles guides à l'intérieur de l'échantillon limite son application. Par ailleurs, les analyseurs de front d'onde requièrent de fortes intensités pour permettre une mesure fiable des aberrations, ce qui nécessite l'utilisation d'étoiles guides particulièrement lumineuses, et réduit la quantité de photons disponible pour l'imagerie. Ce point est particulièrement limitant pour l'imagerie par SMLM, où le nombre de photons collecté pour chaque fluorophore est crucial pour la précision de sa localisation. Pour dépasser ces limitations, des travaux récents ont permis le développement d'analyseurs SH plus sensibles utilisant une caméra EMCCD¹⁷³, ou encore l'utilisation d'analyseur SH sans étoile guide mais basée sur la mesure de la déviation de l'image créée par chaque microlentille¹⁷⁷.

III.2.2.2. Récupération de phase

Une autre méthode pour mesurer la phase d'une onde, et donc les aberrations d'un système, consiste à utiliser des algorithmes de traitement d'image pour l'extraire à partir d'images 3D d'émetteurs ponctuels^{178,179}. Ces approches, dites de « récupération de phase », sont utilisées par de nombreuses techniques de localisation de molécules individuelles qui utilisent des modèles de PSF simulées à partir de cette phase calculée¹⁸⁰⁻¹⁸⁶. Une étude récente a par ailleurs montré qu'il était également possible de réaliser cette récupération de phase directement à partir du signal des molécules individuelles d'une acquisition SMLM, car elles sont les images d'émetteurs ponctuels aléatoirement répartis selon l'axe z ¹⁸⁶.

Si plusieurs algorithmes utilisant différents outils mathématiques ont été développés, ils reposent tous sur le même principe : (1) un modèle de formation d'image prenant en compte la présence d'aberrations, généralement selon une décomposition en polynôme de Zernike, est utilisé afin de calculer des formes de PSF 3D avec aberrations ; (2) Ces formes de PSF 3D sont comparées aux PSF 3D mesurées expérimentalement ; (3) un algorithme d'ajustement itératif permet de retrouver les paramètres décrivant le terme de phase dans le modèle de formation d'image (typiquement les coefficients des polynômes de Zernike) qui simulent le mieux la forme de la PSF expérimentale. Il en résulte une estimation des différentes aberrations présentes dans le système permettant de décrire au mieux la PSF expérimentale selon le modèle de formation d'image utilisé. Ce fonctionnement est décrit sur la Figure III.7 pour la méthode ZOLA-3D développée par Andrey Aristov et al¹⁸³ et que j'ai utilisée dans mes travaux. Cette méthode est disponible sous la forme d'un plugin pour ImageJ¹⁸⁷⁻¹⁸⁹, permettant la localisation 3D de molécules individuelles en imagerie par SMLM. Il offre donc une solution simple à utiliser pour l'estimation des aberrations présentes dans un système d'imagerie sans avoir recours à l'utilisation d'un analyseur de front d'onde.

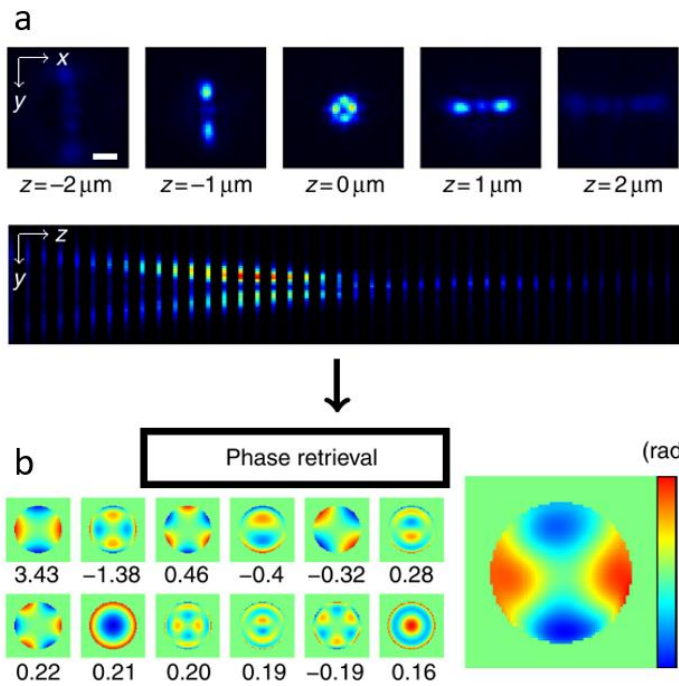


Figure III.7 – Méthode de récupération de phase de ZOLA-3D. Adapté de Aristov et al¹⁸³. (a) Une pile d'images en z d'une bille fluorescente plus petite que la diffraction est acquise. Cette pile d'images permet d'obtenir une PSF expérimentale 3D. (b) Cette PSF est ensuite utilisée par ZOLA-3D pour calculer la phase de l'onde associée à cette PSF expérimentale. Pour se faire, la phase est décomposée selon les polynômes de Zernike. Un estimateur de maximum de vraisemblance est alors utilisé pour déterminer les coefficients de Zernike permettant d'obtenir une PSF identique par simulation.

aberrations d'ordres supérieurs, ce qui rend ces approches moins précises. Elle permet toutefois d'estimer rapidement l'évolution d'aberrations sans avoir recours à des analyseurs de front d'onde. Nous verrons en section III.3.2.1 que nous avons mis à profit la méthode ZOLA3D pour mesurer l'évolution des aberrations au sein de notre système en fonction de la profondeur d'imagerie.

III.2.3. Techniques de correction des aberrations par optique adaptative : correction directe ou indirecte

Il existe plusieurs manières de corriger les aberrations optiques par optique adaptative. La méthode de correction dite directe est conceptuellement la plus simple. Elle est basée sur la mesure réelle des aberrations. Le système standard pour une correction directe est schématisé en Figure III.8.a. La forme du front d'onde provenant d'une source ponctuelle est mesurée à l'aide d'un analyseur de front d'onde (section III.2.2.1) après un modulateur de front d'onde (III.2.1). Au moyen d'une boucle de rétroaction entre l'analyseur et le modulateur, il devient possible de modifier la forme du front d'onde pour supprimer les aberrations du système d'imagerie.

Les avantages et inconvénients de cette méthode sont liés à l'utilisation de l'analyseur de front d'onde (III.2.2.1). Certains développements récents tendent à réduire ces limites. En particulier, des équipes travaillent sur le développement d'analyseurs plus sensibles¹⁷³ ou sur l'implémentation de méthodes permettant la correction des aberrations par mesure directe à l'aide d'un SH, sans utilisation d'étoile guide¹⁷⁷.

La méthode de récupération de phase permet donc de retrouver la phase associée à une PSF expérimentale sans outil de mesure direct tel qu'un analyseur SH. Elle nécessite uniquement l'acquisition de piles d'images en z d'objets ponctuels pour estimer les aberrations du système. En intégrant une modélisation du bruit de mesure à son modèle de formation d'image, l'algorithme utilisé par ZOLA-3D reste efficace même dans des conditions de rapport signal sur bruit faible, contrairement aux analyseurs SH qui nécessitent en général une intensité élevée. Le principe même de ces méthodes basées sur la comparaison de PSF expérimentales à des PSF simulées mène cependant à une estimation généralement moins précise qu'une mesure directe. En effet, plusieurs combinaisons d'aberrations peuvent mener à des déformations comparables, en particulier pour les

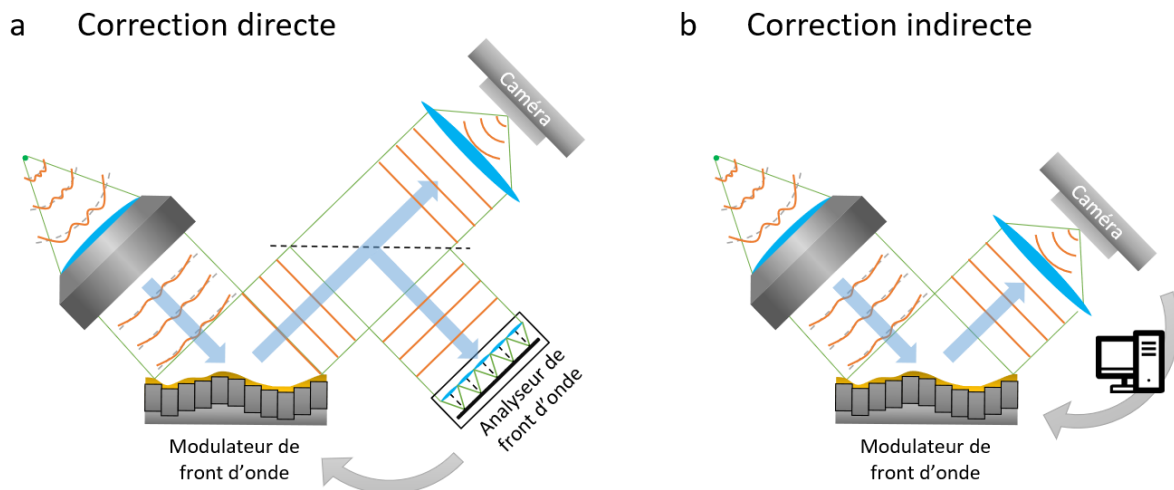


Figure III.8 — Méthodes de correction des aberrations par optique adaptative. (a) Correction directe. Un objet ponctuel émet une onde sphérique, captée par l'objectif. Le front d'onde est modifié par l'optique adaptative. Un analyseur et un modulateur de front d'onde permettent respectivement de mesurer et de modifier le front d'onde sur le plan de Fourier. Une boucle de rétroaction directe entre les deux éléments permet alors de corriger les aberrations. (b) Correction indirecte. En l'absence d'analyseur de front d'onde, les images obtenues par la caméra sont utilisées pour déterminer la forme optimale du miroir.

La seconde méthode de correction est appelée indirecte, car n'utilisant pas d'analyseur de front d'onde pour la mesure des aberrations (Figure III.8.b). Il existe plusieurs approches regroupées sous le terme de correction indirecte. Une première méthode, proche de la correction directe, consiste à mesurer le front d'onde sans utiliser d'analyseur de front d'onde, mais directement à partir des images. Elle est basée sur la segmentation de la pupille arrière de l'objectif¹⁹⁰⁻¹⁹³. L'idée est de diviser la pupille arrière en segments, et d'observer l'image produite par chaque segment. En observant le déplacement de l'image lors de l'application d'un déphasage pour chaque segment à l'aide du modulateur de front d'onde, il est possible d'en déduire la forme que le modulateur de front d'onde doit prendre pour corriger les aberrations. Bien que cette méthode soit considérée comme indirecte, il est intéressant de noter que son fonctionnement est basé sur le même concept que l'analyseur SH, c'est-à-dire la segmentation du front d'onde au niveau de la pupille arrière.

Une autre approche de plus en plus utilisée pour la correction indirecte des aberrations consiste à utiliser une métrique reflétant la quantité d'aberrations présente dans le système, telle que l'intensité ou le contraste¹⁹⁴, ou l'information fréquentielle de l'image^{195,196}. La recherche de maximisation de cette métrique au moyen du modulateur de front d'onde, permet de corriger les aberrations optiques du système. La démarche la plus souvent utilisée consiste à considérer les aberrations comme une somme de modes orthogonaux, tels que la décomposition en polynômes de Zernike^{5,6,139} (voir section III.1.1). Pour chacun des modes, une séquence d'images est acquise en faisant varier l'amplitude du mode à l'aide du modulateur de front d'onde. Le facteur de qualité est alors mesuré pour chacune de ces images, et l'amplitude du mode permettant de maximiser ce facteur de qualité est estimée par ajustement d'un modèle sur ces valeurs. Puis le processus est répété pour le mode suivant d'aberration. Théoriquement, pour un nombre N de modes au minimum $2N+1$ points de mesures sont nécessaires : une image de référence et 2 amplitudes d'aberration pour chaque mode. Les modes décomposant les aberrations étant orthogonaux, comme c'est le cas pour les polynômes de Zernike, leurs corrections sont indépendantes et la somme de toutes les corrections estimées permet de calculer la forme du miroir permettant de corriger l'ensemble des aberrations.

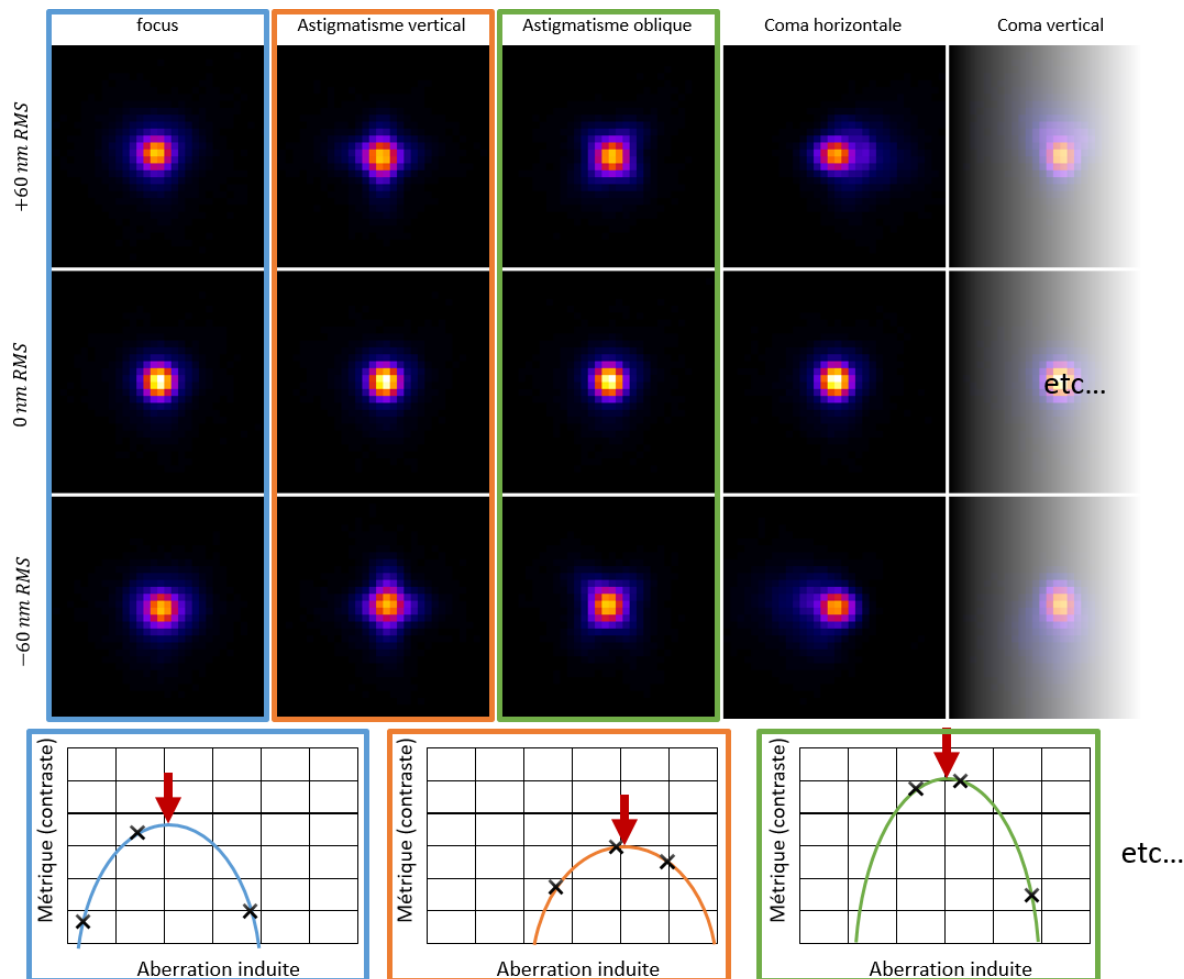


Figure III.9 – Méthode de correction indirecte par algorithme 3N. Le principe de la méthode indirecte est de mesurer une métrique, ici le contraste, donnant indirectement l'information sur la présence d'aberration. Pour chaque mode d'aberration, trois valeurs du contraste sont comparées pour trois valeurs d'aberration induite par le miroir. Un ajustement par une fonction quadratique permet de déterminer la forme optimale du miroir pour maximiser le contraste et donc minimiser l'aberration sondée. L'opération est répétée pour tous les modes d'aberrations pertinents, souvent les premiers ordres de la décomposition de Zernike, jusqu'à une suppression maximale des aberrations.

L'avantage principal de cette méthode est qu'elle ne nécessite pas d'étoiles guides très brillantes, qui peuvent altérer voire être incompatibles avec l'échantillon. Cette méthode présente cependant certaines limitations. La première est la vitesse : pour corriger toutes les aberrations, il est nécessaire d'acquérir de nombreuses images, contrairement à la méthode directe qui n'en nécessite qu'une. De plus, cette méthode se base sur la décomposition des aberrations en modes orthogonaux, et un miroir déformable n'est, en pratique, pas capable d'induire parfaitement un mode d'aberration unique. Cela s'explique principalement par le fait que le miroir déformable est un objet discret, présentant un certain nombre d'actuateurs. Pour la microscopie, les DM typiquement utilisés sont constitués de quelques dizaines à une centaine d'actuateurs (52 dans le cas du système installé sur notre microscope). Il n'est alors pas possible de représenter exactement les polynômes de Zernike. Afin de diminuer l'impact de cette limitation, certains algorithmes corrigent les aberrations mode après mode. Pour chaque mode, l'algorithme utilise 3 images pour obtenir 3 points de mesures, puis la forme de miroir est optimisée avant de passer à l'ordre suivant. Ainsi, pour N modes, 3N images sont utilisées : on parle alors d'algorithme 3N (Figure III.9). La forme optimale de correction est toutefois généralement obtenue qu'après plusieurs tours d'optimisation même avec cette solution.

Enfin, le fait d'estimer la quantité d'aberrations présentes dans le système à partir de leur effet sur une métrique extraite d'une image rend ces approches moins précises que celles basées sur la mesure directe des aberrations. En effet, différentes combinaisons d'aberrations peuvent avoir des effets similaires sur une métrique et ainsi biaiser la détermination des aberrations présentes dans le système. L'adéquation du choix de la métrique avec le type de correction, l'application, et le type d'image qu'il est possible de collecter est donc cruciale pour l'utilisation de ce type de méthodes de corrections indirectes. En SMLM, la présence d'aberrations, en impactant la forme et l'intensité de la PSF du système, va modifier les images des molécules individuelles que l'on cherche à détecter de façon similaire. Or les performances de l'imagerie sont directement dépendantes de la taille et du rapport signal sur bruit des images de molécules individuelles, ou plus généralement d'émetteurs ponctuels. Une métrique simple et relativement robuste qui permet de réaliser la correction des aberrations pour l'imagerie SMLM est donc l'intensité maximale d'une détection d'un émetteur ponctuel. En effet, cette intensité diminue systématiquement lors de l'étalement de la PSF latéralement ou axialement sous l'effet d'aberrations. Sa maximisation est donc révélatrice de la correction des aberrations et de meilleures performances pour la localisation des molécules individuelles. Ce type de métrique est donc communément utilisé pour la correction des aberrations en imagerie par SMLM.

III.3. Implémentation de l'optique adaptative sur le système soSPIM.

La technologie soSPIM, en assurant un sectionnement optique en profondeur tout en préservant une très bonne collection du signal, représente une solution idéale pour l'imagerie de super-résolution en profondeur par SMLM (voir section I.5). Cette technologie offre la possibilité d'imager des cellules entières situées entre 5 et 40 μm au-dessus de lamelle. Toutefois, les aberrations optiques, en particulier sphériques, augmentent de façon importante avec la profondeur d'imagerie¹⁹⁷. Ces aberrations peuvent avoir un impact considérable à la fois sur la précision et sur la justesse de localisation des molécules individuelles¹⁴⁸. Afin de contrer ces effets et optimiser les performances de systèmes d'imagerie par SMLM, plusieurs équipes ont mis en place des méthodes de correction des aberrations optiques basées sur l'optique adaptative^{169,195,196,198-201}. Pour corriger ces aberrations et optimiser l'imagerie par SMLM, nous avons nous aussi cherché à mettre en place une solution d'optique adaptative.

Dans cette section, je vais dans un premier temps présenter le système mis en place sur notre microscope soSPIM pour permettre la correction des aberrations. Je caractériserai ensuite l'évolution des aberrations en fonction de la profondeur d'imagerie, et détaillerai l'impact que ces aberrations peuvent avoir sur la précision et la justesse de localisation des molécules individuelles en 3D. Enfin, nous verrons que la méthode de correction par optique adaptative implémentée dans notre système permet de réduire significativement l'impact de ces aberrations optiques, et de retrouver une résolution comparable à celles pouvant être obtenues à la surface d'une lamelle de microscope.

III.3.1. Système et processus de correction

L'implémentation de l'optique adaptative sur le système soSPIM fait suite au travail de thèse de Corey Butler¹⁴⁷ réalisé au sein de notre équipe. Corey a montré que l'utilisation d'un système d'optique adaptative permet d'améliorer la précision de localisation 3D obtenue par la technique d'astigmatisme comparée à l'utilisation d'une lentille cylindrique. En effet, l'optique adaptative permet de corriger l'ensemble des aberrations présentes dans le système d'imagerie, y compris les aberrations sphériques résiduelles (bague de l'objectif mal ajustée,

épaisseur de la lamelle légèrement différente...), et d'induire un astigmatisme pur et de puissance contrôlable, contrairement aux lentilles cylindriques qui sont des éléments statiques imparfaits et soumis à des défauts de positionnement. Par ailleurs, il a aussi démontré l'intérêt de l'optique adaptative pour corriger des aberrations sphériques apparaissant lors de l'imagerie à quelques micromètres de la lamelle. Toutefois, l'illumination utilisée, TIRF ou HILO (I.4.1), n'était pas adaptée à une imagerie plus en profondeur. Dans la continuité du travail effectué par Corey, j'ai donc entrepris d'implémenter une solution d'optique adaptative au système soSPIM parfaitement adapté à une imagerie en profondeur plusieurs dizaines de microns au-dessus de la lamelle. Cette combinaison a pour but de permettre une localisation des molécules individuelles précise et en 3D, juste jusqu'à 40 μm au-dessus de la lamelle.

Le système d'optique adaptative que j'ai utilisé dans mes travaux est le système MicAO 3DSR distribué par l'entreprise Imagine Optic. Ce système « plug and play » comprend un miroir déformable et une solution logicielle pour le contrôle du miroir et l'utilisation d'algorithmes de correction des aberrations. Il est totalement compatible avec les microscopes commerciaux standard, et permet une implémentation relativement facile. Le miroir déformable qu'il utilise dispose de 52 actionneurs contrôlés à l'aide du logiciel MicAO. La méthode de correction utilisée dans ce système est une correction par algorithme 3N, adaptée à l'imagerie par SMLM (III.2.3). Cette méthode est basée sur les travaux d'Aurélien Facompez²⁰² et de Jun Zeng²⁰³.

Pour utiliser le miroir déformable dans le but de corriger les aberrations du système d'imagerie et induire celles que l'on désire, une étape de calibration à l'aide d'un analyseur SH est nécessaire. Cette étape permet de calculer la matrice de commande du miroir qui détermine comment déplacer les différents actionneurs du miroir afin de créer un mode d'aberration spécifique, généralement selon la décomposition en polynômes de Zernike. Pour cette étape de calibration, le montage est semblable à celui présenté sur la Figure III.9.a. La calibration consiste à actionner chacun des actionneurs séquentiellement et à mesurer leur effet sur la phase d'une onde créée par un émetteur ponctuel à l'aide d'un analyseur SH. Une fois l'action de chaque actionneur connue, il est alors ensuite possible de calculer la matrice de commande afin de pouvoir générer n'importe quelles aberrations. L'analyseur de front d'onde n'est alors plus nécessaire, et peut être remplacé par une caméra pour l'imagerie. Le montage est alors celui présenté Figure III.9.b. Chaque aberration correspondant à un polynôme de Zernike (mode) est générée par la combinaison de l'action de plusieurs actionneurs. Ces derniers étant en nombre limité, ils ne permettent pas de reproduire exactement la forme d'un seul mode. Cela entraîne une certaine dépendance entre les modes d'aberrations rendant la correction par algorithme 3N moins efficace. Il est donc généralement nécessaire de réaliser plusieurs tours d'optimisation successifs pour trouver la meilleure forme à appliquer au DM.

Le fonctionnement de la correction des aberrations par algorithme 3N est présenté en section III.2.3 (Figure III.9). Dans notre cas, et en général pour les applications en SMLM, la métrique utilisée est l'intensité maximale de l'image d'une bille. Les corrections sont effectuées en deux étapes. Une première étape consiste à corriger les aberrations les plus souvent rencontrées, généralement décrites comme étant les aberrations d'ordre inférieur. Il s'agit du défocus, de l'astigmatisme et du coma (primaires, selon deux orientations), de l'aberration sphérique primaire et du trefoil (selon deux orientations). Le calcul de la forme optimale est fait en induisant ± 60 nm RMS d'aberrations*. La seconde étape consiste à

* « nm RMS » : « root mean square » = moyenne quadratique. Cette unité décrit la moyenne quadratique du déplacement du miroir, par rapport à une surface plane, intégrée sur l'ensemble du miroir. Dans nos expériences, la correspondance entre cette déformation du miroir et les coefficients de Zernike (rad) est de 1 nm RMS pour 0.016 rad.

corriger les aberrations dites d'ordre supérieur, à savoir l'astigmatisme, le coma et l'aberration sphérique de second ordre, ainsi que le tétrafoil. Pour ces aberrations d'ordre supérieur, seuls ± 40 nm RMS d'aberrations sont appliqués par le miroir, car leur impact sur la métrique mesurée est plus prononcé et l'induction de trop d'aberrations peut faire diverger l'algorithme. En fonction des conditions d'expérience (quantité d'aberrations présentes, luminosité du marqueur fiduciaire, bruit environnant...), plusieurs itérations de cette procédure de correction peuvent être nécessaires.

Le logiciel MicAO propose de nombreuses options. Il est par exemple possible de sélectionner une métrique pour la correction par algorithme 3N, y compris une métrique personnalisée, calculée extérieurement au logiciel. Une autre option particulièrement intéressante pour notre application est la possibilité d'induire n'importe quelles aberrations. En effet, une fois la matrice d'interaction calculée, si le logiciel MicAO est capable d'agir spécifiquement sur chaque aberration pour les corriger, il est également possible d'induire volontairement une quantité définie d'aberrations. De cette manière, nous pouvons induire une déformation contrôlée de la PSF, en induisant par exemple un astigmatisme mesuré, pour permettre la localisation précise des molécules en 3 dimensions (I.3.3.2.2). Dans la grande majorité de mes expériences, j'induirai 60 nm RMS d'astigmatisme, pour permettre la localisation 3D des émetteurs ponctuels (molécules, billes...).

III.3.2. Mesure et conséquences des aberrations liées à la profondeur d'imagerie

III.3.2.1. Mesure de l'évolution des aberrations avec la profondeur d'imagerie

Afin de mesurer l'évolution des aberrations optiques avec la profondeur d'imagerie, j'ai choisi de me baser sur la méthode de récupération de phase de la méthode ZOLA-3D¹⁸³ intégré au logiciel ImageJ (III.2.2.2). Elle permet d'extraire les aberrations présentes directement à partir de l'image 3D d'émetteurs ponctuels, ce qui rend possible de l'analyse de l'évolution des aberrations en fonction de la profondeur d'imagerie à partir d'une seule acquisition de plusieurs billes.

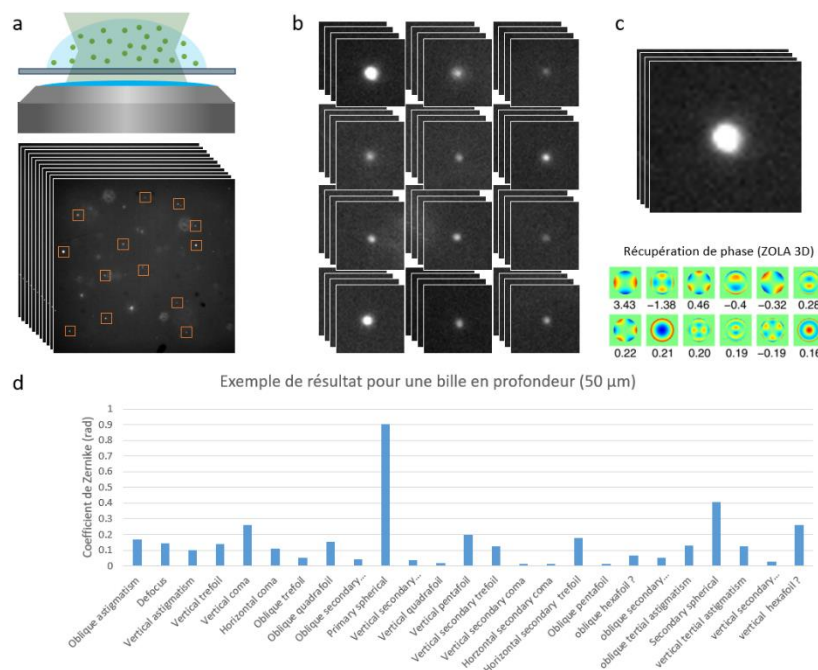


Figure III.10 — Procédure de mesure des aberrations avec la récupération de phase de ZOLA-3D. (a) Des nanodiamants fluorescents sont dilués dans le polymère utilisé pour la fabrication des dispositifs soSPIM. Une pile d'images est acquise selon l'axe de l'objectif, sur un large champ. Plusieurs dizaines de billes sont présentes dans le volume d'acquisition. Chaque bille est automatiquement détectée et (b) une sous-pile est constituée pour chaque bille. (c) Adapté de Aristov et al¹⁸³. Chaque sous-pile d'images est traitée par le logiciel ZOLA-3D. Le logiciel estime les coefficients de Zernike permettant de décrire au mieux la forme de la PSF analysée. (d) Exemple de distribution de coefficients de Zernike correspondant à une bille à 50 µm de profondeur.

La procédure expérimentale menant à la mesure des aberrations est présentée Figure III.10. Des nanodiamants fluorescents de 100 nm de diamètre (ND-NV-100nm-Md, Adamas Nanotechnologies), soit plus petits que la limite de diffraction de notre système d'imagerie, sont dilués dans le polymère MY-134 utilisé pour la fabrication des dispositifs d'imagerie soSPIM. On rappelle que l'indice de réfraction de ce polymère est identique à celui de notre milieu d'imagerie. Une fois ce mélange polymérisé sur une lamelle, nous disposons d'un échantillon contenant des émetteurs pouvant être considérés comme ponctuels, répartis de façon homogène en profondeur. Plusieurs dizaines de PSF peuvent alors être acquises sur une épaisseur de 50 μm au-dessus de la lamelle, en réalisant l'acquisition d'une pile d'images en z avec un pas de 25 nm. Chacune de ces PSF est ensuite traitée à l'aide du plug-in ZOLA-3D dans le but d'extraire la quantité d'aberrations correspondantes. Les résultats de cette première expérience sont présentés Figure III.11.

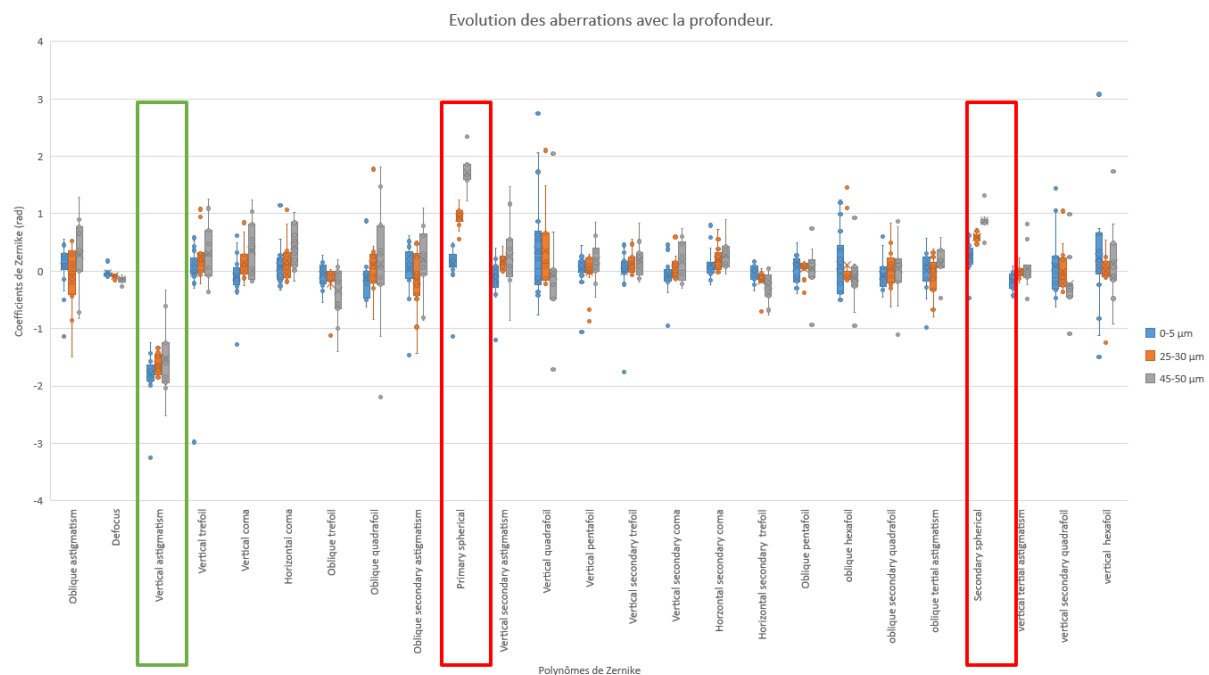


Figure III.11 — Mesure des aberrations en fonction de la profondeur. Ces mesures sont obtenues à l'aide du plug-in ZOLA-3D¹⁸³. Les cadres rouges repèrent les aberrations sphériques (primaire et secondaire), dont la quantité augmente significativement avec la profondeur. Le cadre vert met en évidence la présence d'astigmatisme, induit par le miroir déformable pour cette expérience. 43 PSF ont été utilisées pour obtenir ces données. Les données ont été regroupées par section : en bleu sont représentées les billes entre 0 et 5 μm de profondeur, en rouge les billes entre 25 et 30 μm , et en gris les billes entre 45 et 50 μm .

Une première observation que l'on peut tirer de ces données est que les valeurs peuvent présenter une variabilité relativement importante suivant le mode d'aberration, ou polynômes de Zernike, considérées. Cela peut s'expliquer par le principe même des méthodes de récupération de phase qui estime les aberrations à partir d'un modèle approché de formation d'image (III.2.2.2). Cependant, cette expérience nous permet tout de même de tirer plusieurs informations importantes concernant notre système. Tout d'abord, nous retrouvons l'astigmatisme que nous avons introduit à l'aide de notre système d'optique adaptative (III.3.1) pour permettre la localisation de ces nanodiamants en 3D. D'autre part, nous observons une tendance d'évolution avec la profondeur d'imagerie claire uniquement pour 2 coefficients de Zernike, correspondant aux aberrations sphériques primaires et secondaires. Si l'on observe plus précisément l'évolution des aberrations sphériques primaires en fonction de la profondeur d'imagerie (Figure III.12), on remarque par ailleurs que celles-ci augmentent linéairement, confirmant ce qui a déjà été décrit dans la littérature¹⁹⁷. Enfin, les autres aberrations, même si

elles présentent des distributions de valeurs assez larges, n'évoluent pas avec la profondeur, ou de façon trop faible pour être clairement identifiable.

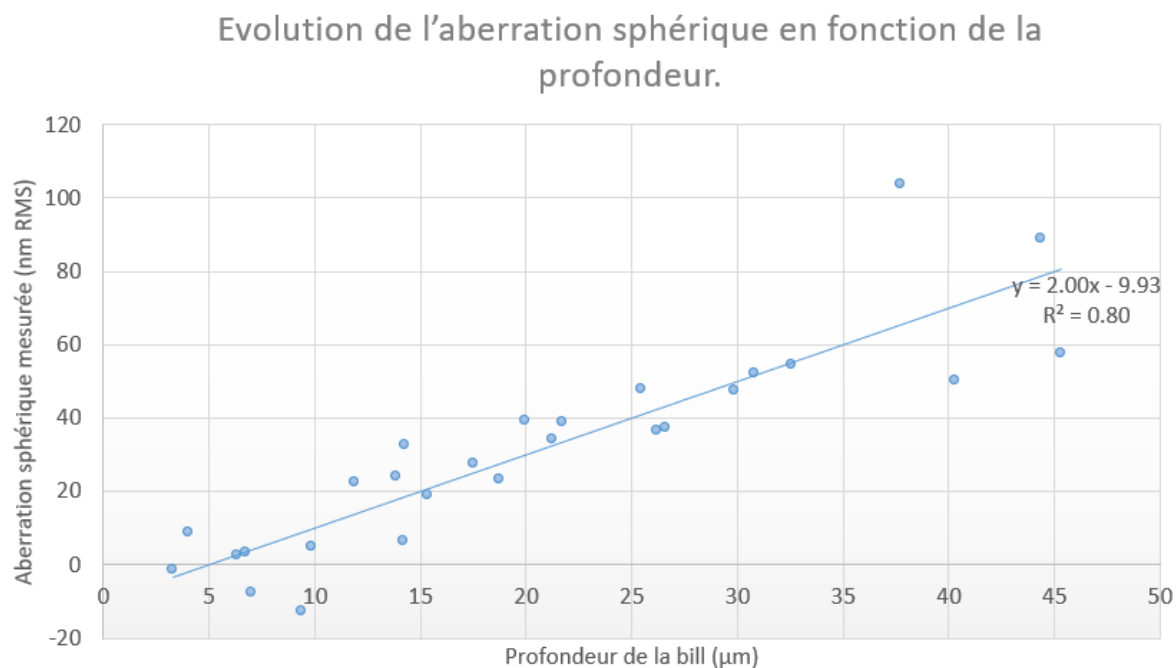


Figure III.12 — Évolution de l'aberration sphérique en fonction de la profondeur. On remarque ici une tendance linéaire en fonction de la profondeur, avec une pente d'environ 2 nm RMS par μm de profondeur. Cependant, le coefficient de détermination (R^2) est très petit, ce qui souligne la faible précision des mesures.

De ces informations, nous pouvons conclure que dans notre système les principales aberrations apparaissant avec la profondeur d'imagerie sont les aberrations sphériques. Afin de déterminer l'impact spécifique que ces dernières peuvent engendrer sur les acquisitions de SMLM, j'ai effectué des mesures de précision et de justesse de localisation dans différentes conditions de présence d'aberrations sphériques.

III.3.2.2. Impact des aberrations sur la localisation 3D des molécules individuelles

Le but de cette section est de montrer l'impact que peuvent avoir les aberrations sphériques évoluant avec la profondeur d'imagerie sur les acquisitions de SMLM. Pour ce faire, j'ai étudié deux caractéristiques prépondérantes pour la reconstruction fidèle de structures imagées par SMLM : la précision et la justesse de localisation.

Afin de s'assurer que seul l'impact spécifique de l'aberration considérée, ici l'aberration sphérique primaire, soit pris en compte dans mes mesures, j'ai décidé de l'induire à l'aide du DM, et d'observer des billes situées à profondeur constante. En utilisant des nanodiamants fluorescents déposés sur une lamelle, j'ai donc corrigé dans un premier temps les aberrations statiques du système. Puis, à l'aide du logiciel MicAO (III.3.1), j'ai induit différentes valeurs d'aberration sphérique primaires, à hauteur de 20 nm RMS ou 50 nm RMS. Ces valeurs correspondent à la quantité d'aberrations mesurée à environ 10 μm et 25 μm de profondeur respectivement (Figure III.12). Ces mesures permettent ainsi d'évaluer l'impact des aberrations sphériques primaires sur l'épaisseur d'une cellule entière (~10 μm), ainsi qu'à 25 μm de profondeur correspondant à la profondeur moyenne de nos cellules dans les puits soSPIM.

III.3.2.2.1. Justesse de localisation

Pour mesurer la justesse de localisation 3D des molécules individuelles, j'ai effectué des acquisitions de PSF sous forme de piles d'images selon l'axe z , pour 3 conditions différentes :

- 0) Une pile d'images avec un nanodiamant à la surface de la lamelle, après correction des aberrations : la référence. Cette référence permet d'effectuer la calibration de la localisation axiale par ajustement gaussien.
- 1) 5 piles d'images d'un autre nanodiamant, sans modifications de la forme du miroir. Cette image permet d'obtenir une mesure de la justesse de localisation sans aberrations.
- 2) 5 piles d'images en appliquant une déformation du miroir correspondant à 20 nm RMS d'aberration sphérique primaire.
- 3) 5 piles d'images en appliquant une déformation du miroir correspondant à 50 nm RMS d'aberration sphérique primaire.

Pour chacune des 3 conditions, les piles d'images sont analysées grâce à la méthode de localisation 3D à partir d'un ajustement gaussien 2D décrit en section I.3.3.2.2. Les acquisitions sont effectuées avec un pas en z de 25 nm à l'aide d'une platine de positionnement nanométrique. On considère ce pas comme juste et précis. En mesurant l'écart entre la position réelle donnée par la platine de translation, et la position fournie par l'algorithme de localisation, nous pouvons mesurer le biais de localisation en fonction de la profondeur, et de la quantité d'aberrations sphériques. Ce biais détermine la justesse de localisation, un petit biais signifiant une grande justesse. La Figure III.13 représente les résultats obtenus pour ces 3 conditions. On remarque que le biais dépend de la localisation axiale. Dans le pire des cas, avec 50 nm d'aberration sphérique, à $z = -400$ nm, on atteint une valeur de biais de 150 nm. En comparaison, lorsque les aberrations sont corrigées, ce biais est contenu à ± 40 nm. Dans le cas où l'on induit 20 nm RMS d'aberration, nous obtenons un biais allant jusqu'à 60 nm.

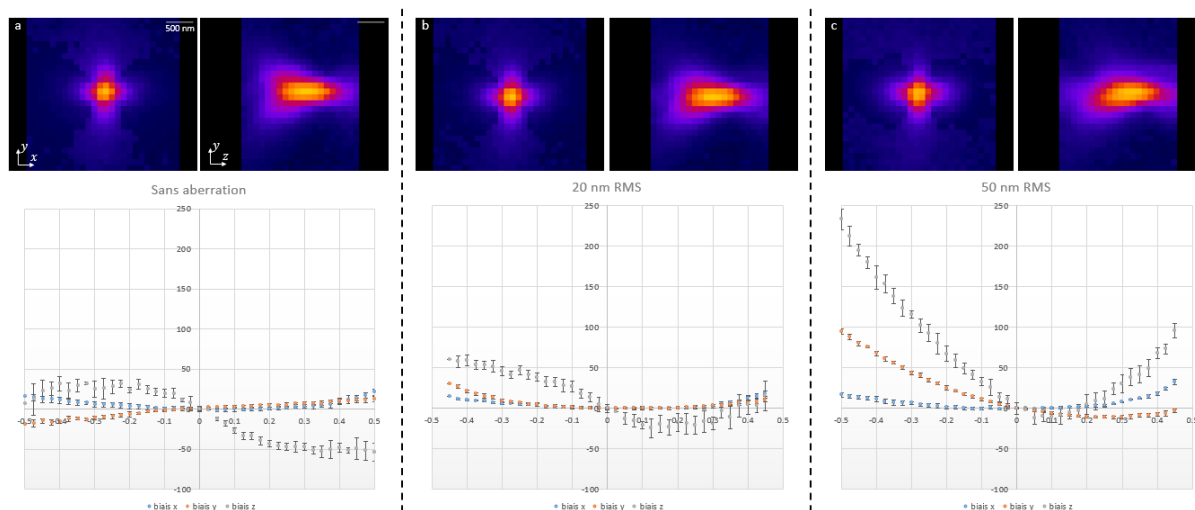


Figure III.13 — Impact de l'aberration sphérique sur la justesse de localisation. Les vignettes représentent le maximum projeté d'une pile d'images selon l'axe z ou selon l'axe x , pour chacune des conditions d'expérience. Les graphiques représentent le biais de localisation, en fonction de la position Δz réelle de la bille. L'axe des abscisses est gradué en micromètres, l'ordonnée est en nanomètres. Les données en bleu, orange et gris sont respectivement le biais selon x , selon y et selon z . Les résultats sont obtenus dans les 3 conditions suivantes : (a) corrigeant les aberrations (b) en induisant 20 nm RMS d'aberration sphérique primaire après correction, et (c) en induisant 50 nm RMS d'aberration sphérique après correction.

En ce qui concerne les directions latérales x et y , il existe également un biais, contenu entre ± 15 nm dans les directions latérales pour $|\Delta z| < 400$ nm. Ce biais reste dans la même fenêtre à 20 nm RMS d'aberration sphérique, mais peut atteindre jusqu'à 70 nm pour $\Delta z = -400$ nm dans le cas où l'on induit 50 nm RMS d'aberration. Cette erreur de localisation dans la direction latérale a déjà été observée de nombreuses fois en microscopie par SMLM^{204–207}, et est habituellement appelée wobble. Ici, on note que le wobble augmente significativement avec l'aberration sphérique.

Ces biais observés en fonction de l'aberration sphérique s'expliquent par la déformation de la PSF du système. Cette déformation de la PSF a deux effets : non seulement le maximum d'intensité est déplacé selon l'axe z , mais la forme de la PSF s'éloigne également du modèle gaussien utilisé dans les algorithmes de localisation. Le modèle n'étant plus valide, la localisation devient erronée.

La présence de ce biais dans la localisation des molécules individuelles est très problématique. Là où une faible précision de localisation réduit la résolution finale, ce biais réduit la justesse de localisation, et déforme les structures. Dans notre situation, le biais dans la direction axiale a tendance à sous-estimer la distance entre l'émetteur fluorescent et le plan focal, ce qui a pour effet de compacter les structures. La correction des aberrations en profondeur est donc indispensable pour retrouver la justesse de localisation qu'il est possible d'atteindre dans les conditions optimales. Cette correction est nécessaire aux profondeurs auxquelles sont typiquement effectuées nos observations, autour de 30 μm au-dessus de la lamelle. Cependant, sur l'épaisseur d'une cellule, de l'ordre de 10 μm , le renouvellement de la correction n'est pas obligatoire, car le biais observé n'est pas significativement plus grand en présence des 20 nm RMS d'aberration sphérique.

Les résultats montrent toutefois la présence de ce biais de localisation axiale même lorsque les aberrations sont corrigées par le système d'optique adaptative que nous avons mis en place. Bien que ce biais ne soit pas important, il doit être pris en compte lors de la reconstruction des acquisitions, sous peine de voir les structures compactées selon la direction z . De plus, comme nous le verrons dans le Chapitre IV, lors de la reconstruction des images de grands volumes, acquises séquentiellement plan par plan, si ce biais n'est pas pris en compte, il peut entraîner l'apparition d'artéfacts de reconstruction. Je détaillerai dans la section 0 la solution que nous avons mise en place afin de permettre de prendre en compte ce biais de localisation pour la reconstruction d'acquisition séquentielle de plusieurs plans. Nous envisageons par ailleurs d'implémenter d'autres méthodes de localisation 3D récemment développées basée sur l'utilisation de PSF modèle¹⁸³ ou de PSF expérimentales²⁰⁸. En effet, de telles méthodes permettraient de prendre en compte les aberrations résiduelles dans le processus de localisation des molécules afin de réduire ces biais de localisation, y compris le wobble, ce que les méthodes par ajustement gaussien ne permettent pas de faire.

III.3.2.2.2. Précision de localisation

Pour mesurer l'impact de l'aberration sphérique sur la précision de localisation, j'ai réalisé des acquisitions selon 6 conditions :

- 0) Une pile d'images de référence, permettant la calibration de la localisation 3D, en ayant au préalable corrigé les aberrations par algorithme 3N.
- 1) Une séquence de 1000 images, à position (latérale et axiale) fixe, sans induire d'aberration.
- 2) Une séquence de 1000 images à position fixe, avec 20 nm RMS d'aberration sphérique induite par le miroir déformable.

- 3) Une séquence de 1000 images à position fixe, avec 50 nm RMS d'aberration sphérique.
- 4-6) 3 autres séquences de 1000 images, dans les 3 conditions précédentes, en réduisant la puissance du faisceau d'excitation, pour obtenir un rapport signal sur bruit équivalent à celui des conditions d'imagerie SMLM réelle.



Figure III.14 — Précision de localisation avec aberration sphérique. (a) Distribution de la position axiale sur les 1000 images. On remarque une évolution rapide de la position. Les points bleus représentent les localisations axiales sur chaque image, tandis que les points orange représentent la moyenne glissante sur 20 images. (b) Distribution des localisations rapportées à la moyenne glissante sur 20 images. (c) Écart-type des localisations dans la direction z , rapportées à la valeur moyenne glissante. En bleu : résultats obtenus avec un rapport signal/bruit élevé. En orange : résultats obtenus avec un rapport signal/bruit plus faible.

Ici encore, chaque séquence d'images est analysée pour en extraire les localisations 3D. On obtient ainsi 1000 localisations par acquisition, ce qui permet d'effectuer des mesures statistiques sur l'étalement des localisations. Après correction des dérives mécaniques sur une bille tierce, une étude statistique de la répartition des localisations permet de déterminer la précision de localisation selon les 3 dimensions (Figure III.14). Dans le cas du rapport signal sur bruit élevé, l'écart-type des localisations axiales varie de 3.2 nm à 3.9 nm, en fonction de la quantité d'aberrations sphériques présente (Figure III.14.c) soit une augmentation de 22 %, et de 17.5 nm à 22.5 nm dans le cas d'un faible rapport signal sur bruit (Figure III.14.d), soit une augmentation de 29 %. En ce qui concerne les directions latérales (x, y), les valeurs des écarts-types restent comprises entre 1.1 et 1.3 nm dans le cas du rapport signal/bruit élevé,

et entre 3.4 et 5.7 nm dans le cas du rapport signal/bruit faible. Ces valeurs sont obtenues avec une bille très proche du focus, avec des localisations comprises entre +50 et -50 nm, et il est important de noter que les résultats peuvent se détériorer si la bille considérée se trouve plus éloignée du plan focal.

Cette expérience met en évidence l'impact des aberrations sphérique sur la précision de localisation. La perte de précision, entre 18 et 27 %, n'est pas négligeable et est d'autant plus forte que le rapport signal sur bruit est faible. On note tout de même que cette perte de précision de localisation est bien moindre, comparée à la perte de justesse de localisation.

Ces résultats concernant la perte de précision et de justesse de localisation en présence d'aberrations sphériques illustrent le fait qu'il est nécessaire de corriger les aberrations pour permettre une imagerie optimale par SMLM en profondeur à l'aide du système soSPIM. Ils montrent aussi que si cette correction est requise pour permettre l'imagerie de cellules situées à une profondeur de 30 μm , il n'est cependant pas nécessaire d'actualiser la correction sur une épaisseur de l'ordre de 10 μm correspondant à l'épaisseur des cellules que nous avons cherché à imager. Une façon de voir ces résultats est que la profondeur du volume isoplanétique dans lequel les aberrations peuvent être considérées comme constante pour notre système est de 10 μm .

III.3.3. Correction des aberrations optiques en profondeur, en conditions réelles

À ce stade, nous pouvons envisager plusieurs procédures de correction des aberrations dans notre système en fonction de la possibilité ou non d'effectuer la correction des aberrations directement en profondeur. La solution la plus simple serait de pouvoir corriger les aberrations directement à la profondeur d'imagerie désirée. Cela requiert la capacité de disposer de billes situées à cette profondeur ce qui peut ne pas être évident suivant la technique de microscopie utilisée. Une seconde solution serait de corriger les aberrations présentes à la lamelle, où il est plus facile de disposer de billes, puis d'appliquer une certaine quantité de correction d'aberrations sphériques en fonction de la profondeur d'imagerie et d'une précalibration de l'évolution de cette aberration avec la profondeur d'imagerie. Cette seconde option ne nécessite pas de disposer de billes en profondeur, mais est basée l'hypothèse que l'évolution de l'aberration sphérique avec la profondeur d'imagerie est constante d'une expérience à l'autre, d'un dispositif d'imagerie/échantillon à l'autre.

La technologie soSPIM repose sur l'utilisation de dispositifs microfabriqués à l'aide d'un polymère d'indice de réfraction égal à celui du milieu d'imagerie. Si cela peu conduire à certaines contraintes pour l'imagerie par SMLM (dont une sera détaillée en section 0), l'utilisation de ces dispositifs peut aussi être mise à profit pour faciliter la correction des aberrations. En effet, il est possible de disposer de sources ponctuelles pouvant servir à la correction des aberrations, quelle que soit la profondeur d'imagerie et ainsi de simplifier le processus de correction. L'optimisation du processus d'incorporation des marqueurs fiduciaires au polymère n'est pas le propos de cette section, et sera présentée plus en détail dans le Chapitre IV (0).

III.3.3.1. Validation de la correction des aberrations en profondeur

Grâce aux dispositifs d'imagerie soSPIM, nous disposons de marqueurs fiduciaires pour la correction des aberrations à la profondeur d'imagerie correspondant aux cellules à cibler (0). Dans notre cas, ces marqueurs fiduciaires sont des nanodiamants fluorescents de 100 nm de diamètre, soit plus petits que la limite de diffraction de l'objectif. Lors de l'imagerie

de cellules individuelles en profondeur par SMLM, après avoir synchronisé le système optique pour permettre l'illumination en feuille de lumière (I.5), une cellule est sélectionnée sur laquelle l'imagerie SMLM sera réalisée. Un nanodiamant situé à proximité de cette cellule dans le polymère formant le puits est alors utilisé pour la correction des aberrations. Cette correction est effectuée par le logiciel MicAO (III.3.1) à l'aide d'une méthode par algorithme 3N utilisant l'intensité maximale de l'image du nanodiamant comme facteur de qualité. Enfin, après correction des aberrations une certaine quantité d'astigmatisme est introduite (60 nm RMS) afin de permettre la localisation des molécules individuelles en 3D (I.3.3.2.2).

Pour confirmer l'intérêt de cette correction, et valider les résultats précédents, nous avons choisi d'utiliser les courbes de calibration d'astigmatisme utilisées pour la localisation en 3D comme métrique de qualité de corrections des aberrations. En effet, la forme de ces courbes est directement corrélée avec de la présence d'aberrations dans le système. Ainsi, leur symétrie est un bon indicateur de la présence globale d'aberrations dans le système, et la différence entre leur minimum est révélateur de la présence d'aberration sphérique plus spécifiquement.

Des exemples de courbes de calibrations ainsi que les PSF associées, obtenues dans diverses situations de correction, sont présentées Figure III.15. Ces acquisitions sont effectuées en conditions réelles, en utilisant un dispositif soSPIM présentant des nanodiamants, à proximité d'une cellule sur le point d'être imagée. On remarque que sans corrections permettant de prendre en compte les aberrations induites par la profondeur d'imagerie (Figure III.15.a — milieu) les courbes de calibrations sont déformées et ne sont plus symétriques. Cela est révélateur de la présence d'aberrations dont on a montré qu'elles peuvent être à l'origine d'une perte importante dans la justesse de localisation des molécules individuelles selon la direction axiale. La correction des aberrations à la profondeur d'imagerie permet de compenser cela en réduisant la déformation des courbes de calibration (Figure III.15.a — droite).

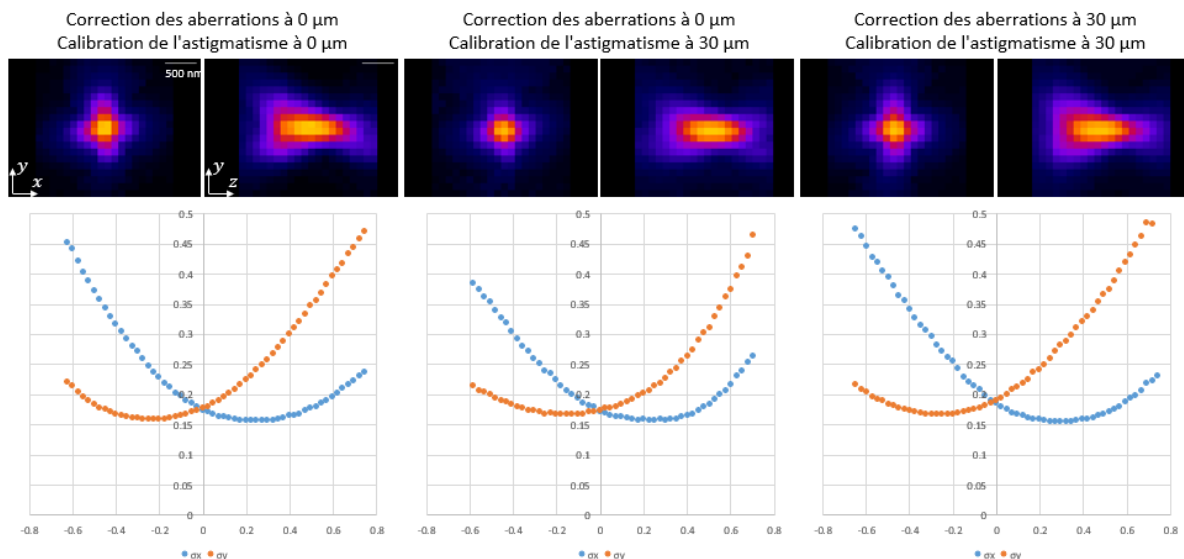


Figure III.15 – Courbes de calibration de l'astigmatisme. Vignettes : projection (max) des PSF selon l'axe z et selon l'axe x . Graphiques : courbes de calibrations, représentant σ_x (bleu) et σ_y (orange) en fonction de z . Les données sont obtenues dans 3 conditions : (gauche) avec une correction des aberrations et une calibration de l'astigmatisme à 0 μm de profondeur, (milieu) avec cette même correction, mais une calibration de l'astigmatisme à 30 μm de profondeur, (droite) avec une correction des aberrations et une calibration de l'astigmatisme à 30 μm de profondeur.

Ces mesures qualitatives ont ensuite été confirmées en estimant le biais sur la localisation axiale des marqueurs fiduciaires selon plusieurs scénarios (Figure III.16) : à 0 μm avec correction des aberrations du système, à 30 μm sans correction supplémentaires, à 30 μm en appliquant une valeur d'aberration sphérique estimée à partir d'une mesure antérieure (Figure III.12), et à 30 μm avec correction des aberrations également à 30 μm . On observe clairement l'effet des aberrations induites par la profondeur d'imagerie sur la justesse de localisation et confirme l'intérêt de corriger ces aberrations pour une imagerie SMLM en profondeur. Par ailleurs, cela semble aussi illustrer que la possibilité de corriger des aberrations directement en profondeur est beaucoup plus fiable qu'une correction basée sur une précalibration. La technologie soSPIM utilisant des dispositifs microfabriqués dans lesquels il est possible d'intégrer des marqueurs fiduciaires représente donc un avantage en ce sens.

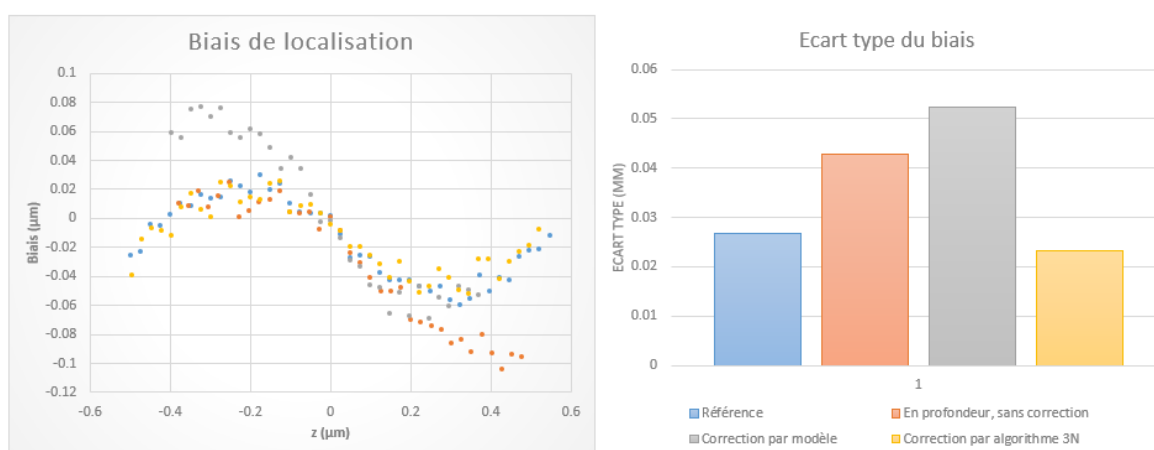


Figure III.16 – biais de localisation mesuré en conditions réelles. A gauche : biais de localisation en fonction de la profondeur. A droite : écart-type du biais sur l'ensemble de la profondeur. Dans les deux graphiques, les données sont obtenues dans les conditions suivantes : bleu : correction des aberrations et une calibration de l'astigmatisme à 0 μm de profondeur. Rouge : Correction des aberrations à 0 μm , calibration de l'astigmatisme à 30 μm . Gris : correction des aberrations à 0 μm , -50 nm d'aberration sphérique induites par le miroir déformable, calibration de l'astigmatisme à 30 μm . Jaune : correction des aberrations et calibration de l'astigmatisme à 30 μm .

III.3.3.2. Imagerie de SMLM en profondeur avec correction des aberrations

La correction des aberrations nous permet donc d'optimiser la qualité d'imagerie en profondeur en corrigeant le biais sur la localisation des molécules individuelles et en optimisant la précision de ces localisations. Cette correction mise en place, nous pouvons effectuer l'imagerie SMLM 3D en profondeur à l'aide du système soSPIM. La Figure III.17 représente les résultats obtenus dans le cas de l'imagerie du réseau de lamine B1, qui délimite la surface du noyau d'une cellule T. Cette cellule se trouve en suspension à l'intérieur d'un puits d'un dispositif soSPIM, à une profondeur de 14 μm au-dessus de la lamelle. Une correction des aberrations à l'aide du système d'AO a été réalisée à cette profondeur à l'aide d'un nanodiamant situé dans le polymère du dispositif soSPIM près de la cellule imagée. Puis, un astigmatisme de 60 nm RMS a été induit afin de permettre la localisation des molécules individuelles en 3D. Cette acquisition a été réalisée grâce à la technique de marquage et de détection DNA-PAINT à partir de la collection de 30 000 images à 10 Hz. Après analyse et filtrage des localisations selon un critère de qualité d'ajustement gaussien $\chi^2 \geq 0.65$ cette section de 1 μm de profondeur a été reconstruite à l'aide de 297 797 localisations.

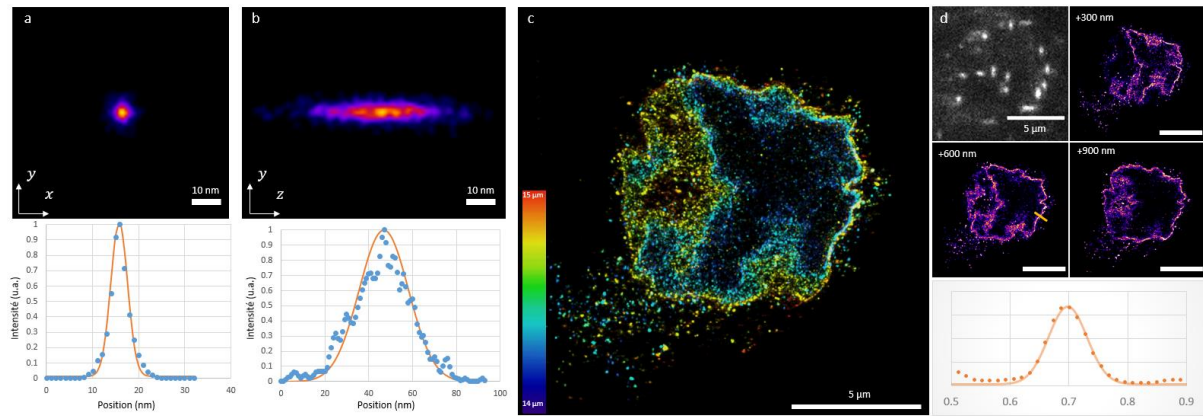


Figure III.17 — Acquisition de Lamine par SMLM en profondeur. (a) Projection selon l'axe z de la reconstruction 3D d'une bille, utilisée pour la correction des aberrations en profondeur. Le profil gaussien présente un écart-type de 2 nm, ce qui équivaut à 1.82 nm. (b) Projection selon l'axe x de la reconstruction de la même bille. Dans cette direction, l'écart-type est de 11.3 nm. Sur les graphiques, les points bleus représentent l'intensité de l'image, normalisée. Cette intensité est proportionnelle au nombre de localisations. Les courbes orange représentent l'ajustement gaussien de chaque courbe. (c) Reconstruction 3D d'une acquisition de Lamine, sur une cellule située à 14 μm de profondeur. Dans cette image super-résolue en 3 dimensions, la couleur représente la profondeur z des localisations, comprise entre 14 et 15 μm . (d) Vignettes représentant le signal de fluorescence moléculaires individuelles, déformé par astigmatisme pour permettre la localisation 3D, ainsi que des sections super-résolues de 300 d'épaisseur. Le graphique représente le profil d'intensité (nombre de localisations, u.a.) le long de la ligne orange. L'abscisse est en μm .

Cette acquisition de l'organisation nanométrique de la lamine B1 au sein d'une cellule en profondeur montre les capacités du système à localiser en 3D des molécules individuelles à une dizaine de micromètres en profondeur pour l'imagerie SMLM 3D. Sur un nanodiamant environnant la cellule, nous avons effectué une mesure de résolution finale après reconstruction. L'écart-type des localisations est de 1.82 nm dans la direction latérale, et de 11.3 nm dans la direction axiale. Cela équivaut à une résolution de 4.3 nm dans la direction latérale, et de 27 nm dans la direction axiale. Notons que les nanodiamants sont de l'ordre de 5 fois plus brillant que les molécules fluorescentes, et que la résolution réelle pour l'image de lamine est donc moins importante. Étant donné que la précision de localisation est inversement proportionnelle à la racine du nombre de photons collectée, on peut donc estimer la précision de localisation des molécules individuelles détectées sur l'image à 10 nm dans la direction latérale et 61 nm dans la direction axiale. En mesurant le profil sur une ligne traversant la membrane cellulaire (ligne orange, Figure III.17.d), et en effectuant un ajustement gaussien sur ce profil, on obtient une largeur à mi-hauteur de 85 nm. On peut également utiliser la méthode de « Fourier Ring Correlation » (FRC), développé par R.P.J. Nieuwenhuizen et al. en 2013²⁰⁹, qui permet d'estimer la résolution globale d'une image SMLM en prenant en compte son contenu en fréquences spatiales. Dans ce cas on obtient une valeur de résolution de 31 nm. Cela démontre donc bien la capacité du système soSPIM à réaliser l'imagerie SMLM plusieurs dizaines de microns au-dessus de la lamelle.

III.3.4. Discussions, limites et perspectives

Au cours de ce chapitre j'ai montré que les aberrations induites par la profondeur d'imagerie, en particulier les aberrations sphériques, peuvent avoir un impact important sur la qualité d'imagerie SMLM, en provoquant une perte de précision mais aussi de justesse des localisations réalisées. Le système d'optique adaptative que j'ai mis en place permet de corriger ces aberrations afin d'en réduire l'impact et de permettre l'imagerie SMLM 3D à plus de 10 μm au dessus de la lamelle, avec des résolutions de 5 nm latéralement, et 25 nm axialement. Cependant, cette méthode de correction présente quelques limites que je vais détailler ici.

III.3.4.1. Biais de localisation

Nous avons mis en évidence que même après correction de toutes les aberrations, la localisation axiale par ajustement gaussien implique tout de même un biais de localisation dans nos expériences. Ce biais résiduel peut avoir deux causes. Soit la correction des aberrations n'est pas suffisamment précise, soit le modèle gaussien utilisé pour la localisation des molécules ne correspond pas à la situation réelle.

Le premier point peut être expliqué par la méthode indirecte utilisée pour corriger les aberrations. Cette méthode est basée sur la mesure de l'impact des aberrations sur une métrique et n'est donc pas aussi précise qu'une mesure directe des aberrations. Le choix de la métrique peut aussi être optimisé afin de mieux s'affranchir du bruit de mesure et autres variations expérimentales afin de proposer une correction plus robuste ^{176,195,199,202,210}

Ensuite, le modèle gaussien utilisé pour la localisation des molécules individuelles est très sensible à la présence d'aberrations. Si ce modèle permet de représenter très fidèlement la forme d'une PSF sans aberrations, il est moins précis lorsqu'il s'agit de prendre en compte des déformations liées à un astigmatisme pour une localisation 3D. La présence d'autres aberrations, en entraînant des déformations encore plus importantes, éloigne donc encore plus la forme des PSF détectées d'une représentation gaussienne pouvant mener à une perte de précision, mais aussi de justesse de localisation. Une façon de s'affranchir de cela serait d'utiliser d'autres méthodes de localisation non basées sur un tel modèle gaussien. Il a ainsi été montré que des processus d'ajustement réalisés sur des PSF simulées¹⁸³ ou expérimentales²⁰⁸ permettent de mieux prendre en compte les imperfections des PSF détectées. Certaines méthodes récentes permettent par ailleurs de calculer une PSF modèle directement à partir du signal des molécules lors de l'imagerie par SMLM sans avoir besoin d'acquérir une PSF 3D¹⁸⁶.

Nous projetons donc d'implémenter ce genre de solutions sur le système soSPIM afin d'améliorer encore ces performances d'imagerie en profondeur.

III.3.4.2. Aberrations dépendantes du champ

Lors de nos premiers essais d'imagerie (IV.4.1), nous nous sommes tout d'abord intéressés à la méthode dSTORM pour l'imagerie SMLM. Cette approche offre en effet certains avantages pour notre application : elle est compatible avec des fréquences d'acquisition 5 à 10 fois plus rapides que la stratégie DNA-PAINT, et elle offre la possibilité de réaliser une imagerie de haute résolution avant de débiter l'acquisition SMLM. Ces avantages ne sont pas négligeables pour l'imagerie SMLM de cellules entières nécessitant l'acquisition séquentielle de plusieurs dizaines de plans, régulièrement espacés en z , pouvant représenter des durées d'acquisition totales de plusieurs heures (IV.4). La possibilité d'évaluer au préalable la qualité de marquage et de signal de la cellule considérée peut aussi représenter une étape de validation importante avant de lancer de telles acquisitions.

Cependant, le milieu tampon nécessaire pour l'imagerie dSTORM a un indice de réfraction différent de l'eau de par sa composition. En effet, le tampon que nous utilisons communément au laboratoire est composé à 36 % de glycérol, ce qui induit une augmentation non négligeable de l'indice de réfraction. Une mesure de cet indice à l'aide d'un réfractomètre nous a donné une valeur de 1.367, alors que l'indice de réfraction du polymère composant les dispositifs d'imagerie soSPIM est de 1.34. Cette différence d'indice induit des aberrations dépendantes de la position du champ de vue. En particulier, j'ai noté que les aberrations évoluent en fonction de la position de l'évènement observé vis-à-vis des puits, comme le montre la Figure III.18. Cela impacte la capacité à utiliser les nanodiamants présents dans le polymère pour corriger de façon efficace les aberrations observées au niveau de l'échantillon

biologique. À l'inverse, pour un milieu d'imagerie d'indice équivalent à celui du polymère des dispositifs soSPIM, comme c'est le cas pour le milieu DNA-PAINT que nous utilisons ($n = 1.339$), aucune aberration dépendante du champ n'est observée. Les corrections d'aberrations effectuées sur des billes à l'intérieur du polymère des dispositifs soSPIM sont donc valables pour les aberrations présentes au niveau des cellules.

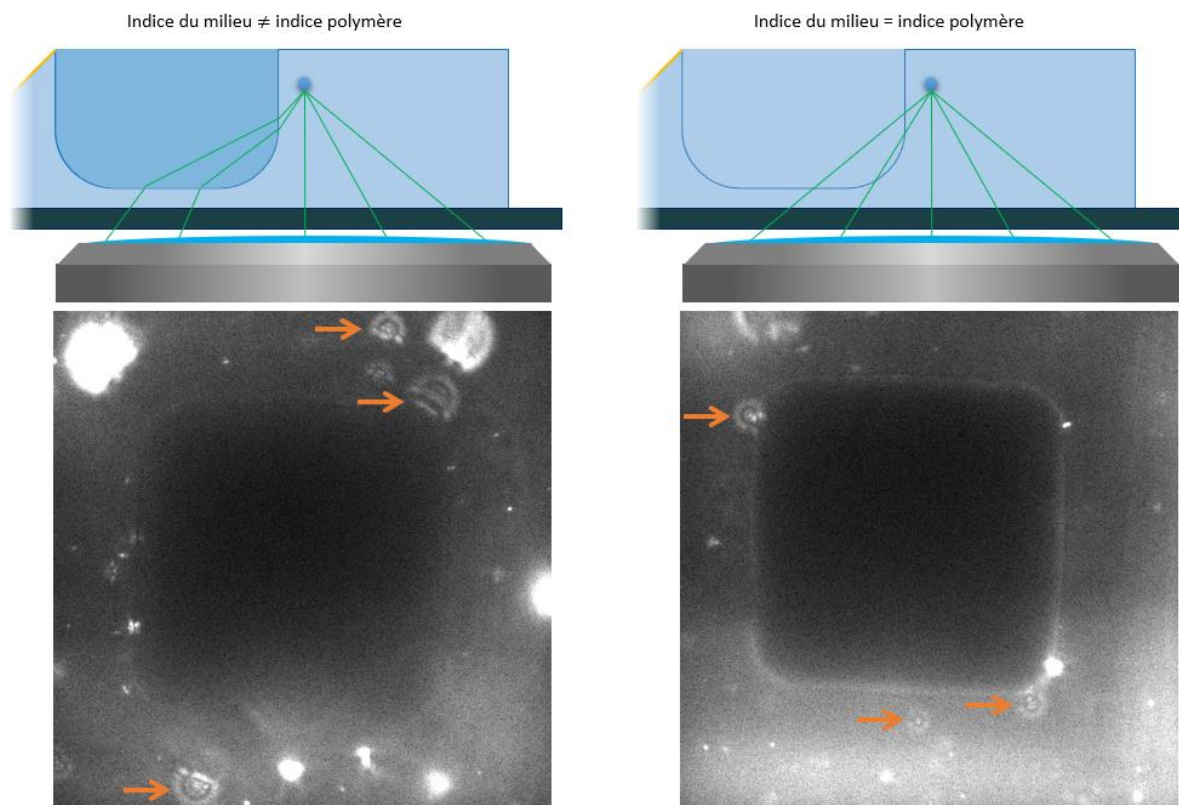


Figure III.18 — Aberrations dépendantes du champ. Les dispositifs soSPIM sont fabriqués à l'aide d'un polymère commercialisé par l'entreprise MyPol, dont l'indice de réfraction est 1.34. L'utilisation de certains milieux d'imagerie d'indice de réfraction plus élevé, comme certains tampons pour l'imagerie dSTORM, provoque l'apparition d'aberrations. Ces aberrations sont dépendantes la position du champ de vue par rapport aux puits du dispositif microfabriqué soSPIM. Ici, à gauche, le tampon dSTORM utilisé induit des aberrations dépendantes du champ, alors qu'à droite, le milieu d'imagerie DNA-PAINT n'induit pas d'aberration dépendante du champ.

Dans ce travail de thèse, plutôt que de chercher à ajuster les indices du milieu dSTORM et du polymère des dispositifs soSPIM entre eux, j'ai pris le parti d'utiliser la technique DNA-PAINT. Cette approche, en plus d'utiliser un milieu dont l'indice correspond à celui de notre polymère, présente un autre avantage considérable pour l'imagerie SMLM de cellule entière : elle est insensible au photoblanchiment des fluorophores (I.3.3.1.4). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant (IV.4.1), le photoblanchiment prématuré des marqueurs est en effet problématique lors de l'acquisition séquentielle de nombreux plans.

Cependant, il serait aussi intéressant d'élaborer un processus d'imagerie compatible dSTORM afin de permettre d'accélérer les processus d'imagerie de volumes entiers. En effet, il récemment été montré que l'optimisation des paramètres d'acquisition en imagerie dSTORM pouvait permettre de réduire considérablement le blanchiment prématuré des fluorophores et donc être plus compatible avec une imagerie séquentielle de volumes importants ²¹¹. Cela pourrait être réalisé par exemple en ajustant l'indice de réfraction du tampon utilisé ou bien celui du polymère dans lequel les dispositifs soSPIM sont fabriqués.

III.3.4.3. Stratégie de correction des aberrations

Une autre limite de notre stratégie de correction des aberrations est que cette correction est fixe pour le volume d'acquisition. Nous avons montré que le volume d'une cellule entière ($10 \times 10 \times 10 \mu\text{m}^3$) peut être considéré comme isoplanétique, et qu'il n'est donc pas nécessaire de renouveler la correction des aberrations au cours de l'imagerie d'une cellule unique. Cependant, cette adaptation de la correction en fonction de la profondeur pourrait être grandement bénéfique pour l'imagerie de plus gros volumes tels que des agrégats complets de quelques cellules.

Par ailleurs, la stratégie actuelle de correction des aberrations ne permet pas de prendre en compte les aberrations induites par l'échantillon lui-même. Si cela est totalement justifiable pour l'imagerie de petits objets ne présentant pas de variations d'indice de réfraction importantes, tels que des cellules individuelles, mais cela l'est beaucoup moins lorsqu'il s'agira d'imager à l'intérieur d'échantillons plus complexes tels que des tranches de cerveaux ou des organoïdes. Dans ce cas la prise en compte des aberrations induites par l'échantillon lui-même sera indispensable ainsi que l'évaluation précise de la taille des cellules isoplanétiques pour l'échantillon considéré afin de déterminer quand il sera nécessaire d'actualiser les corrections réalisées. Dans cette optique, nous envisageons d'implémenter des méthodes récentes de correction des aberrations ne nécessitant pas la présence d'étoiles guides, mais utilisant directement le signal des molécules individuelles d'une acquisition SMLM^{199,201}. En effet ce signal sont des PSF du système d'intensité et de nombre variables par image. Il a ainsi été montré que la définition d'une métrique stable et robuste combinée à un algorithme d'ajustement adapté peut permettre une correction efficace des aberrations jusqu'à $50 \mu\text{m}$ à l'intérieur de tranches de cerveaux simplement à partir de l'acquisition de 300 images de molécules individuelles²⁰¹. L'implémentation de ce type de correction pourrait donc nous permettre de corriger directement les aberrations induites par les échantillons sans avoir recours à l'utilisation de marqueurs fiduciaires. Cela nous offrirait la possibilité d'imager à l'intérieur d'échantillons épais (tranches de cerveau, organoïdes) qui peuvent être directement cultivés ou montés dans les nouveaux dispositifs *JeWells* que nous avons développés et qui ne permettent pas l'intégration de marqueurs fiduciaires telle qu'utilisée dans ce chapitre.

Chapitre IV : Optimisation des processus d'acquisition et de reconstruction

Dans les chapitres précédents, nous avons travaillé sur l'implémentation de méthodes pour relever deux défis posés par l'imagerie de super-résolution par SMLM en profondeur. Le premier défi était lié à l'illumination, tandis que le second était lié à la détection. Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux défis introduits par l'imagerie SMLM de volumes entiers d'une dizaine de microns d'épaisseurs.

Comme introduit en section 1.3.3.3, la qualité d'une image de super-résolution par SMLM dépend de la précision de localisation, mais aussi de la quantité de molécules détectées. Comme nous le verrons dans ce chapitre, afin de pouvoir reconstruire l'ensemble des détails fins de structures complexes, un grand nombre de localisations sont nécessaires, ce qui peut mener à des acquisitions de plus de 24 heures dans le cas de l'imagerie de grands volumes. Or tout microscope est sujet à des dérives spatiales, dont la vitesse peut aller jusqu'à 100 nanomètres par minute. Si elles ne sont pas corrigées, ces dérives ont pour effet d'étaler les structures dans l'espace, ce qui diminue significativement la résolution effective de l'imagerie. C'est d'autant plus vrai en imagerie par SMLM, où l'on peut atteindre des résolutions de l'ordre du nanomètre, et où les dérives doivent donc être corrigées à cette précision. De même, l'analyse des acquisitions et la reconstruction des images de super-résolution sont également des points clefs de l'imagerie par SMLM. Si elles ne sont pas effectuées convenablement, celles-ci peuvent mener à l'apparition d'artéfacts de reconstruction, et donc à une mauvaise représentation des structures imagées.

Dans ce chapitre, je détaillerai les différentes stratégies que j'ai implémentées au cours de ma thèse pour répondre à ces défis. Dans une première partie, je commencerai par exposer les différentes méthodes de correction des dérives existantes, et en particulier celles mises en place pour l'imagerie par SMLM de grands volumes. Nous verrons que la majorité des solutions existantes sont basées sur un traitement post-acquisition des dérives, et nous verrons également en quoi ce type de solution n'est pas compatible avec l'architecture du système soSPIM. Je présenterai alors la solution de correction de dérives 3D en temps réel que nous avons développée, qui tire profit des dispositifs microfabriqués soSPIM pour permettre de disposer de marqueurs fiduciaux sur l'ensemble du volume à imager. Ensuite, je présenterai le logiciel zTrack qui intègre cette solution, et que nous avons par la suite amélioré afin d'automatiser les acquisitions pour l'imagerie de cellules entières pouvant durer plus de 24 h. Dans une troisième partie, je détaillerai le processus de reconstruction des images. Ce processus a été mis en place pour permettre la reconstruction optimale de volumes entiers à l'échelle nanométrique, en utilisant les billes disposées dans les dispositifs d'imagerie soSPIM. Enfin, dans une dernière partie, je présenterai les résultats d'imagerie de cellules entières simples et multicolores utilisant différentes stratégies d'imagerie SMLM. Je discuterai de leurs bénéfices et inconvénients dans le cadre de l'imagerie de grands volumes, et ouvrirai sur une application biologique visant à étudier la répartition de récepteurs membranaires sur des cellules immunitaires.

IV.1. Les dérives spatiales en microscopie

IV.1.1. Origine et conséquences des dérives en microscopie

Tout microscope est sujet à des dérives spatiales, dues aux variations de température et aux contraintes mécaniques que subissent les différents éléments. En effet, les composants du microscope ont des coefficients de dilatation thermique très variés. Cela implique que des variations de température, même faibles, peuvent influencer différemment chaque composant du système et induire des dérives de l'échantillon vis-à-vis de l'objectif. Dans un article de Nahidiazar et al., publié en 2016²¹², il a été montré que même dans des conditions d'expérience minutieusement optimisées réalisées sur un microscope moderne stabilisé, des dérives spatiales subsistent toujours et sont de l'ordre de 10 nm par minute radialement (vitesse instantanée).

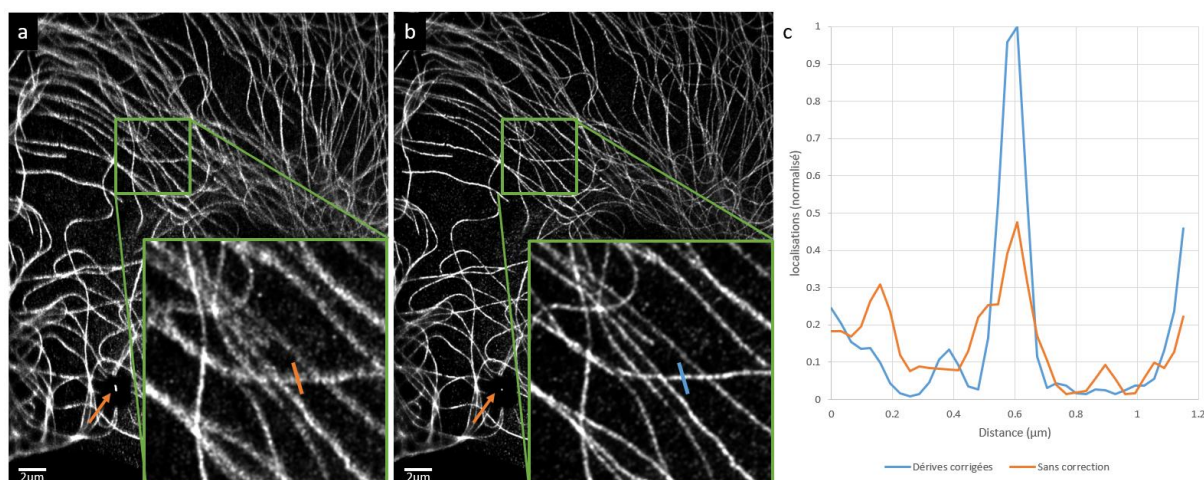


Figure IV.1 — Dérive latérale. Images du réseau de microtubules d'une cellule COS, acquises par SMLM en utilisant la technique DNA PAINT. (a) Acquisition effectuée en corrigeant la dérive axiale (z) à l'aide du Perfect Focus Système intégré au microscope, mais sans correction dans les directions latérales (x, y). (b) Application d'une correction des dérives dans les 3 directions (x, y, z) post-acquisition, en utilisant un marqueur fiduciaire (flèche orange). Insert : zoom dans le cadre vert mettant en évidence l'importance de la correction des dérives spatiales. (c) profils du nombre de localisations (valeurs normalisées) le long de la ligne orange (sans correction) et de la ligne bleue (avec correction). Un ajustement gaussien sur ces valeurs permet d'obtenir un écart-type de 40 nm dans le cas corrigé, contre 78 nm dans le cas non corrigé.

La quantité de dérives observées durant une acquisition est à mettre en relation avec la résolution de la technique d'imagerie utilisée. Dans le cas de l'imagerie haute résolution, il est impossible de résoudre des structures plus fines que 200 nm (I.2.2.3), et les corrections de dérives ne sont donc nécessaires que lorsqu'on observe des échantillons vivants sur de longues périodes. En SMLM toutefois, on peut atteindre des résolutions de l'ordre du nanomètre (jusqu'à 5 nm dans notre cas, III.3.3.2), et toute dérive a donc pour effet de réduire la qualité d'imagerie. C'est d'autant plus vrai que comme introduit en section I.3.3.3, pour l'imagerie de SMLM la qualité de l'image reconstruite ne dépend pas uniquement de la précision de localisation, mais aussi de la quantité de molécules détectées. Afin de pouvoir reconstruire l'ensemble des détails fins de structures complexes, on considère généralement qu'il est nécessaire d'acquérir de 10 000 à 50 000 images sur un système standard d'imagerie SMLM. Avec les stratégies d'imagerie dSTORM et DNA-PAINT, les fréquences d'acquisitions typiques sont de 50 et 10 Hz respectivement, ce qui correspond à un temps d'acquisition de 8 à 40 min pour 25 000 images. À une vitesse de 10 nm par minute, cela peut représenter une dérive allant jusqu'à 80 nm dans le cas de la méthode dSTORM, et 400 nm dans le cas de la méthode DNA-PAINT. La Figure IV.1 représente l'effet que peut avoir une telle dérive latérale au cours d'une acquisition de SMLM en DNA-PAINT. Ici, l'acquisition est effectuée à la surface

de la lamelle en microscopie TIRF. Au cours des 3 heures d'acquisition, une dérive de 400 nm est observée. Sans correction (Figure IV.1.a), les structures de microtubules sont étalées, et on obtient une image moins contrastée, et des structures moins définies. Selon le profil linéaire représenté en Figure IV.1.c, l'épaisseur mesurée du microtubule est de 205 nm (FWHM). En corrigeant les dérives spatiales (Figure IV.1.b), il est possible de retrouver la résolution maximale du système, et le profil d'intensité sur le microtubule donne une épaisseur deux fois plus fine de 105 nm.

La correction des dérives est donc absolument nécessaire pour l'imagerie par SMLM, et cela est d'autant plus vrai que nous souhaitons imager des cellules entières dont l'épaisseur d'environ 10 μm requiert des temps d'acquisition de plusieurs heures. Avec une épaisseur de détection de 0.8 μm , si l'on effectue l'acquisition de façon séquentielle section par section, avec un pas de 400 nm pour assurer une détection continue (IV.3.4), cela représente un minimum de 25 sections correspondant à un temps d'acquisition de 3 à 17 heures en dSTORM et DNA-PAINT respectivement. Il va sans dire que dans ces conditions, les dérives spatiales doivent nécessairement être corrigées minutieusement, sous peine de reconstruire un volume de très faible résolution non représentatif de la structure observée.

IV.1.2. Méthodes de correction des dérives

IV.1.2.1. Systèmes de correction

Il existe plusieurs méthodes pour limiter ou corriger les dérives spatiales en imagerie par SMLM. Une première stratégie est de les corriger en temps réel à l'aide d'un système actif. Le principe est de mesurer en temps réel les dérives, et de les corriger au moyen d'une boucle de rétroaction en déplaçant l'objectif ou l'échantillon. Les microscopes récents destinés à l'imagerie de longue durée sont équipés de systèmes de correction de dérives axiales en temps réel. Le système intégré au microscope Nikon que nous utilisons, nommé « Perfect Focus System », utilise la réflexion d'un faisceau infrarouge sur la lamelle de microscope pour mesurer et corriger en temps réel les dérives axiales avec une précision de l'ordre de 40 nm. Toutefois ces performances restent limitées vis-à-vis des résolutions recherchées et ce système ne permet pas de prendre en compte les dérives latérales (x, y).

Pour permettre une correction plus précise, et dans les 3 directions de l'espace, la démarche communément utilisée est d'appliquer aux images un traitement post-acquisition. Une première méthode consiste à intégrer à l'échantillon des objets ponctuels, tels que des billes fluorescentes, ou des nanodiamants fluorescents, utilisés comme marqueurs fiduciaux. J'utiliserai également le terme « bille » pour parler de ces marqueurs. Grâce à leur localisation au cours du temps il est possible de calculer la dérive pour chaque image de l'acquisition, correspondant à la différence entre la localisation du marqueur à l'image considéré et sa localisation à la première image. Cette valeur de dérive peut alors être retirée aux valeurs des localisations de molécules, pour reconstruire une image exemptée de dérives spatiales^{16,36,213}. Cette méthode a l'avantage de permettre la correction selon les 3 axes de l'espace à condition de pouvoir détecter ces billes en 3D, et de pouvoir disposer de ces marqueurs fiduciaux sur l'échantillon. Il est également possible d'utiliser ce principe pour corriger les dérives en temps réel. Ainsi P. Bon et al.²¹⁴ ont montré que la localisation 3D de nanoparticules par imagerie de phase pouvait permettre une stabilisation d'un système d'imagerie SMLM avec une précision de 0.7 nm radialement et 2.7 nm axialement améliorant très nettement la qualité des images pouvant être acquises.

Une autre méthode de mesure des dérives est basée sur l'utilisation de la « corrélation croisée ». Cette fonction mathématique permet de mesurer la similitude entre deux images en passant par le domaine spectral. L'analyse du pic de similitude nous permet de remonter à la

valeur du déplacement entre les deux images. Ainsi, Bates et al.²¹³ ont montré qu'il était possible de corriger les dérives post-acquisition en utilisant les images acquises pendant l'activation des fluorophores. Ils précisent également qu'il est possible d'utiliser la corrélation croisée directement sur les images dSTORM. En divisant la séquence d'images d'une acquisition de SMLM en plusieurs sous-ensembles, et en les comparant deux à deux par corrélation croisée, cette méthode permet de mesurer puis de corriger les dérives sans avoir à recourir à des marqueurs fiduciaires. Il est ainsi possible de corriger les dérives dans les directions latérales^{55,194,215}, mais également dans la direction axiale, dans le cas où plusieurs sections en z se recouvrant sont comparées deux à deux^{61,198}. Toutefois, les temps de calcul nécessaires n'autorisent pas de correction en temps réel par ce type d'approche.

IV.1.2.2. Stratégies d'acquisition et de correction de dérives pour l'imagerie de gros volumes

En ce qui concerne l'imagerie de grands volumes tels que des cellules entières, le processus d'acquisition peut être une tâche complexe et requiert des stratégies de prise en compte des dérives spécifiques. Les processus d'acquisitions possibles sont variés et intimement liés aux architectures de microscopes utilisés pour l'imagerie, et les stratégies de reconstruction et de correction des dérives dépendent directement de ces processus d'acquisition.

Une première procédure d'imagerie consiste à effectuer l'acquisition volume par volume et de considérer chaque volume exempt de toute dérive spatiale. La correction des dérives entre les volumes est ensuite appliquée post-acquisition. C'est la stratégie utilisée pour acquérir de gros volumes par SMLM avec le système Lattice Light Sheet^{45,100}. Des marqueurs fiduciaires déposés sur la lamelle sont détectés lors de l'acquisition de chaque volume, et leur localisation précise en 3 dimensions permet ensuite de corriger les dérives en 3 dimensions lors de la reconstruction finale du volume imagé.

L'équipe de William Moerner¹⁰⁶ utilise quant à elle une autre approche pour acquérir de gros volumes à l'aide de leur système de microscope à feuille de lumière TILT3D. Ici l'acquisition est réalisée séquentiellement plan par plan, et des marqueurs fiduciaires déposés sur la lamelle de microscopie sont régulièrement imagés. Ces marqueurs peuvent se situer plusieurs micromètres en dessous du plan en cours d'acquisition, et sont imagés par épifluorescence sans changer de position l'objectif. Cette méthode est rendue possible grâce à l'utilisation d'une de PSF en forme de tétrapode permettant une portée de détection axiale jusqu'à 10 μm , réalisée en changeant la forme d'un miroir déformable utilisé en détection. Ce suivi régulier de marqueurs fiduciaires sur la lamelle permet d'une part une correction des dérives en temps réel, et procure d'autre part des références stables pour repositionner précisément les plans les uns par rapport aux autres lors de la reconstruction du volume total.

Une troisième stratégie pour l'imagerie de volume consiste à répéter des cycles d'acquisitions séquentielles de quelques sections qui se recouvrent¹⁹⁸. Une première corrélation croisée à l'intérieur de chaque section permet de corriger les dérives latérales (x, y). Une seconde corrélation croisée est ensuite effectuée entre sections successives afin de les positionner exactement les unes par rapport aux autres. Cette méthode requiert l'acquisition de sections se recouvrant fortement entre elles et n'a été appliquée que pour l'acquisition de volumes de quelques micromètres d'épaisseur.

Les techniques présentées ci-dessus ont été développées, car les méthodes d'acquisition utilisées (1) permettent de corriger les dérives spatiales post-acquisition et (2) ne permettent pas de disposer de marqueurs fiduciaires sur l'ensemble du volume à imager. Dans notre cas, l'utilisation de dispositifs intégrant des miroirs à 45° dans la technologie

soSPIM implique la nécessité de corriger dérives spatiales en temps réel, comme nous le détaillerons dans la section suivante. Cependant, elle offre aussi la possibilité de disposer de marqueurs fiduciaux répartis sur l'ensemble des volumes à acquérir. Nous avons donc mis au point notre propre système de correction des dérives, que nous avons intégré à un logiciel, *zTrack*, permettant de contrôler automatiquement l'ensemble du processus d'acquisition sur de très longues périodes compatible avec l'imagerie par SMLM de cellules entières.

IV.1.3. Impact des dérives avec la technologie soSPIM

La technologie soSPIM a la particularité d'intégrer une partie des optiques au dispositif d'imagerie : les miroirs à 45° (I.5.1). Cette architecture présente plusieurs avantages, de la possibilité d'utiliser des objectifs de forte ouverture numérique pour la détection de molécules individuelles en profondeur, à la capacité de s'adapter à tout microscope inversé commercial pour le transformer en un microscope à feuille de lumière. Cependant, l'utilisation de ces dispositifs d'imagerie implique également des contraintes. En particulier, l'utilisation de miroirs à 45° pour réfléchir le faisceau d'excitation crée un lien entre la position latérale du dispositif et la position axiale de la feuille de lumière. Cela implique qu'un déplacement latéral (x, y) de l'échantillon par rapport à l'objectif a pour conséquence de déplacer axialement (z) la feuille de lumière (Figure IV.2.a). Une dérive latérale du dispositif au cours d'une acquisition aura donc pour conséquence la perte du signal d'excitation.

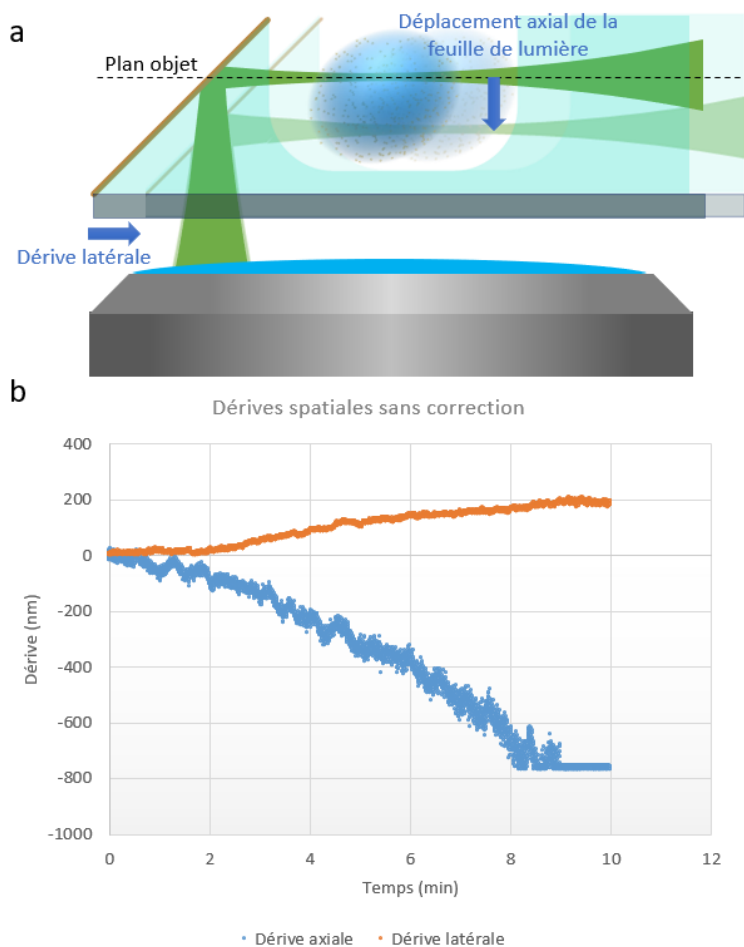


Figure IV.2 - Dérives spatiales et architecture soSPIM. (a) L'architecture soSPIM, par l'utilisation d'un miroir à 45°, crée une relation entre le positionnement de l'échantillon, le positionnement du faisceau laser, et le plan illuminé par la feuille de lumière. Si la position de l'échantillon change suite à une dérive spatiale, sans ajustement du faisceau laser l'illumination ne se fait plus dans le plan focal de l'objectif. La correction des dérives spatiales doit donc être faite en temps réel, pendant l'acquisition. (b) Graphique représentant les dérives spatiales sur notre microscope. Ce graphique est obtenu par localisation d'un nanodiamant fluorescent lors d'une acquisition sans correction de la dérive.

Pour garantir une illumination homogène et stable du plan imagé sur des temps compatibles à l'imagerie par SMLM, il est donc nécessaire de s'assurer que les dérives axiales, mais aussi latérales (x, y, z) soient petites comparées à l'épaisseur de la feuille de lumière. Pour nos acquisitions SMLM, nous utilisons une feuille

de lumière de 2 μm d'épaisseur ($1/e^2$) dont le paramètre confocal de 12 μm permet l'illumination homogène de cellules entières. Or, comme le montre la Figure IV.2.b, les dérives spatiales sur notre microscope sont de l'ordre de 80 nm par minute dans l'axe de l'objectif, et

de l'ordre de 20 nm par minute dans la direction latérale. En ne corrigeant que les dérives axiales, une acquisition d'une heure peut induire une dérive latérale de plus de 1.2 μm , soit une perte de plus de 50 % de l'efficacité d'excitation, et la feuille de lumière peut totalement sortir du champ de détection +de l'objectif en moins de 2 heures. Nos acquisitions pouvant durer jusqu'à 36 heures pour l'acquisition d'une cellule entière (IV.4), l'architecture soSPIM requiert donc une correction en temps réel les dérives latérales en plus des dérives axiales.

IV.2. zTrack : solution pour la correction de dérive en temps réel et l'acquisition SMLM automatique de cellules entières

L'imagerie SMLM de volumes importants, d'une dizaine de microns d'épaisseur ou plus, nécessite la mise en place de stratégies spécifiques d'acquisition et de reconstruction qui dépendent de l'instrument utilisé. En particulier, la méthode de correction des dérives spatiales est fondamentale, et l'architecture spécifique du soSPIM requiert une prise en compte en temps réel.

Toutefois, les dispositifs d'imagerie soSPIM offrent aussi la possibilité unique de disposer de marqueurs fiduciaux sur l'ensemble du volume qui peut être imagé. Grâce à cela, nous avons mis au point une solution logicielle permettant non seulement de corriger les dérives spatiales en 3 dimensions en temps réel, mais aussi de gérer automatiquement l'ensemble de l'acquisition. Dans cette section, je présenterai ce logiciel nommé zTrack, que j'ai codéveloppé avec Marine Cabillic, alors doctorante au sein de notre équipe.

IV.2.1. Solution de correction des dérives implémentée dans le système soSPIM.

Pour permettre la correction en temps réel des dérives spatiales, nous avons mis à contribution l'ensemble des expertises de notre équipe dans le but de développer une solution basée sur la localisation en temps réel de marqueurs fiduciaux. Dans notre cas, ces marqueurs fiduciaux sont des nanodiamants, mais par souci de généralisation et de facilité de lecture, j'utiliserai régulièrement le terme « bille », la méthode étant valable quel que soit le type de marqueur fiducial.

Pour le développement de cette solution de correction des dérives spatiales, nous avons en particulier cherché à tirer profit de l'utilisation des dispositifs microfabriqués nécessaire à l'imagerie soSPIM. Ces dispositifs, décrits en détail en section I.5.1, sont composés de puits créés dans un polymère et longeant des miroirs à 45°. Il offre la possibilité d'intégrer des marqueurs fiduciaux directement dans le polymère et ainsi de les répartir sur l'ensemble du volume entourant les puits et non plus uniquement sur un plan au niveau de la lamelle. Cela ouvre la possibilité de réaliser des acquisitions séquentielles, section par section, en détectant des marqueurs fiduciaux sur chacune des sections imagées. Nous pouvons ainsi non seulement mesurer et corriger les dérives mécaniques, mais aussi disposer de points de références pour la reconstruction finale du volume. Ce dernier point sera discuté dans la partie IV.3.

IV.2.1.1. Optimisation de la microfabrication

En collaboration avec Miguel Sambrano, ingénieur de notre équipe, j'ai cherché à optimiser le processus de fabrication des dispositifs soSPIM pour (1) y incorporer des nanodiamants de façon homogène et à une concentration adaptée à nos contraintes

d'acquisition, et (2) réduire leur signal d'autofluorescence impactant la qualité de l'imagerie SMLM.

Les marqueurs fiduciaires que nous utilisons sont des nanodiamants fluorescents commercialisés par la société Adámas Nanotechnologies. Ces nanodiamants sont rendus fluorescents grâce à l'introduction de « centres azote-lacune » chargés négativement (NV⁻) à l'intérieur de la maille cristalline du diamant. Leur avantage principal par rapport aux billes fluorescentes, communément utilisées et composées de fluorophores organiques, est que ces nanodiamants fluorescents sont totalement insensibles au blanchiment²¹⁶. Cela permet de garantir que les marqueurs fiduciaires restent brillants tout au long de l'acquisition, en particulier pour des acquisitions très longues de type DNA-PAINT, là où des billes fluorescentes ont tendance à blanchir et donc à perdre en intensité voir s'éteindre totalement. Par ailleurs cette stabilité permet de préserver leur fluorescence même après de l'étape de réticulation du polymère par exposition aux UV pendant plusieurs minutes (~ 20 min). Ces nanodiamants sont toutefois généralement moins brillants que les billes fluorescentes, ce qui peut rendre leur détection plus délicate et nécessite de réduire le signal d'autofluorescence du polymère lui-même.

Pour notre application nous avons utilisé des nanodiamants rouges (référence ND-NV-100nm-Md) commercialisés sous la forme d'une solution aqueuse, dont l'émission maximale est à environ 675 nm et l'absorption maximale à environ 570 nm. Cette solution de nanodiamants est diluée dans le polymère des dispositifs soSPIM (1.5.1) dans le but d'obtenir environ 10 billes (nanodiamants) par section imagée pouvant être utilisées pour mesurer, et donc corriger, les dérives spatiales. Notre méthode de localisation par ajustement gaussien sur une PSF présentant un astigmatisme nous permet de détecter et localiser les événements de fluorescence sur une épaisseur de 0.8 μm . Lors de l'imagerie de volume, nous souhaitons limiter au maximum la quantité de données acquises. Nous limitons donc l'observation à une fenêtre d'environ 60x80 μm^2 , autour des puits carrés de 40 μm de côté. Le volume de polymère par section imagée est donc de 2.56×10^{-9} mL, dans lequel nous souhaitons disposer d'environ 10 billes, soit une concentration de 3.9×10^9 billes/mL. Pour obtenir cette concentration, il faut donc diluer la solution mère (~ 5.4×10^{11} billes/mL) à 0.7 %.

L'incorporation des nanodiamants dans le polymère MY-134 a toutefois posé en particulier deux problèmes que nous avons dû surmonter (Figure IV.3.a) : (1) la réduction des agrégats diminuant la concentration effective en nanodiamant et créant un bruit de fond important, et (2) la suppression de bulles impactant la propagation de la feuille de lumière dans le polymère. MY-134 est un polymère fluoré et est donc hydrophobe, or les nanodiamants sont commercialisés dilués dans une solution aqueuse. Leur mélange crée donc une solution hétérogène présentant des bulles d'eau. Ces bulles ont pour conséquence de multiplier les agrégats de nanodiamants, et de créer un milieu optiquement hétérogène impactant la propagation de la feuille de lumière. Nous avons donc cherché à remplacer l'eau dans laquelle les nanodiamants sont suspendus par un solvant plus miscible avec notre polymère. Il nous est alors apparu que l'acétone présente plusieurs avantages dans cette optique : (1) elle est totalement miscible avec le polymère MY-134, (2) elle n'altère pas les nanodiamants, et (3) elle possède la particularité d'être très volatile, et donc de s'évaporer rapidement ne laissant que les nanodiamants et le polymère dans le mélange. Nous avons donc resuspendu nos nanodiamants dans une solution d'acétone pure ce qui nous a permis d'améliorer la qualité de leur mélange dans le polymère MY-134. Enfin, nous avons expérimentalement déterminé la meilleure concentration permettant de compenser la présence de quelques agrégats pour être en capacité de détecter une dizaine de nanodiamants par section. Il est apparu qu'une concentration de 2.5 % de la solution de nanodiamant diluée dans le polymère MY-134 était optimale. Le résultat obtenu est présenté

Figure IV.3.b et montre que l'acétone permet d'éliminer la présence de bulles et de fortement réduire les agrégats.

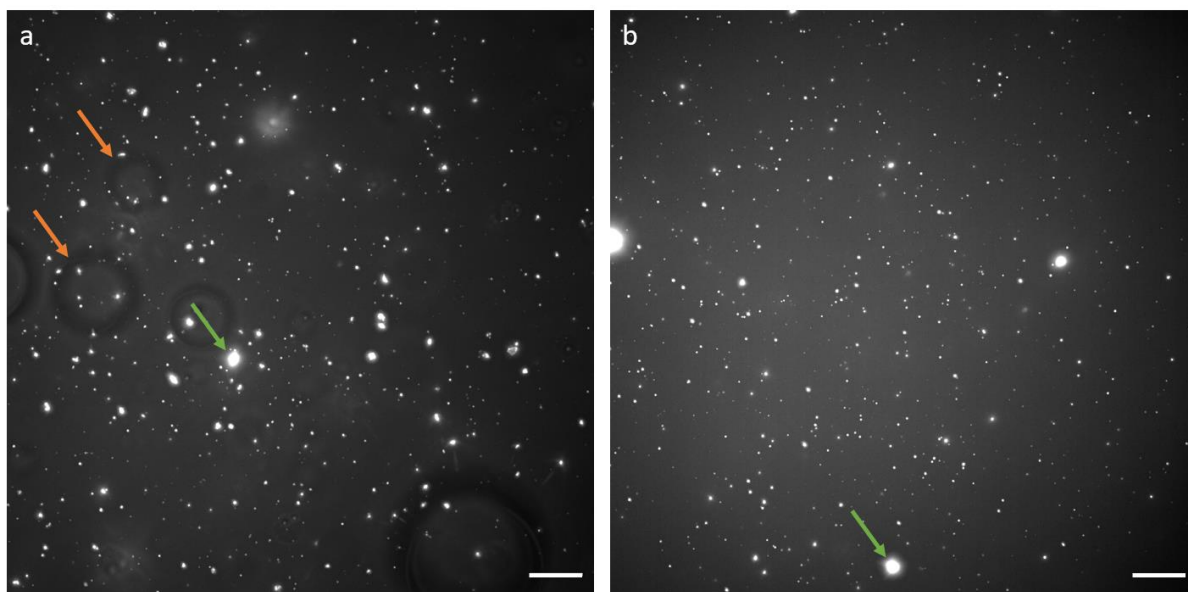


Figure IV.3 – Amélioration de la microfabrication. Ces images sont obtenues par projection d'intensité maximale sur une épaisseur de 50 μm en z . (a) Le polymère a été mélangé avec la solution acqueuse originelle de nanodiamants. On observe la présence de bulles (flèches orange) et de nombreux agrégats (flèche verte). (b) Dans le cas où les nanodiamants sont dilués dans de l'acétone avant de les mélanger avec le polymère, nous n'observons plus de bulle, et les agrégats sont moins nombreux. Barre d'échelle : 10 μm

Un autre problème que nous avons dû surmonter est l'autofluorescence non négligeable du polymère MY-134 dans une large partie du spectre visible, comprenant la gamme spectrale des nanodiamants. En effet, ces derniers ne sont pas extrêmement brillants et la précision de leur localisation dépend directement du rapport signal sur bruit de leur détection (section I.3.3.3). Pour assurer une meilleure localisation et donc une meilleure correction des dérives spatiales possibles, nous avons cherché des moyens de diminuer cette autofluorescence. Par ailleurs, elle impacte aussi dans une moindre mesure la détection des molécules individuelles situées dans les puits, et donc sa réduction ne peut être que bénéfique pour les acquisitions de SMLM avec la technologie soSPIM.

Cette autofluorescence est principalement due à la présence de photo-initiateurs non consommés par la réaction de polymérisation après illumination aux UV. Ces photo-initiateurs sont en majorité extraits après polymérisation par plusieurs bains dans de l'éthanol. Cependant, les traces restantes peuvent s'avérer problématiques pour notre application. En s'inspirant de travaux publiés par l'équipe de H. Shroff¹¹³ sur l'utilisation d'un polymère semblable (BIO-133 aussi commercialisé par l'entreprise MyPolymer), nous avons développé le protocole suivant pour supprimer cette autofluorescence : les dispositifs destinés à l'imagerie SMLM sont immergés dans de l'éthanol à 70 % puis exposés sous une lampe UV (UV-KUB, KLO2) pendant 2 heures. Cette étape permet de fortement réduire l'autofluorescence du polymère et ainsi atteindre des rapports signal sur bruit supérieur à 10 pour la détection des nanodiamants assurant une précision de localisation de 5 nm latéralement (x, y) et 25 nm axialement (z).

IV.2.1.2. Correction 3D des dérives en temps réel

Une fois les nanodiamants répartis dans le polymère des dispositifs soSPIM, il s'agit à présent de les détecter et de les localiser en 3D afin de mesurer les dérives spatiales au cours du temps. Pour cela nous nous appuyons sur une méthode de localisation développée au sein

de notre équipe⁵⁶. Cette méthode permet une localisation 3D des émetteurs ponctuels par astigmatisme en temps réel. Les dérives mesurées au cours de l'acquisition par rapport à une position de référence acquise en début de processus sont alors corrigées à l'aide d'une boucle de rétroaction contrôlant une platine de positionnement piézoélectrique 3 axes.

Comme indiqué dans la section (IV.1.3), les dérives spatiales de notre système sont de l'ordre de la dizaine à la centaine de nanomètres par minute selon la direction, et il n'est donc pas nécessaire de les corriger à chaque image pour maintenir la feuille de lumière en place. Pour permettre une correction des dérives la plus précise possible, celle-ci n'est pas effectuée à chaque image, mais après une moyenne calculée sur N images. L'objectif de cette moyenne est de lisser les effets des bruits de localisation (5 nm (x, y), 20 nm (z)), et de la platine de positionnement (5 nm (x, y, z)) afin de garantir une correction plus précise. Cette méthode de correction des dérives a été implémentée au logiciel zTrack qui sera présenté dans la section suivante.

La Figure IV.4 représente les dérives spatiales observées (1) sans correction, (2) en corrigeant uniquement les dérives en z grâce au Perfect Focus System du microscope, et (3) en corrigeant les dérives selon les 3 dimensions (x, y, z) grâce à la solution logicielle zTrack. On remarque que cette dernière permet de corriger les dérives spatiales avec une précision de 15 nm dans la direction latérale et de 30 nm dans la direction axiale, soit légèrement meilleure que la correction axiale procurée par le Perfect Focus System. Il est à noter ici que cette précision de correction est bien supérieure à notre besoin, puisque son objectif premier est d'assurer le maintien de la feuille de lumière sur le plan imagé tout au long de l'acquisition. Cependant, cette correction n'est pas aussi précise que ce que l'on pourrait obtenir en traitement post-acquisition. Cette limite vient du fait que la platine de translation nanométrique présente un bruit de quelques nanomètres qui, ajouté à la précision de localisation de 5 nm, limite les performances de correction en temps réel. Une correction complémentaire post-acquisition est donc aussi effectuée lors du traitement des acquisitions afin de supprimer les dérives résiduelles, comme nous le verrons en section IV.3.1.

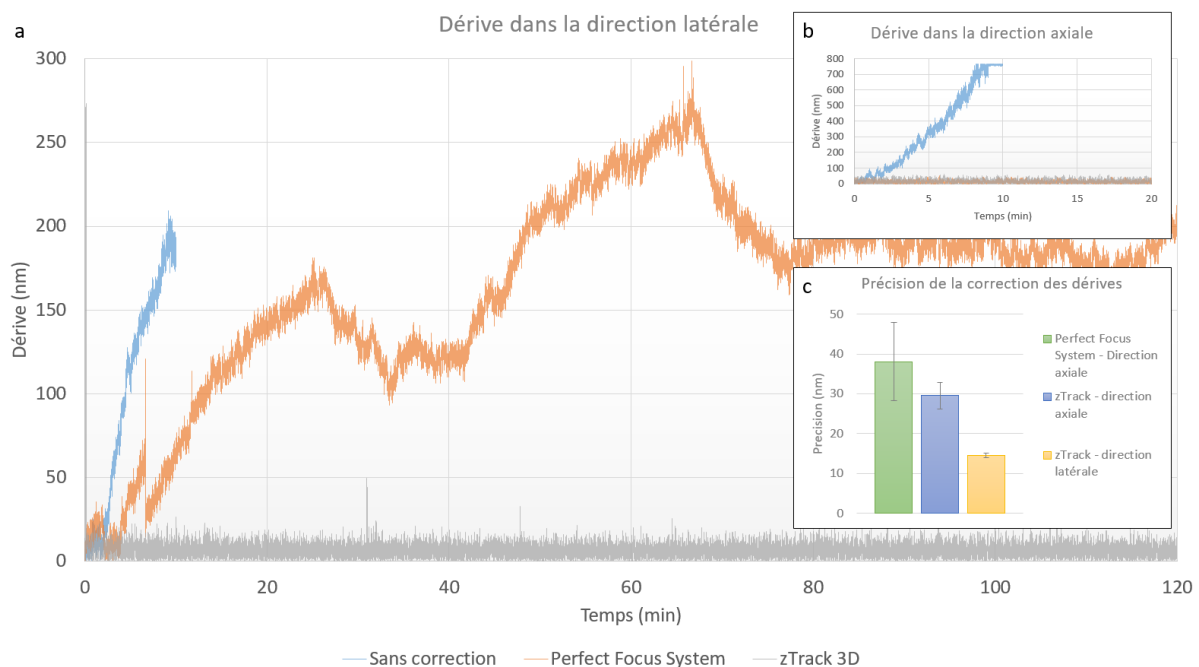


Figure IV.4 – Correction des dérives spatiales. (a, b) Évolution des dérives latérales (a) et axiales (b), mesurées au cours d'une expérience de 2 heures. Sans correction l'acquisition n'a pas pu atteindre 10 minutes, car le fiduciaire est sorti du champ de détection de l'objectif en z . En utilisant le Perfect Focus System, l'acquisition peut continuer, car le marqueur fiduciaire reste dans le champ de l'objectif, mais la dérive latérale dépasse les 150 nm

au bout de 20 minutes. En utilisant zTrack, les dérives sont corrigées dans les trois directions. La vignette représente la précision de la correction des dérives. On remarque que zTrack permet une correction avec une précision de 15 nm dans la direction latérale, et de 30 nm dans la direction axiale meilleure que le Perfect Focus System de notre microscope.

IV.2.2. Processus d'acquisition automatisé par zTrack.

Le processus d'acquisition plan par plan que nous avons mis en place (Figure IV.5) est entièrement contrôlé et automatisé grâce au logiciel zTrack. Avant le début de l'acquisition, l'utilisateur s'assure d'avoir sélectionné une cellule viable en termes de signal de molécules individuelles (expression de la protéine, densité de marquage, intensité...), et paramètre les logiciels soSPIM et zTrack. Le paramétrage de soSPIM consiste à synchroniser la position de la feuille de lumière avec le plan (z) observé, comme introduit précédemment (section I.5), afin d'assurer la possibilité d'imager l'ensemble du volume. La qualité de cette synchronisation est essentielle, car l'objectif est de supprimer toute intervention humaine pendant l'acquisition, et un défaut de synchronisation induirait un décalage croissant entre la position de la feuille de lumière et le plan imagé au cours de l'acquisition. Puis l'utilisateur configure les différents paramètres de l'acquisition qui sera entièrement gérée par le logiciel zTrack : le nombre de plans et le pas entre les plans, les paramètres de correction de dérive tels que la fréquence et le seuil de correction, ou encore la fenêtre de moyennage des localisations des nanodiamants.

Un paramètre clef du processus d'acquisition est le pas entre les sections acquises afin d'assurer une reconstruction homogène sur l'ensemble du volume imagé. Le miroir déformable que nous utilisons pour corriger les aberrations (III.3.1) nous permet d'introduire l'astigmatisme nécessaire à la localisation des événements de fluorescence en 3 dimensions, sur une épaisseur de 0.8 μm . Nous mesurons par ailleurs que la probabilité de détection d'une molécule est maximale lorsqu'elle est située sur le plan focal du fait du caractère gaussien de l'illumination en z et de l'étalement des PSF avec la distance axiale vis-à-vis du plan focal (Figure IV.9.a, section IV.3.4). Pour assurer une répartition homogène des localisations sur l'ensemble du volume d'acquisition, il est donc nécessaire d'acquérir des sections qui se recouvrent suffisamment afin de créer une continuité de détection des molécules individuelles selon l'axe z (Figure IV.9, section IV.3.4). Nous avons trouvé qu'un pas de 300 à 400 nm nous permet cela. De plus, cela nous assure que les nanodiamants utilisés pour la correction des dérives spatiales sont systématiquement détectables sur au moins deux sections consécutives. Nous verrons en section 0 que cela permet la reconstruction du volume total en procurant des points de références entre les différentes sections acquises.

Une fois l'ensemble des paramètres définis, l'utilisateur peut lancer l'acquisition qui est alors totalement prise en charge par zTrack selon la procédure représentée Figure IV.5. Le logiciel détecte et sélectionne automatiquement une bille de référence en début d'acquisition de chaque section en fonction de son intensité, de sa forme, et de sa taille. Il détermine sa position initiale, et suit sa position en temps réel au cours de l'acquisition de la section. À chaque mesure de dérive supérieure au seuil déterminé par l'utilisateur, une correction est appliquée en utilisant la platine de translation piézoélectrique. À la fin de chaque section, le logiciel sauvegarde l'ensemble des données, déplace la platine selon l'axe z en fonction du pas paramétré, modifie en conséquence la position de la feuille de lumière, puis répète la procédure d'acquisition d'une section avec correction 3D des dérives. Cette procédure est répétée pour l'ensemble des plans prédéfinis par l'utilisateur. De plus, le logiciel zTrack sauvegarde également des fichiers de métadonnées contenant des informations telles que la position axiale de chaque section, la région de l'image contenant la bille sélectionnée, ou la position de la bille tout au long de la séquence d'images. Ces métadonnées seront ensuite utilisées pour la reconstruction finale de l'image (voir section 0).

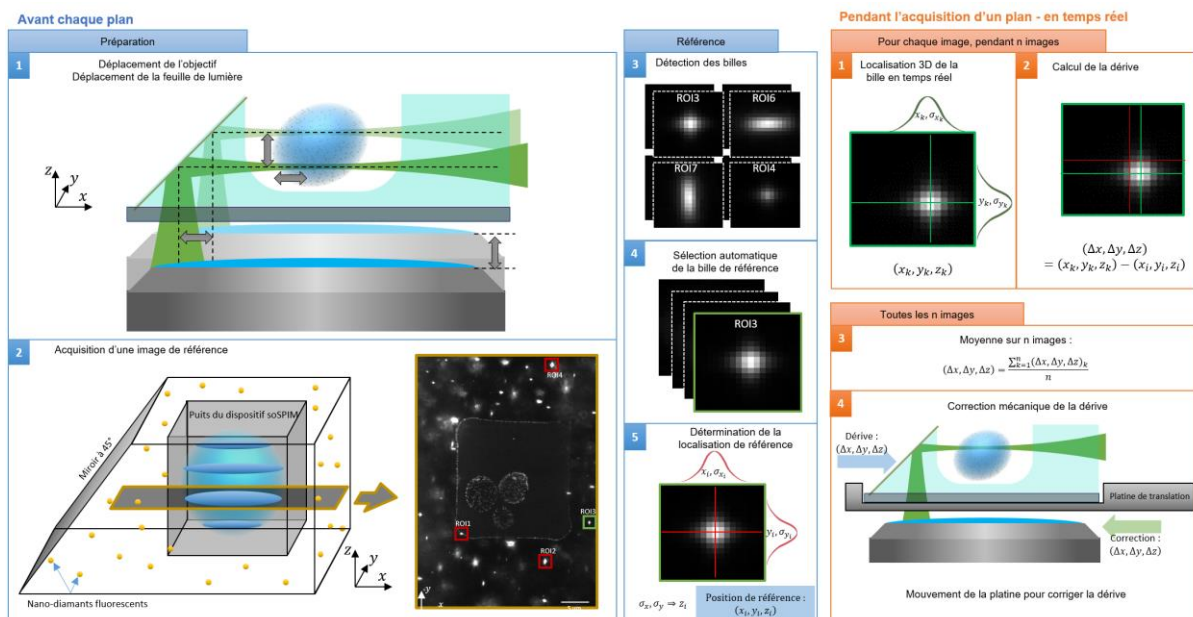


Figure IV.5 - Pipeline d'acquisition. L'acquisition se fait de manière séquentielle plan par plan. Avant chaque section (cadres bleus), le logiciel zTrack déplace l'objectif sur le plan à observer, et le logiciel soSPIM adapte la position de la feuille de lumière en conséquence. Une image est acquise à partir de laquelle le logiciel zTrack détecte automatiquement les billes. Au moyen d'un score basé sur l'intensité, la taille, et la ressemblance avec une forme gaussienne, le logiciel sélectionne une bille de référence optimale, et mesure sa localisation précise en 3 dimensions. Puis le logiciel démarre automatiquement l'acquisition d'une séquence d'image pour ce plan, dont les paramètres sont fixés par l'utilisateur. Pendant l'acquisition de la séquence (cadre orange) la localisation 3D de la bille est mesurée en direct, et toutes les n images (typiquement 15), une moyenne est calculée et une correction des dérives éventuelles effectuée.

IV.3. Méthode de reconstruction de cellules entières.

Une fois l'acquisition terminée, les données doivent être traitées pour permettre la reconstruction super-résolue du volume entier imagé. Cette étape de traitement et de reconstruction n'est pas triviale, et représente les derniers défis que j'ai relevés au cours de ma thèse. Dans cette section, je vais tout d'abord exposer brièvement la méthode utilisée pour localiser les molécules et corriger les dérives spatiales résiduelles. Nous verrons ensuite que le biais de localisation introduit précédemment (III.3.2.2.1) a pour conséquence de créer des artefacts de reconstruction. Pour corriger ces artefacts, j'ai mis en place une procédure de repositionnement des sections imagées basée sur la localisation des marqueurs fiduciaires, que je développerai dans une troisième partie. Enfin, dans une dernière partie, je présenterai les résultats permettant de valider les processus de reconstruction que nous avons mis en place.

IV.3.1. Méthode de localisation des molécules individuelles : PALMTracer

Pour la localisation 3D des molécules par la méthode d'astigmatisme, nous utilisons le logiciel PALMTracer, développé au sein de notre équipe par Jean-Baptiste Sibarita, Adel Kechkar et Corey Butler. PALMTracer est un outil complet, permettant en premier lieu la détection et la localisation de molécules individuelles par analyse d'ondelette et ajustement gaussiens^{56,217}. PALMTracer permet également de traiter les données, en appliquant par exemple des filtres, et d'exporter ces données sous divers formats, dont un format compatible avec le logiciel ThunderSTORM²¹⁸ que j'ai utilisé pour la reconstruction des images finales (IV.4). J'ai donc utilisé le logiciel PALMTracer pour analyser les données acquises, section

par section, et obtenir les localisations précises des émetteurs ponctuels pour chaque séquence d'image, que ce soit les marqueurs fiduciaires ou les clignotements des molécules individuelles.

Une seconde étape a ensuite consisté à corriger les dérives résiduelles à partir des localisations des marqueurs fiduciaires. En effet, nous avons vu précédemment (III.3.3.2) que notre méthode de localisation 3D par astigmatisme permet d'atteindre une résolution de 5 nm dans la direction latérale, supérieure à la précision de la correction des dérives en temps réel que j'ai évaluée à 15 nm dans cette direction (IV.2.1.2). Pour obtenir des images avec la meilleure résolution possible, il est donc nécessaire d'effectuer une correction supplémentaire de ces dérives résiduelles. Pour automatiser cette correction, nous avons ajouté à PALMTracer une fonction permettant de récupérer les métadonnées produites par zTrack. Parmi ces métadonnées, les régions d'intérêt contenant les billes de références sont utilisées pour déterminer la bille qui sera utilisée pour la correction des dérives à chaque section. En l'espace de 2 heures, PALMTracer permet de traiter un jeu de données comprenant 10 sections, chacune composée de 15 séquences de 1000 images. Cela représente 150 000 images pour 120 Go de données. En fonction de la quantité de données totales à traiter (jusqu'à 70 plans composés de 15 000 images), l'analyse d'une acquisition complète peut durer plus de 10 heures. Notons que notre méthode de localisation est actuellement réalisée post-acquisition pour des raisons de développement logiciel. L'implémentation d'une analyse en temps réel des acquisitions rendu possible par les travaux de l'équipe⁵⁶ fait partie de nos perspectives, et permettra de supprimer ce temps d'analyse supplémentaire.

IV.3.2. Artéfacts de reconstruction

Une fois l'ensemble des images traitées, et les données de localisation de chaque section extraite, le défi suivant concerne la reconstruction du volume entier. Pour cela, les sections doivent être convenablement positionnées les unes sur les autres. La méthode la plus évidente et la plus directe consiste à ajouter un offset (valeur de décalage) à chaque localisation, correspondant à la position du plan sur laquelle elle a été réalisée. Dans notre cas, le premier plan étant la référence, les localisations du second plan se voient associer un offset dz , le plan suivant $2 \times dz$, et ainsi de suite, où dz est le pas entre les sections. Cependant, comme le montre la Figure IV.6, en appliquant cette méthode de reconstruction, nous observons des artéfacts de reconstruction.

Les artéfacts présents sur les images (a1) et (b1) de la Figure IV.6 ont déjà été observés à de multiples reprises en microscopie de super-résolution²⁰⁴⁻²⁰⁷. Cette distorsion latérale dépendante de la profondeur, couramment appelée « wobble », peut avoir de nombreuses sources, souvent associées à des aberrations optiques du système. Elle provient du fait que la position radiale de l'intensité maximale de la PSF varie avec la profondeur z . En règle générale, le wobble peut être corrigé post-acquisition au moyen d'une calibration effectuée sur un marqueur fiduciaire. Cependant, ce wobble dépend généralement aussi de la position dans le champ de vue et est donc particulièrement complexe à corriger comme c'est le cas dans notre système. Nous faisons également l'hypothèse que ce wobble peut être plus prononcé dans notre système qu'habituellement du fait de légères différences d'indice de réfraction entre le polymère et le milieu d'imagerie situé dans les puits. Afin de minimiser cela, nous avons opté pour la méthode d'imagerie par SMLM DNA-PAINT, qui permet d'utiliser un milieu dont l'indice de réfraction est très proche du polymère comme nous l'avons caractérisé à l'aide d'un réfractomètre. Nous avons en effet montré en section III.3.4.2 que ce milieu d'imagerie permettait de réduire significativement la quantité d'aberrations dépendantes du champ. Cependant si ces indices ne sont pas parfaitement identiques, il reste possible que des aberrations subsistent. Cela expliquerait le fait que nous observons un

wobble variable sur le champ de vue, mais également en fonction de la profondeur, car plus nous imageons en profondeur et plus la lumière doit traverser une proportion élevée de milieux d'indices potentiellement différents. Dans ce cas, un ajustement plus précis de l'indice de réfraction du milieu d'imagerie pourrait nous affranchir de cet artéfact.

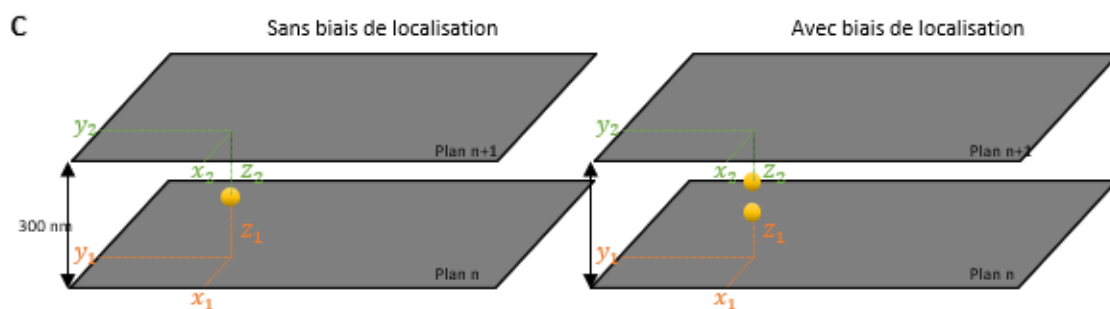
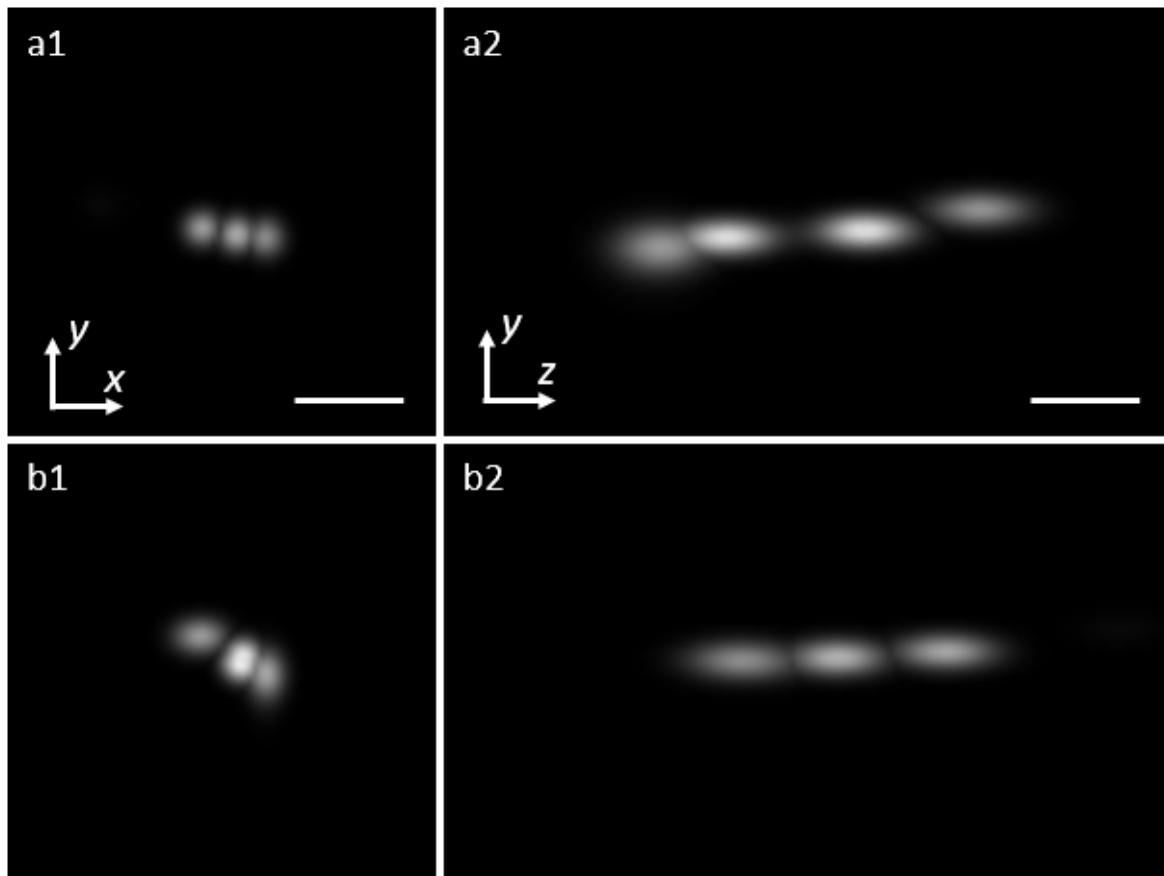


Figure IV.6 – Artéfacts de reconstruction. Chaque image représente la reconstruction 3D d'une bille isolée, localisée dans 3 sections d'acquisition. On note que la bille apparaît 3 fois pour chaque image. Les images (a1) et (b1) représente les projections selon l'axe z tandis que les images (a2) et (b2) représente des projections selon l'axe x . Les artéfacts présents dans le plan (x, y) sont dus à l'effet de wobble. Dans la direction axiale, les échos sont dus aux biais de localisation axiale. Barre d'échelle : 20 nm. (c) sans biais de localisation, la bille détectée dans chaque plan est bien reconstruite à une unique position. Avec un biais de localisation, la distance entre la bille et le plan est sous-estimé, et la bille apparaît plusieurs fois dans la direction axiale.

Les images (a2) et (b2) de la Figure IV.6 montrent par ailleurs que des artéfacts de reconstruction sont également présents selon l'axe z . Ces artéfacts, que nous appelons échos, ont pour origine les biais de localisation selon l'axe z que nous avons caractérisé en section III.3.4.2. Du fait de ces biais, la distance dans la direction axiale entre l'évènement de fluorescence et le plan focal est sous-estimée. La conséquence sur une section unique

d'acquisition est un rétrécissement des structures selon l'axe z . Sur la reconstruction d'un volume entier nécessitant le repositionnement des sections les unes par rapport aux autres, à priori définit par le pas dz entre les plans, cela entraîne l'apparition de répétitions (échos) des structures imagées sur plusieurs plans consécutifs selon z (Figure IV.6.c). Le positionnement des plans en z et la correction de ces échos représentent donc un défi supplémentaire pour permettre la reconstruction fidèle du volume imagé dans son ensemble.

IV.3.3. Repositionnement des plans deux à deux

Pour nous affranchir des artéfacts d'échos, nous avons mis en place une méthode de reconstruction basée sur la localisation de marqueurs fiduciaires sur plusieurs plans successifs. Notre procédure finale de reconstruction est détaillée Figure IV.7. Les étapes de localisation sont gérées par PALMTracer, comme indiqué dans la section IV.3.1. PALMTracer permet d'obtenir un jeu de donnée pour chaque section contenant les localisations des billes et des molécules. Ces sections sont ensuite repositionnées les unes par rapport aux autres à partir de la localisation des marqueurs fiduciaires sur plusieurs sections successives. Grâce aux métadonnées fournies par zTrack, chaque bille de référence à chaque section peut être aisément retrouvé. Sa localisation sur les plans précédents et suivants est alors utilisée pour calculer le pas d'_z mesuré par notre méthode de localisation 3D entre ces sections. Ce pas est alors appliqué comme offset sur les localisations au sein de ces sections. Cette étape est répétée pour chaque section, jusqu'à avoir repositionné le jeu de données complet.

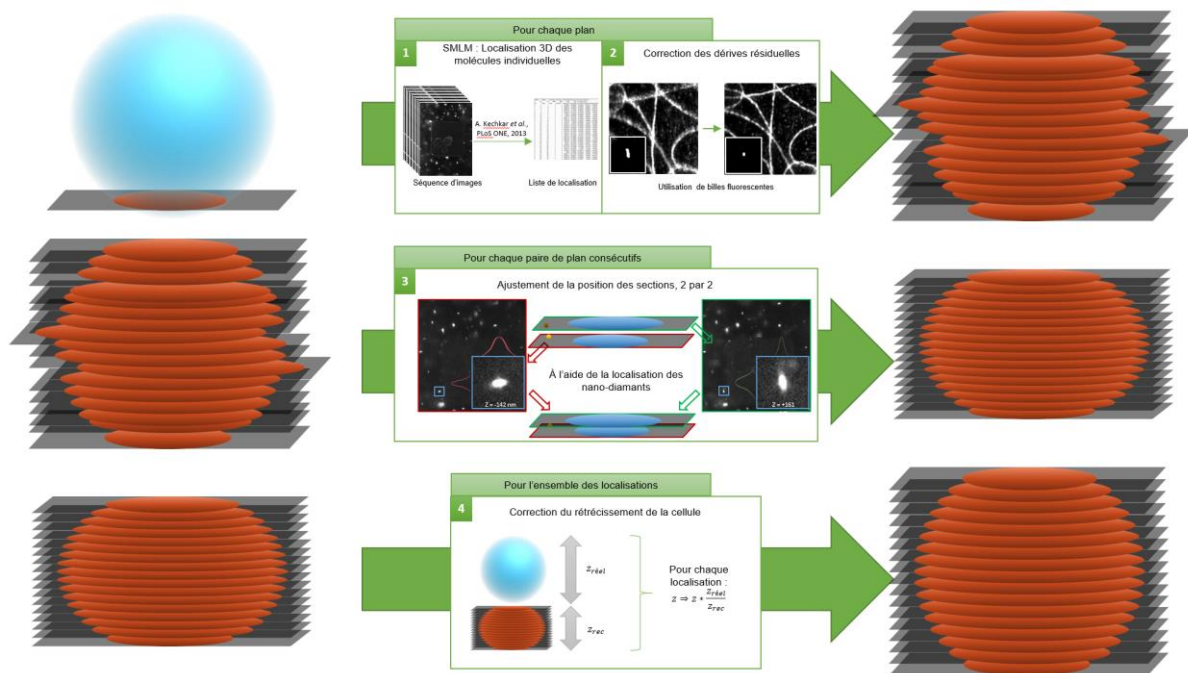


Figure IV.7 – Processus de reconstruction des images de super-résolution. Les deux premières étapes du processus sont totalement gérées par PALMTracer. (1) Les événements de fluorescence sont localisés pour chaque plan, et (2) les dérives résiduelles sont corrigées automatiquement, en utilisant les billes de références indiquées dans les métadonnées. (3) Les sections sont ensuite repositionnées correctement les unes sur les autres, en utilisant les billes de référence. Le résultat est un jeu de donnée de localisation complet, pour toute l'acquisition, sans artéfact, mais dont la forme est écrasée dans l'axe z . (4) La dernière étape consiste à corriger cet écrasement de la cellule, en appliquant un facteur d'étirement sur l'ensemble des localisations.

Une fois cette étape terminée, le jeu de données obtenu contient les localisations des molécules sur la cellule entière, exempté d'artéfact d'écho. Cependant, les localisations axiales étant biaisées, car basée sur une localisation sous-estimant leur position par rapport à leur plan focal de référence, la cellule est rétrécie selon l'axe z . Pour remédier à cela, il est

nécessaire corriger la position axiale des localisations à l'aide d'un facteur d'élargissement. Ce facteur est calculé à partir du pas entre sections défini lors de l'acquisition et réalisé à l'aide de la platine de translation que l'on considère comme juste et précise. Le jeu de données final peut alors être utilisé pour reconstruire des images de super-résolution 3D avec des résolutions nanométriques (IV.4).

IV.3.4. Validation des processus d'acquisition et de reconstruction

Les images présentées dans cette thèse sont créées à l'aide de ThunderSTORM²¹⁸, un plug-in pour les logiciels ImageJ^{188,189}, et Fiji¹⁸⁷. PALMTracer permet d'exporter les données sous le format standard de ThunderSTORM, et nous pouvons ainsi réaliser les images directement sous Fiji, qui contient de nombreuses options de traitement et de mise en forme d'image, en particulier de flou Gaussien permettant de rendre compte de la précision de localisation.

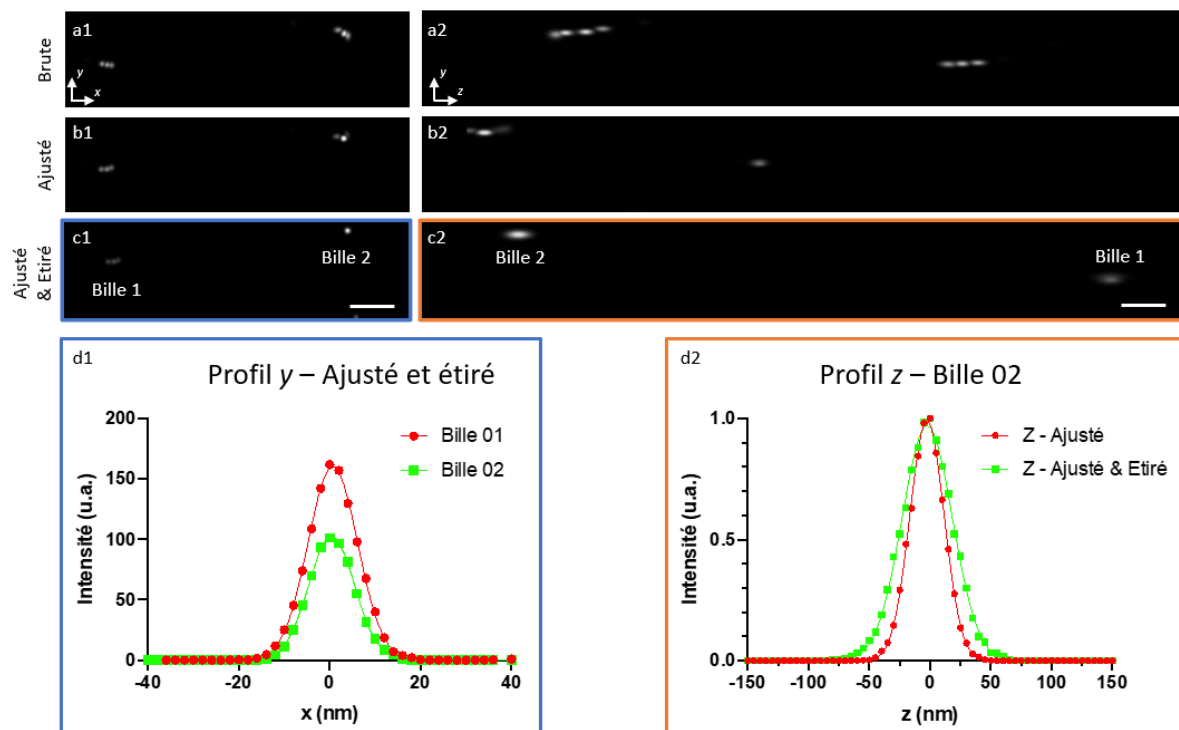


Figure IV.8 – Résolution après correction des artefacts. (a-c) Projections de l'intensité maximale dans 3 conditions : (a) en appliquant un pas de 300 nm entre les sections, (b) en appliquant un pas calculé à partir des positions des billes dans les plans consécutifs, et (c) en appliquant cette même correction, ainsi qu'un filtrage des localisations ($|z| < 450$ nm) et en corrigeant la compression en z. Barre d'échelle : 100 nm

Le repositionnement des données grâce aux localisations de billes est un point clef de la reconstruction. La Figure IV.8 représente le résultat obtenu pour deux billes détectées sur 3 plans consécutifs et à deux profondeurs différentes. On note que la procédure de repositionnement permet de supprimer les artefacts d'échos dans la direction axiale (Figure IV.8.c2). Les profils d'intensité dans les directions latérale et axiale après correction des échos et de l'écrasement dû aux biais de localisation (Figure IV.8.c et d) permettent de mesurer la résolution estimée à 47 nm pour la direction axiale (z), et 12 nm dans les directions latérales (x, y). Dans les images présentées Figure IV.8 (b) et (c), le wobble a également été corrigé pour la bille 2, mais comme le montrent les images, ce wobble est dépendant du champ, et n'est donc pas correctement corrigé pour la bille 1. On note également que le filtrage selon la

localisation axiale $|z| < 450$ nm a permis de supprimer des artéfacts résiduels, qui sont en réalité des localisations aberrantes. Cela montre qu'il est important d'appliquer des filtres aux localisations pour ne garder que les détections de molécules pertinentes.

Comme le met en évidence la Figure IV.9, un pas d_z de 300 nm effectué entre les sections permet également de lisser les localisations selon la direction z . Sur la Figure IV.9.a, on observe que la distribution des localisations n'est pas uniforme sur l'ensemble d'une section, et que la probabilité de détection est plus élevée sur le plan focal qu'aux extrémités de la profondeur de champ de l'objectif. Cet histogramme permet également de nous confirmer que nous détectons bien les molécules sur une épaisseur de 0.8 μm , bien que la probabilité de détection soit plus faible à cette distance. La distribution des localisations sur l'ensemble de l'acquisition est toutefois lissée grâce à la superposition des volumes de détections entre les sections (Figure IV.9.c). Les variations observées sur ce graphique sont dues au nombre de localisations par section (Figure IV.9.b), qui peut varier au cours de l'acquisition en fonction du nombre de molécules réellement présentes à chaque section.

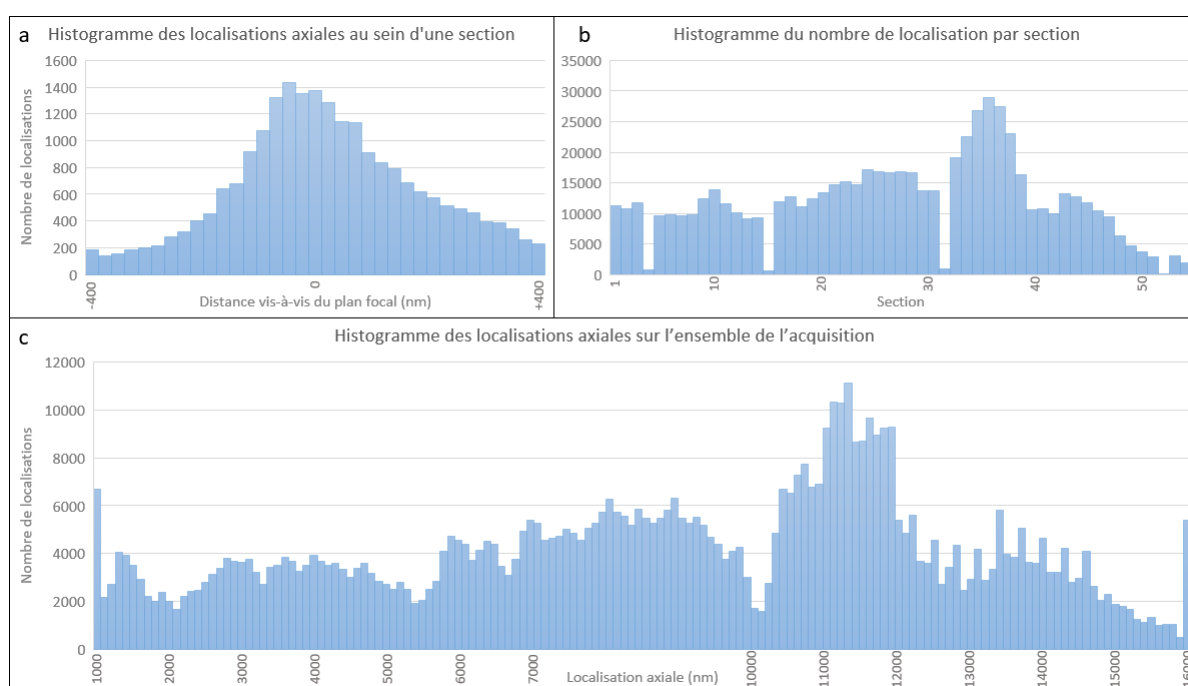


Figure IV.9 – Histogrammes de localisations en z . (a) Distribution des localisations selon l'axe z au sein d'une unique section. Intervalle : 25nm. (b) distribution des localisations de molécules par section. Intervalle : 1 section. (c) distribution des localisations dans l'axe z sur l'ensemble de l'acquisition. Intervalle : 100 nm

Enfin, on observe également sur la Figure IV.9.b qu'aucune détection de molécule n'est faite sur 4 sections parmi les 54 effectuées sur cette acquisition. Cela est dû au fait que, à de rares occasions, le logiciel zTrack ne parvient pas à sélectionner un marqueur fiduciaire satisfaisant aux critères de sélection pour la section observée. Dans ce cas la section est ignorée et l'acquisition passe directement à la suivante, plutôt que de lancer une acquisition sans possibilité de corriger les dérives en temps réel.

IV.4. Imagerie SMLM de cellules entières

IV.4.1. Comparaison des méthodes dSTORM et DNA-PAINT

Les procédures d'acquisition (IV.2.2) et de reconstruction (IV.3) ont été développées dans le but de permettre l'imagerie par SMLM de cellules entières. J'ai effectué une première

preuve de fonctionnement du système complet d'acquisition en utilisant la technique dSTORM pour imager le réseau formé par la protéine lamine B1 autour du noyau de cellules eucaryotes (Figure IV.10). Ici, il s'agit d'une cellule COS ensemencé à l'intérieur d'un puits de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ d'un dispositif soSPIM. Nous avons choisi d'imager cette protéine pour nos premières validations pour deux raisons. Tout d'abord la structure formée par la protéine Lamine B1 est bien connue et peut permettre une estimation rapide du gain en résolution de la technique d'imagerie utilisée. D'autre part, le caractère continu du réseau de Lamin autour des noyaux est une caractéristique forte permettant d'estimer aisément les performances de la technique d'imagerie pour reconstruire fidèlement une structure 3D.

Cette acquisition constitue une première validation du système complet développé au cours de cette thèse, permettant l'imagerie de gros volumes en profondeur grâce à la combinaison de :

1. La technologie soSPIM permettant un sectionnement optique en profondeur grâce à une illumination en feuille de lumière tout en utilisant un objectif à forte ouverture numérique (1.27)
2. Un système d'optique adaptative utilisé afin de corriger les aberrations optiques apparaissant avec la profondeur et d'induire un astigmatisme contrôlé pour la localisation 3D des molécules détectées
3. Un système permettant l'automatisation de l'acquisition et la correction des dérives en temps réel (zTrack)
4. Un processus complet d'analyse permettant de prendre en compte et de corriger les biais de localisation en z observés.

Elle a été réalisée sur une cellule de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur située à $30 \mu\text{m}$ au-dessus de la lamelle. L'acquisition a consisté à prendre 10 000 images par plans, acquises à une fréquence de 50 Hz, pour un total de 43 sections. Le pas entre chaque section était de 300 nm. Cela a représenté un temps d'acquisition de 3 heures, pour un volume de donnée de 303 Go.

Si cette acquisition a permis de valider les processus d'acquisition et de reconstruction développés, elle met aussi en évidence certaines limites liées à l'imagerie par la méthode dSTORM pour l'acquisition multiplan de volumes. La lamine B1 est une protéine qui forme un réseau continu autour du noyau des cellules, et nous nous attendons donc à des localisations quasiment en continu sur toute la structure. La reconstruction de notre acquisition ne montre pas cette continuité, mais plutôt des zones denses réparties sur le pourtour du noyau de la cellule. Lors du processus d'analyse des images, nous avons détecté moins de 80 595 molécules pour cette acquisition, et ce sans appliquer de filtre sur la qualité des ajustements gaussiens. Cette quantité est extrêmement faible pour une structure aussi dense que la Lamine imagée en 3D sur un volume de $10 \mu\text{m}$ d'épaisseur. La résolution de l'image reconstruite est donc fortement impactée par ce faible nombre de localisations ne permettant pas de reconstruire fidèlement la structure imagée. Ce faible nombre de localisations peut avoir 3 origines inhérentes à la technique dSTORM pour l'imagerie de volumes importants : le blanchiment des molécules, la durée de vie du tampon chimique, et l'indice de réfraction élevé de ce dernier.

En effet, la méthode dSTORM utilise un tampon chimique pour limiter le blanchiment des fluorophores et stabiliser les états noirs des fluorophores dans le but d'induire leur clignotement (1.3.3.1.3). Ce tampon permet d'augmenter le budget de photon disponible pour l'imagerie^{42,219} en limitant la probabilité de blanchiment, mais ne le prévient pas totalement, ce qui impacte le nombre de molécules détectable total par acquisition. Par ailleurs, le sectionnement optique apporté par un faisceau gaussien impose un compromis entre le champ de vue et la finesse du sectionnement, comme nous l'avons étudié dans le Chapitre II.

Dans notre cas, pour nous assurer que la cellule est illuminée de manière homogène, nous utilisons un faisceau dont le diamètre de 2 μm . Or, les molécules ne sont détectées que sur une épaisseur de 0.8 μm autour du plan focal. De nombreuses molécules situées dehors de la section imagée sont donc excitées et parfois blanchies avant d'avoir pu être détectées. Cela est particulièrement problématique pour des stratégies d'acquisition séquentielle plan par plan lorsque le faisceau d'excitation illumine les plans suivant avant leur imagerie.

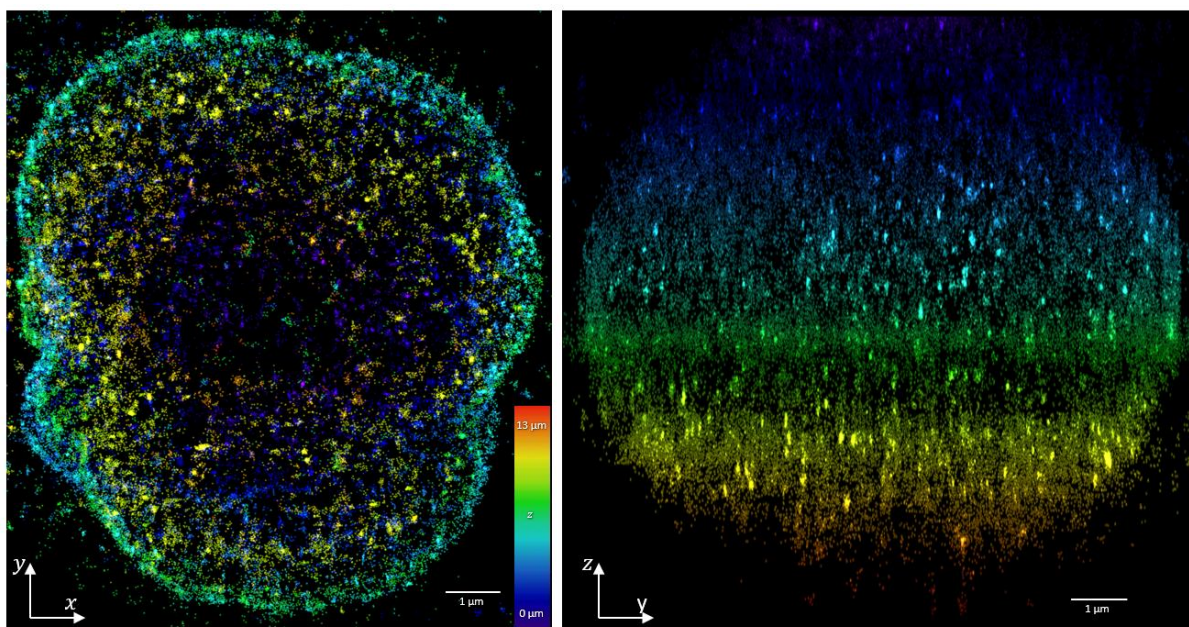


Figure IV.10 - Image de de lamine B obtenue par dSTORM à l'aide de soSPIM, zTrack, et l'optique adaptative. Reconstruction en 3 dimensions d'une acquisition de lamine B tapissant le noyau d'une cellule COS. On observe une structure ponctiforme non continue ne correspondant pas à la structure attendue du fait des limitations de la technique dSTORM avec la technologie soSPIM.

Le tampon chimique utilisé en imagerie dSTORM pose un second problème pour les acquisitions de longues durées. En effet ce tampon utilise un système enzymatique afin de consommer l'oxygène environnant et ainsi réduire la probabilité de blanchiment des fluorophores. Or tout système enzymatique à une certaine durée de vie, ce qui impose une limite temporelle à l'efficacité du tampon à partir de laquelle le blanchiment des fluorophores augmente de façon importante. Cela est particulièrement problématique pour la réalisation d'acquisition durant plusieurs heures ce qui est le cas pour l'imagerie séquentielle de plusieurs dizaines de plans composés de plusieurs milliers d'images chacun.

Enfin, lors de cette expérience, la qualité des localisations des molécules individuelles n'était pas non plus au rendez-vous. Une étape standard lors de la reconstruction des acquisitions est de filtrer les localisations, en fonction de certains critères tels que la qualité de l'ajustement gaussien ou l'intensité du signal détecté. Le premier critère permet d'ignorer les localisations de mauvaise qualité, car réalisées sur des PSF déformées. Le critère d'intensité permet lui de filtrer les PSF soit très peu intenses et donc localisables avec une trop faible précision, soit trop intense, ce qui est la signature de la superposition de plusieurs molécules dans une tache de diffraction. Lors de l'application de ces filtres, en particulier un filtre sur la qualité de l'ajustement gaussien ($\chi^2 \geq 0.65$), plus de 80 % des localisations ont été rejetées. Cela indique qu'une majorité des PSF détectées au cours de l'acquisition étaient déformées. La raison de cette déformation a été introduite en section III.3.4.2 : Le tampon dSTORM que nous utilisons est fortement concentré en glycérol, ce qui augmente l'indice de réfraction de la solution. Une mesure de l'indice de réfraction du tampon à l'aide d'un réfractomètre nous a donné une valeur de 1.36. Or le polymère que nous utilisons pour

réaliser nos dispositifs soSPIM a un indice de réfraction est proche de l'eau (1.34). La différence d'indice entre le polymère et le milieu d'imagerie dans les puits mène donc à l'apparition d'aberrations dépendantes du champ qu'il n'est pas possible de corriger avec notre système d'optique adaptative, et impacte énormément la qualité de l'imagerie SMLM.

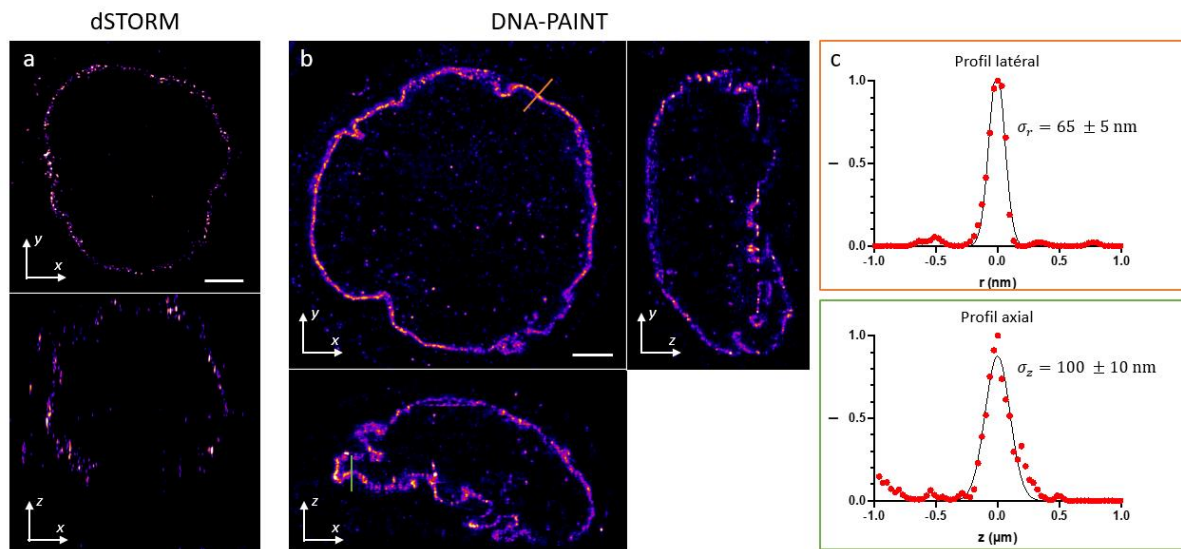


Figure IV.11 – Comparaison entre les méthodes dSTORM et DNA-PAINT. (a et b) Images de super-résolution de Lamine B1 par les méthodes (a) dSTORM et (b) DNA-PAINT. Les images représentées sont des sections de 100 μm d'épaisseur, au centre du noyau de la cellule. (c) profil latéral (ligne orange) et axial (ligne verte) le long des lignes des images en (b).

Une solution pour pouvoir détecter un plus grand nombre de molécules tout en limitant l'écart d'indice de réfraction consiste à utiliser la méthode DNA-PAINT. Cette méthode a deux avantages dans notre situation : non seulement l'indice de réfraction du milieu DNA-PAINT (mesuré à 1.339) est très proche de l'indice du polymère (1.34), mais la méthode DNA-PAINT a également l'avantage de ne pas être limitée par le photoblanchiment des fluorophores (voir section I.3.3.1.4). La Figure IV.11 représente une comparaison entre les stratégies dSTORM (Figure IV.11.a) et DNA-PAINT (Figure IV.11.b) pour l'imagerie de la lamine B1. L'apport de la méthode DNA-PAINT est ici évident, la structure étant nettement mieux définie que pour l'image obtenue par dSTORM. Pour cette cellule, un total de 1 248 000 molécules ont été détectées (après filtration), sur une épaisseur de 7 μm. L'acquisition totale a duré 13 heures. Ce grand nombre de localisations permet d'obtenir une structure quasiment continue, bien mieux définie que dans le cas de l'imagerie par la méthode dSTORM. De plus, la qualité des localisations est bien meilleure, puisque le filtrage selon le facteur $\chi^2 \geq 0.65$ ne rejette plus que 40 % des localisations. Cette acquisition DNA-PAINT permet d'estimer expérimentalement la résolution du système soSPIM. Ainsi on mesure une épaisseur de 65 nm (FWHM) et 100 nm (FWHM) du signal de laminB1 sur les bords de la cellule radialement et axialement respectivement. La résolution est donc au moins aussi fine que ces valeurs.

Ainsi, en choisissant de nous concentrer sur la méthode DNA-PAINT pour la suite des expériences, nous pouvons nous assurer de ne pas être limités par la durée de vie du tampon utilisé et le blanchiment précoce des molécules en ce qui concerne la densité de localisations, et améliorer la qualité des localisations en limitant les aberrations optiques dépendantes du champ.

IV.4.2. Imagerie et quantification sur cellules entières en profondeur

IV.4.2.1. Imagerie des récepteurs membranaires PD1 et CD3

Dans la suite de ma thèse, j'ai cherché à caractériser l'organisation spatiale de récepteurs membranaires sur l'ensemble de la membrane de cellules immunitaires dans le cadre d'un projet de recherche mené par Marine Cabillic. Marine, après avoir participé au développement d'une plateforme couplant l'imagerie de super-résolution par SMLM et le criblage haut débit^{220,221}, a cherché au cours de sa thèse à caractériser l'organisation de deux récepteurs membranaires sur cellules T à l'échelle nanométrique : les protéines CD3 et PD1. Ce travail, réalisé en collaboration avec la compagnie Sanofi, avait pour but de mieux caractériser l'effet d'anticorps thérapeutiques destinés à l'immunothérapie. En effet, ces récepteurs ont une action d'activation (CD3) et d'inhibition (PD1) du système immunitaire, et l'observation de l'organisation nanométrique de ces récepteurs peut mener à une meilleure compréhension des processus biologiques immunitaires engagés dans la lutte contre les cellules cancéreuses, et de leur réponse sous l'action d'anticorps thérapeutiques. Une sensibilité accrue de mesure de ces effets peut donc être très bénéfique pour la recherche de nouveaux anticorps thérapeutiques aux propriétés accrues dans laquelle s'est lancée l'entreprise Sanofi.

La caractérisation systématique de l'organisation de ces récepteurs à l'aide de la plateforme de criblage haut débit d'imagerie SMLM a permis d'étudier l'effet de différentes conditions (type anticorps thérapeutique, conditions d'activation des cellules immunitaires...) sur leur organisation spatiale. Cela a ouvert la voie à des études statistiques grâce à l'acquisition et l'analyse automatisée de très nombreuses cellules. Toutefois, les observations réalisées sont restées limitées à une épaisseur de 1 μm au-dessus de la lamelle, due à l'utilisation d'une illumination de type TIRF dans le processus d'acquisition SMLM (I.4.1). Cela a impliqué des développements afin de permettre l'adhésion des cellules T sur des lamelles alors que ces cellules se trouvent plus généralement en suspension en condition physiologique. Il a également fallu considérer que le confinement induit par la lamelle avait un impact négligeable sur l'organisation des récepteurs membranaires et que les mesures réalisées à la lamelle étaient bien représentatives de l'organisation sur l'ensemble de la membrane des cellules.

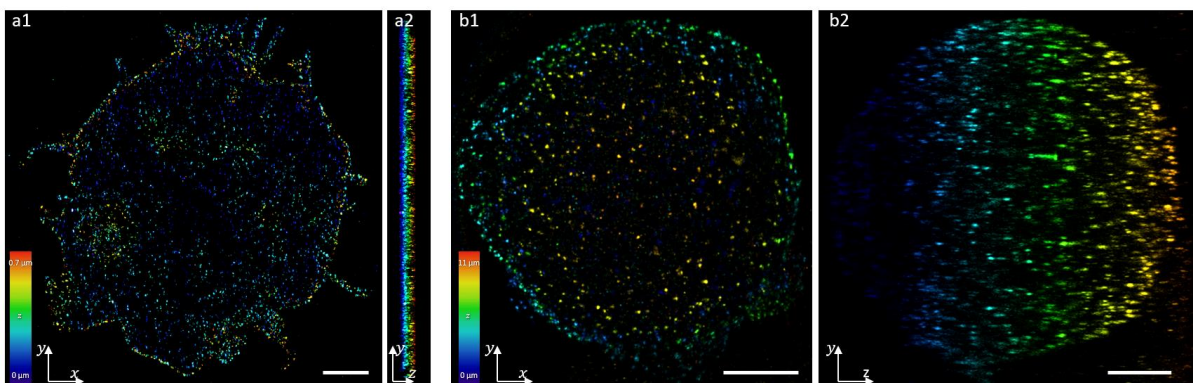


Figure IV.12 – Comparaison entre microscopie TIRF et soSPIM. (a1, a2) Image de super-résolution du récepteur PD1 à la surface d'une cellule T, acquise par microscopie TIRF. L'imagerie est limitée à quelques centaines de nanomètres au-dessus de la lamelle. (b1 et b2) Acquisition du même récepteur en utilisant le système soSPIM combiné à l'optique adaptative permettant d'imager l'ensemble de la cellule.

Grâce aux développements réalisés tout au long de mon projet de thèse, nous pouvons à présent observer ces cellules en suspension, c'est-à-dire dans une configuration plus proche de leur environnement physiologique, avec des résolutions nanométriques dans les 3 dimensions. De plus, la technologie soSPIM permet d'observer l'ensemble de la cellule, là où la microscopie TIRF nous limite à une section de 1 μm . Je me suis donc associé à Marine afin d'imager les récepteurs membranaires utilisés dans son travail et étudier leur répartition 3D sur la surface totale de la membrane de cellules T en suspension. Ce travail a pour but de valider les expériences réalisées sur lamelle par la plateforme d'imagerie SMLM haut débit.

Les images présentées Figure IV.12 représentent la répartition de la protéine PD1 à la surface de cellules T. Les images ont été acquises par la technique DNA-PAINT, et l'absence d'aberrations dépendantes du champ permet un signal de SMLM de bonne qualité y compris en profondeur, et moins de 20 % des localisations sont perdues lors du filtrage $\chi^2 \geq 0.65$. Pour obtenir les 450 000 images qui ont permis la reconstruction de la cellule entière (Figure IV.12.b), l'acquisition a duré plus de 13 heures. Au total, après filtrage des détections de mauvaise qualité ($\chi^2 \leq 0.65$), 200 000 localisations sont utilisées dans la reconstruction des images super-résolues en 3 dimensions sur une épaisseur de 11 μm à environ 20 μm de profondeur. En comparaison, l'acquisition à la surface de la lamelle par microscopie TIRF a permis la détection de 34 000 molécules, sur une épaisseur de 0.7 μm .

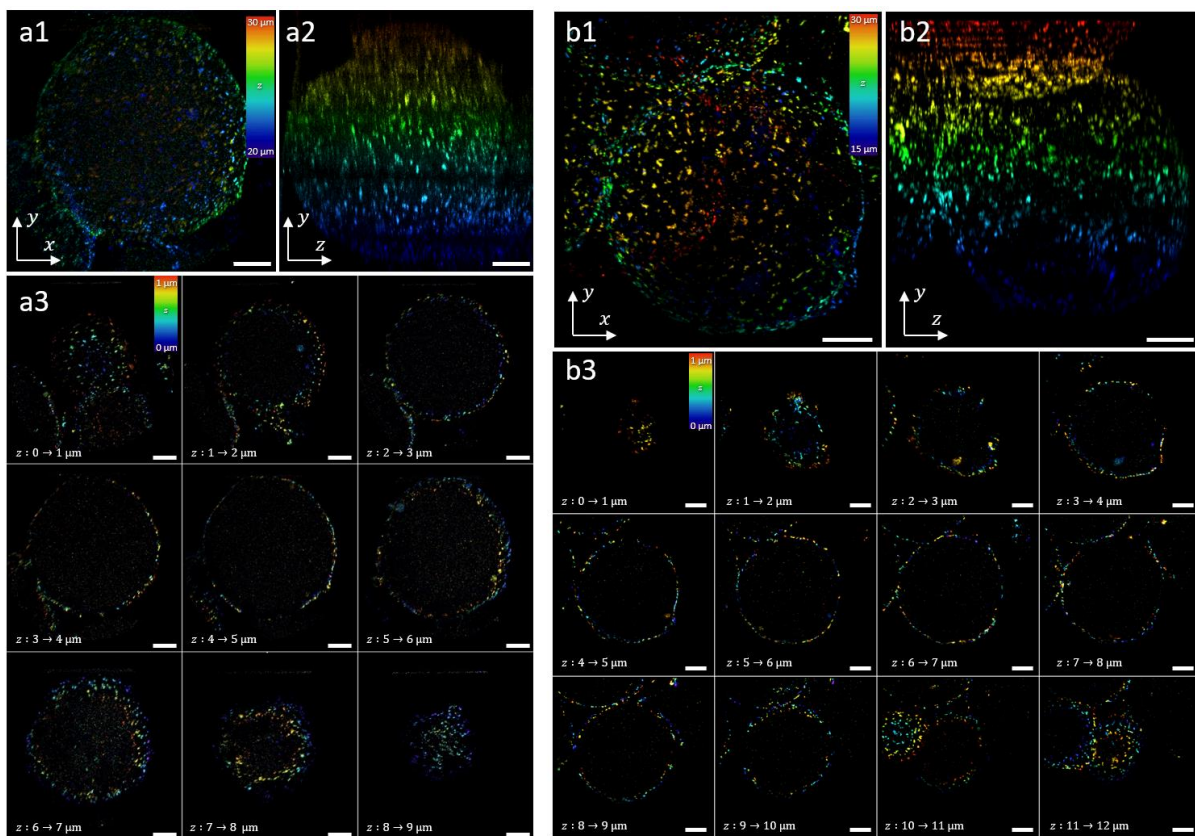


Figure IV.13 – Reconstruction 3D de super-résolution sur cellule entière. Acquisition DNA-PAINT du récepteur CD3 sur la membrane d'une cellule T. En haut, les images représentent les projections selon z et x de la cellule entière. La couleur code pour la profondeur des localisations, selon les échelles des images correspondantes. En bas, les vignettes représentent des sections de 1 μm d'épaisseur selon l'axe z.

Nous avons également imagé la protéine CD3 sur différentes cellules T. Les deux cellules présentées Figure IV.13 ont été obtenues avec deux acquisitions distinctes, ayant duré 22 h (a) et 34 heures (b). Les images sont reconstruites à partir de 512 000 et 634 000 localisations respectivement, et mettent en évidence l'organisation des protéines

sous forme de clusters. Une mesure sur l'un de ces clusters de localisations nous donne une taille de 69 nm dans la direction latérale x et de 186 nm dans la direction axiale z .

IV.4.2.2. Sectionnement et quantifications

L'imagerie de super-résolution par SMLM en plus de permettre l'observation d'organisations de protéines à des échelles nanométriques ouvre aussi la voie à la quantification de ces organisations. Dans cette optique, plusieurs solutions ont été développées pour permettre la segmentation de structures d'intérêts telles que des clusters de protéines, en tenant compte du caractère pointilliste des données SMLM. Le logiciel SR-Tesseler²²², développé par Florian Levet au sein de notre équipe fait partie de ces solutions et présente l'avantage de permettre aussi la segmentation d'objet 3 D. SR-Tesseler utilise une partition de l'espace exploitant les propriétés des digrammes de Voronoï calculés à partir des localisations de molécules individuelles : chaque localisation donne naissance à un polygone (ou a un polyèdre en 3D), dont les caractéristiques géométriques dépendent de la position des molécules voisines. Cette mosaïque permet de visualiser les structures, et de mettre en évidence les différents niveaux d'organisation des protéines observées. L'utilisation de certaines caractéristiques de ces polygones (polyèdres), telles que leur aire (volume), permet une segmentation automatique, robuste au bruit de fond, et multiéchelle des objets observés. Il est alors possible de quantifier certaines caractéristiques des objets segmentés telles que leur taille (aire ou volume), le nombre de localisations faisant partie de l'objet, ou encore leur densité sur la surface de la cellule...

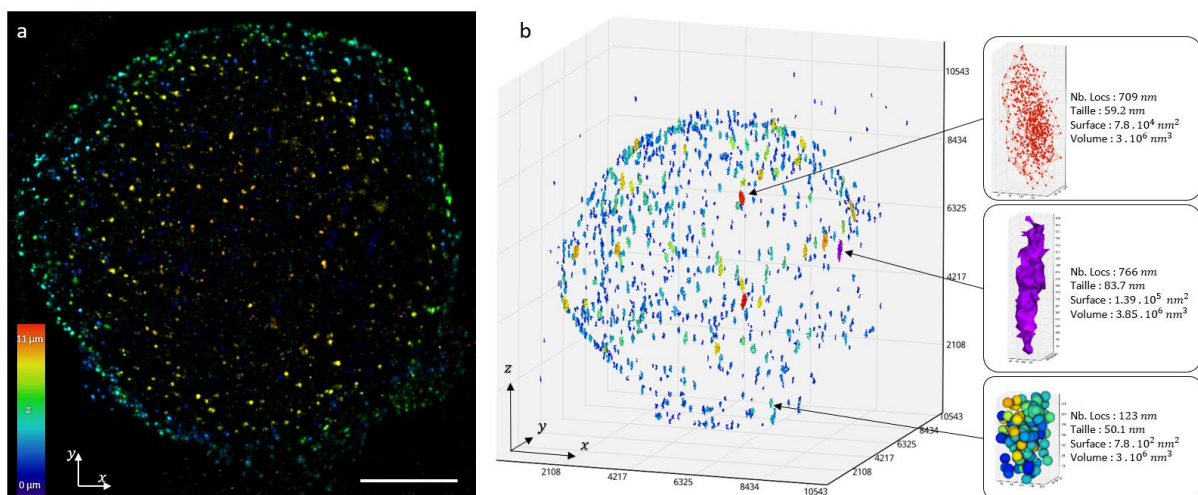


Figure IV.14 – Quantification de l'organisation spatiale de récepteurs membranaires. (a) Reconstruction 3D de la répartition de récepteur PD1 à la surface d'une cellule T imagé par la technique soSPIM. (b) Représentation 3D de la segmentation des clusters de récepteurs PD1 de l'image (a) réalisée avec l'outil SR-Tesseler. SR-Tesseler permet également de quantifier certaines données pour chaque cluster, tel que le nombre de localisations associé au cluster, ou ses dimensions. A droite sont représentées le diagramme de delaunay à partir des localisations (haut), la surface 3D (milieu), ou les localisations (bas) pour 3 clusters présent sur la cellule.

La Figure IV.14 présente une segmentation des clusters de localisations, effectuée sur une acquisition de récepteurs PD1 par la méthode DNA-PAINT. Il s'agit de résultats préliminaires, et l'objectif ici est de comparer ces résultats avec ceux obtenus par Marine lors de son étude de ces mêmes protéines PD1 en 2D sur lamelle de microscope. Nous envisageons par exemple de calculer la densité de cluster en fonction de la surface de la membrane de la cellule, ou encore estimer le nombre moyen de localisations par cluster que nous pourrions comparer aux mêmes quantifications 2D effectuées sur lamelle. Cette comparaison permettra de valider ou non le modèle utilisé par Marine dans ces travaux, en confirmant que les résultats obtenus sur lamelle sont bel et bien pertinents. Les résultats préliminaires vont en ce sens, et Marine a pu montrer que les distributions de cluster

observées sur les cellules déposées sur lamelle présentent qualitativement des caractéristiques semblables à celles observées sur les cellules en suspensions dans les dispositifs soSPIM imagées en 3 dimensions.

IV.5. Discussion et perspectives

IV.5.1. Conclusion

Grâce aux développements que j'ai exposés dans ce chapitre, nous avons mis en place un système de microscopie en feuille de lumière stable et automatisé, permettant l'imagerie de super-résolution 3D de cellules entières. En collaboration avec Marine Cabillic, j'ai développé une méthode de correction des dérives spatiales, basée sur la localisation de marqueurs fiduciaires répartis sur l'ensemble du volume d'acquisition en tirant profit de l'utilisation des dispositifs d'imagerie soSPIM. Le processus de fabrication de ces derniers a été optimisé afin d'obtenir une densité de nanodiamants suffisante pour nos contraintes d'imagerie. J'ai également co-développé un logiciel, zTrack, permettant de corriger les dérives spatiales en temps réel et d'automatiser l'ensemble du processus d'acquisition. Ce processus a permis de réaliser des acquisitions de plus de 30 heures nécessaires à l'imagerie de cellules entières par la méthode DNA-PAINT, sans intervention de l'utilisateur.

J'ai également mis en place une procédure de reconstruction complète du volume imagé garantissant des résolutions nanométriques dans les 3 directions de l'espace. Cette procédure, basée également sur la localisation des marqueurs fiduciaires comme points de références, permet de supprimer les artéfacts de reconstruction provenant de biais de localisation en z induit par des aberrations optiques résiduelles. La procédure est également partiellement automatisée, car elle utilise les métadonnées fournies par zTrack lors de l'acquisition pour détecter les billes à utiliser à chaque section pour le repositionnement. Enfin, j'ai validé le bon fonctionnement du système complet en imageant diverses structures à l'intérieur de cellules entières avec jusqu'à 12 nm (x, y) et 47 nm (z) de résolution pour les marqueurs fiduciaires environnants. J'ai enfin pu observer la répartition spatiale des récepteurs membranaires CD3 et PD1 à la surface de cellules T en suspension, et des études qualitatives préliminaires sur leur organisation semblent valider le modèle biologique de cellules T sur lamelle étudié par notre équipe.

IV.5.2. Perspectives

Si ces développements récents ont permis de mettre en place un système complet autorisant l'acquisition et la reconstruction d'images SMLM 3D de volumes, ils nous ont également permis de mettre en évidence certaines limites de notre système, et d'orienter la suite du projet.

IV.5.2.1. Méthodes de localisation et de reconstruction

Une première limite (et perspective) concerne notre méthode de reconstruction. La méthode utilisée à ce jour n'est en effet pas la plus optimale et requiert plusieurs intervention et supervision par l'utilisateur. Nous envisageons tout d'abord d'améliorer la correction des biais de localisation en z en prenant en compte l'ensemble des billes présentes dans l'échantillon et non plus une seule par section comme réalisé aujourd'hui. D'autre part, nous aimerions développer une solution complète et automatique intégrant l'ensemble des étapes de reconstruction de la localisation, à la représentation finale en passant par l'étape de recalage des différentes sections les unes par rapport aux autres. Cela permettrait de mieux utiliser les métadonnées pouvant être extraites du logiciel zTrack, voir d'intégrer une solution de

localisation en temps réel que notre outils WAVETracer, entièrement compatible avec PALMTracer, autorise. Un travail est en cours pour implémenter ces deux options à PALMTracer.

Toutefois, la solution de repositionnement des plans telle qu'implémentée aujourd'hui ne permet pas de résoudre le problème originel lié au biais de localisation axiale. Ce biais de localisation est dû à la méthode par ajustement gaussien que nous utilisons. De même, pour le moment, nous ne pouvons corriger le wobble du système. Une première étape pour réduire ces problèmes serait d'ajuster de façon précise l'indice de réfraction du milieu d'imagerie, pour le faire correspondre à l'indice du polymère, ce qui réduirait les aberrations dépendantes du champ. Ensuite, nous pourrions appliquer une correction du wobble ainsi que le biais de localisation axial à l'aide d'une calibration effectuée sur des PSF^{207,223}. Nous envisageons également d'implémenter de nouvelles méthodes de localisation, basées sur l'utilisation de PSF simulées¹⁸³, de PSF expérimentale²⁰⁸, ou encore des méthodes utilisant le deep learning²²⁴.

IV.5.2.2. Optimisation de la vitesse d'acquisition

La méthode DNA-PAINT que nous avons principalement utilisée dans mes travaux présente de nombreux avantages pour l'imagerie de volume entier. Elle est insensible au photoblanchiment ce qui donne la possibilité de collecter un très grand nombre de localisations lors d'une acquisition séquentielle plan à plan. Elle repose aussi sur l'utilisation d'un tampon dont l'indice de réfraction est équivalent à l'indice du polymère des dispositifs soSPIM réduisant drastiquement les aberrations dépendantes du champ de vue que nous avons observé avec d'autres tampons d'indice différents. Toutefois, une contrainte importante de la méthode DNA-PAINT est sa faible vitesse d'acquisition dépendante de la cinétique d'accrochage et de décrochage des brins imageur. Cela implique des temps d'imagerie pouvant aller jusqu'à 30 heures pour l'acquisition de volumes d'une dizaine de microns d'épaisseur, entraînant des problèmes de stabilité du système, d'évaporation du milieu d'immersion, etc. Il serait donc intéressant d'implémenter certains développements récents en imagerie DNA-PAINT permettant d'augmenter d'un à deux ordres de grandeur la vitesse d'acquisition de ce type de méthode. Il a en effet été montré qu'en optimisant la composition du tampon d'imagerie et en utilisant des séquences de brins complémentaires différentes il était possible d'atteindre des vitesses d'acquisition de 50 Hz et d'accélérer d'un facteur 100 la cinétique d'accrochage/décrochage des brins d'ADN entre eux^{225,226}.

Une autre solution serait de rendre compatible la technique d'imagerie dSTORM avec la technologie soSPIM. En effet, cette technique présente certains avantages dont pourrait bénéficier le pipeline d'acquisition mis en place. Elle donne la possibilité de visualiser les structures en haute résolution avant de démarrer un long processus d'acquisition par SMLM et ainsi mieux choisir la ou les cellules à imager. Elle permet aussi d'acquérir à des fréquences 5 à 10 fois plus élevées que par la méthode DNA-PAINT actuellement utilisée. Il serait donc particulièrement intéressant d'effectuer quelques perfectionnements pour permettre une imagerie dSTORM de haute qualité avec la technologie soSPIM. Pour cela, un premier travail est nécessaire pour ajuster l'indice de réfraction du milieu d'imagerie, et le faire correspondre à celui du polymère des dispositifs soSPIM. Ensuite, un travail devra être fait pour optimiser les conditions d'imagerie, et en particulier la puissance d'illumination et le temps d'intégration de la caméra. En effet, des travaux récents montrent qu'un ajustement précis de ces paramètres combiné à l'utilisation de certains fluorophores peut permettre de réduire fortement des problèmes de blanchiment précoce des fluorophores²¹¹. Enfin, nous pourrions également utiliser des tampons développés récemment²²⁷ dont la durée de vie est très largement améliorée permettant des acquisitions de longue durée sans perte de qualité.

IV.5.2.3. Imagerie deux couleurs, et quantifications

Pour finir, les travaux de quantification effectués au cours de cette thèse ne sont que préliminaires, et mériteraient d'être poussés. Dans cette optique d'aller plus loin et d'effectuer des études d'intérêt biologique poussé, nous souhaitons observer la répartition de deux protéines différentes sur une même cellule. Des premières expériences ont montré que notre système pouvait effectuer des acquisitions multicouleur (Figure IV.15). Ces acquisitions ont été effectuées par la méthode Exchange-PAINT^{46,53}. L'avantage de cette méthode est qu'il est possible d'utiliser le même fluorophore pour les deux cibles, ce qui évite l'apparition d'aberrations chromatiques. Cependant, cette méthode d'imagerie ne peut se faire que de façon séquentielle : la totalité de la cellule doit être acquise pour une protéine, avant de passer à la suivante. Ces images ont été réalisées avant les développements récents permettant une acquisition stable et robuste sur de très longues durées, et ces développements pourraient permettre de faciliter ce type d'acquisition très complexe à réaliser.

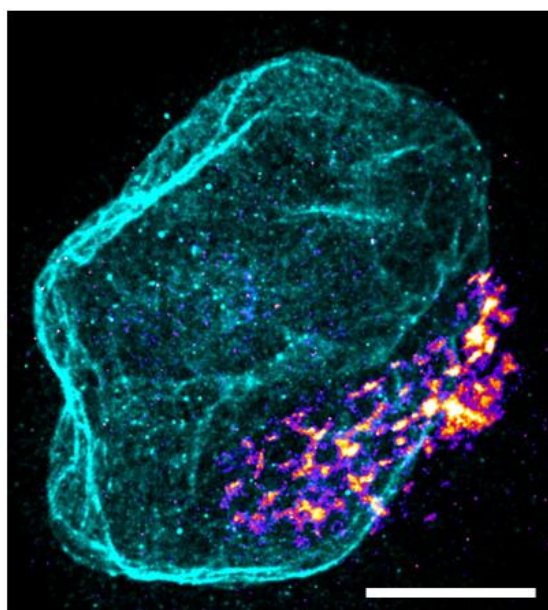


Figure IV.15 – Imagerie de super-résolution multicouleur. (a) Représentation d'une acquisition 2 couleurs effectuée par la méthode DNA-PAINT. La LamineB1 est représentée en cyan, et l'appareil de Golgi (GM130) en magenta.

L'un de nos projets immédiats s'inscrit dans la continuité des travaux effectués par Marine Cabillic sur l'étude de l'organisation des récepteurs membranaires PD1 et CD3 à la surface de cellule T. Dans un premier temps, nous projetons d'effectuer acquisitions multicouleur sur ces deux récepteurs PD1 et CD3 suivant différents stades d'activation des cellules T. Cela permettrait d'observer sur une même acquisition, et sur une même cellule, la répartition de ces deux protéines au rôle antagoniste (activation et neutralisation du système immunitaire), et de quantifier leur densité respective en fonction du stade d'activation de la cellule. Cela pourrait contribuer à déterminer des métriques de caractérisation d'activation de ces cellules pouvant être utilisées dans des tests de criblage. Une seconde étude vise à quantifier l'organisation relative des récepteurs PD1 vis-à-vis d'anticorps thérapeutiques candidats étudiés par Marine. Une étude quantitative sur

la colocalisation de ces anticorps thérapeutiques et de leur récepteur cible pourrait permettre d'étudier l'efficacité de divers candidats thérapeutiques. Plus généralement de développement d'un pipeline robuste d'imagerie et de reconstruction SMLM multicouleur à l'échelle de cellules entières combiné à des outils de quantification d'organisation relative de protéines déjà développés dans l'équipe²²⁸ peut ouvrir de nombreuses perspectives dans plusieurs champs de la biologie cellulaire.

Conclusion

Lorsque j'ai rejoint l'équipe de Jean-Baptiste Sibarita pour débiter cette thèse, je n'avais aucune expérience en imagerie du vivant. Seules mes connaissances générales en optique fondamentale et appliquée me permettaient de me projeter, et bien qu'il fût difficile d'imaginer tout ce que cette thèse pouvait me réserver, je me suis lancé dans cette aventure. Si j'ai pu avancer, c'est essentiellement grâce à l'aide et à la patience de l'ensemble des membres l'équipe, qui m'ont transmis leur savoir et m'ont soutenu. Je pense en premier lieu à mon directeur de thèse Rémi Galland, qui m'a transmis toutes les connaissances nécessaires au bon déroulement de ce projet de thèse. De la culture cellulaire, dont je ne connaissais rien, à l'imagerie de super-résolution, en passant par la « simple » manipulation d'un microscope moderne, Rémi m'a transmis toutes les bases nécessaires au bon déroulement de mes recherches. Bien entendu, l'ensemble des membres de l'équipe ont participé activement à cela, et c'est donc principalement grâce la dynamique du groupe que j'ai pu mener à bien ce projet.

L'idée générale du projet était l'implémentation de nouvelles méthodes d'imagerie au système soSPIM. Si de nombreuses possibilités se cachaient derrière ce large objectif, nous avions une vision précise des nouvelles technologies que nous voulions ajouter au système. L'intérêt de ce système est de permettre de transformer n'importe quel microscope inversé en microscope à feuille de lumière et sa capacité à imager une très large gamme d'échantillons, allant de la cellule entière au petit animal. Cependant, l'utilisation des faisceaux gaussiens pour l'illumination impose un fort compromis entre la finesse du sectionnement optique, et le champ de vue. Si j'ai choisi d'orienter cette thèse vers le cas particulier de l'imagerie par SMLM, cette affirmation est valable quelque soit le type d'imagerie, et une amélioration des performances du sectionnement optique pouvait apporter un atout considérable au système soSPIM. Au regard des performances proposées par d'autres architectures utilisant des faisceaux dits « non diffractifs », la direction à prendre semblait évidente. C'est alors qu'ont débuté mes premières expériences. De la prise en main générale du microscope, aux spécificités de fonctionnement du système soSPIM, cette première étape a été riche en enseignements, en expériences, en découvertes et en développements techniques. Au terme de cette première phase de mon travail, j'ai pu montrer que s'il était possible d'implémenter une illumination par faisceaux non diffractifs au système soSPIM. Toutefois, de trop nombreuses limitations s'opposaient à l'utilisation de ce type de faisceaux. Ces dernières pourraient être levées, et nous avons proposé des développements qui permettraient une implémentation plus robuste et fonctionnelle. Cependant, ces développements n'étant pas l'objet de mon travail de recherche, nous avons dû faire un choix. Plutôt que de pousser dans cette direction incertaine, nous nous sommes intéressés à l'autre innovation que nous préjettions d'intégrer au système.

Cette autre innovation, c'est l'optique adaptative. L'idée d'implémenter cette technologie innovante à notre système d'imagerie soSPIM s'incrimait dans la suite logique des travaux de Corey Butler. Au cours de sa thèse de doctorat précédent mon arrivée au sein de l'équipe, Corey avait montré que l'optique adaptative apportait de nombreux avantages pour l'imagerie par SMLM 3D. En effet, cette technologie permettait non seulement de corriger les aberrations optiques du système, mais également d'introduire une déformation précise de la PSF du microscope, et en particulier un astigmatisme pur. Les expériences de Corey en microscopie TIRF et HILO ont ainsi montré que l'utilisation de l'optique adaptative permettait

une imagerie de très haute qualité par les méthodes de SMLM. De plus, cet intérêt grandit avec la profondeur, où des aberrations apparaissent systématiquement et réduisent significativement la qualité d'imagerie. Il semblait évident que l'étape suivante était d'implémenter cette technologie à notre système soSPIM, qui permet l'imagerie SMLM en profondeur. C'est donc la direction que j'ai prise pour la suite de mon travail. Reprenant les travaux qui avaient précédé mon arrivée, j'ai entrepris de caractériser précisément les aberrations présentes dans le microscope, et leur impact dans le cas spécifique de l'imagerie SMLM. J'ai mis en évidence l'apparition d'aberrations sphériques en fonction de la profondeur d'imagerie malgré l'utilisation d'un objectif à eau. En quantifiant ces aberrations et leur impact sur la qualité des images obtenues, j'ai montré qu'il était nécessaire de les corriger pour obtenir des images avec les résolutions les plus fines possibles. J'ai également montré que la correction appliquée par notre système était efficace et permettait des résolutions identiques à celles obtenues à proximité de la lamelle de microscope. Cependant, j'ai également mis en évidence les limites de ce système de correction, en particulier avec la présence d'aberrations dépendantes du champ de vue. Ces aberrations ne pouvant être corrigées par l'optique adaptative, il est nécessaire de traiter leur origine. Ces aberrations sont présentes dans tout système de microscopie, mais elles sont certainement amplifiées dans notre système qui utilise des dispositifs microfabriqués. Un ajustement extrêmement précis de l'indice de réfraction du milieu d'imagerie pourrait alors diminuer significativement les aberrations dépendantes du champ. À moyen terme, un travail devra être fait sur ce point pour permettre une imagerie de la plus haute qualité possible.

En découvrant l'imagerie par SMLM, j'ai aussi découvert toutes les difficultés inhérentes à ce type d'acquisition. Trouver les conditions d'imagerie optimales, telles que la puissance de l'illumination et le temps d'exposition de la caméra sont déjà des tâches délicates lors de l'imagerie d'un plan unique. Ces optimisations deviennent d'autant plus complexes lors de l'imagerie de volume, en particulier lorsque l'on utilise la méthode dSTORM, pour laquelle les marqueurs fluorescents sont sensibles au photoblanchiment. Me concentrer sur la méthode DNA-PAINT pour m'affranchir de bon nombre de ces limites m'a permis d'avancer dans le projet et de travailler à résoudre de nombreux autres problèmes techniques. La correction des dérives spatiales et l'automatisation du processus d'acquisition grâce au logiciel zTrack ont été un point clef de mes développements. En supervisant des acquisitions de plusieurs dizaines d'heures, le logiciel zTrack nous permet d'imager de façon relativement facile, des images de volumes entiers par SMLM. Si je dis relativement simple, c'est parcequ'il s'agit toujours d'une méthode d'imagerie exigeante. Pour obtenir des résultats probants, il ne suffit pas d'avoir en main un système stable et robuste. Il est également nécessaire d'avoir un échantillon viable. L'imagerie de la lamelle B1, par exemple, nous a permis de valider l'ensemble des développements intégrés, de l'optique adaptative à l'automatisation des acquisitions. Cependant, lorsque nous avons entrepris d'imager des cibles biologiquement pertinentes tels que les récepteurs membranaires CD3 et PD1 des cellules T, nous avons rencontré de nombreuses nouvelles limitations liées à la culture cellulaire, à la spécificité du marquage des protéines d'intérêt, ou encore à la variabilité de l'expression de ces protéines par cellules T. Ces défis ne sont pas développés dans cette thèse, car ils ne sont pas l'objet principal de mon travail. Cependant, ils sont la raison principale de l'absence, à l'heure actuelle, d'une publication dans une revue scientifique. En effet, la valeur ajoutée d'une application biologique de nos développements est une opportunité que nous ne voulons pas manquer, et c'est pourquoi nous avons travaillé à résoudre ces nombreux problèmes et à permettre cette imagerie quantitative sur des cellules immunitaires en profondeur. Grâce au travail conjoint de l'ensemble de l'équipe de recherche, nous avons réussi à obtenir plusieurs images de cellules entières, avec une qualité croissante à chaque expérience. Notre objectif

à court terme est d'effectuer de nouvelles images, en particulier multicolores. Ce qui nous permettrait d'appuyer l'intérêt des développements que j'ai apporté au système pour une application biologiquement pertinente.

Au terme de ce projet, j'ai évidemment espoir de voir mes développements servir à une application en recherche biologique. Mes minces connaissances en biologie cellulaire ne me permettent pas d'avoir une vision précise des applications possibles. Il est toutefois évident que cette technologie ouvre la porte à de nombreuses recherches et à des découvertes intéressantes. L'observation à l'échelle nanométrique de l'organisation des protéines peut en effet permettre de résoudre de nombreuses questions, en particulier grâce à la possibilité de co-localiser différentes protéines. Il serait par exemple possible d'observer et de mesurer quantitativement l'interaction entre les récepteurs membranaires de deux cellules en suspension dans les dispositifs soSPIM. Il serait également possible de pousser nos développements pour l'imagerie de plus gros échantillons. L'imagerie de super-résolution en profondeur au sein même de tranches de cerveau permettrait d'étudier les nanodomains des récepteurs AMPA, et de mieux comprendre le fonctionnement des synapses. De manière plus générale, l'observation d'échantillons dans des conditions physiologiques avec des résolutions toujours plus fines, permettra de mieux déterminer le rôle de chaque constituant du vivant, de mieux comprendre son fonctionnement, de découvrir des solutions aux problèmes que nous connaissons.

Bibliographie

1. Galland, R. *et al.* 3D high-and super-resolution imaging using single-objective SPIM. *Nature Methods* **12**, 641–644 (2015).
2. Leith, E. N. Introduction to Fourier Optics. *IEEE Transactions on Information Theory* vol. 15 191 (1969).
3. Liu, Z., Tian, L., Liu, S. & Waller, L. Real-time brightfield, darkfield, and phase contrast imaging in a light-emitting diode array microscope. *Journal of Biomedical Optics* **19**, 1 (2014).
4. Renz, M. Fluorescence microscopy-A historical and technical perspective. *Cytometry Part A* vol. 83 767–779 (2013).
5. Zernike, F. & Stratton, F. J. M. Diffraction Theory of the Knife-Edge Test and its Improved Form, The Phase-Contrast Method. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society* **94**, 377–384 (1934).
6. Zernike, von F. Beugungstheorie des schneidenvorfahrens und seiner verbesserten form, der phasenkontrastmethode. *Physica* **1**, 689–704 (1934).
7. Nomarski, G. & Weill, A. R. Application à la métallographie des méthodes interférentielles à deux ondes polarisées. *Revue de Métallurgie* **52**, 121–134 (1955).
8. SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & SAIGA, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent. *Journal of cellular and comparative physiology* **59**, 223–239 (1962).
9. Rayleigh. XXXI. Investigations in optics, with special reference to the spectroscope . *The London, Edinburgh, and Dublin Philosophical Magazine and Journal of Science* **8**, 261–274 (1879).
10. Abbe, E. Beiträge zur Theorie des Mikroskops und der mikroskopischen Wahrnehmung. *Archiv für Mikroskopische Anatomie* **9**, 413–468 (1873).
11. Giepmans, B. N. G., Adams, S. R., Ellisman, M. H. & Tsien, R. Y. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**, 217–224 (2006).
12. Ries, J., Kaplan, C., Platonova, E., Eghlidi, H. & Ewers, H. A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies. *Nature Methods* **9**, 582–584 (2012).
13. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802–805 (1994).
14. Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 12501–12504 (1994).
15. Patterson, G. H. & Lippincott-Schwartz, J. A photoactivatable GFP for selective photolabeling of proteins and cells. *Science* **297**, 1873–1877 (2002).
16. Betzig, E. *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science* **313**, 1642–1645 (2006).

17. Hess, S. T., Girirajan, T. P. K. & Mason, M. D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical Journal* **91**, 4258–4272 (2006).
18. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816–821 (2012).
19. Keppler, A. *et al.* A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature Biotechnology* **21**, 86–89 (2003).
20. Los, G. v. *et al.* HaloTag: A novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chemical Biology* **3**, 373–382 (2008).
21. Hell, S. W. & Wichmann, J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics Letters* **19**, 780 (1994).
22. Dickson, R. M., Cubitt, A. B., Tsien, R. Y. & Moerner, W. E. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature* **388**, 355–358 (1997).
23. Yang, Z. *et al.* Super-resolution fluorescent materials: An insight into design and bioimaging applications. *Chemical Society Reviews* vol. 45 4651–4667 (2016).
24. Gustafsson, M. G. L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. SHORT COMMUNICATION. *Journal of Microscopy* **198**, 82–87 (2000).
25. Guo, Y. *et al.* Visualizing Intracellular Organelle and Cytoskeletal Interactions at Nanoscale Resolution on Millisecond Timescales. *Cell* **175**, 1430-1442.e17 (2018).
26. Gustafsson, M. G. L. Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13081–13086 (2005).
27. Rego, E. H. *et al.* Nonlinear structured-illumination microscopy with a photoswitchable protein reveals cellular structures at 50-nm resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, (2012).
28. Wu, Y. & Shroff, H. Faster, sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging. *Nature Methods* **15**, 1011–1019 (2018).
29. Hell, S. W. Improvement of lateral resolution in far-field fluorescence light microscopy by using two-photon excitation with offset beams. *Optics Communications* **106**, 19–24 (1994).
30. Inavalli, V. V. G. K. *et al.* A super-resolution platform for correlative live single-molecule imaging and STED microscopy. *Nature Methods* **16**, 1263–1268 (2019).
31. Lenz, M. O. *et al.* 3-D stimulated emission depletion microscopy with programmable aberration correction. *Journal of Biophotonics* vol. 7 29–36 (2014).
32. Bingen, P., Reuss, M., Engelhardt, J. & Hell, S. W. Parallelized STED fluorescence nanoscopy. *Optics Express* **19**, 23716 (2011).
33. Bergermann, F., Alber, L., Sahl, S. J., Engelhardt, J. & Hell, S. W. 2000-fold parallelized dual-color STED fluorescence nanoscopy. *Optics Express* **23**, 211 (2015).

34. Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S. & Hell, S. W. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy at low light intensities by using reversibly photoswitchable proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17565–17569 (2005).
35. Bossi, M., Fölling, J., Dyba, M., Westphal, V. & Hell, S. W. Breaking the diffraction resolution barrier in far-field microscopy by molecular optical bistability. *New Journal of Physics* **8**, 275 (2006).
36. Rust, M. J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods* **3**, 793–795 (2006).
37. Dubertret, B. *et al.* In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* **298**, 1759–1762 (2002).
38. Manley, S. *et al.* High-density mapping of single-molecule trajectories with photoactivated localization microscopy. *Nature Methods* **5**, 155–157 (2008).
39. Lando, D. *et al.* Quantitative single-molecule microscopy reveals that CENP-ACnp1 deposition occurs during G2 in fission yeast. *Open Biology* **2**, (2012).
40. Grimm, J. B. *et al.* Bright photoactivatable fluorophores for single-molecule imaging. *Nature Methods* vol. 13 985–988 (2016).
41. Fölling, J. *et al.* Fluorescence nanoscopy by ground-state depletion and single-molecule return. *Nature Methods* **5**, 943–945 (2008).
42. Heilemann, M. *et al.* Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie - International Edition* **47**, 6172–6176 (2008).
43. Sharonov, A. & Hochstrasser, R. M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 18911–18916 (2006).
44. Giannone, G. *et al.* Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical Journal* **99**, 1303–1310 (2010).
45. Legant, W. R. *et al.* High-density three-dimensional localization microscopy across large volumes. *Nature Methods* **13**, 359–365 (2016).
46. Jungmann, R. *et al.* Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nature Methods* **11**, 313–318 (2014).
47. Strauss, S. *et al.* Modified aptamers enable quantitative sub-10-nm cellular DNA-PAINT imaging. *Nature Methods* **15**, 685–688 (2018).
48. Huang, F. *et al.* Video-rate nanoscopy using sCMOS camera-specific single-molecule localization algorithms. *Nature Methods* **10**, 653–658 (2013).
49. Lin, Y. *et al.* Quantifying and optimizing single-molecule switching nanoscopy at high speeds. *PLoS ONE* **10**, e0128135 (2015).
50. Shim, S. H. *et al.* Super-resolution fluorescence imaging of organelles in live cells with photoswitchable membrane probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13978–13983 (2012).
51. Lampe, A., Haucke, V., Sigrist, S. J., Heilemann, M. & Schmoranzler, J. Multi-colour direct STORM with red emitting carbocyanines. *Biology of the Cell* **104**, 229–237 (2012).

52. Jungmann, R. *et al.* Single-molecule kinetics and super-resolution microscopy by fluorescence imaging of transient binding on DNA origami. *Nano Letters* **10**, 4756–4761 (2010).
53. Agasti, S. S. *et al.* DNA-barcoded labeling probes for highly multiplexed Exchange-PAINT imaging. *Chemical Science* **8**, 3080–3091 (2017).
54. Jungmann, R. *et al.* Quantitative super-resolution imaging with qPAINT. *Nature Methods* **13**, 439–442 (2016).
55. Sage, D. *et al.* Super-resolution fight club: assessment of 2D and 3D single-molecule localization microscopy software. *Nature Methods* **16**, 387–395 (2019).
56. Kechkar, A., Nair, D., Heilemann, M., Choquet, D. & Sibarita, J. B. Real-Time Analysis and Visualization for Single-Molecule Based Super-Resolution Microscopy. *PLoS ONE* **8**, e62918 (2013).
57. Shtengel, G. *et al.* Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3D cellular ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 3125–3130 (2009).
58. Bourg, N. *et al.* Direct optical nanoscopy with axially localized detection. *Nature Photonics* **9**, 587–593 (2015).
59. Juette, M. F. *et al.* Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nature Methods* **5**, 527–529 (2008).
60. Hajj, B. *et al.* Whole-cell, multicolor superresolution imaging using volumetric multifocus microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 17480–17485 (2014).
61. Huang, F. *et al.* Ultra-High Resolution 3D Imaging of Whole Cells. *Cell* **166**, 1028–1040 (2016).
62. Bon, P. *et al.* Self-interference 3D super-resolution microscopy for deep tissue investigations. *Nature Methods* **15**, 449–454 (2018).
63. Huang, B., Wang, W., Bates, M. & Zhuang, X. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science* **319**, 810–813 (2008).
64. Pavani, S. R. P. *et al.* 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 of the United States of America* **106**, 2995–2999 (2009).
65. Shechtman, Y., Weiss, L. E., Backer, A. S., Sahl, S. J. & Moerner, W. E. Precise Three-Dimensional Scan-Free Multiple-Particle Tracking over Large Axial Ranges with Tetrapod Point Spread Functions. *Nano Letters* **15**, 4194–4199 (2015).
66. Jia, S., Vaughan, J. C. & Zhuang, X. Isotropic three-dimensional super-resolution imaging with a self-bending point spread function. *Nature Photonics* **8**, 302–306 (2014).
67. Deschamps, J., Mund, M. & Ries, J. 3D superresolution microscopy by supercritical angle detection. *Optics Express* **22**, 29081 (2014).
68. Cabriel, C. *et al.* Combining 3D single molecule localization strategies for reproducible bioimaging. *Nature Communications* **10**, 1980 (2019).

69. Jouchet, P. *et al.* Nanometric axial localization of single fluorescent molecules with modulated excitation. *Nature Photonics* **15**, 297–304 (2021).
70. Thompson, R. E., Larson, D. R. & Webb, W. W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical Journal* **82**, 2775–2783 (2002).
71. Baddeley, D. & Bewersdorf, J. Biological Insight from Super-Resolution Microscopy: What We Can Learn from Localization-Based Images. *Annual Review of Biochemistry* **87**, 965–989 (2018).
72. Shannon, C. E. Communication in the Presence of Noise. *Proceedings of the IRE* **37**, 10–21 (1949).
73. Sauer, M. Localization microscopy coming of age: From concepts to biological impact. *Journal of Cell Science* **126**, 3505–3513 (2013).
74. Li, D. *et al.* Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics. *Science* **349**, aab3500–aab3500 (2015).
75. Tokunaga, M., Imamoto, N. & Sakata-Sogawa, K. Highly inclined thin illumination enables clear single-molecule imaging in cells. *Nature Methods* **5**, 159–161 (2008).
76. Goodman, D. S. *Theory and Practice of Scanning Optical Microscopy*. *Journal of the Optical Society of America A* vol. 4 (Academic Press, 1987).
77. Hosny, N. A. *et al.* Super-Resolution Imaging Strategies for Cell Biologists Using a Spinning Disk Microscope. *PLoS ONE* **8**, (2013).
78. Biermann, B. *et al.* Imaging of molecular surface dynamics in brain slices using single-particle tracking. *Nature Communications* **5**, 3024 (2014).
79. Schueder, F. *et al.* Multiplexed 3D super-resolution imaging of whole cells using spinning disk confocal microscopy and DNA-PAINT. *Nature Communications* **8**, 1–9 (2017).
80. Vaziri, A., Tang, J., Shroff, H. & Shank, C. v. Multilayer and three-dimensional super-resolution imaging of thick biological samples. in *Optics InfoBase Conference Papers* vol. 23 20221–20226 (2009).
81. Papagiakoumou, E., Ronzitti, E. & Emiliani, V. Scanless two-photon excitation with temporal focusing. *Nature Methods* vol. 17 571–581 (2020).
82. York, A. G., Ghitani, A., Vaziri, A., Davidson, M. W. & Shroff, H. Confined activation and subdiffractional localization enables whole-cell PALM with genetically expressed probes. *Nature Methods* **8**, 327–333 (2011).
83. Siedentopf, H. & Zsigmondy, R. Über Sichtbarmachung und Größenbestimmung ultramikroskopischer Teilchen, mit besonderer Anwendung auf Goldrubingläser. *Annalen der Physik* **315**, 1–39 (1902).
84. Huisken, J., Swoger, J., del Bene, F., Wittbrodt, J. & Stelzer, E. H. K. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* **305**, 1007–1009 (2004).
85. Weber, M., Mickoleit, M. & Huisken, J. Light sheet microscopy. in *Methods in Cell Biology* vol. 123 193–215 (Elsevier Inc., 2014).

86. Keller, P. J., Schmidt, A. D., Wittbrodt, J. & Stelzer, E. H. K. Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy. *Science* **322**, 1065–1069 (2008).
87. Planchon, T. A. *et al.* Rapid three-dimensional isotropic imaging of living cells using Bessel beam plane illumination. *Nature Methods* **8**, 417–423 (2011).
88. Baumgart, E. & Kubitscheck, U. Scanned light sheet microscopy with confocal slit detection. *Optics Express* **20**, 21805 (2012).
89. Fahrbach, F. O., Gurchenkov, V., Alessandri, K., Nassoy, P. & Rohrbach, A. Self-reconstructing sectioned Bessel beams offer submicron optical sectioning for large fields of view in light-sheet microscopy. *Optics Express* **21**, 11425 (2013).
90. Breuninger, T., Greger, K. & Stelzer, E. H. K. Lateral modulation boosts image quality in single plane illumination fluorescence microscopy. *Optics Letters* **32**, 1938 (2007).
91. Keller, P. J. *et al.* Fast, high-contrast imaging of animal development with scanned light sheet-based structured-illumination microscopy. *Nature Methods* **7**, 637–642 (2010).
92. Reynaud, E. G., Kržič, U., Greger, K. & Stelzer, E. H. K. Light sheet-based fluorescence microscopy: More dimensions, more photons, and less photodamage. *HFSP Journal* **2**, 266–275 (2008).
93. Swoger, J., Verveer, P., Greger, K., Huisken, J. & Stelzer, E. H. K. Multi-view image fusion improves resolution in three-dimensional microscopy. *Optics Express* **15**, 8029 (2007).
94. Huisken, J. & Stainier, D. Y. R. Even fluorescence excitation by multidirectional selective plane illumination microscopy (mSPIM). *Optics Letters* **32**, 2608 (2007).
95. Krzic, U., Gunther, S., Saunders, T. E., Streichan, S. J. & Hufnagel, L. Multiview light-sheet microscope for rapid in toto imaging. *Nature Methods* **9**, 730–733 (2012).
96. Schmid, B. *et al.* High-speed panoramic light-sheet microscopy reveals global endodermal cell dynamics. *Nature Communications* **4**, 1–10 (2013).
97. Voleti, V. *et al.* Real-time volumetric microscopy of in vivo dynamics and large-scale samples with SCAPE 2.0. *Nature Methods* **16**, 1054–1062 (2019).
98. Cella Zanacchi, F. *et al.* Live-cell 3D super-resolution imaging in thick biological samples. *Nature Methods* **8**, 1047–1050 (2011).
99. Chen, B. C. *et al.* Lattice light-sheet microscopy: Imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution. *Science* **346**, 1257998 (2014).
100. Wäldchen, F. *et al.* Whole-cell imaging of plasma membrane receptors by 3D lattice light-sheet dSTORM. *Nature Communications* **11**, 1–6 (2020).
101. Gebhardt, J. C. M. *et al.* Single-molecule imaging of transcription factor binding to DNA in live mammalian cells. *Nature Methods* **10**, 421–426 (2013).
102. Greiss, F., Deligiannaki, M., Jung, C., Gaul, U. & Braun, D. Single-Molecule Imaging in Living Drosophila Embryos with Reflected Light-Sheet Microscopy. *Biophysical Journal* **110**, 939–946 (2016).
103. Zhao, Z. W. *et al.* Spatial organization of RNA polymerase II inside a mammalian cell nucleus revealed by reflected light-sheet superresolution microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**, 681–686 (2014).

104. Hu, Y. S. *et al.* Light-sheet Bayesian microscopy enables deepcell super-resolution imaging of heterochromatin in live human embryonic stem cells. *Optical Nanoscopy* **2**, 1–12 (2013).
105. Hu, Y. S., Cang, H. & Lillemeier, B. F. Superresolution imaging reveals nanometer- and micrometer-scale spatial distributions of T-cell receptors in lymph nodes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, 7201–7206 (2016).
106. Gustavsson, A. K., Petrov, P. N., Lee, M. Y., Shechtman, Y. & Moerner, W. E. 3D single-molecule super-resolution microscopy with a tilted light sheet. *Nature Communications* **9**, 123 (2018).
107. Dunsby, C. Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy. *Optics Express* **16**, 20306 (2008).
108. Bouchard, M. B. *et al.* Swept confocally-aligned planar excitation (SCAPE) microscopy for high-speed volumetric imaging of behaving organisms. *Nature Photonics* **9**, 113–119 (2015).
109. Yang, B. *et al.* Epi-illumination SPIM for volumetric imaging with high spatial-temporal resolution. *Nature Methods* **16**, 501–504 (2019).
110. Kim, J. *et al.* Oblique-plane single-molecule localization microscopy for tissues and small intact animals. *Nature Methods* **16**, 853–857 (2019).
111. Ponjavic, A., Ye, Y., Laue, E., Lee, S. F. & Klenerman, D. Sensitive light-sheet microscopy in multiwell plates using an AFM cantilever. *Biomedical Optics Express* **9**, 5863 (2018).
112. Ravasio, A., Vaishnavi, S., Ladoux, B. & Viasnoff, V. High-resolution imaging of cellular processes across textured surfaces using an indexed-matched elastomer. *Acta Biomaterialia* **14**, 53–60 (2015).
113. Han, X. *et al.* A polymer index-matched to water enables diverse applications in fluorescence microscopy. *Lab on a Chip* (2021) doi:10.1039/d0lc01233e.
114. Aoun, L. *et al.* Amoeboid Swimming Is Propelled by Molecular Paddling in Lymphocytes. *Biophysical Journal* **119**, 1157–1177 (2020).
115. Singh, A. P. *et al.* 3D Protein Dynamics in the Cell Nucleus. *Biophysical Journal* **112**, 133–142 (2017).
116. Durnin, J., Miceli, J. & Eberly, J. H. Diffraction-free beams. *Physical Review Letters* **58**, 1499–1501 (1987).
117. Durnin, J., Eberly, J. H. & Miceli, J. J. Comparison of Bessel and Gaussian beams. *Optics Letters* **13**, 79 (1988).
118. McGloin, D., Garcés-Chávez, V. & Dholakia, K. Interfering Bessel beams for optical micromanipulation. *Optics Letters* **28**, 657 (2003).
119. Bambardekar, K., Clément, R., Blanc, O., Chardès, C. & Lenne, P. F. Direct laser manipulation reveals the mechanics of cell contacts in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**, 1416–1421 (2015).
120. Garcés-Chávez, V., McGloin, D., Melville, H., Sibbett, W. & Dholakia, K. Simultaneous micromanipulation in multiple planes using a self-reconstructing light beam. *Nature* **419**, 145–147 (2002).

121. Mcgloin, D. & Dholakia, K. Bessel beams: Diffraction in a new light. *Contemporary Physics* **46**, 15–28 (2005).
122. Royer, L. A., Lemon, W. C., Chhetri, R. K. & Keller, P. J. A practical guide to adaptive light-sheet microscopy. *Nature Protocols* **13**, 2462–2500 (2018).
123. Nytk, J., McCluskey, K., Aggarwal, S., Tello, J. A. & Dholakia, K. Enhancement of image quality and imaging depth with Airy light-sheet microscopy in cleared and non-cleared neural tissue. *Biomedical Optics Express* **7**, 4021 (2016).
124. Vettenburg, T. *et al.* Light-sheet microscopy using an Airy beam. *Nature Methods* **11**, 541–544 (2014).
125. Zhao, T. *et al.* Multicolor 4D Fluorescence Microscopy using Ultrathin Bessel Light Sheets. *Scientific Reports* **6**, 26159 (2016).
126. Yu, X., Zhang, M. & Lei, S. Multiphoton polymerization using femtosecond bessel beam for layerless three-dimensional printing. *Journal of Micro and Nano-Manufacturing* **6**, (2018).
127. Fahrbach, F. O., Simon, P. & Rohrbach, A. Microscopy with self-reconstructing beams. *Nature Photonics* **4**, 780–785 (2010).
128. Chen, Y. & Liu, J. T. C. Characterizing the beam steering and distortion of Gaussian and Bessel beams focused in tissues with microscopic heterogeneities. *Biomedical Optics Express* **6**, 1318 (2015).
129. Gohn-Kreuz, C. & Rohrbach, A. Light-sheet generation in inhomogeneous media using self-reconstructing beams and the STED-principle. *Optics Express* **24**, 5855 (2016).
130. Fahrbach, F. O. & Rohrbach, A. Propagation stability of self-reconstructing Bessel beams enables contrast-enhanced imaging in thick media. *Nature Communications* **3**, 1–8 (2012).
131. Fahrbach, F. O. & Rohrbach, A. A line scanned light-sheet microscope with phase shaped self-reconstructing beams. *Optics Express* **18**, 24229 (2010).
132. Mahmoud, M. A., Shalaby, M. Y. & Khalil, D. Propagation of Bessel beams generated using finite-width Durnin ring. *Applied Optics* **52**, 256–263 (2013).
133. Čižmár, T. & Dholakia, K. Tunable Bessel light modes: engineering the axial propagation. *Optics Express* **17**, 15558 (2009).
134. Gao, L. *et al.* Noninvasive imaging beyond the diffraction limit of 3D dynamics in thickly fluorescent specimens. *Cell* **151**, 1370–1385 (2012).
135. Gao, L., Tang, W.-C., Tsai, Y.-C. & Chen, B.-C. Lattice light sheet microscopy using tiling lattice light sheets. *Optics Express* **27**, 1497 (2019).
136. Aakhte, M., Akhlaghi, E. A. & Müller, H. A. J. SSPIM: A beam shaping toolbox for structured selective plane illumination microscopy. *Scientific Reports* **8**, (2018).
137. Yang, Z. *et al.* A compact Airy beam light sheet microscope with a tilted cylindrical lens. *Biomedical Optics Express* **5**, 3434 (2014).
138. Chang, B. J. *et al.* Universal light-sheet generation with field synthesis. *Nature Methods* **16**, 235–238 (2019).
139. Lakshminarayanan, V. & Fleck, A. Zernike polynomials: A guide. *Journal of Modern Optics* **58**, 545–561 (2011).

140. Rivet, S., Bradu, A., Bairstow, F., Forrière, H. & Podoleanu, A. Group refractive index and group velocity dispersion measurement by complex master slave interferometry. *Optics Express* **26**, 21831 (2018).
141. Cutler, P. J. *et al.* Multi-Color Quantum Dot Tracking Using a High-Speed Hyperspectral Line-Scanning Microscope. *PLoS ONE* **8**, e64320 (2013).
142. Abrahamsson, S. *et al.* Fast multicolor 3D imaging using aberration-corrected multifocus microscopy. *Nature Methods* **10**, 60–63 (2013).
143. Sheppard, C. J. R. Aberrations in high aperture conventional and confocal imaging systems. *Applied Optics* **27**, 4782 (1988).
144. Sheppard, C. J. R. & Gu, M. Aberration compensation in confocal microscopy. *Applied Optics* **30**, 3563 (1991).
145. Arimoto, R. & Murray, J. M. A common aberration with water-immersion objective lenses. *Journal of Microscopy* **216**, 49–51 (2004).
146. Ji, N. Adaptive optical fluorescence microscopy. *Nature Methods* **14**, 374–380 (2017).
147. Butler, C. Quantitative single molecule imaging deep in biological samples using adaptive optics. (2017).
148. Coles, B. C. *et al.* Characterisation of the effects of optical aberrations in single molecule techniques. *Biomedical Optics Express* **7**, 1755 (2016).
149. Booth, M., Andrade, D., Burke, D., Patton, B. & Zurauskas, M. Aberrations and adaptive optics in super-resolution microscopy. *Microscopy* **64**, 251–261 (2015).
150. Hama, H. *et al.* Scale: A chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nature Neuroscience* **14**, 1481–1488 (2011).
151. Ueda, H. R. *et al.* Whole-Brain Profiling of Cells and Circuits in Mammals by Tissue Clearing and Light-Sheet Microscopy. *Neuron* vol. 106 369–387 (2020).
152. Hardy, J. W. & Thompson, L. *Adaptive Optics for Astronomical Telescopes* . *Physics Today* vol. 53 (2000).
153. Albert, O., Sherman, L., Mourou, G., Norris, T. B. & Vdovin, G. Smart microscope: an adaptive optics learning system for aberration correction in multiphoton confocal microscopy. *Optics Letters* **25**, 52 (2000).
154. Booth, M. J., Neil, M. A. A., Juškaitis, R. & Wilson, T. Adaptive aberration correction in a confocal microscope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 5788–5792 (2002).
155. Booth, M. J. Adaptive optical microscopy: The ongoing quest for a perfect image. *Light: Science and Applications* **3**, e165–e165 (2014).
156. Azucena, O. *et al.* Adaptive optics wide-field microscopy using direct wavefront sensing. *Optics Letters* **36**, 825 (2011).
157. Vermeulen, P., Muro, E., Pons, T., Lorient, V. & Fragola, A. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *Journal of Biomedical Optics* **16**, 076019 (2011).
158. Pedrazzani, M. *et al.* Sensorless adaptive optics implementation in widefield optical sectioning microscopy inside in vivo *Drosophila* brain . *Journal of Biomedical Optics* **21**, 036006 (2016).

159. Liu, T. L. *et al.* Observing the cell in its native state: Imaging subcellular dynamics in multicellular organisms. *Science* **360**, eaaq1392 (2018).
160. Maurer, C., Jesacher, A., Bernet, S. & Ritsch-Marte, M. What spatial light modulators can do for optical microscopy. *Laser and Photonics Reviews* **5**, 81–101 (2011).
161. Leach, J. *et al.* 3D manipulation of particles into crystal structures using holographic optical tweezers. *Optics Express* **12**, 220 (2004).
162. Papagiakoumou, E. *et al.* Functional patterned multiphoton excitation deep inside scattering tissue. *Nature Photonics* **7**, 274–278 (2013).
163. Shechtman, Y., Sahl, S. J., Backer, A. S. & Moerner, W. E. Optimal point spread function design for 3D imaging. *Physical Review Letters* **113**, 133902 (2014).
164. Shechtman, Y., Weiss, L. E., Backer, A. S., Lee, M. Y. & Moerner, W. E. Multicolour localization microscopy by point-spread-function engineering. *Nature Photonics* **10**, 590–594 (2016).
165. Yang, Y., Chen, W., Fan, J. L. & Ji, N. Adaptive optics enables aberration-free single-objective remote focusing for two-photon fluorescence microscopy. *Biomedical Optics Express* **12**, 354 (2021).
166. Park, J. H., Kong, L., Zhou, Y. & Cui, M. Large-field-of-view imaging by multi-pupil adaptive optics. *Nature Methods* **14**, 581–583 (2017).
167. Booth, M. J. Adaptive optics in microscopy. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **365**, 2829–2843 (2007).
168. Girkin, J. M., Poland, S. & Wright, A. J. Adaptive optics for deeper imaging of biological samples. *Current Opinion in Biotechnology* **20**, 106–110 (2009).
169. Izeddin, I. *et al.* PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking. *Optics Express* **20**, 4957 (2012).
170. Platt, B. C. & Shack, R. History and principles of Shack-Hartmann wavefront sensing. *Journal of Refractive Surgery* **17**, S573-7 (2001).
171. Tao, X., Norton, A., Kissel, M., Azucena, O. & Kubby, J. Adaptive optical two-photon microscopy using autofluorescent guide stars. *Optics Letters* **38**, 5075 (2013).
172. Aviles-Espinosa, R. *et al.* Measurement and correction of in vivo sample aberrations employing a nonlinear guide-star in two-photon excited fluorescence microscopy. *Biomedical Optics Express* **2**, 3135 (2011).
173. Brajones, J. M., Clouvel, G., Dovillaire, G., Levecq, X. & Lorenzo, C. Highly sensitive shack–hartmann wavefront sensor: Application to non-transparent tissue mimic imaging with adaptive light-sheet fluorescence microscopy. *Methods and Protocols* **2**, 1–13 (2019).
174. Won Cha, J. & So, P. T. C. A shack-hartmann wavefront sensor based adaptive optics system for multiphoton microscopy. in *Biomedical Optics, BIOMED 2008* vol. 15 046022 (International Society for Optics and Photonics, 2008).
175. Rahman, S. A. & Booth, M. J. Direct wavefront sensing in adaptive optical microscopy using backscattered light. *Applied Optics* **52**, 5523–5532 (2013).

176. Bourgenot, C., Saunter, C. D., Love, G. D. & Girkin, J. M. Comparison of closed loop and sensorless adaptive optics in widefield optical microscopy. *Journal of the European Optical Society* **8**, 13027 (2013).
177. Hubert, A. *et al.* Adaptive optics light-sheet microscopy based on direct wavefront sensing without any guide star. *Optics Letters* **44**, 2514 (2019).
178. Hanser, B. M., Gustafsson, M. G. L., Agard, D. A. & Sedat, J. W. Phase retrieval for high-numerical-aperture optical systems. *Optics Letters* **28**, 801 (2003).
179. Hanser, B. M., Gustafsson, M. G. L., Agard, D. A. & Sedat, J. W. Phase-retrieved pupil functions in wide-field fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy* **216**, 32–48 (2004).
180. Liu, S., Kromann, E. B., Krueger, W. D., Bewersdorf, J. & Lidke, K. A. Three dimensional single molecule localization using a phase retrieved pupil function. *Optics Express* **21**, 29462 (2013).
181. McGorty, R., Schnitzbauer, J., Zhang, W. & Huang, B. Correction of depth-dependent aberrations in 3D single-molecule localization and super-resolution microscopy. *Optics Letters* **39**, 275 (2014).
182. Quirin, S., Pavani, S. R. P. & Piestun, R. Optimal 3D single-molecule localization for superresolution microscopy with aberrations and engineered point spread functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 675–679 (2012).
183. Aristov, A., Lelandais, B., Rensen, E. & Zimmer, C. ZOLA-3D allows flexible 3D localization microscopy over an adjustable axial range. *Nature Communications* **9**, 2409 (2018).
184. Petrov, P. N., Shechtman, Y. & Moerner, W. E. Measurement-based estimation of global pupil functions in 3D localization microscopy. *Optics Express* **25**, 7945 (2017).
185. Sakamoto, J. A. & Barrett, H. H. Maximum-likelihood estimation of parameterized wavefronts from multifocal data. *Optics Express* **20**, 15928 (2012).
186. Xu, F. *et al.* Three-dimensional nanoscopy of whole cells and tissues with in situ point spread function retrieval. *Nature Methods* **17**, 531–540 (2020).
187. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* vol. 9 676–682 (2012).
188. Rueden, C. T. *et al.* ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data. *BMC Bioinformatics* **18**, 529 (2017).
189. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* vol. 9 671–675 (2012).
190. Ji, N., Milkie, D. E. & Betzig, E. Adaptive optics via pupil segmentation for high-resolution imaging in biological tissues. *Nature Methods* **7**, 141–147 (2010).
191. Milkie, D. E., Betzig, E. & Ji, N. Pupil-segmentation-based adaptive optical microscopy with full-pupil illumination. *Optics Letters* **36**, 4206 (2011).
192. Scrimgeour, J. & Curtis, J. E. Aberration correction in wide-field fluorescence microscopy by segmented-pupil image interferometry. *Optics Express* **20**, 14534 (2012).

193. Ji, N., Sato, T. R. & Betzig, E. Characterization and adaptive optical correction of aberrations during in vivo imaging in the mouse cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 22–27 (2012).
194. Thayil, A. & Booth, M. J. Self calibration of sensorless adaptive optical microscopes. *Journal of the European Optical Society* **6**, 16 (2011).
195. Tehrani, K. F., Xu, J., Zhang, Y., Shen, P. & Kner, P. Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) using a genetic algorithm. *Optics Express* **23**, 13677 (2015).
196. Burke, D., Patton, B., Huang, F., Bewersdorf, J. & Booth, M. J. Adaptive optics correction of specimen-induced aberrations in single-molecule switching microscopy. *Optica* **2**, 177 (2015).
197. Booth, M. J. & Wilson, T. Refractive-index-mismatch induced aberrations in single-photon and two-photon microscopy and the use of aberration correction. *Journal of Biomedical Optics* **6**, 266 (2001).
198. Mlodzianoski, M. J. *et al.* Active PSF shaping and adaptive optics enable volumetric localization microscopy through brain sections. *Nature Methods* **15**, 583–586 (2018).
199. Tehrani, K. F., Zhang, Y., Shen, P. & Kner, P. Adaptive optics stochastic optical reconstruction microscopy (AO-STORM) by particle swarm optimization. *Biomedical Optics Express* **8**, 5087 (2017).
200. Liu, S., Huh, H., Lee, S. H. & Huang, F. Three-Dimensional Single-Molecule Localization Microscopy in Whole-Cell and Tissue Specimens. *Annual Review of Biomedical Engineering* **22**, 155–184 (2020).
201. Siemons, M. E., Hanemaaijer, N. A. K., Kole, M. H. P. & Kapitein, L. C. REALM: AO-based localization microscopy deep in complex tissue. *bioRxiv* 2020.06.12.147884 (2020) doi:10.1101/2020.06.12.147884.
202. Facomprez, A., Beaurepaire, E. & Débarre, D. Accuracy of correction in modal sensorless adaptive optics. *Optics Express* **20**, 2598 (2012).
203. Zeng, J., Mahou, P., Schanne-Klein, M.-C., Beaurepaire, E. & Débarre, D. 3D resolved mapping of optical aberrations in thick tissues. *Biomedical Optics Express* **3**, 1898 (2012).
204. Pavani, S. R. P. & Piestun, R. Three dimensional tracking of fluorescent microparticles using a photon-limited double-helix response system. *Optics Express* **16**, 22048 (2008).
205. Lew, M. D. *et al.* Three-dimensional superresolution colocalization of intracellular protein superstructures and the cell surface in live *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, E1102–E1110 (2011).
206. Gahlmann, A. *et al.* Quantitative multicolor subdiffraction imaging of bacterial protein ultrastructures in three dimensions. *Nano Letters* **13**, 987–993 (2013).
207. Carlini, L., Holden, S. J., Douglass, K. M. & Manley, S. Correction of a depth-dependent lateral distortion in 3D super-resolution imaging. *PLoS ONE* **10**, e0142949 (2015).
208. Li, Y. *et al.* Real-time 3D single-molecule localization using experimental point spread functions. *Nature Methods* **15**, 367–369 (2018).

209. Nieuwenhuizen, R. P. J. *et al.* Measuring image resolution in optical nanoscopy. *Nature Methods* **10**, 557–562 (2013).
210. Antonello, J., Barbotin, A., Chong, E. Z., Rittscher, J. & Booth, M. J. Multi-scale sensorless adaptive optics: application to stimulated emission depletion microscopy. *Optics Express* **28**, 16749 (2020).
211. Diekmann, R. *et al.* Optimizing imaging speed and excitation intensity for single-molecule localization microscopy. *Nature Methods* **17**, 909–912 (2020).
212. Nahidiazar, L., Agronskaia, A. v., Broertjes, J., van Broek, B. den & Jalink, K. Optimizing imaging conditions for demanding multi-color super resolution localization microscopy. *PLoS ONE* **11**, e0158884 (2016).
213. Bates, M., Huang, B., Dempsey, G. T. & Zhuang, X. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science* **317**, 1749–1753 (2007).
214. Bon, P. *et al.* Three-dimensional nanometre localization of nanoparticles to enhance super-resolution microscopy. *Nature Communications* **6**, 1–8 (2015).
215. Wang, Y. *et al.* Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm. *Optics Express* **22**, 15982 (2014).
216. Bradac, C. *et al.* Observation and control of blinking nitrogen-vacancy centres in discrete nanodiamonds. *Nature Nanotechnology* **5**, 345–349 (2010).
217. Izeddin, I. *et al.* Wavelet analysis for single molecule localization microscopy. *Optics Express* **20**, 2081 (2012).
218. Ovesný, M., Křížek, P., Borkovec, J., Švindrych, Z. & Hagen, G. M. ThunderSTORM: A comprehensive ImageJ plug-in for PALM and STORM data analysis and super-resolution imaging. *Bioinformatics* **30**, 2389–2390 (2014).
219. Hartwich, T. M. P. *et al.* A stable, high refractive index, switching buffer for super-resolution imaging. *bioRxiv* 465492 (2018) doi:10.1101/465492.
220. Cabillic, M. Caractérisation de l'organisation et du trafic de paires récepteur/anticorps thérapeutiques par microscopie de localisation de molécules uniques couplée au criblage à haut débit. [Http://www.theses.fr](http://www.theses.fr) (2021).
221. Beghin, A. *et al.* Localization-based super-resolution imaging meets high-content screening. *Nature Methods* **14**, 1184–1190 (2017).
222. Levet, F. *et al.* SR-Tesseler: A method to segment and quantify localization-based super-resolution microscopy data. *Nature Methods* **12**, 1065–1071 (2015).
223. Li, Y., Wu, Y.-L., Hoess, P., Mund, M. & Ries, J. Depth-dependent PSF calibration and aberration correction for 3D single-molecule localization. *Biomedical Optics Express* **10**, 2708 (2019).
224. Nehme, E., Weiss, L. E., Michaeli, T. & Shechtman, Y. Deep-STORM: super-resolution single-molecule microscopy by deep learning. *Optica* **5**, 458 (2018).
225. Schueder, F. *et al.* An order of magnitude faster DNA-PAINT imaging by optimized sequence design and buffer conditions. *Nature Methods* **16**, 1101–1104 (2019).
226. Strauss, S. & Jungmann, R. Up to 100-fold speed-up and multiplexing in optimized DNA-PAINT. *Nature Methods* **17**, 789–791 (2020).

227. Provost, A. *et al.* Innovative particle standards and long-lived imaging for 2D and 3D dSTORM. *Scientific Reports* **9**, 1–13 (2019).
228. Levet, F. *et al.* A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy. *Nature Communications* **10**, 2379 (2019).