



HAL
open science

Holographie et imagerie de front d'onde pour l'étude de phénomènes intracellulaires dynamiques

Clémence Gentner

► **To cite this version:**

Clémence Gentner. Holographie et imagerie de front d'onde pour l'étude de phénomènes intracellulaires dynamiques. Optique [physics.optics]. Sorbonne Université, 2022. Français. NNT : 2022SORUS479 . tel-04520983

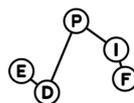
HAL Id: tel-04520983

<https://theses.hal.science/tel-04520983>

Submitted on 26 Mar 2024

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

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



THÈSE DE DOCTORAT DE SORBONNE UNIVERSITÉ

Préparée par

CLÉMENCE GENTNER

Holographie et imagerie de front d'onde pour l'étude de phénomènes intracellulaires dynamiques

Composition du Jury :

Pr. Olivier Haeberlé.....Rapporteur
Dr. Serge Meimon Rapporteur
Dr. Jean-François Berret.....Président du jury
Dr. Corinne Fournier.....Examinatrice
Dr. Alexandra Fragola Examinatrice
Dr. Robert Kuszelewicz Co-directeur de thèse
Pr. Gilles Tessier.....Co-directeur de thèse
Dr. Pascal Berto..... Co-encadrant

École doctorale 564 : Physique en Île-de-France

Travail réalisé dans l'équipe de Microscopie 3D du département de Photonique
de l'Institut de la Vision.

Thèse soutenue le 25 mars 2022

Remerciements

Arrivée au bout de ces 3 ans et demie de thèse, j'ai beaucoup de personnes à remercier de les avoir rendus si inoubliables.

Tout d'abord, je suis très honorée et reconnaissante envers les membres de mon jury, qui ont tous accepté avec enthousiasme d'en faire partie. Je vous en remercie ainsi que de vous être déplacés pour l'occasion, et d'avoir fait de l'épreuve redoutée des questions une discussion scientifique très intéressante.

Je souhaite aussi remercier les personnes avec qui j'ai collaboré. D'abord, l'équipe d'Olivier Goureau (en particulier Sacha, Sandy et Marilou) pour les organoïdes et cellules rétinienne : je vous remercie non seulement d'avoir travaillé pour m'en fournir en quantité illimitée, mais aussi pour avoir pris le temps de m'expliquer et de discuter sur nos projets et sur mes résultats. Dans la lignée des aides que j'ai eues en biologie, merci à Marie-Hélène Verlhac pour l'accueil et pour les essais sur ovocytes, et sur les nombreuses discussions incluant aussi Maria Almonacid, Marie-Emilie Terret et Noemi Zollo. Ensuite, je remercie Jean-François Berret de m'avoir gentiment accueillie dans son labo et de m'avoir transmis ses méthodes de synthèse de particules magnétiques bien que je n'ai pas de formation en chimie. Merci aussi à Kate Grieve et Olivier Thouvenin pour les conseils sur l'imagerie dynamique, Laurent Belliard et Pierre Bon pour le projet qSCAT, Grigorios Gerotziapas et Chi Mai pour les expériences sur leurs cellules cancéreuses, et Maia Brunstein pour les essais d'ablation laser.

Comme je l'ai beaucoup répété depuis le début de mon doctorat, je m'estime extrêmement chanceuse de mon équipe d'encadrants.

J'ai rencontré Gilles Tessier par hasard lors d'une autre visite, et en plus d'avoir été intéressée par ses sujets de recherche, j'ai tout de suite vu une personnalité avec laquelle je souhaitais travailler, à base de gentillesse et d'humilité. Cette première impression s'est largement confirmée et amplifiée durant les 4 années suivantes. Merci Gilles de m'avoir fait confiance, et d'avoir été ce mentor présent pour moi que ce soit en situation de travail, de rire, ou de doute. J'ai eu le bonheur de constater qu'en tant que chef d'équipe, il n'est sûrement pas un hasard que ses collègues possèdent ces mêmes qualités.

En suivant l'ordre chronologique des rencontres, j'ai aussi eu la chance d'être encadrée par Pascal Berto, le célèbre Marseillais qui ne porte le t-shirt gris comme personne, et au caractère aussi adorable qu'il prétend être mauvais. Merci pour tout ce que tu m'as appris sur l'optique, sur la masse (des) sè(ei)che(s), et sur la gestion des rats d'appartement et autres parasites. Merci aussi à la petite Maia pour sa patience quand son papa devait me parler au téléphone tout en s'occupant d'elle.

Last but not least, pourquoi se contenter de deux encadrants parfaits quand on peut avoir l'insolence d'en avoir trois? En tant que co-directeur, ou directeur, on n'a jamais trop su, Robert Kuszelewicz m'a apporté une immense aide qui m'a plus d'une fois débloquée sur des aspects théoriques cruciaux, et ce toujours parsemé de petites blagues qui me manquent déjà. Tu m'as beaucoup impressionnée et inspirée par ton calme et ta bonne humeur, omniprésents même face aux équations les plus moches, les signaux les plus bruités, et les situations de la vie les moins faciles.

Encore infiniment merci à vous trois, je me suis sentie encouragée et soutenue chaque jour, et même encore maintenant car vous m'avez aidée au-delà de la thèse à pouvoir continuer dans cette lancée et à prendre confiance.

Mon prochain remerciement va sans hésiter à Christophe Tourain, le chouchou de tout l'institut de la Vision. Tu es à la base d'une grande partie de mes montages expérimentaux, sans compter les nombreux autres services que tu n'as pas arrêté de me rendre sans même que

j'aie à demander. Merci d'avoir été un collègue aussi agréable, je n'oublierai pas nos rituels du midi à la cantine et les petits apéros du soir.

C'est avec déchirement que je me sépare de mes préférés du labo à savoir mon frère de thèse Chang-François, ma sœur de thèse Massilia, Cécile et sa version dark, fast Anis et bébé Tonio/Toro/Tots/[...] . Merci d'être mes acolytes!

Merci aussi à Benoit, Tengfei, Joe, Minh Chau, mes parrain/tuteur de thèse Emiliano et Benoît, ainsi que Valentina Emiliani et tout le département de photonique pour les aides, les sourires et les petites discussions de tous les jours.

Au-delà des murs du labo, je suis reconnaissante du soutien de tous mes amis qui se reconnaîtront. Comme dirait mon ami méditatif Jamal, pour être sûre de n'en oublier aucun, je vais les citer tous : merci à tous! En pensant à mes années de thèse, j'aurai toujours une pensée émue pour ceux que l'on y a perdus, Laurent et Lauren, et leurs familles qui me sont si chères.

Merci à mon père de m'avoir donné le goût de la physique, et à ma mère de m'avoir communiqué sa fibre littéraire (tout aussi utile!). Merci à mes trois grandes sœurs d'être trois modèles d'inspiration, à mes beaux frères et à mes quatre nièces qui m'ont fourni beaucoup d'énergie. Je souhaite remercier tout particulièrement Thomas pour son aide et ses encouragements précieux tout au long de mes études.

En parlant de ces dernières, merci aux enseignants et responsables du Magistère d'Orsay Claire Marrache-Kikuchi et Patrick Puzo d'avoir instauré la bienveillance et l'humanité dans cette formation au même titre que la qualité d'enseignement.

Un grand merci va aussi à ma belle-famille pour toutes les super vacances en Bretagne. Finalement, mon remerciement le plus cher revient à mon Julien pour le soutien sans limite et le quotidien doux et serein.

Table des matières

I	Holographie hétérodyne en champ sombre pour imager la viscosité	5
1	Instrumentation holographique et étude du signal hétérodyne	7
1.1	Historique et principe de l'holographie	8
1.2	Enregistrement de l'hologramme	11
1.3	Reconstruction holographique	13
1.3.1	Filtrage spatial	13
1.3.2	Propagation	14
1.4	Procédés temporels	15
1.4.1	Filtrage temporel	15
1.4.2	Holographie hétérodyne	17
1.5	Algorithme de reconstruction holographique	21
1.6	Montage optique	22
1.6.1	Chemin optique	22
1.6.2	Configuration holographique	23
1.6.3	Illumination en champ sombre	23
1.6.4	Sources lumineuses	24
1.6.5	Maintien en température de l'échantillon	24
1.6.6	Sensibilité au bruit du système	26
1.7	Conclusion	28
2	Holographie hétérodyne : application à l'imagerie de viscosité	29
2.1	Microrhéologie : état de l'art	30
2.2	Imagerie de viscosité via la rotation brownienne de nanobâtonnets d'or	32
2.2.1	Relation entre la mesure de rotation brownienne et la viscosité	32
2.2.2	Diffusion plasmonique par des nanobâtonnets d'or	34
2.2.3	Imagerie de viscosité qualitative	40
2.2.4	Mesure expérimentale du signal	40
2.2.5	Imagerie de viscosité quantitative	44
2.2.6	Conclusion	47
2.3	Imagerie de viscosité via la rotation induite de bâtonnets magnétiques	48
2.3.1	Rotation magnétiquement induite	48
2.3.2	Synthèse des bâtonnets micrométriques d'oxyde de fer	53
2.3.3	Diffusion optique par des bâtonnets d'oxyde de fer	53
2.3.4	Montage expérimental	55
2.3.5	Mesure de la rotation magnétiquement induite	57
2.3.6	Mesure de la fréquence de transition	58
2.3.7	Basses fréquences : holographie homodyne	59
2.3.8	Hautes fréquences : holographie hétérodyne	62
2.3.9	Conclusion	66
2.4	Conclusion et perspectives de l'imagerie de viscosité par holographie hétérodyne de nanobâtonnets en rotation	67

II	Analyse de front d'onde pour imager les dynamiques intracellulaires	69
3	Imagerie de phase de dynamiques intracellulaires	71
3.1	Formalisme	73
3.2	Microscopie à contraste de phase	75
3.2.1	Contraste de phase de Zernike	75
3.2.2	Contraste interférentiel différentiel	77
3.3	Imagerie de phase quantitative par holographie numérique	79
3.4	Imagerie de front d'onde	81
3.4.1	Analyseur de Shack-Hartmann	81
3.4.2	Interféromètre à décalage quadri-latéral (ID4L)	82
3.4.3	Imagerie de front d'onde avec un diffuseur fin (DiPSI)	85
3.4.4	Conclusion sur le choix de méthode d'imagerie de phase	90
3.5	Microscopie quantitative de phase DiPSI	91
3.5.1	Illumination	91
3.5.2	Réimagerie du diffuseur	92
3.5.3	Traitements de l'image de phase	92
3.6	Imagerie de dynamiques cellulaires par imagerie de front d'onde	94
3.6.1	Contexte biologique	95
3.6.2	Traitement numérique et représentation colorimétrique	96
3.6.3	Images de dynamiques intracellulaires	103
3.6.4	Conclusion	107
3.7	Gain en sensibilité de phase par filtrage spatial : qSCAT	108
3.7.1	Modèle théorique	109
3.7.2	Simulations	112
3.7.3	Montage optique	115
3.7.4	Résultats expérimentaux	117
3.8	Conclusion et perspectives de l'imagerie de phase de dynamiques intracellulaires	120
	Conclusion	123
	Annexe A Calcul du signal hétérodyne	127
	Annexe B Champ diffusé par un nanobâtonnet d'or en rotation	133
	Annexe C Synthèse physico-chimique de bâtonnets d'oxyde de fer	139
	Annexe D Evolution d'un objet magnétique sous champ dans un fluide	143
	Annexe E Imagerie de dynamiques à très hautes fréquences par holographie hétérodyne	147
	Bibliographie	151

Introduction

La microscopie, célèbre invention datant du XVII^e siècle, est l'outil principal à l'étude du vivant. Mais elle n'intéresse pas uniquement les biologistes, puisque son développement fait appel aux principes fondamentaux de l'optique. Elle est ainsi l'une des pierres fondatrices de la pluridisciplinarité entre biologie et physique.

Les enjeux de la microscopie peuvent se résumer à une quête de fidélité de l'image à l'échantillon observé. Les principaux attributs de l'image sur lesquels on peut juger cette fidélité sont :

- **Sa résolution spatiale.** La microscopie permet une observation magnifiée des échantillons, et le niveau de détail accessible se traduit par la plus petite distance séparant deux points que l'on est capable de distinguer. Le défi de la super-résolution, c'est-à-dire l'imagerie au-delà de la limite de diffraction, a été relevé et fut l'objet du prix Nobel de chimie de 2014 [1]. La limite de résolution en microscopie optique est continuellement repoussée et permet de nos jours d'imager à l'échelle de la molécule unique par une multitude de techniques [2].
- **Sa spécificité.** L'image microscopique doit permettre l'identification de structures choisies pour son interprétation. Par exemple, des constituants cellulaires peuvent être colorés par un marquage spécifique en microscopie de fluorescence [3], et la microscopie Raman identifie les éléments chimiques par leurs signatures spectrales [4].
- **Sa tridimensionnalité.** La quasi-totalité des phénomènes prenant place dans les trois dimensions de l'espace, il ne peuvent pas être analysés de façon complète sous une simple coupe bidimensionnelle. C'est pourquoi certaines techniques comme la tomographie à cohérence optique [5] ou la tomographie holographique [6] visent à reconstruire le volume observé par un empilement de coupes optiquement sectionnées.
- **Sa dimension temporelle.** De la même manière que pour le point précédent, toute scène d'un échantillon figée sur une image ne renseigne que sur une infime partie du processus biologique en cours.

D'une certaine façon, toute méthode d'imagerie consiste en un compromis entre ces critères, qui doit s'adapter aux attentes de l'application concernée. Les travaux présentés dans cette thèse contribuent essentiellement à faire avancer la quatrième de ces problématiques, concernant les aspects temporels, sans pour autant perdre de vue les trois autres. Les travaux sur le thème de cet axe temporel sont ici portés par deux motivations principales :

1. Ajouter aux images des informations de dynamiques (intra)cellulaires

La richesse d'une scène biologique passe par la forte activité des cellules et organites. La grande diversité des dynamiques à l'œuvre est une manifestation de la complexité du métabolisme [7]. C'est pourquoi une image qui porte, en plus des informations structurelles, des données relatives à l'activité, constitue un précieux outil d'analyse. Les défis sont multiples : premièrement, le processus d'imagerie ne doit pas perturber les phénomènes d'intérêt. On

souhaite alors privilégier une mesure *endogène*, sans marquage ni aucune intervention dans l'échantillon autre que son illumination. Ensuite, la résolution temporelle doit être adaptée aux échelles de temps pertinentes de l'objet d'étude : en principe, des phénomènes biologiques ont lieu aussi bien à de très basses fréquences de l'ordre du mHz, que jusqu'au kHz pour les plus petits objets en forte agitation. Enfin, la sensibilité de la détection du signal doit permettre d'extraire des signaux potentiellement très faibles d'un environnement temporel très bruité.

2. Révéler de nouveaux contrastes grâce à l'exploration de sondes en mouvement

La microrhéologie, domaine d'étude des propriétés hydromécaniques dans les cellules, présente un besoin de réduire les échelles spatiales de mesure. En effet, les grandeurs hydrodynamiques telles que la viscosité évoluent avec l'échelle spatiale, et leurs variations sont une caractéristique cruciale de l'environnement cellulaire, au point qu'elles sont qualifiées de *matière noire* de la biologie [8]. En particulier, la viscosité intervient entre autres dans la description de la rigidité de la structure cellulaire, ainsi que des forces d'organisation pour le transport de ses compartiments, comme par exemple le déplacement du noyau des ovocytes lors de la méiose [9-15]. Un moyen d'imager ce réseau cellulaire complexe est alors de mettre en contraste l'une de ses principales grandeurs caractéristiques : la viscosité. Nous choisissons une approche basée sur la détection optique de sondes en mouvement, en cherchant à extraire une mesure suffisamment locale pour atteindre une résolution d'imagerie.

Méthodes

De manière générale, la microscopie de fluorescence domine largement en imagerie biologique, notamment pour sa grande spécificité cellulaire. Elle repose sur un marquage par injection de molécules fluorescentes qui se fixent à des molécules choisies. Quoique le marquage fluorescent ait été une véritable révolution en biologie [16, 17], les biologistes sont constamment à la recherche de modes de contraste les moins invasifs possibles. En effet, outre une certaine complexité expérimentale, le marquage fluorescent pose plusieurs problèmes, qu'il soit endogène, c'est-à-dire fabriqué par la cellule elle-même, ou bien exogène : perturbatifs, voire toxiques, les fluorophores ont une durée d'utilisation limitée par le phénomène de photoblanchiment. Mais les cellules étant essentiellement transparentes, l'imagerie d'intensité sans marquage est peu sensible aux faibles différences d'indices de réfraction des milieux cellulaires. Une stratégie non invasive permettant de créer un tel contraste artificiel et quantitatif dans des objets très transparents est pour cela souhaitable, voire indispensable selon les applications.

C'est pourquoi on choisit de se tourner vers la famille des techniques d'imagerie de phase, sensibles aux différences d'indice de réfraction. Pour les mesures dynamiques, ces méthodes sont tout indiquées car elles ont la capacité de mesurer la phase temporelle accumulée par les ondes composant le faisceau d'illumination. Pour schématiser, on mesure non seulement la quantité de photons ayant interagi avec l'objet, mais aussi leurs temps relatifs d'arrivée. Il intervient donc une notion temporelle, et aussi de profondeur puisque ce sont les variations d'épaisseur et/ou d'indice qui induisent un retard entre les photons. On dispose ainsi d'une sensibilité supplémentaire à l'imagerie conventionnelle d'intensité, et ce sans marquage.

La microscopie de phase est un vaste domaine. Deux grands axes s'en dégagent, définis par les méthodes utilisées : *holographiques* (ou *interférométriques*) et *auto-référencées*.

Les premières reposent sur les interférences obtenues par superposition de deux faisceaux lumineux, l'un portant les déphasages produits par l'objet, l'autre constituant une référence. Les méthodes de la deuxième catégorie, auto-référencées, utilisent quant à elles un seul faisceau d'illumination et calculent la phase soit à partir de plusieurs points de vue, soit via les interférences ayant lieu au sein de cet unique faisceau, composé d'ondes diffractées par l'échantillon et d'ondes incidentes non altérées.

Ces deux axes principaux se déclinent en tout un panel de méthodes. Les avantages et inconvénients de chacune sont à mettre en regard de l'application recherchée.

Tout au long de ce travail, nous justifierons le choix des méthodes employées pour chaque application qu'il s'agisse d'imagerie de viscosité ou d'imagerie de dynamiques intracellulaires. Au-delà de la quête d'optimisation des performances, on s'attache à prendre en considération que l'objectif principal est la création d'outils pour la recherche biomédicale. Les développements dans notre domaine doivent alors comprendre un souci d'adaptabilité de la technique en tant que système diffusable industriellement, ou utilisable par des chercheurs non spécialisés en optique.

Les deux motivations biologiques évoquées, l'imagerie de viscosité et l'imagerie de dynamiques intracellulaires, sont tour à tour adressées chacune dans une partie de la thèse.

La première partie concerne les travaux mis en oeuvre pour l'imagerie de viscosité intracellulaire. La méthode utilisée, l'holographie, est présentée dans un premier chapitre, ainsi que la configuration adoptée pour l'imagerie dynamique : l'holographie hétérodyne. Puis son application à l'imagerie de viscosité, via l'imagerie holographique en champ sombre de nanoparticules, est développée dans un deuxième chapitre. Ce dernier fait intervenir des travaux théoriques et expérimentaux sur les interactions entre nanoparticules et échantillon fluide d'une part, et entre lumière et nanoparticules sondes d'autre part. Une méthode d'imagerie de viscosité, actuellement appliquée à des recherches sur la biologie des ovocytes, en résulte. La deuxième partie de la thèse est composée d'un chapitre ayant pour thème la mesure de phase quantitative en transmission. Après un état de l'art, une méthode auto-référencée est présentée et utilisée pour produire des images de dynamiques intracellulaires, basée sur un traitement temporel inspiré de celui de la tomographie à cohérence optique dynamique [18, 19]. En plus de ces résultats appliqués, un développement plus fondamental apportant un gain à la sensibilité de tout système d'imagerie de front d'onde est démontré.

Première partie

Holographie hétérodyne en champ sombre pour imager la viscosité

Chapitre 1

Instrumentation holographique et étude du signal hétérodyne

Sommaire

1.1	Historique et principe de l'holographie	8
1.2	Enregistrement de l'hogramme	11
1.3	Reconstruction holographique	13
1.3.1	Filtrage spatial	13
1.3.2	Propagation	14
1.4	Procédés temporels	15
1.4.1	Filtrage temporel	15
	Modulateur acousto-optique (MAO)	15
	Holographie à décalage de phase	16
	Démodulation à n phases	16
1.4.2	Holographie hétérodyne	17
	Hétérodynage, stroboscopie	17
	Principe de l'holographie hétérodyne	18
	Fonction de transfert instrumentale	19
	Moyennage temporel	20
1.5	Algorithme de reconstruction holographique	21
1.6	Montage optique	22
1.6.1	Chemin optique	22
1.6.2	Configuration holographique	23
1.6.3	Illumination en champ sombre	23
1.6.4	Sources lumineuses	24
1.6.5	Maintien en température de l'échantillon	24
1.6.6	Sensibilité au bruit du système	26
	Sources de bruits techniques	26
	Rapport signal à bruit en holographie hétérodyne	26
	Bruit de cohérence (spatial)	27
	Réduction de la longueur de cohérence de la source	27
1.7	Conclusion	28

1.1 Historique et principe de l'holographie

Célèbre pour sa faculté d'imagerie en 3D, l'holographie est largement répandue non seulement dans le monde scientifique, mais aussi dans l'art contemporain et dans la culture populaire. Une image holographique est l'équivalent d'une photographie en trois dimensions ne nécessitant qu'une seule prise d'image, contrairement à d'autres méthodes d'imagerie tridimensionnelle comme la tomographie qui requiert un balayage d'images en profondeur.



(a) Hologramme d'une tortue [20]

(b) Hologramme de la princesse Leia dans la saga Star Wars [21]

Figure 1.1 – Photographies d'hologrammes argentiques. Ici, on appelle hologramme un motif d'interférences imprimé sur la plaque photographique. En l'éclairant d'une certaine façon, une image apparaît en 3D.

L'imagerie 3D requiert un degré de liberté supplémentaire par rapport à l'imagerie 2D : la connaissance des directions des faisceaux lumineux. Cependant cette information ne peut pas être directement imprimée sur un support bidimensionnel puisqu'il n'existe pas de matériau qui guiderait les faisceaux dans des directions contrôlées.

Un élément de réponse est apporté par notre expérience quotidienne : la vision binoculaire. Nous nous servons de plusieurs repères pour appréhender l'espace en 3D. Par exemple, la superposition des objets peut nous suffire à déduire leurs profondeurs relatives. Mais la vision binoculaire, plus puissante en termes de précision, est un véritable calcul des profondeurs effectué par notre cerveau, basé sur le fait que chaque œil projette un angle de vue différent de la scène sur la rétine. Par la conscience des mouvements musculaires (proprioception) et de la distance entre les yeux, le cerveau calcule la profondeur du point source via les angles déduits de cette triangulation. La profondeur peut donc être restituée en imagerie en utilisant deux directions d'observation.

En termes de faisceau lumineux, la direction du faisceau, donc la notion de profondeur peut être reliée à la phase, c'est-à-dire au retard relatif des différents points du front d'onde. A la traversée d'un milieu caractérisé par un indice de réfraction n , les rayons lumineux accumulent un déphasage proportionnel à cet indice et à l'épaisseur (voir figure 1.2a).

Les techniques d'imagerie conventionnelles ne mesurent que l'intensité lumineuse. La mesure de la phase combinée à la mesure de l'intensité caractérise complètement le champ électromagnétique scalaire. La mesure est alors sensible, en plus de l'amplitude de l'onde lumineuse, à la forme de ses fronts d'onde. La forme du front d'onde est ce qui différencie par exemple une onde sphérique d'une onde plane : sa courbure par rapport à un plan se décrit par des retards locaux, c'est-à-dire des déphasages. Les reliefs d'un objet se retrouvent ainsi imprimés dans les fronts de l'onde lumineuse transmise ou diffusée, comme illustré sur la figure 1.2b.

En 1948, le physicien hongrois Dennis Gabor eut l'idée de contrôler le front d'une fonction d'onde électronique de cette manière. Ingénieur en microscopie électronique, il cherchait à corriger les distortions causées par les lentilles magnétiques dans son dispositif. Il mit alors en

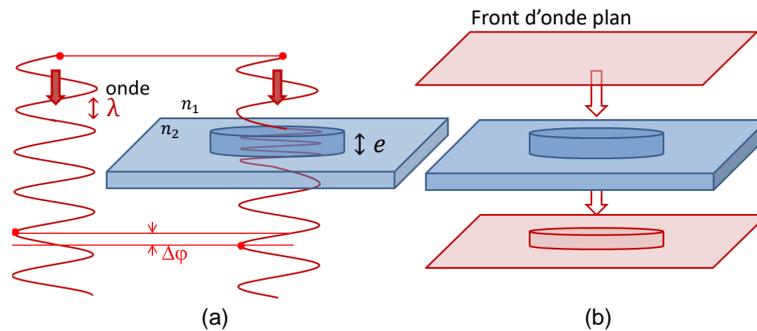


Figure 1.2 – (a) Le déphasage $\Delta\varphi$ accumulé par une onde de longueur λ traversant une variation d'indice de réfraction $\Delta n = n_2 - n_1$ sur une épaisseur e vaut $\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} e \Delta n$. (b) La forme des fronts d'onde porte les reliefs associés aux variations d'indice et d'épaisseur de l'objet illuminé.

place un système de double faisceau et mesura la différence entre le front d'onde électronique diffusé par l'objet et un front d'onde cohérent de référence, via leurs interférences imprimées sur une plaque photographique [22]. Il donna à sa méthode le nom d'holographie, du Grec *holos* (entier) et *grapho* (écrire).

L'invention du laser en 1960 marqua un tournant décisif dans l'histoire de l'holographie. En effet, la cohérence étant un caractère crucial à l'interférométrie, le degré de cohérence sans précédent de ces sources lumineuses entraîna l'extension de l'holographie à sa célèbre version optique. L'innovation de Gabor fut par conséquent récompensée par le prix Nobel de physique en 1971 pour la création d'un domaine entier de l'optique.

Emmet Leith et Juris Upatnieks réalisèrent les premiers des hologrammes avec un laser hélium-néon en 1964 [23]. Les faisceaux lumineux offrent la capacité d'être divisés à l'aide de lames séparatrices, ce qui est plus difficile avec des faisceaux électroniques. Ceci leur permit d'introduire un angle entre les faisceaux d'illumination et de référence (configuration *hors axe*). Gabor était quant à lui forcé d'utiliser une configuration *dans l'axe*, qui apporte plusieurs contraintes telles que l'obligation d'illuminer en transmission, restreignant les objets imageables à des objets translucides. De plus, à la restitution, l'obstruction du faisceau de référence est indispensable pour éviter d'éblouir l'observateur.

Ainsi, dans la configuration la plus courante, un unique faisceau laser est séparé en deux pour créer d'une part le faisceau qui illumine l'objet, et d'autre part un faisceau de référence qui éclaire directement le support d'enregistrement. Comme ces deux faisceaux sont cohérents, c'est-à-dire que leurs fronts d'ondes ont une relation de phase stationnaire, des interférences ont lieu sous forme de franges reflétant l'addition algébrique des amplitudes respectives des deux ondes. Chaque rayon transmis ou réfléchi par l'objet produit son propre patron de franges lors de l'interférence avec la référence. L'orientation de ces franges est parallèle à l'intersection entre les plans des fronts d'onde, indiquant la direction du rayon par rapport à la référence. Leur espacement encode cette direction : plus l'angle entre les rayons qui interfèrent est grand, plus les franges sont resserrées. La superposition de tous ces motifs est imprimée sur la plaque photographique (voir figure 1.3).

Après développement argentique, la structure composée des franges d'interférences est traduite, suivant les procédés, en une variation d'indice, d'absorption, ou (plus rarement) d'épaisseur, sur la plaque. Pour reconstruire l'image, il faut illuminer ce support à nouveau à l'aide du faisceau de référence. En traversant la plaque, la lumière retrouve des conditions de phase (et/ou d'amplitude) qu'elle avait précédemment. Les faisceaux retrouvent donc la direction qu'ils avaient lorsque l'objet était présent. Des franges plus fines vont par exemple produire une plus grande déflexion des rayons, reproduisant les directions des faisceaux que renvoyaient l'objet dans la phase d'enregistrement.

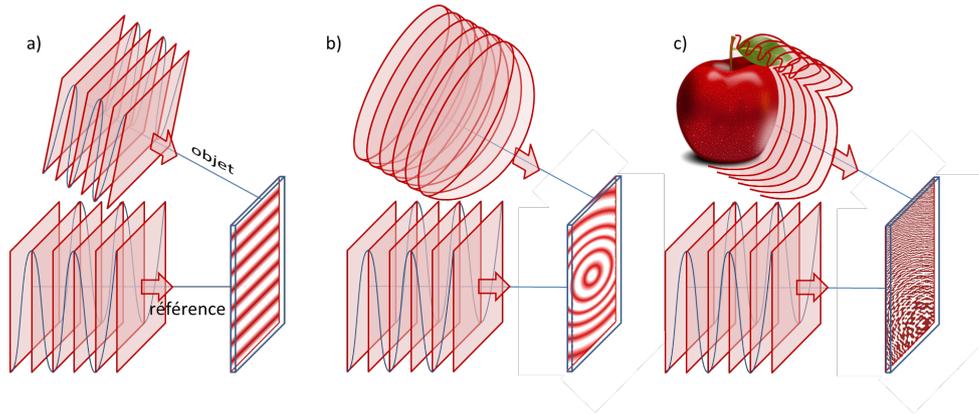
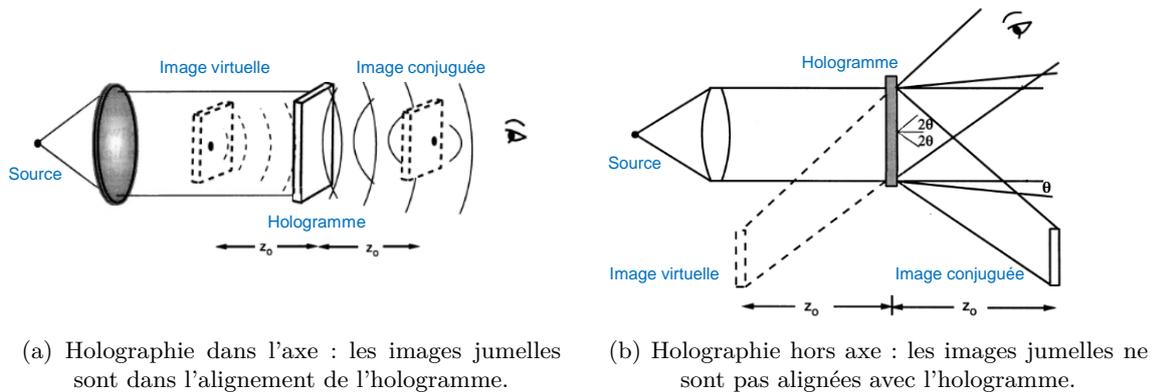


Figure 1.3 – Patron d'interférence (hologramme) résultant de la superposition d'une onde plane de référence avec un faisceau cohérent constitué d'ondes (a) plane, (b) sphérique, et (c) diffusées par la surface d'une pomme.

En regardant à travers la plaque photographique, on voit donc l'image tridimensionnelle de l'objet à la position où il se trouvait lors de l'enregistrement. Cette image correspond à l'ordre -1 d'interférence. Une image jumelle correspondant à l'ordre $+1$ est produite symétriquement de l'autre côté de la plaque photographique. Dans la configuration dans l'axe utilisée par Gabor, cette image conjuguée dégrade la qualité d'observation puisqu'elle se trouve dans l'alignement entre l'observateur et l'image virtuelle (voir figure 1.4a). Ce problème est résolu par la configuration hors axe de Leith et Upatnieks (voir figure 1.4b).



(a) Holographie dans l'axe : les images jumelles sont dans l'alignement de l'hologramme.

(b) Holographie hors axe : les images jumelles ne sont pas alignées avec l'hologramme.

Figure 1.4 – Position des images jumelles dans les configurations (a) de Gabor et (b) de Leith-Upatnieks. [24]

La plupart des hologrammes que l'on peut voir dans des dispositifs artistiques, comme ceux de la figure 1.1, ont été enregistrés à l'aide de lasers comme expliqué ci-dessus. On constate cependant qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser une illumination laser pour les observer. Des innovations ont effectivement permis de reconstruire des hologrammes avec de la lumière blanche : l'hologramme de Denisyuk [25] est enregistré à proximité immédiate de l'objet pour limiter le besoin d'une grande longueur de cohérence temporelle de la source, et Stephen A. Benton abandonne partiellement l'axe vertical de la tridimensionalité pour également restreindre le degré de cohérence nécessaire dans ses hologrammes "arc-en-ciel" [26].

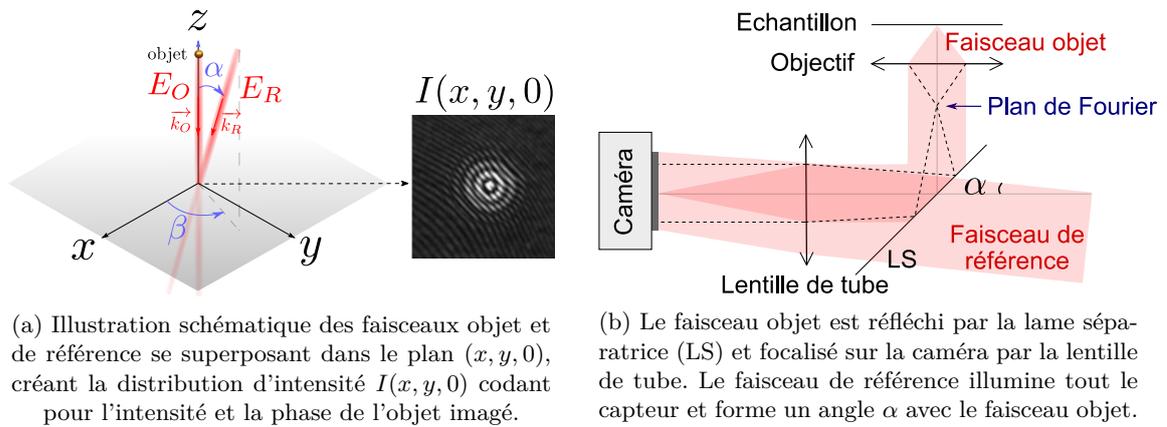
A la fin des années 1960 est née l'holographie digitale : Joseph W. Goodman et Robert W. Lawrence reconstruisent pour la première fois numériquement une image à partir d'un hologramme enregistré sur plaque photographique [27]. Puis en 1994, Ulf Schnars et Werner Jüptner remplacent le film photographique par une caméra [28]. Les franges d'interférence ne sont donc plus imprimées dans un matériau physique, mais enregistrées sous forme d'une

image numérique. Alors qu'en holographie analogique on reconstruit l'hologramme en ré-illuminant le motif engravé par la référence, la reconstruction à partir d'un hologramme numérique consiste en un décodage de l'interférogramme par un calcul, pour obtenir le champ complexe diffusé par l'objet. De manière réciproque, des hologrammes calculés peuvent être imprimés sur un support : un laser balaye la surface pour la cloquer (procédé utilisé dans les CD inscriptibles) et y graver les franges. L'illumination de ce motif permet de restituer l'hologramme visible. Des procédés mécaniques de moulage permettent de les reproduire en grande quantités sur polymères, puis les coller sur nos billets, cartes bleues, ou étiquettes anti-contrefaçon.

Les applications de l'holographie se multiplient depuis l'avènement de l'holographie numérique qui donne accès au contrôle et à l'analyse complète des ondes électromagnétiques. Ce chapitre présente d'abord une description physique des deux étapes de la production d'une image holographique : l'enregistrement de l'hologramme, puis la restitution de l'image 3D. Il montre ensuite comment le caractère interférentiel de l'holographie permet d'y ajouter une dimension temporelle pour l'analyse d'échantillons dynamiques. Puis les aspects expérimentaux du montage en termes de mise en place et de performances sont présentés.

1.2 Enregistrement de l'hologramme

L'hologramme est l'interférogramme issu de la superposition des faisceaux d'objet et de référence sur le plan d'enregistrement. Cette section en développe le calcul et les informations qu'il contient sur la géométrie du système.



(a) Illustration schématique des faisceaux objet et de référence se superposant dans le plan $(x, y, 0)$, créant la distribution d'intensité $I(x, y, 0)$ codant pour l'intensité et la phase de l'objet imagé.

(b) Le faisceau objet est réfléchi par la lame séparatrice (LS) et focalisé sur la caméra par la lentille de tube. Le faisceau de référence illumine tout le capteur et forme un angle α avec le faisceau objet.

Figure 1.5 – Illustrations de la superposition des faisceaux holographiques dont les interférences forment l'hologramme sur le plan de détection.

Dans le repère (O, x, y, z) (figure 1.5a), le support d'enregistrement est placé dans le plan $z = 0$. L'intensité qui y est enregistrée, $I(x, y, 0)$, est le motif d'interférences entre les champs électriques de la lumière diffusée par l'objet, $E_O(x, y, z)$, et du faisceau de référence, $E_R(x, y, z)$, en $z = 0$. Le faisceau de référence utilisé ici est une onde plane. Dans le cas le plus général, il forme un angle α avec le faisceau objet et l'intersection entre les plans (\vec{k}_O, \vec{k}_R) et (x, y) forme un angle β avec l'axe Ox . A un instant donné, il s'écrit alors, en fonction de son amplitude uniforme $A_R(x, y, z) = A_R$, de son vecteur position $\vec{r} = x\vec{u}_x + y\vec{u}_y + z\vec{u}_z$, de son vecteur d'onde $\vec{k} = k_x\vec{u}_x + k_y\vec{u}_y + k_z\vec{u}_z$, et de sa direction de polarisation \vec{u} que l'on prend égale à celle de l'onde objet :

$$\vec{E}_R(x, y, z) = A_R e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} \vec{u} \quad (1.1)$$

En posant $I_j = |\vec{E}_j|^2$, l'expression de l'intensité enregistrée sur le support est la suivante :

$$I(x, y, 0) = \left| \vec{E}_O(x, y, 0) + \vec{E}_R(x, y, 0) \right|^2 \quad (1.2)$$

$$\begin{aligned} &= I_O(x, y, 0) + I_R(x, y, 0) && \text{ordre 0} \\ &+ E_O(x, y, 0)E_R^*(x, y, 0) && \text{ordre +1} \\ &+ E_O^*(x, y, 0)E_R(x, y, 0) && \text{ordre -1} \end{aligned} \quad (1.3)$$

C'est cette intensité $I(x, y, 0)$, ou son enregistrement sur un support photosensible, que nous appellerons *hologramme*. L'équation (1.3) comporte trois termes. Le premier, $I_O(x, y, 0) + I_R(x, y, 0)$, est la somme des intensités des deux faisceaux. C'est l'ordre 0 d'interférence ; il ne contient aucune information de phase et est celui que l'on obtiendrait avec un système d'imagerie en lumière temporellement incohérente. Les deux termes suivants sont les ordres +1 et -1 d'interférence et sont respectivement proportionnels au champ complexe de l'onde objet E_O et de son conjugué E_O^* dans le plan du support d'enregistrement $(x, y, 0)$ [29, 30]. En reportant l'expression (1.1) dans l'équation (1.3) :

$$\begin{aligned} I(x, y, 0) &= I_O(x, y, 0) + I_R(x, y, 0) && \text{ordre 0} \\ &+ E_O(x, y, 0)A_R e^{-i\vec{k} \cdot \vec{r}} && \text{ordre +1} \\ &+ E_O^*(x, y, 0)A_R e^{i\vec{k} \cdot \vec{r}} && \text{ordre -1} \end{aligned} \quad (1.4)$$

Un hologramme $I(x, y, 0)$ enregistré dans l'espace réel, comme celui de la figure 1.5a contient donc, superposées, des informations relatives à chacun de ces ordres. Cependant, leurs spectres spatiaux sont distincts dans l'espace des fréquences spatiales si $\vec{k} \cdot \vec{r} \neq 0$, c'est-à-dire dans la configuration *hors axe* schématisée sur la figure 1.5. En holographie analogique, cette configuration permet de visualiser l'image reconstruite dans une direction distincte de celle de son image conjuguée (figure 1.4b). En holographie numérique, elle occasionne également une séparation des ordres d'interférences, qui est visible après transformée de Fourier spatiale sur la figure 1.6b.

L'ordre 0 y est visible au centre de l'image, correspondant à l'origine du repère (k_x, k_y) . Chaque ordre +1 ou -1 apparaît sous forme d'un disque de centre $(\vec{k} \cdot \vec{u}_x, \vec{k} \cdot \vec{u}_y)$ et dont l'extension est égale à $\frac{ON}{\lambda M}$ où λ est la longueur d'onde, et ON et M sont respectivement l'ouverture numérique et le grandissement du système d'imagerie. Sur l'image, la distance du centre du repère au centre d'un disque est déterminée par la fréquence spatiale des franges i.e. l'interfrange i . En configuration hors axe le système s'assimile à un interféromètre de Michelson en coin d'air, d'où $i = \frac{\lambda}{2\alpha}$. L'orientation de ce rayon dans l'espace des k est perpendiculaire à l'orientation principale des franges¹. En configuration dans l'axe où $\alpha = 0$ on se trouverait dans le cas d'un interféromètre de Michelson en lame d'air avec des franges circulaires sur la figure 1.6a et les trois ordres superposés sur la figure 1.6b.

La netteté des disques sur la figure 1.6b traduit leur distance au plan de Fourier du système d'imagerie (voir figure 1.5b), par analogie avec les images jumelles qui ne sont pas dans les mêmes plans z (voir figure 1.4). En pratique, on applique numériquement une lentille virtuelle à l'hologramme qui corrige une éventuelle sphéricité de l'onde de référence, et permet ainsi de visualiser de manière nette l'un des ordres dans l'espace des vecteurs d'onde. L'expression de cette correction de phase L en fonction de la valeur de la vergence δ (dioptrie) souhaitée pour la correction et les coordonnées x et y est donnée par : [30]

$$L(\delta, x, y) = e^{i\frac{\delta k_0}{2} d_{\text{px}}^2 \left[\left(x \frac{M}{d_{\text{px}}} - \frac{n_{\text{px}}}{2} \right)^2 + \left(y \frac{M}{d_{\text{px}}} - \frac{n_{\text{px}}}{2} \right)^2 \right]} \quad (1.5)$$

1. C'est-à-dire l'orientation qu'auraient les franges pour une onde objet plane.

où $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$ est le module du vecteur d'onde, d_{px} et n_{px} sont respectivement la taille et le nombre des pixels de la caméra et M est le grandissement optique ($\frac{M}{d_{\text{px}}}$ est le facteur (en m^{-1}) de mise à l'échelle de l'image numérique).

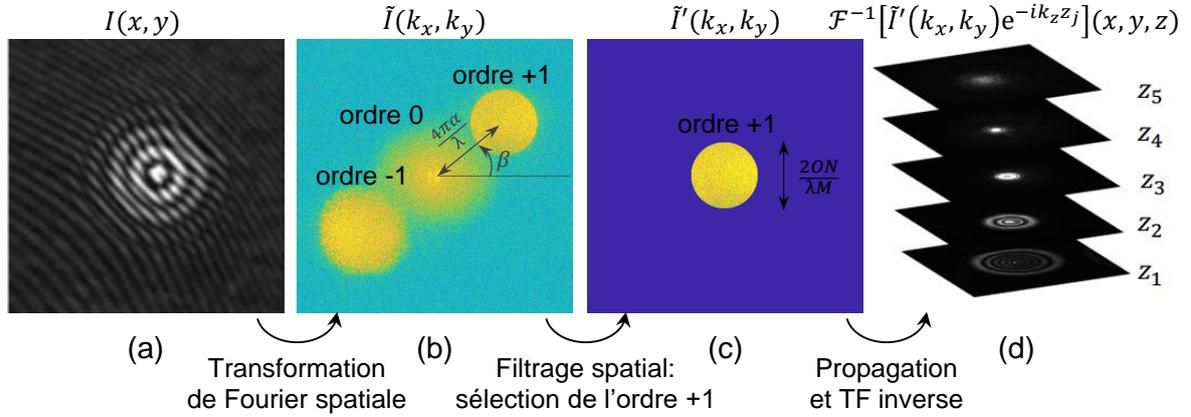


Figure 1.6 – (a) Hologramme dans l'espace réel.

(b) Hologramme dans l'espace des fréquences spatiales. Les trois ordres d'interférence sont distincts, et leurs position et dimensions sont déterminées par les caractéristiques du montage optique.

(c) Ordre +1 de l'hologramme isolé et centré dans une matrice nulle.

(d) L'ordre +1 est propagé puis subit une transformée de Fourier spatiale inverse. Ici, l'image de la fonction d'étalement du point de l'objet imagé est reconstruite dans les plans z voulus.

1.3 Reconstruction holographique

Une fois l'hologramme enregistré, on cherche à en extraire le champ complexe diffusé dans tout l'espace $E_O(x, y, z)$. L'expression (1.4) de l'interférogramme fait intervenir sa répartition dans le plan de l'enregistrement $z = 0$ uniquement, $E_O(x, y, 0)$. La méthode que nous utilisons propose d'isoler l'un des termes de (1.4) en éliminant les termes parasites par un filtrage spectral, puis de restituer la dépendance en z du champ diffusé par l'objet.

1.3.1 Filtrage spatial

Comme observé sur la figure 1.6b, la configuration hors axe présente l'avantage de la séparation spectrale² des trois ordres holographiques. Une simple découpe numérique dans l'espace de Fourier sélectionne et centre le disque de l'ordre +1 dans un espace vide (technique appelée *zero padding*), voir figure 1.6c. L'hologramme est alors réduit à son ordre +1 dont la phase $k_x x + k_y y$ est annulée par le centrage numérique. Son expression revient donc simplement au champ complexe objet au plan $z = 0$ multipliée à l'amplitude A_R du champ de référence. En indiquant le filtrage spatial par un *prime*, ses expressions dans l'espace réel et réciproque sont respectivement les suivantes :

$$I'(x, y, 0) = A_R E_O(x, y, 0) \quad (1.6)$$

$$\begin{aligned} \tilde{I}'(k_x, k_y; z = 0) &= \mathcal{F}[I'(x, y, 0)](k_x, k_y; z = 0) \\ &= A_R \tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0) \end{aligned} \quad (1.7)$$

2. Notons que *spectral* s'entend ici comme associé au spectre des fréquences spatiales.

Le terme $\tilde{I}'(k_x, k_y; z = 0)$ (et donc également $\tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0)$) ayant été isolé, il est à présent possible d'utiliser les propriétés de propagation des ondes électromagnétiques afin de calculer la valeur de \tilde{E}_O pour toute autre valeur de z .

1.3.2 Propagation

L'étape de propagation permet de passer du champ $E_O(x, y, 0)$ au champ $E_O(x, y, z)$. La profondeur est restituée à partir de l'onde plane de référence $E_R(x, y, z)$ qui a permis les interférences menant à l'hologramme. En effet, si l'on multiplie l'hologramme (1.6) par $E_R(z) = A_R e^{-ik_z z}$,³ la phase $k_z z$ de la référence est multipliée à chaque composante spectrale du champ objet (1.7) :

$$\tilde{I}'(k_x, k_y; z = 0) E_R(z) = I_R \tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0) e^{-ik_z z} \quad (1.8)$$

où $I_R = A_R^2$ est l'intensité lumineuse du faisceau de référence.

Or, ce spectre $\tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0) e^{-ik_z z}$ est celui d'une solution élémentaire de l'équation de Helmholtz $\nabla^2 E_O(x, y, z) + k^2 E_O(x, y, z) = 0$:

$$\tilde{E}_O(k_x, k_z; z) = \tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0) e^{-ik_z z} \quad (1.9)$$

L'équation (1.9) traduit que la propagation d'une perturbation dans un plan z revient à un simple déphasage $k_z z$ de chaque onde plane composant cette perturbation [24].

Ainsi, d'après les équations (1.8) et (1.9), le champ d'intérêt $E_O(x, y, z)$ est la transformée de Fourier inverse de l'hologramme dans l'espace des k propagé dans le plan z :

$$E_O(x, y, z) = \frac{1}{A_R} \mathcal{F}^{-1} \left[\tilde{I}'(k_x, k_y; z = 0) e^{-iz \sqrt{\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2}} \right] (x, y, z) \quad (1.10)$$

où $\frac{2\pi}{\lambda} = \sqrt{k_x^2 + k_y^2 + k_z^2}$ est le module du vecteur d'onde du faisceau de référence de longueur d'onde λ . On peut donc reconstruire en 3D la diffusion lumineuse d'un objet à partir de l'acquisition d'un hologramme dans un unique plan z quelconque, comme illustré sur la figure 1.6d.

La reconstruction du champ décrite par l'équation (1.10) est basée sur la convolution de son spectre angulaire à une fonction de transfert propagatrice, selon la théorie des filtres linéaires [31], et est donc soluble numériquement à l'aide d'une succession de transformées de Fourier. Tandis que dans ce type de méthode le grossissement de la taille de l'objet reconstruit est fixé par le montage, d'autres méthodes permettent de le contrôler [32, 33]. Il existe également des méthodes de reconstruction sans aucune considération de propagation optique, dans lesquelles les motifs de franges sont reconnus par *deep learning* [34].

3. En supposant que la phase $k_x x + k_y y$ a été annulé par le centrage explicité à la section précédente.

1.4 Procédés temporels

Dans les sections précédentes, les déphasages spatiaux entre les deux faisceaux laser du montage holographique sont mis à profit pour isoler les signaux pertinents et pour reconstruire une image tridimensionnelle.

De manière similaire, des déphasages temporels entre le faisceau de référence et la lumière diffusée ou transmise par l'objet peuvent être exploités. En utilisant des déphasages contrôlés, on peut discriminer les trois ordres, cette fois temporellement, afin de les filtrer. De plus, si la lumière détectée de l'objet évolue au cours du temps, des composantes temporelles peuvent être isolées de cette manière afin :

- **d'améliorer le rapport signal à bruit** en utilisant des techniques de détection synchrone pour rejeter les bruits intervenant à des fréquences autres que celle qui est pertinente,
- **d'en isoler certaines** afin de créer une image dont le contraste provient des propriétés dynamiques de l'objet.

1.4.1 Filtrage temporel

La section 1.3.1 a présenté un filtrage des ordres d'interférences de l'hologramme effectué en les déphasant spatialement les uns des autres grâce à la configuration hors axe, puis en sélectionnant le terme voulu dans l'espace des fréquences spatiales. Il existe une transposition de cette technique dans le domaine temporel, qui peut être utilisée combinée au filtrage spatial, ou bien en remplacement de celui-ci, afin d'obtenir une isolation optimale des ordres. En effet, la configuration dans l'axe peut être préférée pour maximiser le produit espace-bande passante, et le filtrage spatial n'est alors plus possible.

Le produit espace-bande passante est le produit entre la taille en pixels de l'hologramme dans l'espace réel et la taille en pixels du disque de rayon $\frac{ON}{\lambda M}$ dans l'espace de Fourier, puisque ce disque représente les fréquences spatiales accessibles. Sa maximisation se retrouve limitée en configuration hors axe à cause de la condition de non-recouvrement des ordres [35, 36]. Bien que des stratégies existent pour l'optimiser malgré tout en configuration hors axe [37], ce produit ne peut atteindre sa valeur maximale qu'en configuration dans l'axe, et le filtrage temporel est alors employé seul pour atténuer les ordres parasites [38].

Un déphasage temporel peut alors être ajouté entre les trois ordres holographiques pour les discriminer, dans une configuration appelée holographie à décalage de phase [39]. Il est possible de générer ce décalage mécaniquement, mais c'est une solution peu stable. Pour ce faire, on choisit plutôt ici un battement en fréquence introduit entre les deux faisceaux à l'aide de modulateurs acousto-optiques.

Modulateur acousto-optique (MAO)

Un modulateur acousto-optique est un dispositif optique composé d'un cristal dont l'indice de réfraction est rendu spatialement périodique grâce une onde acoustique radio-fréquence. Cette distribution en indice de réfraction agit comme un réseau de diffraction sur un faisceau laser incident, d'où une séparation spatiale en plusieurs ordres de diffraction. De plus, en raison du déplacement des plans d'indice au cours du temps, la pulsation de l'onde diffractée à l'ordre k (où $k \in \mathbb{Z}$) est décalée de $k\omega$ (où ω est la pulsation de l'onde acoustique) par effet Doppler.

Holographie à décalage de phase

L'utilisation d'un seul MAO ne permet de produire que des décalages à la fréquence de la porteuse, soit quelques dizaines de MHz, ce qui est trop rapide pour une caméra. Pour obtenir un battement de fréquence ΔF quelconque⁴ entre les deux faisceaux holographiques, un MAO fonctionnant autour de sa fréquence centrale $f_{\text{MAO}} = 80$ MHz est utilisé dans chaque faisceau. Le premier MAO module l'onde objet à f_{MAO} et l'autre module l'onde de référence à $f_{\text{MAO}} - \Delta F$. En conséquence, les franges d'interférence défilent à la fréquence de battement ΔF , qui peut être choisie arbitrairement.

La technique de l'holographie à décalage de phase permet d'éliminer les ordres holographiques 0 et -1 en rendant ce défilement des franges synchrone avec l'acquisition par la caméra dans l'ordre $+1$ uniquement. Ainsi, en utilisant des techniques de détection synchrone ou, dans notre cas, de détection synchrone multiplexée [40], il est ainsi possible de ne filtrer que la composante des franges qui oscille à la fréquence souhaitée. Comme dans le cas d'une détection synchrone classique, ce dispositif permet d'éliminer une part importante du bruit, soit toutes les composantes situées à d'autres fréquences. Après démodulation à la fréquence d'acquisition, l'ordre 0 est en effet supprimé puisque statique, et l'ordre -1 aussi car en opposition de phase. La synchronicité est établie en choisissant la valeur de décalage $\Delta F = \frac{f_{\text{acq}}}{n}$ où f_{acq} est la fréquence d'acquisition, et n un entier pair supérieur ou égal à 2 pour satisfaire la condition d'échantillonnage de Nyquist-Shannon en vue d'une démodulation à n phases.

Démodulation à n phases

La démodulation s'effectue en sommant les n hologrammes dotés de leur phase $m\frac{\pi}{2}$ ($m = \{0, 1, \dots, n-1\}$) dans le cycle de fréquence f_{acq} :

$$I_{n \text{ phases}}(x, y, 0) = \frac{1}{n} \sum_{m=0}^{n-1} I_m(x, y, 0) e^{im\frac{\pi}{2}} \quad (1.11)$$

$$\begin{aligned} &= \frac{1}{n} \sum_{m=0}^{n-1} [i^m (I_{O,m}(x, y, 0) + I_{R,m}(x, y, 0)) && \text{ordre 0} \\ &+ (+1)^m E_O(x, y, 0) E_R^*(x, y, 0) && \text{ordre +1} \\ &+ (-1)^m E_O^*(x, y, 0) E_R(x, y, 0)] && \text{ordre -1} \end{aligned} \quad (1.12)$$

En prenant n pair, les premiers et derniers termes (ordres 0 et -1) s'annulent et il reste seulement l'ordre $+1$ égal au champ $E_O(x, y, 0)$ au facteur constant $E_R^*(x, y, 0)$ près (voir figure 1.7).

$$I_{n \text{ phases}}(x, y, 0) = E_O(x, y, 0) E_R^*(x, y, 0) \quad (1.13)$$

En pratique, la valeur $n = 4$ est choisie comme compromis entre échantillonnage et résolution temporelle. D'après l'équation (1.11), la démodulation à 4 phases revient à la simple combinaison linéaire suivante :

$$I = \frac{I_0 - I_2 + i(I_1 - I_3)}{4} \quad (1.14)$$

En permettant d'isoler temporellement l'ordre $+1$, ce filtrage temporel améliore le rapport signal sur bruit (les composantes de bruit situées hors de la fréquence d'intérêt sont éliminées). La présence de résidus des ordres 0 et -1 visible sur la figure 1.7 est due d'une part aux bruits de phase rendant le calcul (1.12) inexact, et d'autre part à l'erreur d'échantillonnage

4. $\Delta F \in [0, \sim 100 \text{ MHz}]$

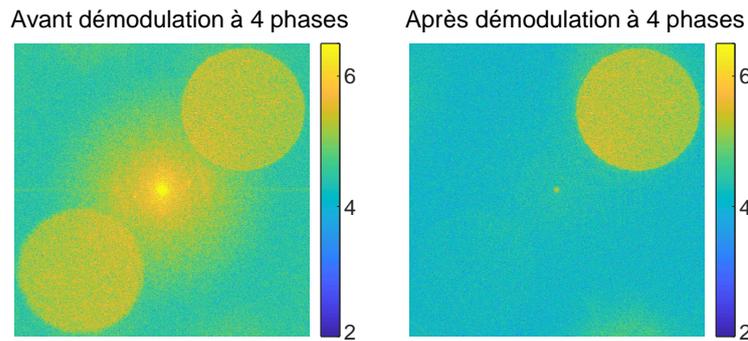


Figure 1.7 – Hologramme dans l’espace des fréquences spatiales avant et après démodulation à 4 phases. Après démodulation, les ordres 0 et -1 sont fortement atténués par rapport à l’ordre $+1$ resté majoritairement intact.

introduite par le délai de la caméra entre deux acquisitions⁵. C’est pourquoi la configuration hors axe adoptée ici a l’avantage d’éliminer entièrement le bruit par association d’un filtrage spatial (voir section 1.3.1).

La fréquence de la composante du signal que l’on isole ainsi peut être choisie, permettant donc en plus du filtrage d’effectuer une étude spectrale complète.

1.4.2 Holographie hétérodyne

Nous avons vu jusqu’ici que l’hologramme est un objet bidimensionnel encodant à la fois l’amplitude et la phase de l’onde, et donc l’information sur les trois dimensions spatiales de l’échantillon imagé. Dans le cadre d’étude de phénomènes dynamiques, il est intéressant d’ajouter à ce codage une information temporelle.

Il est bien sûr possible, si l’on dispose d’une caméra très rapide, d’imager une évolution temporelle en utilisant un échantillonnage à très haute fréquence. L’holographie Doppler [38] mesure le décalage fréquentiel accumulé par la lumière diffusée par les éléments en mouvement de l’échantillon par rapport au faisceau de référence, sans avoir besoin de modulateurs acousto-optiques. Ce principe fonctionne d’ailleurs aussi sur des systèmes d’imagerie non holographiques comme la tomographie à cohérence optique (OCT) [42]. Cependant, cette technique est limitée à quelques kHz, ordre de grandeur des cadences typiques que peuvent atteindre les caméras les plus rapides, tandis que les caméras standards utilisées couramment fonctionnent typiquement jusqu’à la centaine de Hz. Il est de plus difficile, dans le cas d’échantillons faiblement diffusants comme les nôtres, d’obtenir une exposition suffisante lorsque les temps d’accumulation sont très courts.

Une alternative qui a pour avantage de ne pas être limitée en fréquence par les performances de la caméra est l’holographie hétérodyne. Le décalage en fréquence ΔF introduit en holographie à décalage de phase revient à ajouter une détection homodyne ou hétérodyne, aussi appelée stroboscopique, au montage holographique.

Hétérodynage, stroboscopie

Dans certains films, les pales d’un hélicoptère apparaissent fixes ou ralenties, parce que la cadence d’acquisition des images avoisine la fréquence du mouvement ou un de ses multiples ou sous-multiples. Par ce phénomène, appelé *stroboscopie*, on peut effectivement figer une composante de fréquence f_0 en l’imageant à la même fréquence. Pour en imager l’amplitude, la fréquence de la caméra peut par exemple être choisie égale à nf_0 afin d’échantillonner le signal un nombre entier n de fois, puis d’appliquer une démodulation à n phases (voir section

5. Une correction à cet effet est démontrée dans [41].

1.4.1). Cette méthode de détection par "figeage", que l'on qualifie d'homodyne, reste cependant limitée aux relativement basses fréquences d'acquisition accessibles instrumentalement, puisque la caméra doit être n fois plus rapide que le phénomène étudié. Pour s'affranchir de cette limitation, il est judicieux de mettre en œuvre la stroboscopie au stade de l'illumination plutôt qu'à celui de l'acquisition. Les mouvements relativement périodiques de danseurs en boîte de nuit, par exemple, apparaissent ralentis lorsqu'éclairés par des flashes alternatifs.

Plus généralement, en notant $u(t) = U \sin(2\pi f_0 t + \varphi)$ la composante d'intérêt, la détection hétérodyne consiste en la multiplication au signal d'une sinusoïde en phase portant un décalage de fréquence f_1 : $v(t) = \sin(2\pi(f_0 + f_1)t + \varphi)$. L'information sur l'amplitude U recherchée est alors reportée dans deux nouvelles composantes issues de la multiplication des sinus :

$$u(t)v(t) = \frac{U}{2} (\cos(2\pi f_1 t) - \cos(2\pi(2f_0 + f_1)t + 2\varphi)) \quad (1.15)$$

Le premier terme, en $\frac{U}{2} \cos(2\pi f_1 t)$, porte donc une information sur l'amplitude U du phénomène, mais est porté par une modulation à f_1 , qui peut être aussi lente que souhaitée, même si la fréquence f_0 est très élevée. L'hétérodynage peut donc être vu comme un moyen de réduire la fréquence effective du phénomène observé.

Principe de l'holographie hétérodyne

La nature interférentielle du montage holographique permet de produire la fréquence stroboscopique directement entre les deux faisceaux d'illumination [43]. Comme expliqué à la section 1.4.1, la modulation de chaque faisceau à l'aide d'un MAO aux fréquences respectives f_{MAO} et $f_{\text{MAO}} - \Delta F$ produit un battement des franges d'interférence à la fréquence ΔF . On a donc $f_0 + f_1 = \Delta F$ dans l'expression de $v(t)$ dans l'équation (1.15). Pour ramener la composante de fréquence f_0 à celle de la démodulation à $\frac{f_{\text{acq}}}{4} = f_1$, le décalage de fréquence ΔF à imposer entre les deux faisceaux à l'aide des MAOs est donc le suivant :

$$\Delta F = \frac{f_{\text{acq}}}{4} + f_0 \quad (1.16)$$

En fonction de la valeur f_0 de la fréquence que l'on cherche à sonder, il est ainsi possible de passer d'un mode de fonctionnement homodyne à un mode hétérodyne :

- Pour les phénomènes à basse fréquence f_0 , l'échantillonnage à 4 phases permet de remonter à U . On est alors en détection homodyne où $f_{\text{acq}} = 4f_0$ ($\Delta F = 0$).
- Pour les phénomènes de fréquences f_0 inaccessibles par caméra, on impose le battement $\Delta F = \frac{f_{\text{acq}}}{4} + f_0$ entre les faisceaux holographiques. Les composantes de fréquence f_0 sont décalées dans la nouvelle composante hétérodyne à $\frac{f_{\text{acq}}}{4}$ (le premier terme de l'équation (1.15)) [44]. Les fréquences voulues sont ainsi translatées de manière à autoriser un échantillonnage par la caméra, qui travaille toujours à f_{acq} .

En associant la détection hétérodyne à l'holographie, **seuls les phénomènes oscillant à f_0 sont visibles sur l'image** après démodulation à 4 phases et reconstruction. Cela permet d'**imager sélectivement les différentes composantes du spectre temporel**. Cependant, la relation entre le signal mesuré et l'amplitude U devient plus complexe à exprimer puisqu'elle fait intervenir une fonction d'appareil, ou fonction de transfert instrumentale \tilde{S}_{ins} .

Fonction de transfert instrumentale

Le signal mesuré par la caméra est noté $\tilde{S}_{cam}(f, r)$ car il correspond aux images dans l'espace des positions repérées par les coordonnées $r = (x, y)$, et dans le domaine spectral (temporel) des fréquences hétérodynes $f = \Delta F - \frac{f_{acq}}{4}$. L'annexe A démontre qu'il est issu de la convolution entre le signal diffusé par l'objet, que l'on note $\tilde{g}(f, r)$, et une fonction de transfert instrumentale $\tilde{S}_{ins}(f)$:

$$\tilde{S}_{cam}(f, r) = \left| \left(\tilde{g}(r) * \tilde{S}_{ins} \right) (f) \right| \quad (1.17)$$

En effet, comme illustré à la figure 1.8, dans le domaine temporel, l'acquisition par la caméra échantillonne le signal $g(t, r)$ sur des fenêtres de largeur t_{int} , le temps d'intégration, à la fréquence d'acquisition f_{acq} . On peut donc écrire une première forme de la fonction de réponse correspondante comme la convolution d'une fonction rectangle de largeur t_{int} à un peigne de Dirac de période f_{acq}^{-1} :

$$S_{ins,1}(t) = \left| \text{Rect} \left(\frac{t}{t_{int}} \right) * \sum_n \delta \left(t - \frac{n}{f_{acq}} \right) \right| \quad (1.18)$$

Dans le domaine des fréquences, $\tilde{S}_{ins,1}(f) = \mathcal{F}[S_{ins,1}(t)](f)$. La fonction de transfert a donc la forme d'un sinus cardinal échantillonné à la fréquence d'acquisition f_{acq} (voir figure 1.8).

$$\tilde{S}_{ins,1}(f) = t_{int} f_{acq} \left| \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \right| \sum_n \delta(f - n f_{acq}) \quad (1.19)$$

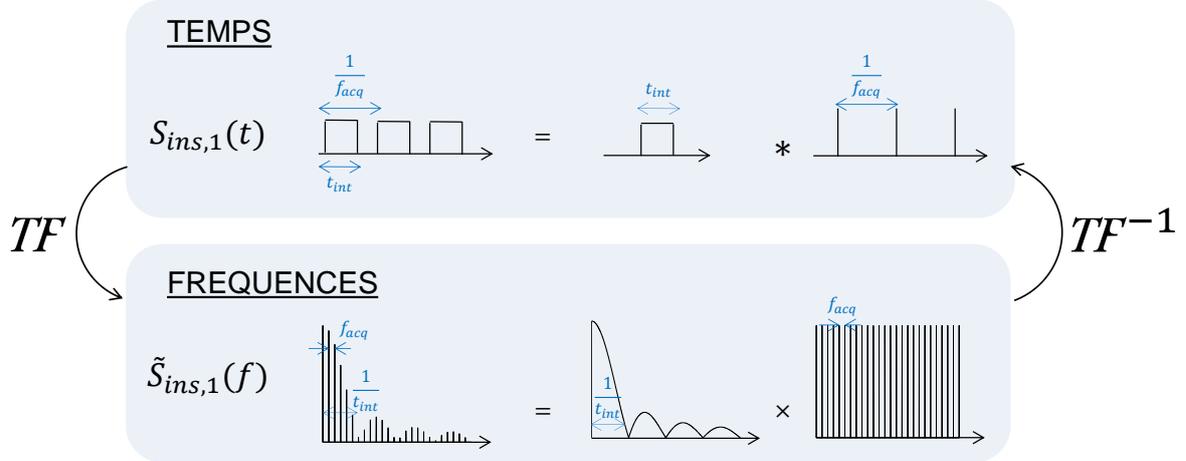


Figure 1.8 – Illustration schématique de la fonction de transfert instrumentale dans l'espace temporel et dans l'espace des fréquences temporelles.

En haut : les expositions successives (intégration sur t_{int} , période f_{acq}^{-1}) correspondent à la convolution d'une fonction rectangle et d'un peigne.

En bas : dans l'espace des fréquences (après transformée de Fourier), l'inverse de la largeur t_{int} des fenêtres d'acquisition est retrouvé dans la période du sinus cardinal, et l'accumulation à la fréquence f_{acq} est retrouvée de façon réciproque en multiplication du sinus cardinal.

Moyennage temporel En pratique, lors des acquisitions, une moyenne est effectuée sur N images démodulées à 4 phases afin d'augmenter le rapport signal sur bruit. La contribution de ce paramètre N apparaît dans une deuxième expression de la fonction de transfert notée $\tilde{S}_{ins,2}(f)$. Le calcul menant à l'expression (1.20) est détaillé en annexe A.

$$\tilde{S}_{ins,2}(f) = t_{int} \left| \operatorname{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \frac{\left[\frac{\sin \left(4\pi \frac{\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right)}{f_{acq}} \right)}{\sin \left(\frac{\pi f}{f_{acq}} + \frac{\pi}{2} \right)} \frac{\sin \left(2\pi \left(N + \frac{1}{2} \right) \left(\frac{4f}{f_{acq}} + 1 \right) \right)}{\sin \left[\pi \left(\frac{4f}{f_{acq}} + 1 \right) \right]} \right]} \right| \quad (1.20)$$

Ces deux définitions voisines mènent à des fonctions de transfert \tilde{S}_{ins} très proches. Les simulations numériques des expressions $\tilde{S}_{ins,1}(f)$ (1.19) et $\tilde{S}_{ins,2}(f)$ (1.20), ainsi qu'une mesure expérimentale de la fonction de transfert⁶, sont tracées sur la figure 1.9. La ressemblance entre les trois courbes confirme l'interprétation et chaque étape du calcul de $\tilde{S}_{ins,2}(f)$, ainsi que la validité de l'emploi de l'expression simplifiée $\tilde{S}_{ins,1}(f)$.

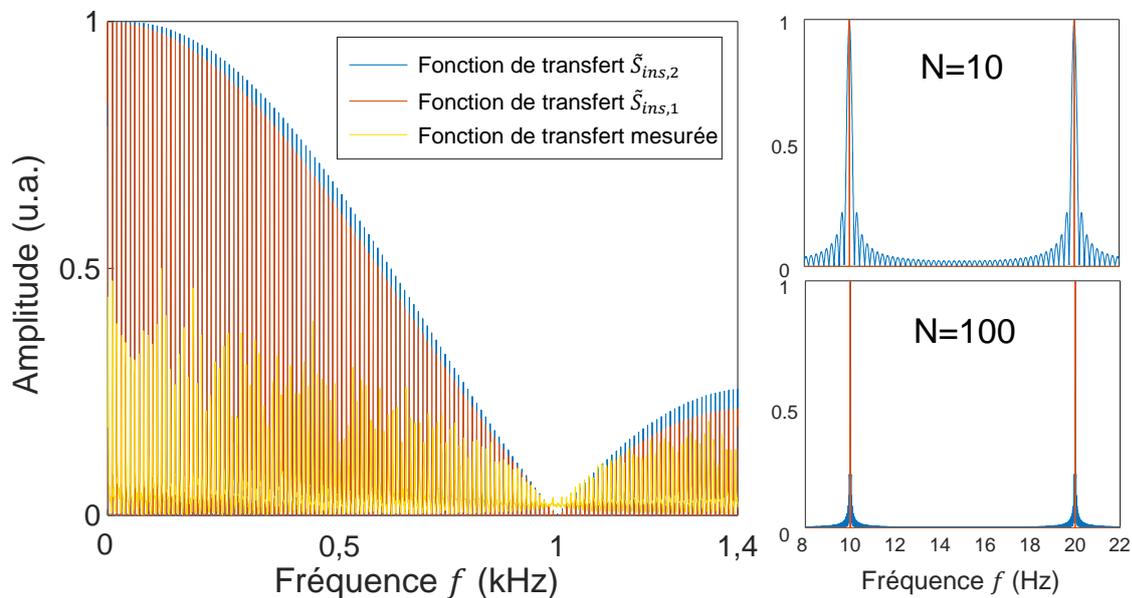


Figure 1.9 – Représentation graphique d'une mesure de bruit expérimental convolué à la fonction de transfert (jaune) et de deux simulations numériques de la fonction de transfert instrumentale : $\tilde{S}_{ins,1}(f)$ (1.19) en orange et $\tilde{S}_{ins,2}(f)$ (1.20) en bleu. Les paramètres utilisés sont $t_{int} = 1$ ms et $f_{acq} = 10$ Hz. Le pas d'échantillonnage est de 500 mHz pour la mesure et 10 mHz pour les simulations. Les encarts à droite montrent un agrandissement sur les simulations autour de 15 Hz, pour deux valeurs de l'entier N intervenant dans $\tilde{S}_{ins,2}(f)$.

Il est à noter que le peigne de la fonction $\tilde{S}_{ins,2}(f)$ résulte d'interférences entre les quotients de sinusoides (équation (1.20)), tandis que celui de la fonction $\tilde{S}_{ins,1}(f)$ est simulé avec des pics de Dirac, non physiques. L'écart au pic de Dirac idéal est visible sur les encarts de la figure 1.9 et diminue lorsque le nombre d'image moyennées N augmente, traduisant bien l'obtention d'un pic infiniment étroit dans la limite $N \rightarrow +\infty$. La valeur $N = 100$ est choisie expérimentalement comme compromis entre définition des pics et résolution temporelle.

6. Mesure du spectre hétérodyne d'un objet diffusant fixe. Le signal obtenu est par conséquent la convolution de la fonction de transfert au bruit expérimental.

1.5 Algorithme de reconstruction holographique

Le diagramme de la figure 1.10 résume les sections précédentes en un algorithme permettant la reconstruction d'images à partir des hologrammes codé sous Matlab ou, pour obtenir une reconstruction en temps réel, en langage CUDA.

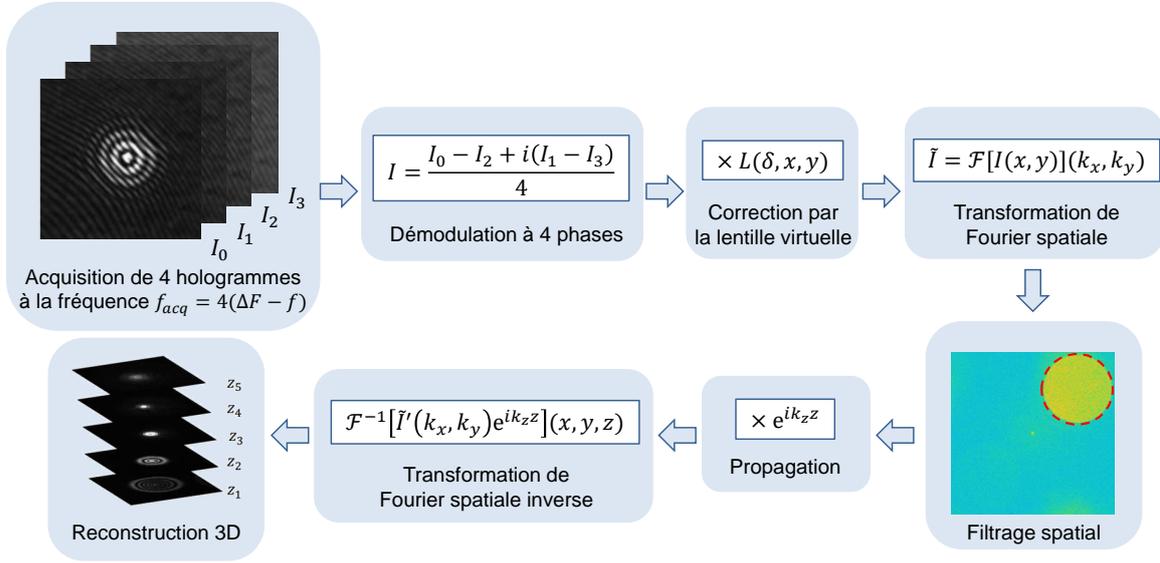


Figure 1.10 – Algorithme de reconstruction holographique résumant les sections précédentes.

En pratique, 4 hologrammes⁷ sont enregistrés à la fréquence $f_{acq} = 4(\Delta F - f)$ où ΔF est le battement de fréquence imposé entre les deux MAOs et f est la fréquence que l'on cherche à investiguer. Le défilement des franges à la fréquence ΔF sur les 4 hologrammes est une porteuse multiplicative aux phénomènes dynamiques imagés, qui ramène les composantes de fréquence f à la fréquence $\frac{f_{acq}}{4}$ comme l'explique l'équation (1.15).

Numériquement, on démodule alors à 4 phases en recombinaison les 4 hologrammes en un seul hologramme complexe démodulé par l'équation (1.11). On le multiplie à la lentille numérique (1.5). Par une transformée de Fourier numérique de l'hologramme, on visualise les ordres d'interférence sur l'image d'intensité correspondante. On ajuste ainsi la valeur de dioptrie δ de la lentille numérique de manière à rendre net l'un des ordres. L'ordre choisi est numériquement découpé et centré dans une matrice nulle.

On a ainsi isolé le champ $\tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0)$ et on peut alors appliquer la méthode de propagation du spectre angulaire (équation (1.10)) par un algorithme simple [45]. En effet, on a vu que la méthode des spectres angulaires se base sur l'égalité $\tilde{E}_O(k_x, k_y; z) = \tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0)e^{ik_z z}$,

où $k_z = \sqrt{\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2}$. La propagation dans le plan z choisi peut donc s'effectuer par la simple multiplication de la matrice contenant l'ordre +1, $\tilde{E}_O(k_x, k_y; z = 0)$, par la matrice de propagation $e^{iz\sqrt{\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right)^2 - k_x^2 - k_y^2}}$.

k_x et k_y s'obtiennent en convertissant les positions x et y dans l'espace dual des fréquences spatiales :

$$k_{j=\{x,y\}} = \frac{2\pi M}{n_{px}d_{px}} \left(j \frac{M}{d_{px}} - \frac{n_{px}}{2} \right) \quad (1.21)$$

7. Avec le moyennage, N hologrammes sont enregistrés et traités 4 à 4. N doit donc être multiple de 4.

où n_{px} et d_{px} sont respectivement le nombre et la taille des pixels de la caméra, et M est le grandissement du système optique. $\frac{d_{\text{px}}}{M}$ est la taille du pixel virtuel, c'est-à-dire du pixel de l'image.

Pour finir, il suffit d'effectuer une transformée de Fourier inverse au résultat pour obtenir la reconstruction, dans l'espace réel, du plan choisi.

1.6 Montage optique

Cette section est dédiée à l'implémentation expérimentale de l'enregistrement d'un hologramme numérique, et présente le montage optique réalisé pour le système d'holographie hétérodyne.

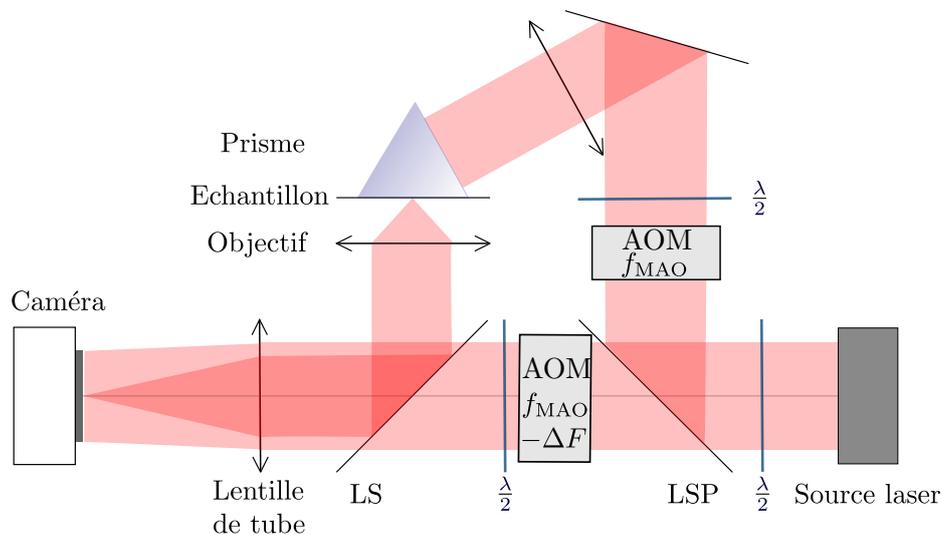


Figure 1.11 – Chemin optique. Le rôle du prisme est expliqué dans la section 1.6.3. $\frac{\lambda}{2}$: lame demi-onde. LS : lame séparatrice. CSP : cube séparateur de polarisation. MAO : modulateur acousto-optique.

1.6.1 Chemin optique

Le chemin optique consiste en un interféromètre de Mach-Zender et est schématisé sur la figure 1.11. Le faisceau laser en sortie de la source est séparé en deux faisceaux (objet et référence) par une lame séparatrice de polarisation. Une lame demi-onde placée en amont permet de contrôler la répartition d'intensité lumineuse entre les deux polarisations, donc les intensités respectives des deux faisceaux.

Un modulateur acousto-optique (MAO, voir section 1.4.1) est ensuite placé dans chaque faisceau pour l'holographie à décalage de phase et la détection hétérodyne. En sortie, l'ordre $+1$ du modulateur est sélectionné par un diaphragme (voir le schéma plus détaillé de la figure 1.13). Le MAO est orienté dans l'espace de sorte à maximiser l'intensité dans l'ordre $+1$.

Une lame demi-onde est placée dans chaque faisceau afin de contrôler les polarisations, mais aussi d'aligner les polarisations des bras de référence et d'objet pour autoriser la formation d'interférences.

Le faisceau objet est couplé à l'échantillon via un prisme pour une illumination en champ sombre, détaillée dans le paragraphe suivant. La lumière diffusée par l'échantillon est collectée par l'objectif de microscope et est recombinée au faisceau de référence sur une lame séparatrice. La lentille de tube du microscope (Olympus IX71) forme l'image de l'objet sur le capteur de la caméra (Andor ZYLA sCMOS 5.5).

1.6.2 Configuration holographique

Deux types d'hologrammes peuvent être générés selon la position du plan d'enregistrement, i.e. le capteur de la caméra en holographie digitale.

On peut acquérir un hologramme de Fourier en plaçant la caméra dans un plan de Fourier du système optique (voir figure 1.5b). On enregistre donc directement l'hologramme dans l'espace des fréquences spatiales, et une seule transformée de Fourier est nécessaire à la reconstruction [46]. C'est donc la configuration la plus simple en termes de reconstruction numérique.

Cependant, dans cette configuration, l'image microscopique de l'objet n'est pas directement observable sur la caméra. Cela rend délicat des opérations expérimentales élémentaires telles que le positionnement de l'échantillon. Pour cette raison, nous travaillons plutôt dans une configuration où la caméra et l'échantillon sont conjugués, comme schématisé sur la figure 1.11.

1.6.3 Illumination en champ sombre

L'imagerie d'objets à faible section efficace de diffusion nécessite une illumination intense ($I_{obj} \gg I_{ref}$). Afin de ne pas éblouir la caméra et de les distinguer plus facilement du fond, une configuration en champ sombre est nécessaire.

Comme illustré sur la figure 1.12, le faisceau objet est pour cela couplé à la lame portant l'échantillon via un prisme de verre. Après traversée de l'échantillon, le faisceau subit une réflexion totale interne à l'interface lame-air. Ainsi, seule la lumière diffusée par l'échantillon, et ses particules optiquement diffusantes, est collectée par l'objectif de microscope. Les particules apparaissent donc sur fond noir.

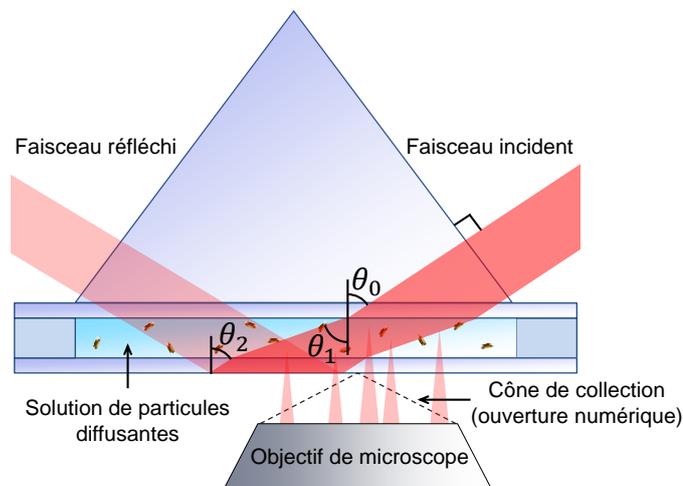


Figure 1.12 – Illumination en champ sombre par couplage du faisceau à l'échantillon via un prisme de verre. Une goutte d'huile permet l'adaptation d'indice avec la lame. Le faisceau incident est totalement réfléchi et n'est pas collecté par l'objectif, donc seule la lumière diffusée par l'échantillon est imagée.

Si le faisceau incident est normal à la face d'entrée du prisme (rectangle isocèle), alors $\theta_0 = 45^\circ$ et l'angle de réfraction après la première interface verre-échantillon vaut $\theta_1 = \arcsin \frac{n_{verre}}{n_{milieu}\sqrt{2}} = 54^\circ$ pour $n_{verre} = 1.52$ et $n_{milieu} = n_{eau} = 1.33$ ⁸. A la deuxième interface échantillon-verre on retrouve $\theta_2 = \theta_0 = 45^\circ$. A la dernière interface verre-air, l'angle de réflexion totale est $\theta_{lim} = \arcsin \frac{1}{n_{verre}} \approx 42^\circ$, donc $\theta_2 > \theta_{lim}$ et le faisceau subit une réflexion totale interne.

8. Dans nos expériences, l'échantillon est généralement en phase aqueuse.

Une réflexion totale interne peut aussi être produite dès l'interface lame-échantillon⁹. L'objectif collecte alors la diffusion des objets proches de l'interface plongés dans l'onde évanescente produite. Cette configuration présente l'avantage d'une haute résolution axiale grâce au sectionnement optique basé sur la condition de proximité des objets à la lamelle sur la diffusion de la lumière [47].

1.6.4 Sources lumineuses

Afin d'adapter la longueur d'onde aux objets étudiés, et notamment d'optimiser la diffusion, trois sources continues sont montées :

- une diode laser de longueur d'onde $\lambda = 532$ nm et de puissance en sortie 80 mW,
- une diode laser de longueur d'onde $\lambda = 785$ nm et de puissance en sortie 90 mW,
- une diode superluminescente de longueur d'onde centrale $\lambda = 833$ nm et de puissance en sortie 26 mW.

Le montage est composé de deux chemins principaux, chacun composé d'un interféromètre de Mach-Zender comprenant deux MAOs de la figure 1.11. Le montage entier est schématisé sur la figure 1.13. Le premier chemin est celui du laser vert. Le laser infrarouge et la diode superluminescente partagent le deuxième chemin et y sont interchangeables par le biais d'un miroir basculant. En effet, la proximité de leurs longueurs d'onde permet d'utiliser des orientations de MAOs proches. Ce deuxième chemin est doté d'une ligne à retard pour l'équilibrage fin de la différence de marche nécessaire lors de l'utilisation de la diode superluminescente dont la longueur de cohérence est très faible (voir section 1.6.6).

L'utilisation de deux chemins (donc deux sources) distincts simultanément permet un multiplexage en longueur d'onde [48], en polarisation [49], ou en d'autres grandeurs comme par exemple la fréquence hétérodyne. La figure 1.14 montre un hologramme acquis avec les deux lasers vert et infrarouge. Cette configuration permet de réaliser deux mesures entièrement distinctes simultanément. Le multiplexage peut être optimisé en occupant toute la bande passante par des disques provenant d'un nombre maximal de faisceaux d'illumination afin de maximiser le produit délai-bande passante [50].

1.6.5 Maintien en température de l'échantillon

Pour les observations d'échantillons vivants, la lame de microscope doit être maintenue à la température 37 °C. L'ajout d'un incubateur qui assure également l'apport en oxygène est alors idéal. Dans nos travaux, seul le maintien en température a été produit, et les échantillons biologiques sont éventuellement placés dans un milieu CO₂ indépendant pour rallonger leur survie.

Le contrôle de la température s'avère également crucial dans nos travaux d'imagerie de viscosité présentés au chapitre 2.

Pour cela, le porte-échantillon est doté de résistances chauffantes en contact avec la lame microscopique, ainsi que d'une sonde thermométrique. L'ensemble est branché en une boucle d'asservissement PID¹⁰ afin de maintenir la température à une valeur choisie (37 °C pour les échantillons biologiques, ou une valeur quelconque pour fixer la valeur de viscosité du milieu).

9. Pour les valeurs de n_{verre} et n_{milieu} prises en exemple, le faisceau incident doit alors entrer par la face du prisme avec un angle supérieur à $\arcsin \frac{n_{\text{milieu}}}{n_{\text{verre}}} = 61^\circ$.

10. Le signal de sortie est la somme des termes Proportionnel, Intégral et Dérivé du signal d'erreur.

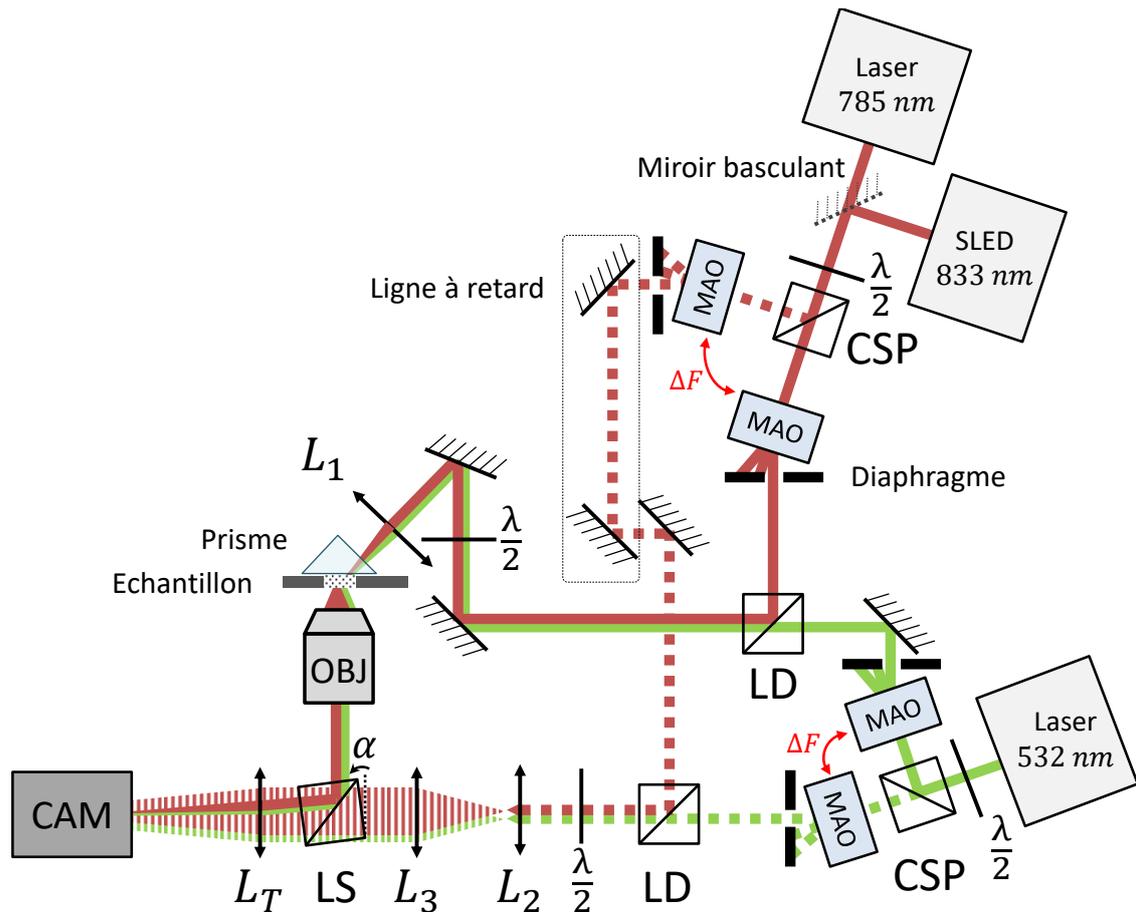
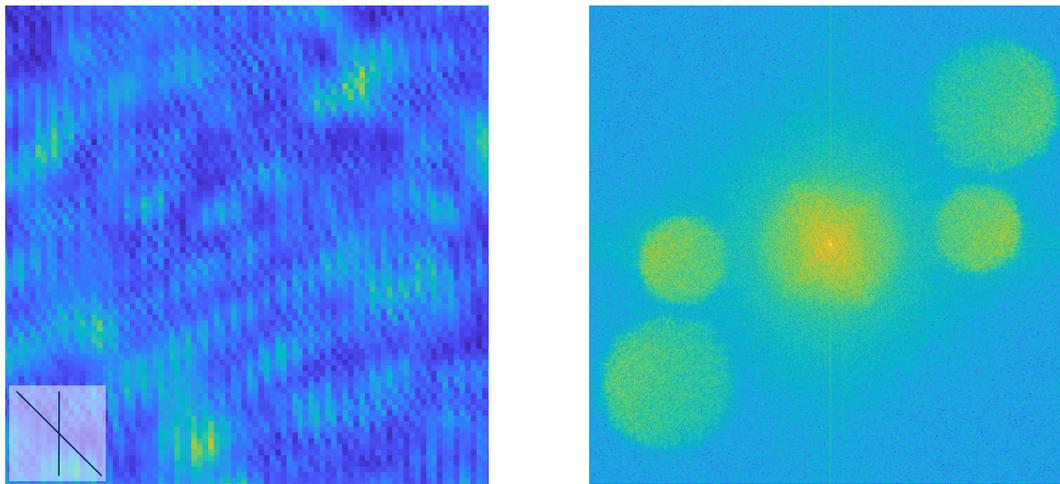


Figure 1.13 – Représentation schématique du montage complet. Deux chemins optiques, rouge et vert, sont combinés par des lames dichroïques (LD). Pour chaque chemin, le faisceau en sortie de la source est divisé en deux par un cube séparateur de polarisation (CSP) précédé d'une lame demi-onde ($\frac{\lambda}{2}$) permettant de répartir l'intensité. Chacun de ces faisceaux passe par un modulateur acousto-optique (MAO, voir section 1.4.1) dont seul l'ordre +1 de diffraction est conservé à l'aide d'un diaphragme. Les deux MAO d'un chemin de même longueur d'onde portent la différence de fréquence hétérodyne ΔF . La voie objet, en traits pleins, est focalisée sur l'échantillon par la lentille L_1 , à travers le prisme pour l'illumination en champ sombre (voir section 1.6.3). La lumière diffusée par l'échantillon est collectée par l'objectif, réfléchi par la lame séparatrice (LS) puis focalisée sur la caméra par la lentille de tube (L_T) avec un angle α pour la configuration hors axe. La voie de référence, en traits pointillés, est étendue et rendue légèrement divergente par les lentilles L_2 et L_3 puis traverse la lame séparatrice et illumine la surface du capteur de la caméra grâce à la lentille de tube. Chaque voie est dotée d'une lame demi-onde. Sur le chemin rouge, deux sources, laser et diode superluminescente (SLED), sont interchangeable grâce au miroir basculant. La voie de référence du chemin rouge est dotée d'une ligne à retard pour l'ajustement de la différence de chemin nécessaire lorsque la SLED est utilisée.



(a) Hologramme dans l'espace réel (agrandissement d'un détail) : deux orientations de franges sont visibles (guide visuel en bas à gauche).

(b) Hologramme dans l'espace des fréquences spatiales. Le ratio des tailles de disques est égal au ratio des longueurs d'ondes $\frac{532 \text{ nm}}{785 \text{ nm}} = 0.7$.

Figure 1.14 – Hologramme multiplexé en longueur d'onde.

1.6.6 Sensibilité au bruit du système

La sensibilité du système correspond à la qualité de la mesure atteignable en dépit des sources de bruit présentes. Outre les optimisations liées à l'alignement du montage optique, des sources de bruit indépendantes de l'expérimentateur entrent en jeu. Cette section en présente les principales et leur niveau d'intervention dans une mesure d'holographie hétérodyne.

Sources de bruits techniques

L'acquisition digitale du signal donne lieu à plusieurs mécanismes qui induisent du bruit dans la mesure. Les principaux sont listés ci-dessous :

- Le bruit de photons, aussi appelé bruit de grenaille. Il vient du caractère fondamentalement aléatoire de l'arrivée des photons sur le capteur : c'est une source de bruit de nature quantique dont la statistique associée suit une loi de Poisson d'écart-type $\sigma = \sqrt{N_{ph}}$ où N_{ph} est le nombre de photons détectés. Il constitue la limite fondamentalement infranchissable en termes de réduction du bruit.
- Le bruit électronique du capteur, aussi appelé bruit sombre, ayant pour origine la fluctuation thermique du nombre d'électrons générés dans le circuit, indépendamment de l'arrivée de photons. On peut le voir comme l'équivalent du bruit de grenaille pour les électrons [51].

Rapport signal à bruit en holographie hétérodyne

Les méthodes de filtrage de l'ordre 0 d'interférence de l'holographie digitale (voir sections 1.3.1 et 1.4.1) associées à l'isolation d'une composante fréquentielle hors du bruit par l'hétérodyne (voir section 1.4.2) permettent d'atteindre la limite ultime du bruit de grenaille. Dans ce régime, le bruit électronique de la caméra peut en effet devenir négligeable devant le nombre de photo-électrons N_{ph} créés. Lorsque le bruit de photons $\sqrt{N_{ph}}$ domine, le rapport signal à bruit est $\frac{N_{ph}}{\sqrt{N_{ph}}} = \sqrt{N_{ph}}$.

Le caractère interférentiel de l'holographie, ajouté au double filtrage (temporel et spatial), permet d'atteindre ce régime même lorsque le nombre de photons diffusés par l'objet est faible [29].

Pour optimiser le rapport signal à bruit, il est alors avantageux de maximiser le nombre de photons reçus par la caméra. Cette condition revient à un choix de répartition de l'intensité du laser privilégiant la voie de référence.

Dans ce cas, en appelant P_O et P_R les puissances des faisceaux objet et de référence, le signal holographique d'ordre +1 S est proportionnel à $\sqrt{P_O P_R}$ puisque le signal consiste en la multiplication des champs $E_O E_R$. Le bruit de photons σ correspond à la somme de leurs contributions $\sqrt{N_{ph}} \propto \sqrt{P_O + P_R} \approx \sqrt{P_R}$.¹¹ Le rapport signal à bruit est alors égal à $\sqrt{P_O}$ et varie donc avec l'intensité du signal uniquement.

Bruit de cohérence (spatial)

L'inconvénient majeur de l'imagerie en lumière cohérente est le phénomène de tavelure ou speckle, un artefact venant des nombreuses interférences entre les rayons diffusés dans le montage ou dans l'échantillon et menant à une granularité de l'image. Des techniques visant à réduire le speckle varient les angles d'illumination afin de moyennner spatialement le speckle [52], discriminent et réduisent le signal venant de diffusions multiples [53], ou appliquent un traitement numérique tel un filtrage spatial ou un lissage gaussien. La taille des grains de speckle peut aussi être contrôlée car elle est proportionnelle à la distance entre l'objet et le détecteur [54].

Réduction de la longueur de cohérence de la source Une autre approche de réduction du speckle réside dans l'illumination car cette granularité est d'autant plus présente que le milieu traversé est diffusant et que la longueur de cohérence L_c de la source est grande. Tandis que pour les diodes lasers monomodes utilisées L_c est de l'ordre de la dizaine de mètres, nous proposons d'utiliser une diode superluminescente (SLED sur la figure 1.13) dont la longueur de cohérence est $L_c \approx 70 \mu\text{m}$. Outre une réduction du speckle, la principale motivation était ici de profiter du sectionnement optique propre aux sources incohérentes : seuls les points sources de l'échantillon tels que la longueur des rayons objet est égale à la longueur de la voie de référence plus ou moins $\frac{L_c}{2}$ vont interférer avec la référence. C'est le principe de la tomographie à cohérence optique (OCT) [5]. La différence de chemin optique entre les voies objet et de référence est alors cruciale, c'est pourquoi une ligne à retard est mise en place dans le montage illustré sur la figure 1.13. Ainsi, seuls les photons présents dans un intervalle de profondeur L_c dans l'échantillon vont contribuer au signal, mais également au speckle. On peut qualifier ce montage d'hybride holographie-OCT plein champ.

L'objectif principal de ce montage est d'effectuer un sectionnement optique pour s'affranchir de la diffusion optique dans les échantillons épais tels que les organoïdes de rétine (voir chapitre 3). La figure 1.15 montre des reconstructions holographiques hétérodynées à $\Delta F = 100 \text{ Hz}$ d'un organoïde de rétine avec la diode laser infrarouge de longueur de cohérence $L_c \approx 10 \text{ m}$ et la diode superluminescente où $L_c \approx 70 \mu\text{m}$, c'est-à-dire avec un sectionnement de type OCT. On constate qu'avec le grossissement $\times 10$, la reconstruction avec la diode superluminescente est restreinte dans le plan : la bande de taille $\sim L_c$ sur laquelle les interférences ont lieu est plus petite que le champ de vue.

En grossissement $\times 50$, le champ de vue est plus petit que cette zone d'interférences. En revanche, l'échantillon utilisé n'est pas assez épais comparé à L_c pour observer une quelconque diminution du speckle par rapport à l'image acquise avec le laser de grande longueur de cohérence. L'utilisation de ce chemin à source faiblement incohérente sera réservé à des observations de champ de vue inférieur à $L_c \approx 70 \mu\text{m}$ sur des objets de grande épaisseur devant L_c .

11. En effet, en posant $\sigma_i \propto \sqrt{P_i}$ où $i \in \{O, R\}$ on a $\sigma = \sqrt{\left(\frac{\partial S}{\partial P_O}\right)^2 \sigma_O^2 + \left(\frac{\partial S}{\partial P_R}\right)^2 \sigma_R^2} \propto \sqrt{P_O + P_R}$.

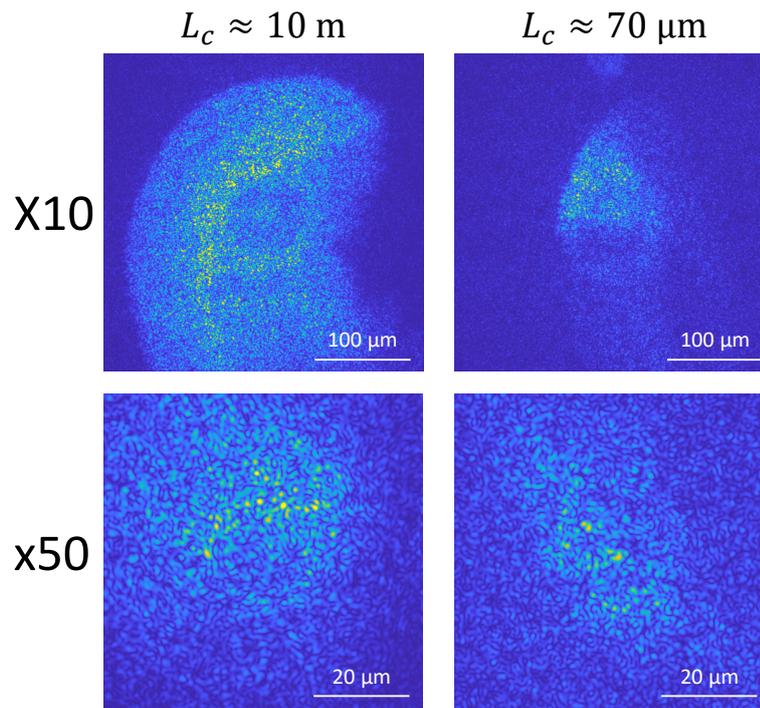


Figure 1.15 – Images holographiques reconstruites d’un organoïde de rétine à $\Delta F = 100$ Hz pour deux grossissements différents, et deux sources de longueur de cohérence L_c différentes.

1.7 Conclusion

Bien qu’inventée avant l’ère numérique, l’holographie a bénéficié d’un développement majeur lors de son avènement. En effet, l’imagerie tridimensionnelle y gagne de nombreux degrés de liberté sur la correction d’artefacts, la propagation, la résolution... De plus, au-delà de la simple projection d’image, la mesure quantitative du champ complexe lumineux peut être obtenue. On accède alors à une véritable analyse de l’objet simultanément en amplitude et en phase.

Pour l’étude de phénomènes dynamiques, la détection hétérodyne est une adjonction puissante. D’une part, la sensibilité de la mesure holographique se trouve augmentée jusqu’à la limite ultime du bruit de grenaille grâce à la sélection précise en fréquence. D’autre part, de nombreuses perspectives d’applications sont offertes. Le chapitre 2 présente le développement d’**une méthode d’imagerie de viscosité par étude spectrale de la rotation de nanosondes**. Une étude de dynamiques à très hautes fréquences dans des échantillons biologiques sera aussi discutée plus loin.

Le travail dans le domaine fréquentiel impose la convolution du signal par une fonction de transfert instrumentale non triviale. La déconvolution numérique d’un signal bruité n’apportant en général qu’un résultat de basse qualité, **l’étude précise de cette fonction de transfert** a été préférée afin d’identifier et de contrôler son intervention dans le signal mesuré.

Le montage holographique est réalisé dans une configuration de microscopie. **L’illumination en champ sombre l’adapte à l’imagerie d’objets faiblement diffusants comme des nanoparticules.** La thermalisation du porte-échantillon optimise d’une part les expérimentations sur le vivant, et d’autre part les mesures bénéficiant de la connaissance précise de la température du milieu imagé comme l’imagerie de viscosité, sujet du prochain chapitre.

Chapitre 2

Holographie hétérodyne : application à l'imagerie de viscosité

Sommaire

2.1	Microrhéologie : état de l'art	30
2.2	Imagerie de viscosité via la rotation brownienne de nanobâtonnets d'or	32
2.2.1	Relation entre la mesure de rotation brownienne et la viscosité	32
2.2.2	Diffusion plasmonique par des nanobâtonnets d'or	34
	Origine de l'appellation <i>plasmon</i>	34
	Pulsation plasma d'un métal	34
	Résonance plasmon de surface	35
	Plasmon localisé	35
	Effet de forme : diffusion par un nanobâtonnet d'or	36
	Champ diffusé par un nanobâtonnet	37
	Calcul analytique du signal collecté lors de la rotation	39
	Intégration numérique sur le cône de collection de l'objectif	39
2.2.3	Imagerie de viscosité qualitative	40
2.2.4	Mesure expérimentale du signal	40
	Simulation numérique	41
	Hiérarchie des paramètres temporels	42
2.2.5	Imagerie de viscosité quantitative	44
	Etalonnage	44
	Imagerie <i>quantitative</i> de viscosité	45
2.2.6	Conclusion	47
2.3	Imagerie de viscosité via la rotation induite de bâtonnets magnétiques	48
2.3.1	Rotation magnétiquement induite	48
	Différents ordres magnétiques	48
	Paramagnétisme	48
	Ferromagnétisme	49
	Superparamagnétisme	50
	Rotation forcée de bâtonnets superparamagnétiques	50
	Sous champ magnétique tournant	51
	Sous champ magnétique oscillant	52
2.3.2	Synthèse des bâtonnets micrométriques d'oxyde de fer	53
2.3.3	Diffusion optique par des bâtonnets d'oxyde de fer	53
2.3.4	Montage expérimental	55
2.3.5	Mesure de la rotation magnétiquement induite	57
	Détection de la rotation	57
	Spectre du clignotement induit	58

2.3.6	Mesure de la fréquence de transition	58
	Modélisation	58
	Critère temporel	59
2.3.7	Basses fréquences : holographie homodyne	59
2.3.8	Hautes fréquences : holographie hétérodyne	62
	Image de viscosité quantitative	62
	Suivi tridimensionnel de bâtonnet unique	64
2.3.9	Conclusion	66
2.4	Conclusion et perspectives de l'imagerie de viscosité par holo-	
	graphie hétérodyne de nanobâtonnets en rotation	67

Dans la section 1.4.2 du chapitre 1, nous avons vu comment obtenir une mesure résolue en fréquence f à partir d'hologrammes hétérodynes. Le contraste de cette image correspond aux variations en densité de diffuseurs oscillant à la fréquence f dans l'échantillon imagé. L'acquisition de plusieurs fréquences, ou l'étude du spectre, révèle de façon quantitative les gammes temporelles des différentes dynamiques à l'œuvre.

Ce chapitre est dédié à une application de l'holographie hétérodyne qui mesure de cette façon les fréquences de rotation de nanoparticules en exploration dans un milieu. Que cette rotation soit passive ou forcée, la dynamique de chaque nanoparticule traduit les propriétés mécaniques locales du milieu : plus l'objet évolue lentement, plus la viscosité environnante est élevée. En attribuant chacune de ces sondes à un pixel virtuel, on reconstruit une image de viscosité quantitative de l'échantillon.

2.1 Microrhéologie : état de l'art

La plupart des processus chimiques, biochimiques et biologiques se déroulent dans des milieux liquides où les objets, molécules et organites sont déplacés par des mouvements stochastiques. Ces mouvements sont entraînés mais aussi simultanément entravés par la viscosité. En effet, la viscosité est l'émergence collective des collisions élastiques moléculaires par lesquelles le système fluide se thermalise. Selon l'échelle à laquelle les interactions moléculaires sont considérées, cette propriété peut donc être définie différemment aux échelles micro et macroscopique. La mesure macroscopique de la viscosité est réalisée par rhéométrie, technique qui consiste en la mesure de la résistance globale du fluide sur des plaques en rotation [55]. A plus petite échelle, la viscosité et autres propriétés mécaniques ne peuvent pas être sondées avec des instruments macroscopiques, et leur mesure définit un vaste domaine de recherche appelé microrhéologie [56]. Ce domaine est particulièrement essentiel en biologie où de nombreux processus subcellulaires sont clairement influencés, voire dirigés par des variations locales de viscosité, comme par exemple la brisure de symétrie observée pendant plusieurs phases de la méiose dans les ovocytes [13, 15]. La viscosité a également été établie comme un critère déterminant pour l'identification des cellules cancéreuses [57]. Un outil d'imagerie quantitative de la viscosité serait crucial pour élucider les causes sous-jacentes à ces mécanismes biologiques, mais aussi au microfluidique ou à l'étude de milieux complexes.

La mesure de certaines propriétés mécaniques à la surface d'un échantillon peut être obtenue par la microscopie à force atomique [58], par la mesure d'ondes acoustiques se propageant dans la cellule [59], ou par la sonde de force biomembranaire [60] et l'aspiration par micropipette [61] qui permettent de déduire une valeur globale à l'intérieur de la cellule par l'intermédiaire de la tension de la membrane [62].

En revanche, l'accès à la viscosité à l'intérieur de l'environnement fermé d'une cellule est plus difficile et nécessite des transducteurs intracellulaires qui peuvent se déplacer soit *activement*

(excitation externe), soit *passivement* (mouvement brownien activé thermiquement) tandis que leur mouvement est sondé sans contact, généralement par des méthodes optiques.

Les méthodes *passives* présentent l'avantage d'être simples puisqu'une exploration brownienne de la sonde ne requiert aucun contrôle externe. Des approches fondées sur la spectroscopie de corrélation de fluorescence [63] permettent de mesurer la valeur de la viscosité le long de la trajectoire de translation brownienne de sondes fluorescentes. Pour obtenir des mesures statistiquement significatives, la particule doit avoir parcouru une distance suffisamment longue, ce qui limite la localité et la résolution spatiale des mesures de viscosité. En revanche, le mouvement brownien ne se limite pas à la translation, et une rotation significative peut se produire sur de courtes échelles de temps [64]. Par conséquent, détecter la rotation plutôt que la translation offre potentiellement une meilleure résolution spatiale pour l'imagerie de viscosité. Ainsi, la microscopie à durée de vie de fluorescence (FLIM) sur des rotors moléculaires génétiquement modifiés a récemment montré sa capacité à sonder la viscosité [65, 66]. Cependant, les problèmes de photoblanchiment liés à l'utilisation de la fluorescence interdisent toute expérience dépassant quelques minutes, ce qui est évidemment problématique pour étudier des phénomènes de durée supérieure.

Dans la mesure où elles reposent sur un phénomène aléatoire (brownien), ces méthodes passives peuvent exiger des acquisitions longues afin d'obtenir une statistique suffisante. Dans ces cas, une excitation *active* des sondes peut être préférable.

Parmi les méthodes *actives* sans contact, les pinces optiques peuvent être utilisées pour mesurer la viscosité des fluides en calibrant la force nécessaire au piégeage d'une nanosonde [64, 67-69]. Bien que locales et rapides, une cartographie de viscosité nécessite un nombre considérable de ces pinces optiques, égal au nombre de pixels souhaité.

Dans ce travail, nous proposons deux types de méthodes, active et passive, de l'imagerie de viscosité.

Mesures passives : Alternativement aux sondes fluorescentes, les nanoparticules plasmoniques sondées optiquement permettent de réaliser des expériences suffisamment longues pour mesurer des activités métaboliques sur de grandes échelles de temps. Les nanoparticules d'or, par exemple, sont biocompatibles. En choisissant une géométrie asphérique comme les nanobâtonnets, la rotation de l'objet se traduit par une variation de la section efficace de diffusion effective, donc par une variation d'intensité mesurée (clignotement). De telles mesures de viscosité locale utilisant des nanobâtonnets d'or ont été réalisées dans le cadre de la diffusion dynamique de la lumière (DLS) [70, 71]. La section 2.2 présente une approche qui consiste en la mesure du clignotement produit par des nanobâtonnets d'or sous illumination laser lors de leur rotation brownienne, et ainsi en l'imagerie quantitative de la viscosité d'un milieu contenant ces nanobâtonnets.

Mesures actives : Une mesure de viscosité active sans pinces optiques est obtenue en utilisant des aiguilles magnétiques micro ou nanoscopiques et en mesurant leur fréquence angulaire de rotation imposée par un champ magnétique tournant [72]. Le plan de rotation y étant ainsi contrôlé et optimisé, cette méthode est une alternative plus performante à notre système d'imagerie de viscosité utilisant des sondes browniennes et est présentée dans la section 2.3.

2.2 Imagerie de viscosité via la rotation brownienne de nanobâtonnets d'or

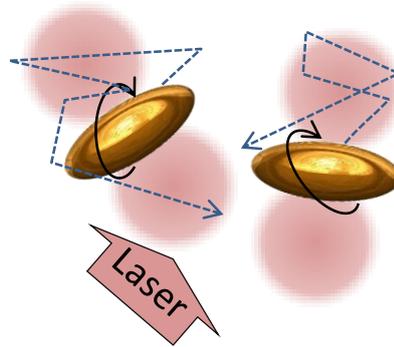


Figure 2.1 – Illustration de bâtonnets d'or en mouvement brownien de translation et de rotation sous illumination laser.

Nous présentons ici une approche d'imagerie de viscosité reposant sur la mesure du clignotement de la diffusion optique de nanobâtonnets d'or sous illumination laser soumis à un mouvement de rotation brownien [73]. Comme expliqué au chapitre 1, une détection hétérodyne couplée à l'holographie permet d'imager sélectivement la composante de clignotement local à une fréquence arbitraire comprise dans une large gamme (0 - dizaines de MHz). A une fréquence hétérodyne donnée, les images du signal de clignotement présentent un contraste lié à la viscosité locale et à la diffusion optique. En balayant les fréquences, nous obtenons des images spectrales (où *spectrales* se réfère aux fréquences de rotation et non à la longueur d'onde) de la densité de nanobâtonnets en rotation. Nous montrons que le spectre en fréquence du clignotement peut être calibré pour divers milieux afin d'obtenir des mesures quantitatives de viscosité, indépendamment de la densité locale des diffuseurs ou de l'intensité d'illumination. Grâce à cet étalonnage, nous produisons des images quantitatives de viscosité locale en plein champ. Comme les particules peuvent rester confinées dans des volumes plus petits que ceux balayés dans le mouvement brownien translationnel, la méthode a le potentiel de fournir des images de viscosité intracellulaire 3D à haute résolution et de ce fait des informations inédites sur les processus intracellulaires.

Cette section explicite d'abord la relation menant de la mesure de la rotation brownienne à la viscosité, puis le mécanisme de diffusion de la lumière par des nanoparticules d'or et l'origine du clignotement observé. Enfin, la méthode d'imagerie de viscosité par mesure hétérodyne des clignotements issus de la rotation brownienne est présentée, pour l'obtention d'un contraste de viscosité d'abord qualitatif puis quantitatif.

2.2.1 Relation entre la mesure de rotation brownienne et la viscosité

La dynamique d'une particule brownienne soumise aux forces provenant des frottements et des chocs avec le fluide dans lequel elle évolue est décrite par une équation de Langevin. Sa résolution mène à la description de la translation brownienne comme un processus stochastique gaussien via son déplacement quadratique moyen sur le temps d'observation Δt :

$$\langle \Delta r^2 \rangle = 2dD_t \Delta t \quad (2.1)$$

où d est la dimension de l'espace d'immersion et D_t est le coefficient de diffusion translationnel. Ce processus opère également sur la rotation, et le déplacement angulaire quadratique moyen pendant l'intervalle Δt s'exprime de façon analogue par :

$$\langle \Delta \theta^2 \rangle = 2dD_r \Delta t \quad (2.2)$$

où D_r est le coefficient de diffusion rotationnelle par rapport à un axe arbitraire.

Le coefficient de diffusion est inversement proportionnel à la viscosité dynamique η du milieu dans lequel l'objet évolue en mouvement brownien. D'après la loi de Stokes-Einstein, les coefficients de diffusion translationnelle et rotationnelle d'une sphère de rayon r s'expriment respectivement par [74] :

$$D_t(\eta) = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (2.3)$$

$$D_r(\eta) = \frac{k_B T}{8\pi\eta r^3} \quad (2.4)$$

où k_B est la constante de Boltzmann et T est la température.

Il découle des expressions (2.1) à (2.4) que le temps caractéristique de rotation peut être bien inférieur à celui de translation : par exemple, pour une sphère de rayon 100 nm, le temps de rotation d'un angle moyen $\frac{\pi}{2}$ ($\Delta t_{rot} \approx 0.3$ ms) est bien inférieur au temps de translation d'une extension typique de fonction d'étalement du point 500 nm ($\Delta t_{trans} \approx 10$ ms). L'exploitation de la rotation plutôt que la translation brownienne peut donc s'effectuer sur des échelles de temps Δt plus courtes. La résolution ultime de la méthode est donnée par la distance dont s'est déplacée la particule pendant le temps Δt nécessaire à l'acquisition, dont Δt_{trans} et Δt_{rot} sont des estimations minimales. Si pour une mesure translationnelle cette résolution est caractérisée par une distance Δr , elle est alors typiquement réduite d'un facteur 10 pour une mesure rotationnelle. Ainsi, la mesure de la viscosité η via une sonde brownienne en rotation gagne sensiblement en résolution spatiale par rapport à une mesure via sa translation.

En ce qui concerne la détection optique, la rotation d'une sphère ne mène évidemment à aucune modulation de la lumière qu'elle diffuse. Or, notre approche cherche à traduire la rotation de l'objet par un signal optique. Il faut pour cela utiliser un objet anisotrope, afin que les variations de l'amplitude de la lumière qu'il diffuse traduisent celles de son orientation. On choisit pour cela d'employer des nanobâtonnets.

Géométriquement, les nanobâtonnets peuvent être modélisés par des cylindres de longueur L et de diamètre D . La rotation autour du grand axe du cylindre peut être ignorée car elle ne contribue à aucune modulation optique, mais la rotation autour de tout axe perpendiculaire à l'axe principal, caractérisée par le coefficient de diffusion rotationnelle D_{r_\perp} , peut moduler temporellement la diffusion optique. Ce coefficient dépend de η par l'intermédiaire de la loi de Stokes-Einstein adaptée aux cylindres [75] :

$$D_{r_\perp}(\eta) = \frac{3k_B T}{\pi\eta L^3} \ln\left(\frac{L}{D} - \delta_\perp\right) \quad (2.5)$$

où δ_\perp est un facteur constant dépendant du rapport d'aspect $\frac{L}{D}$.

Par conséquent, d'après l'équation (2.2), la viscosité η est directement liée au déplacement angulaire quadratique moyen $\langle\Delta\theta^2\rangle$ des nanobâtonnets, qui peut être mesuré optiquement via les variations temporelles de la diffusion de la lumière. Puisque notre dispositif d'holographie hétérodyne détecte des variations périodiques de diffusion optique, on mesure un signal g proportionnel au déplacement angulaire $\approx \sqrt{\langle\Delta\theta^2\rangle}$. Ce signal est donc proportionnel à la racine carrée du temps d'observation sur la viscosité d'après les équations (2.2) et (2.5) :

$$g(\eta, \Delta t) \propto \sqrt{2dD_{r_\perp}(\eta)\Delta t} \propto \sqrt{\frac{\Delta t}{\eta}} \quad (2.6)$$

La section efficace de diffusion optique est une grandeur critique lorsque l'on travaille avec des objets aussi petits que des nanoparticules. Il existe deux leviers permettant d'agir sur

la valeur de la section efficace : la taille des particules et la nature du matériau. Pour notre application, la taille nanométrique est contrainte par la quête de haute résolution spatiale. Il reste donc l'optimisation de l'interaction lumière-matière, passant par le choix du matériau constituant les nanobâtonnets vis-à-vis de ses propriétés de polarisabilité.

2.2.2 Diffusion plasmonique par des nanobâtonnets d'or

Les nanoparticules métalliques présentent une particularité optique qui émerge de la combinaison des propriétés électroniques du métal et de leur taille sub-longueur d'onde : la résonance plasmonique qui augmente fortement la section efficace de diffusion, dans une plage de longueurs d'onde précise. Malgré leur taille nanométrique, grâce à ce phénomène les particules utilisées sont facilement détectables sous illumination laser à faible puissance (ici, ~ 10 mW répartis sur le champ de vue de 10^{-3} à 0.5 mm² soit typiquement 100 W cm⁻²).

Origine de l'appellation *plasmon*

Un plasma est un état particulier de la matière, très fortement ionisé où noyaux positifs et électrons libres forment des fluides chargés en interaction. Le modèle classique de Drude-Sommerfeld approxime les déplacements des électrons individuels par un mouvement collectif où l'interaction avec les ions positifs fixes est traitée comme une force de freinage visqueux. Ce nuage d'électrons est très sensible aux perturbations externes, comme une excitation lumineuse dont le champ électrique oscillant provoque l'oscillation du nuage électronique. Les modes de ces oscillations collectives sont appelés plasmons.

Le modèle de Drude-Sommerfeld fournit une description particulière de cette réaction, et la réduit à une force de friction comprenant les interactions entre électrons¹, entre électrons et noyaux, et entre électrons et phonons, dissipant le travail produit par la force excitatrice. Le ratio d'amplitude de ces forces définit une pulsation caractéristique $\omega_p = \sqrt{\frac{ne^2}{\epsilon_0 m}}$ (où n est la densité d'électrons libres, e et m sont la charge et la masse de l'électron, et ϵ_0 est la permittivité diélectrique du vide), appelée pulsation plasma. Cette valeur détermine les régimes selon lesquels le plasma répond aux excitations électromagnétiques.

Le champ d'application du modèle de Drude-Sommerfeld inclut le cas des métaux : en première approximation, les électrons de conduction délocalisés y jouent le même rôle que le nuage électronique libre. Les plasmons existent donc aussi dans les métaux et l'étude de leur couplage aux ondes électromagnétiques constitue un domaine de recherche à part entière.

Pulsation plasma d'un métal

La diffusion du spectre lumineux par la surface métallique peut être décrite par la permittivité relative ϵ du matériau, qui caractérise sa capacité à se polariser en réaction à un champ électrique externe par rapport au vide (par définition, $\epsilon = \frac{\epsilon_{\text{matériau}}}{\epsilon_0}$) : [76, 77]

$$\epsilon(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega(\omega + i\tau^{-1})} \quad (2.7)$$

On peut remarquer que $\epsilon(\omega)$ est une grandeur complexe, qui tend vers une valeur réelle lorsque $\omega \gg \tau^{-1}$. Dans l'équation (2.7), τ^{-1} est le facteur d'amortissement qui provient des interactions entre électrons, entre électrons et noyaux et entre électrons et phonons. Ce facteur est égal à la fréquence de ces collisions et peut être négligeable par rapport à ω .

1. Seules les transitions intrabandes sont considérées dans le modèle de Drude-Sommerfeld, c'est-à-dire les transitions à l'intérieur d'une même bande d'énergie. Ses prédictions sont faussées par les transitions interbandes car les électrons libres qui passent dans des bandes d'énergie supérieures créent un fond positif qui écrante le nuage initial.

Dans ce cas, et si $\omega < \omega_p$, alors $\epsilon < 0$ et toutes les constantes optiques comme l'indice de réfraction $n = \sqrt{\epsilon}$ sont complexes. Cela traduit l'interdiction de la propagation à l'intérieur du métal : la partie imaginaire de n apporte une dissipation, contrairement à sa partie réelle qui correspond aux effets dispersifs.

Pour l'or, la valeur $\omega_p = 1.4 \cdot 10^{16}$ Hz indique que toutes les ondes de longueur supérieure à $\frac{2\pi c}{\omega_p} = 135$ nm, y compris l'ensemble du spectre visible, ne pénètrent pas le métal et ne peuvent qu'exciter des oscillations des charges de surface.

Résonance plasmon de surface

Ces oscillations de charges de surface sont quantifiées en modes électroniques collectifs appelés plasmons de surface. Leur couplage à la lumière donne lieu à des états mixtes électron-photon, appelés polaritons plasmoniques de surface (PPS) [78]. Si l'onde lumineuse a la même fréquence et le même vecteur d'onde que l'un des plasmons, alors le PPS entre en résonance et on parle de Résonance Plasmon Surfactive (RPS). L'ampleur de ce couplage lumière-matériau est proportionnelle à l'amplitude de l'onde lumineuse réémise. [79, 80]

Plasmon localisé

Lorsque les dimensions de l'objet métallique en question sont largement inférieures à la longueur d'onde de la lumière, sa polarisation induite par le champ électrique est homogène sur l'ensemble de la particule. L'objet se comporte alors optiquement comme un dipôle et on parle de nanoparticule plasmonique. La relation de Heisenberg $\Delta x \Delta k = \text{constante}$ entraîne que la localité du plasmon de surface ($\Delta x \ll \lambda$) relâche la contrainte sur la condition d'accord de phase avec l'onde lumineuse. En effet, contrairement à ceux d'une surface métallique macroscopique, les plasmons de surface localisés ne sont pas des ondes progressives longitudinales, de sorte qu'aucune astuce n'est nécessaire pour y coupler une onde lumineuse transverse [76, 77, 81].

De plus, comme la phase de l'onde est pratiquement constante à l'échelle de la nanoparticule, on se trouve dans le régime quasi-statique : tous les points de la particule répondent simultanément au même champ sans effet de retard. La seule dépendance temporelle provient de celle des champs électrique et magnétique \vec{E} et \vec{B} , qui est cependant lente devant les temps de réponse de polarisation. La polarisabilité de la nanoparticule métallique est alors celle d'un dipôle unique et est simplement dictée par \vec{E} . Dans ce cadre dipolaire électrostatique, la réponse du matériau est résumée par la polarisabilité microscopique α telle que $\vec{P} = \alpha \vec{E}$, où \vec{P} est le vecteur polarisation de la particule dipolaire. Pour une sphère dans un milieu de permittivité relative $\epsilon_m = \left(\frac{kc}{\omega}\right)^2$, l'expression de α est donnée par l'équation (2.8). [82]

$$\alpha = \epsilon_m \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon + 2\epsilon_m} \quad (2.8)$$

D'après l'équation (2.7) et la discussion qui la suit, la condition de minimisation du dénominateur de α fait apparaître la condition de résonance $\Re(\epsilon_m) = -2\epsilon$. S'il existe une fréquence pour laquelle les matériaux (le métal et le milieu qui l'entoure) vérifient, même de manière approchée, cette relation, la polarisabilité α de la particule peut atteindre des valeurs très élevées. Elle correspond au mode de Résonance Plasmonique de Surface (RPS) d'une nanoparticule sphérique.

Effet de forme : diffusion par un nanobâtonnet d'or

Plus généralement, une nanoparticule métallique présente un nombre de modes RPS égal à son degré d'anisotropie. Pour un ellipsoïde dont les trois dimensions d'axes sont notées R_i , $i \in \{1, 2, 3\}$, la polarisabilité selon l'axe i s'écrit : [82]

$$\alpha_i = \epsilon_m \frac{\epsilon - \epsilon_m}{\epsilon_m + N_i(\epsilon - \epsilon_m)} \quad (2.9)$$

Dans l'expression (2.9), N_i est le facteur géométrique, dit de dépolarisation, défini par :

$$N_i = \frac{R_1 R_2 R_3}{2} \int_0^\infty \frac{ds}{(s + R_i^2) \sqrt{(s + R_1^2)(s + R_2^2)(s + R_3^2)}} \quad (2.10)$$

Dans le cas d'un nanobâtonnet, on a $R_1 = L > R_2 = R_3 = D$ donc deux coefficients distincts seulement, et les expressions de $N_1 = N_{\parallel}$ et $N_{2,3} = N_{\perp}$ sont les suivantes, en posant $e = \sqrt{1 - \left(\frac{D}{L}\right)^2}$: [83]

$$N_{\parallel} = \frac{1 - e^2}{2e^3} \left(\ln \frac{1+e}{1-e} - 2e \right) \quad (2.11)$$

$$N_{\perp} = \frac{1 - N_{\parallel}}{2} \quad (2.12)$$

Les singularités de α_i définies par $\epsilon_{\parallel, \perp} = \left(1 - \frac{1}{N_{\parallel, \perp}}\right) \epsilon_m$ dans l'équation (2.9) aboutissent ainsi à deux modes RPS, correspondant à l'alignement du champ électrique sur ces deux axes. Puisque $L > D$, il découle des équations (2.11) et (2.12) que $N_{\parallel} < N_{\perp}$ et par conséquent $\epsilon_{\parallel} > \epsilon_{\perp}$. La résonance associée au grand axe, appelée résonance plasmonique de surface longitudinale, est donc de longueur d'onde supérieure à celle associée au petit axe, appelée résonance plasmonique de surface transverse.

Si la théorie de Mie généralisée permet de calculer avec exactitude la section efficace de diffusion de ces particules, il est en pratique plus simple d'utiliser des méthodes numériques comme l'approximation discrète dipolaire (DDA). Deux résonances sont visibles sur le spectre de diffusion simulé par DDA [84] sur la figure 2.2. Les nanobâtonnets d'or utilisés, de dimensions 150×50 nm, ont une RPS transverse (mesurée par le fournisseur) à $\lambda_{\perp} = 524$ nm et une RPS longitudinale à $\lambda_{\parallel} = 807$ nm. On observe sur la figure 2.2 un décalage de 80 nm pour la RPS longitudinale et de 30 nm pour la RPS transverse que l'on peut attribuer à des imprécisions de simulation.

Afin de maximiser le contraste de clignotement, il faut maximiser le contraste $\frac{\sigma_{\parallel}(\lambda)}{\sigma_{\perp}(\lambda)}$. On choisit donc la longueur d'onde d'excitation (i.e. du laser du montage holographique) au plus proche de la longueur d'onde de la résonance du grand axe : $\lambda = 785$ nm. En effet, à cette résonance la section efficace de diffusion associée est maximale ($\sigma_{\parallel} = 4 \cdot 10^{-9}$ cm² d'après la figure 2.2). D'autre part, la variation de cette section efficace lors de la rotation est maximale ($\frac{\sigma_{\parallel}}{\sigma_{\perp}} = 10^3$), et c'est à ce contraste de diffusion périodique (i.e. clignotement) que le système d'holographie hétérodyne est sensible.

Pour valider l'aptitude des bâtonnets à sonder la viscosité, il est important que ces propriétés dépendent peu de la composition du liquide, qui peut influencer sur ϵ_m et donc sur la résonance. On vise idéalement une diffusion indépendante de la composition afin que seule la vitesse de rotation du bâtonnet porte la grandeur à mesurer. Pour cela, le spectre de diffusion en configuration parallèle est calculé par DDA [84] pour les deux indices de réfraction n correspondant aux compositions extrêmes utilisées dans cette étude : celui de l'eau ($n_{eau} = 1.33$) et celui d'un mélange aqueux à 30% de glycérol ($n_{30\%glycérol} = 0.3n_{glycérol} + 0.7n_{eau} =$

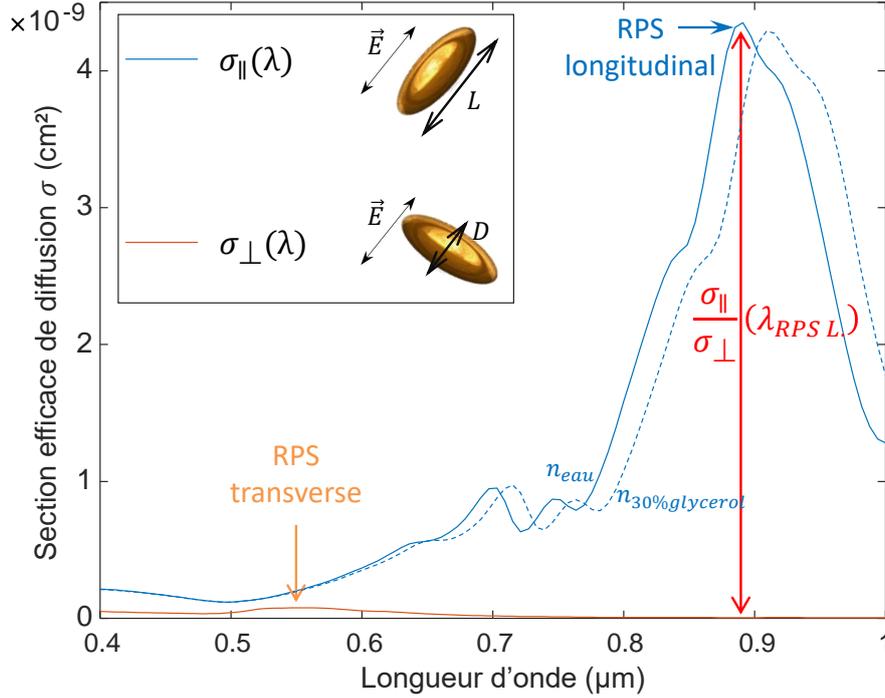


Figure 2.2 – Spectre de diffusion d'un nanobâtonnet d'or de longueur 150 nm et de diamètre 50 nm, calculé par approximation discrète dipolaire (DDA) [84], selon l'orientation de son grand axe par rapport à la polarisation de l'onde lumineuse. Le contraste de diffusion maximal à la résonance longitudinale est indiqué par la flèche rouge. La variation en indice de réfraction est représentée pour la courbe bleue : le trait plein correspond à l'eau ($n_{eau} = 1.33$) et le trait pointillé à une solution aqueuse à 30% de glycérol ($n_{30\%glycérol} = 1.37$).

1.37). Le décalage produit par la variation d'indice de réfraction est visible sur la figure 2.2 (courbes bleues en traits plein et pointillés). A la résonance, les valeurs des sections efficaces de diffusion $\sigma_{n_{eau}} = 4.4 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$ et $\sigma_{n_{30\%glycérol}} = 3.7 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2$ sont très proches. Le ratio entre cette diminution $\left(\frac{\sigma_{n_{eau}}}{\sigma_{n_{30\%glycérol}}} \approx 1\right)$ et le contraste dû au clignotement $\left(\frac{\sigma_{\parallel}}{\sigma_{\perp}} = 10^3\right)$ est donc de l'ordre de 10^{-3} . On peut donc négliger la contribution de la composition, et de l'indice, au contraste de clignotement.

Champ diffusé par un nanobâtonnet

En illuminant les nanobâtonnets à la résonance du grand axe, la section efficace de diffusion varie donc sur une large gamme selon l'orientation du grand axe par rapport à la polarisation de l'onde lumineuse \vec{E}_O . Dans ce paragraphe, l'origine du champ diffusé \vec{E}_{diff} est détaillée en prenant en compte l'anisotropie des bâtonnets, en vue de calculer l'amplitude de champ collectée lors de la rotation.

Les polarisabilités définies dans l'équation (2.9) forment les éléments du tenseur de polarisabilité $\bar{\bar{\alpha}}$. Dans la base des axes propres du bâtonnet, en fixant $\alpha_1 = \alpha_{\parallel}$ et $\alpha_{2,3} = \alpha_{\perp}$,

$$\bar{\bar{\alpha}} = \begin{pmatrix} \alpha_{\parallel} & 0 & 0 \\ 0 & \alpha_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \alpha_{\perp} \end{pmatrix} \quad (2.13)$$

$\bar{\bar{\alpha}}$ dicte l'orientation et le module du vecteur polarisation \vec{P} du bâtonnet en réaction au champ électrique de l'onde lumineuse excitatrice \vec{E}_O . Pour une nanoparticule composée d'un

nombre N de molécules polarisables, on a : [77, 82]

$$\vec{P} = N\bar{\alpha}\vec{E}_O \quad (2.14)$$

Ce vecteur \vec{P} est la grandeur qui détermine la distribution angulaire de la diffusion lumineuse par le bâtonnet. En effet, en modélisant la diffusion par un rayonnement dipolaire en champ lointain, le champ électrique diffusé a pour expression : [77]

$$\vec{E}_{\text{diff}}(P) = -\frac{P \sin \theta'}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikr}}{r} \vec{u}_{\theta'} \quad (2.15)$$

où r et θ' définissent la distance et l'angle du point d'observation et $\vec{u}_{\theta'}$ est le vecteur unitaire orthoradial portant le champ diffusé dans un repère local d'axe principal \vec{P} (voir figure B.1a en annexe B). Le diagramme de diffusion d'un nanobâtonnet formé par les lignes de champ de \vec{E}_{diff} pour un angle arbitraire $\frac{\pi}{4}$ entre \vec{E}_O et le grand axe du bâtonnet \vec{u}_{\parallel} est représenté sur la figure 2.3a. En notant θ cet angle $\left(\vec{E}_O, \vec{u}_{\parallel}\right)$, l'équation (2.14) se développe en :

$$\vec{P} = E_O(\alpha_{\parallel} \cos \theta \vec{u}_{\parallel} + \alpha_{\perp} \sin \theta \vec{u}_{\perp}) \quad (2.16)$$

L'équation (2.16) implique que lorsque $\theta = 0$, $\vec{P} = \alpha_{\parallel} E_O \vec{u}_{\parallel}$, et lorsque $\theta = \frac{\pi}{2}$, $\vec{P} = \alpha_{\perp} E_O \vec{u}_{\perp}$. Or, d'après les équations (2.9) et (2.10), $\alpha_{\perp} < \alpha_{\parallel}$, donc dans les situations $\theta = 0$ et $\theta = \frac{\pi}{2}$, le module du vecteur polarisation P atteint respectivement ses valeurs maximale et minimale (voir les encarts de la figure 2.3b). Pour un nanobâtonnet très anisotrope, dont le rapport longueur-diamètre $\frac{L}{D}$ est très élevé, le rapport $\frac{\alpha_{\parallel}}{\alpha_{\perp}}$ est également élevé et on peut négliger la composante suivant \vec{u}_{\perp} . Dans ce cas, \vec{P} est en pratique toujours aligné sur \vec{u}_{\parallel} , et son amplitude devient nulle lorsque $\vec{u}_{\parallel} \perp \vec{E}_O$. On peut se placer dans ce cas limite pour calculer le champ de diffusion collecté.

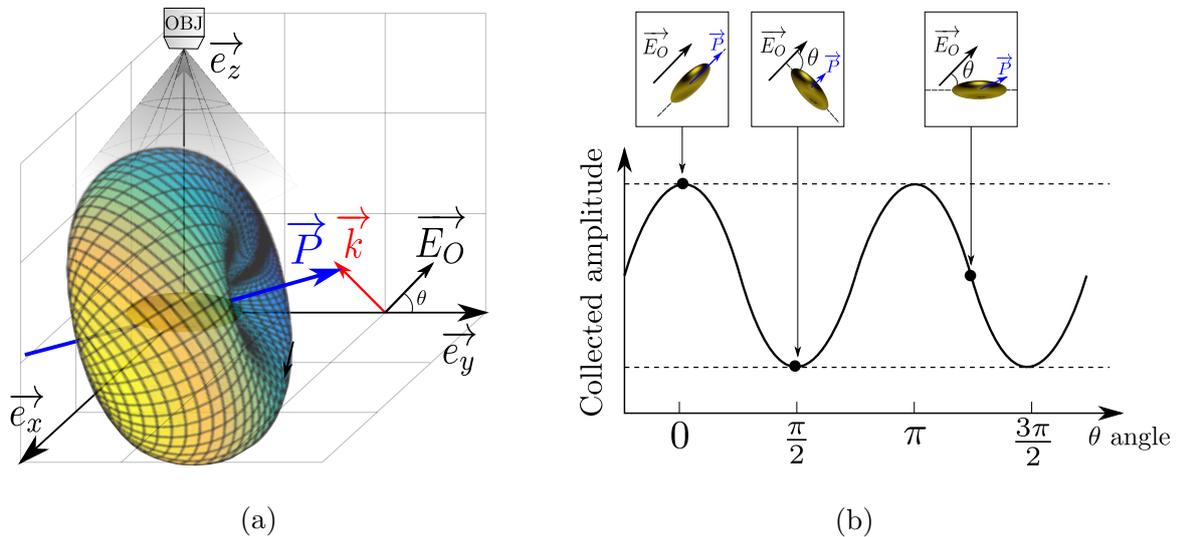


Figure 2.3 – (a) Diagramme de diffusion plasmonique d'un nanobâtonnet illuminé par une onde lumineuse de vecteur d'onde \vec{k} et de champ électrique \vec{E}_O . Le vecteur \vec{P} correspond à la polarisation du bâtonnet en réponse à \vec{E}_O , dont les lignes de champ forment le tore de diffusion. (b) Champ diffusé intégré sur le cône de collection de l'objectif de microscope en fonction de l'angle entre le grand axe et le champ d'excitation dans l'approximation $\frac{L}{D} \ll 1$ (résultat numérique). Les encarts représentent les situations correspondantes.

Calcul analytique du signal collecté lors de la rotation

Afin de comprendre et prévoir le clignotement et son amplitude, nous avons développé un modèle tenant compte de la géométrie de la particule, de la direction et polarisation de l'illumination, et de la collection de la lumière diffusée par un objectif de microscope. L'annexe B développe le calcul de l'amplitude du champ diffusé collectée pendant la rotation d'un nanobâtonnet. Le champ diffusé est alors calculé en fonction des angles (β, ϕ) formés par le vecteur polarisation \vec{P} dans le repère du laboratoire (voir figure B.1a). L'amplitude du champ collecté par le système holographique E_{coll} est l'interférence entre le champ du faisceau objet (\vec{E}_O) après diffusion (\vec{E}_{diff}), et le champ de référence \vec{E}_R en configuration hors axe d'angle α (voir chapitre 1). On pose alors :

$$E_{\text{coll}}(P, \gamma, \phi'') E_R = \vec{E}_{\text{diff}}(P, \gamma, \phi'') \cdot \vec{E}_R \quad (2.17)$$

où $\gamma(\beta, \phi)$ et $\phi''(\beta, \phi)$ sont les angles qui repèrent le point d'observation du champ diffusé dans le repère tournant lié à \vec{P} (voir figure B.1b). L'équation (2.18) est le résultat du calcul développé en annexe B et fait intervenir deux fonctions trigonométriques $\xi(\beta, \phi, \gamma, \phi'')$ et $\zeta(\beta, \phi, \gamma, \phi'')$ qui y sont définies.

$$E_{\text{coll}}(P, \gamma, \phi'') = -\frac{\alpha_{\parallel} \sin \beta \cos \phi E_O}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} e^{ikz \sin \gamma \cos \phi'' \sin \alpha} \frac{\sqrt{1-\xi^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}}{\sqrt{1+\zeta^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}} \quad (2.18)$$

Cependant, ce signal n'est pas collecté en totalité par l'objectif.

Intégration numérique sur le cône de collection de l'objectif

L'intensité du signal collecté est obtenue en intégrant $|E_{\text{coll}}(P, \gamma, \phi'') E_R|$ sur le cône de collection de l'objectif de microscope d'ouverture numérique ON :

$$I_{\text{tot}}(\beta, \phi) = E_R \int_{\phi''=0}^{2\pi} \int_{\gamma=\pi-\arcsin ON}^{\pi} |E_{\text{coll}}(P, \gamma, \phi'')| d\gamma d\phi'' \quad (2.19)$$

Dans l'approximation du bâtonnet très anisotrope $\frac{L}{D} \ll 1$ où $\vec{P} \parallel \vec{u}_{\parallel}$ et en considérant un nanobâtonnet dont le grand axe appartient au plan (z, \vec{E}_O) , on a $\theta = \beta + \left(\widehat{\vec{E}_O, \vec{u}_z}\right)$. Or, en pratique on choisit pour l'onde objet une polarisation TE (transverse électrique) afin de maximiser sa projection sur le plan (x, y) du fait de l'illumination oblique via le prisme (voir section 1.6.3). En conséquence, on choisit la même polarisation pour le faisceau de référence (comme posé dans l'annexe B) pour maximiser le contraste des interférences. La polarisation TE implique donc que \vec{E}_O est orthogonal à l'axe Oz .

Pour cette raison, dans l'approximation du bâtonnet très anisotrope contenu dans (z, \vec{E}_O) , on a $\beta = \theta + \frac{\pi}{2}$. La résolution numérique de l'équation (2.19) mène à une courbe d'allure sinusoïdale et est tracée sur la figure 2.3b, ici en fonction de θ et pour une valeur de ϕ arbitraire (I_{tot} ne varie finalement pas avec ϕ , ce qui est cohérent avec la figure B.1b).

Comme attendu, on observe des fluctuations d'intensité qui correspondent précisément à la rotation². Grâce à ce modèle, on vérifie également que leur amplitude augmente avec l'ouverture numérique de collection ON .

Ainsi, il est possible d'utiliser des bâtonnets comme transducteurs. Afin d'obtenir une mesure de leurs mouvements, une mesure de l'intensité diffusée peut être utilisée.

2. Plus précisément, on mesure la projection de la rotation dans un plan perpendiculaire à (x, y) . Cet inconvénient est éliminé dans l'alternative utilisant des nanobâtonnets magnétiques en rotation forcée dans le plan (x, z) (section 2.3).

2.2.3 Imagerie de viscosité qualitative

En utilisant le montage d'holographie hétérodyne décrit à la section 1.6, on reconstruit l'image des composantes d'une fréquence spécifique f du clignotement d'un ensemble de bâtonnets. Sur l'expérience de la figure 2.4, 1000 hologrammes hétérodynes (i.e. 250 images démodulées à 4 phases) à la fréquence $f = \Delta F - \frac{f_{acq}}{4} = 2$ kHz acquis à $f_{acq} = 100$ Hz pendant $t_{int} = 10$ μ s ont été moyennés. Les images hétérodynes sont normalisées par l'image des composantes statiques (c'est-à-dire à $\Delta F = \frac{f_{acq}}{4}$).

L'échantillon est une lame contenant deux chambres microfluidiques séparées par une paroi de 300 μ m (voir figure 2.4b). Ces compartiments contiennent la même concentration, $3 \cdot 10^{-3}$ μ L $^{-1}$, en nanobâtonnets d'or dans de l'eau ($\eta = 0.8$ mPa s à la température 30 °C³) et une solution aqueuse à 30% de glycérol ($\eta = 2.2$ mPa s à 30 °C).

La figure 2.4c montre un **contraste qualitatif de viscosité** entre les deux milieux [73]. En effet, il y apparaît un contraste provenant de la différence en densité de diffuseurs ayant une composante de clignotement à la fréquence $f = 2$ kHz. La normalisation des images hétérodynes à f par l'image à fréquence nulle assure que l'on s'affranchit de la dépendance envers les inhomogénéités d'illumination ou de répartition des nanobâtonnets. Comme attendu, le signal est clairement plus fort dans la partie gauche de l'image : dans l'eau, la rotation des nanobâtonnets est en effet plus rapide que dans le mélange eau-glycérol plus visqueux. A toute fréquence, y compris 2 kHz, le signal est donc d'autant plus intense que la viscosité est faible. Autrement dit, à concentration de bâtonnets égale, la densité d'objets clignotant à une fréquence choisie (ici $f = 2$ kHz) est d'autant plus grande que le milieu est fluide.

2.2.4 Mesure expérimentale du signal

Le contraste de viscosité obtenu sur l'image hétérodyne 2.4c à une fréquence arbitraire est qualitatif et ne permet pas de remonter simplement à des valeurs quantitatives de viscosité. Cependant, une information plus riche réside dans l'étude du spectre des fréquences de clignotement. Ce signal noté $\tilde{S}(f)$ est obtenu par un balayage en fréquences hétérodynes f du signal d'ordre +1, noté I_{tot} dans l'équation (2.19).

Comme vu à l'équation (2.6), la contribution de la diffusion optique par les nanoparticules en rotation brownienne au signal enregistré pendant une durée d'évolution Δt est $g(\eta, \Delta t) \propto \sqrt{\frac{\Delta t}{\eta}}$. L'investigation de la composante de fréquence f produit donc un signal $\tilde{g}(\eta, f) \propto \sqrt{\frac{1}{f\eta}}$. Lors de la mesure, ce signal est convolué à la fonction de transfert instrumentale liée à l'acquisition par la caméra $\tilde{S}_{ins}(f)$ (voir section 1.4.2). L'expression du signal mesuré est alors :

$$\tilde{S}(f) = \left(\tilde{g} * \tilde{S}_{ins} \right) (f) \quad (2.20)$$

Pour connaître $\tilde{g}(f)$, une déconvolution numérique est une approche à éviter en général car génératrice de bruit, même s'il est possible de limiter ces bruits par l'utilisation d'un filtrage de Wiener numérique [85]. L'approche choisie ici contourne la déconvolution en utilisant plutôt un ajustement du signal mesuré au signal calculé avec la fonction de transfert instrumentale simulée, avec pour seul paramètre libre portant l'information sur la viscosité $\gamma(\eta) \propto \eta^{-\frac{1}{2}}$, soit :

$$\tilde{S}(f) \propto \frac{\gamma(\eta)}{\sqrt{f}} * \left| \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \right| \sum_n \delta(f - n f_{acq}) \quad (2.21)$$

3. La température est fixée par le porte-échantillon chauffant, voir section 1.6.

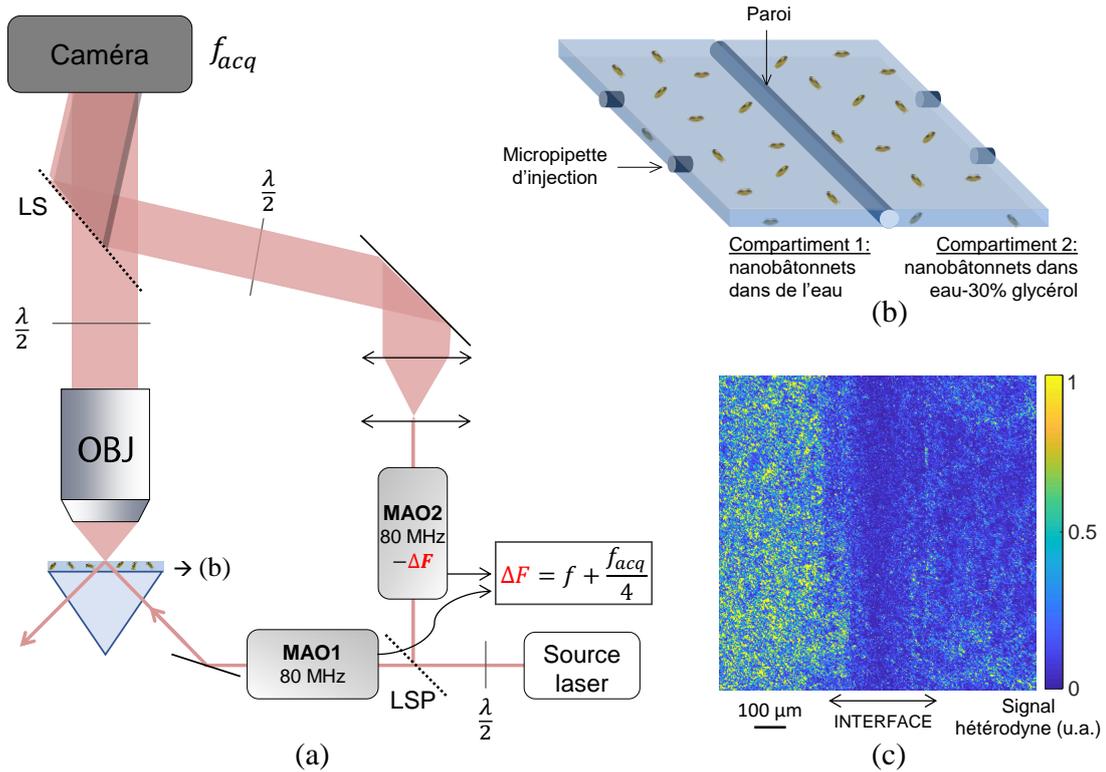


Figure 2.4 – (a) Schéma simplifié du montage. La fréquence hétérodyne ΔF est choisie égale à $f + \frac{f_{acq}}{4}$ où f est la fréquence investiguée. L'échantillon est une lame en verre contenant un milieu parcouru de nanobâtonnets d'or, couplée au prisme. La lumière diffusée par les nanobâtonnets est collectée par un objectif de microscope de grandissement $\times 4$ et d'ouverture numérique 0.13. (b) Les solutions imagées sont contenues dans une chambre microfluidique alimentée par des micropipettes de $300 \mu\text{m}$ de diamètre. Deux compartiments séparés par une fine cloison ($300 \mu\text{m}$) sont utilisés pour imagier le contraste entre deux milieux. (c) Image hétérodyne obtenue à la fréquence $f = 2 \text{ kHz}$. Chaque compartiment contient la même concentration $3 \cdot 10^{-3} \mu\text{L}^{-1}$ de nanobâtonnets d'or dans de l'eau ($\eta = 0.8 \text{ mPa s}$) et une solution aqueuse à 30% de glycérol ($\eta = 2.2 \text{ mPa s}$).

Le signal hétérodyne est plus faible dans le milieu visqueux (droite).

Simulation numérique

La fonction de transfert instrumentale $\tilde{S}_{ins}(f)$ définie à l'équation (1.19) est simulée et convoluée numériquement à la fonction $\tilde{g}(\eta, f) \propto \frac{\gamma(\eta)}{\sqrt{f}}$. Le choix existe entre deux méthodes de calcul équivalentes : la première consiste en la convolution numérique de $\tilde{g}(f)$ avec le produit du sinus cardinal et un peigne de fréquence *ad hoc*. La deuxième ne nécessite ni convolution numérique ni simulation de peigne, mais consiste à sommer simplement un nombre entier n de fois le sinus cardinal multiplié par $\tilde{g}(f - n f_{acq})$.

La figure 2.5 montre un exemple d'ajustement des données expérimentales à deux échelles différentes.

Dans une zone située entre deux pics spectralement résolus (figure 2.5b), on mesure un bruit $\Delta\tilde{S}$ (de 0.01 u.a. sur ces données normalisées). Par conséquent, en choisissant les fréquences hétérodynes telles qu'elles se situent entre deux pics, on peut omettre le peigne de Dirac dans la simulation à la condition que le bruit du signal ne soit pas supérieur à cette valeur : s'il y est supérieur, cela signifie que la présence des pics a une influence. Ce critère nous autorise alors à nous contenter d'ajuster la ligne de base des spectres par la convolution au sinus

cardinal. La fonction d'ajustement simplifiée devient alors :

$$\tilde{S}'(f) \propto \frac{\gamma(\eta)}{\sqrt{f}} * \left| \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \right| \quad (2.22)$$

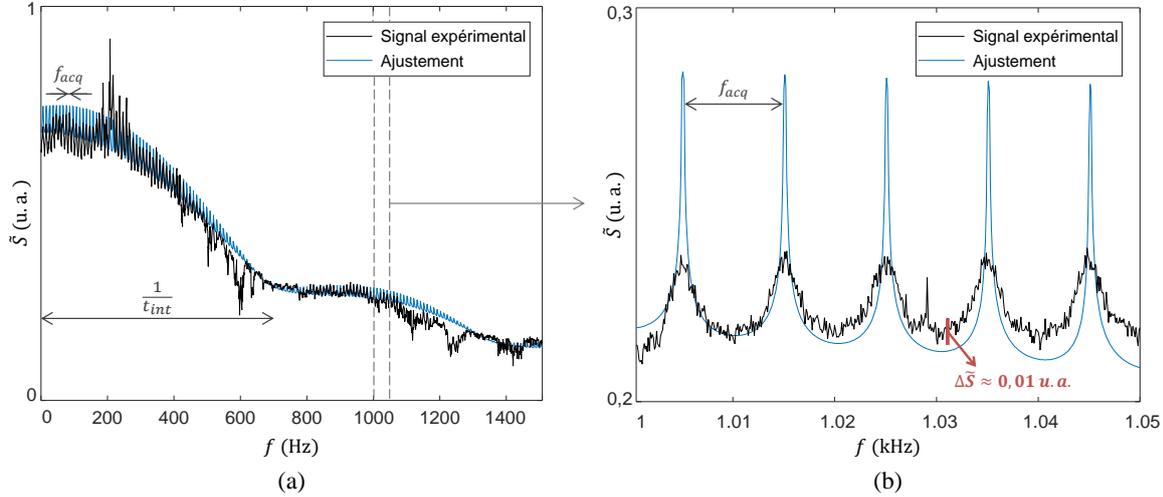


Figure 2.5 – Spectres expérimentaux ajustés par la fonction (2.21) d'une solution de nanobâtonnets en concentration $6 \cdot 10^7 \mu\text{L}^{-1}$ dans de l'eau sur différents intervalles de fréquence hétérodyne f , avec un objectif de microscope $\times 50$, ON 0.5. Scan sur : (a) une large gamme [0,1.5] kHz, et (b) une gamme plus étroite [1,1.05] kHz. La valeur du temps d'exposition t_{int} de la caméra impacte la largeur des oscillations du sinus cardinal ((a) : $t_{int} = 1/700$ s), et la valeur de la cadence d'acquisition f_{acq} est la période du peigne de Dirac ((b) : $f_{acq} = 10$ Hz)

H hiérarchie des paramètres temporels

L'ajustement montré sur la figure 2.5 ne fonctionne avec un paramètre libre unique $\gamma(\eta)$ ou deux (si une correction d'offset est nécessaire) qu'à condition de respecter une certaine hiérarchie dans les grandeurs temporelles en jeu.

D'abord, la limite supérieure de la fréquence balayée est fixée par la valeur de la durée d'exposition t_{int} . Elle détermine la valeur maximale de la fréquence détectable des dynamiques en jeu. En effet, on ne peut pas résoudre temporellement un phénomène plus court que la durée d'intégration du signal par la caméra. On choisit alors la plus petite valeur de la durée d'acquisition permise par le système, à savoir $t_{int} = 10 \mu\text{s}$ (figures 2.4 et 2.8). En conséquence, le spectre enregistré n'est significatif que jusqu'à la fréquence $f_{max} = t_{int}^{-1} = 100$ kHz. Cette contrainte n'est pas gênante car en pratique, les faibles signaux au delà de $f \sim 25$ kHz rendent délicat un ajustement quantitatif des mesures.

Par ailleurs, malgré le filtrage hétérodyne, des bruits à basse fréquence (vibrations) affectent également les signaux expérimentaux en dessous de $f_{bruit} \sim 1$ kHz, et la mesure peut alors devenir imprécise.

Pour l'essentiel, nos mesures sont donc effectuées et ajustées dans la gamme 1 – 25 kHz. Cette gamme de fréquences accessibles doit être comparée au temps de rotation des bâtonnets, puisqu'une mesure correcte du clignotement ne peut être obtenue que pour des temps permettant une rotation suffisante des bâtonnets. Pour la rotation d'un nanobâtonnet, on définit le temps de décohérence τ_c par la durée typique d'une rotation moyenne de $\frac{\pi}{2}$, soit

$\tau_c = \frac{(\pi/2)^2}{6D_r}$ d'après l'équation (2.2), où $D_r(L, D, \eta)$ est donné par l'équation (2.5). En deçà de ce temps, la rotation ne peut être échantillonnée de manière significative (voir figure 2.6).

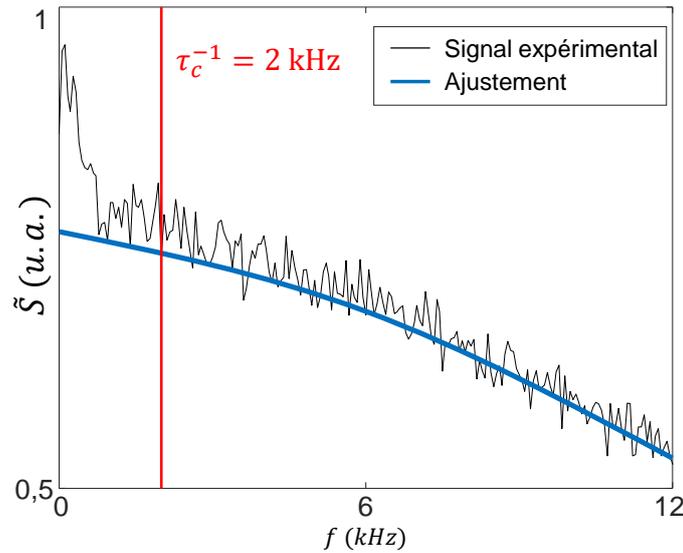


Figure 2.6 – Spectre hétérodyne d'une solution de nanobâtonnets d'or dont l'inverse du temps caractéristique de rotation est $\tau_c^{-1} = 2 \text{ kHz}$. En dessous de cette fréquence, les mesures dévient du signal attendu par l'équation (2.22) : le clignotement est trop rapide par rapport à la fréquence d'analyse.

Via D_r , τ_c dépend donc à la fois de la géométrie et de la viscosité η . En utilisant cette relation, la gamme de mesure accessible ($[1, 25]$ kHz) peut donc être reliée à une gamme de viscosité mesurable avec un type donné de bâtonnets.

En prenant $L = 150 \text{ nm}$ et $D = 50 \text{ nm}$, on obtient ainsi un intervalle mesurable $\eta = [0.1; 3.5]$ mPa s à 37°C . Cette gamme correspond aux viscosités de milieux relativement fluides, et est donc pertinente pour l'imagerie de cytoplasme par exemple.

Des valeurs de viscosité plus élevées peuvent cependant être mesurées en utilisant des nanobâtonnets plus petits. Optiquement, un bon contraste de clignotement peut être conservé, pour une longueur d'onde donnée, puisque la résonance du grand axe, RPS longitudinale, est conservée pour un rapport d'aspect $\frac{L}{D}$ constant. Par exemple, avec des nanobâtonnets de dimensions $50 \times 17 \text{ nm}$, la gamme s'étend à $[3.8, 95]$ mPa s. Un grand intervalle de valeurs de viscosité peut donc être mesuré⁴ en adaptant les dimensions des nanobâtonnets à la grande diversité de valeurs rencontrées dans les échantillons biologiques : des valeurs allant jusqu'à 10 mPa s correspondent à des milieux tels que le cytoplasme, le sang ou des follicules [86], tandis que des centaines de mPa s sont attendues dans des structures telles que des vésicules [87] ou des matrices mitochondriales [66]. L'inconvénient est qu'une connaissance a priori de l'ordre de grandeur des viscosités attendues est nécessaire au choix de la taille des bâtonnets. Ce problème sera résolu dans la section 2.3.

A partir des spectres hétérodynes acquis, nous sommes maintenant capables d'en tirer un paramètre $\gamma(\eta)$ dépendant de la viscosité grâce à l'ajustement par la fonction (2.22) prenant en compte la convolution du signal de clignotement à la fonction de transfert instrumentale. A présent, un étalonnage de $\gamma(\eta)$ en valeurs de viscosité est la dernière étape avant l'obtention d'une imagerie de viscosité quantitative, basée sur l'ajustement du spectre hétérodyne de chaque pixel des images.

4. A condition de prendre en compte la potentielle contribution du décalage du pic de résonance plasmonique avec les variations d'indice de réfraction (voir figure 2.2).

2.2.5 Imagerie de viscosité quantitative

La fonction $\gamma(\eta)$, tirée de l'ajustement du spectre $\tilde{S}(f)$ par la fonction (2.22), permet de décrire de manière univoque le lien entre la viscosité et les mesures. Une fois ce paramètre étalonné, la mesure de $\tilde{S}(f)$ sur chaque pixel permet alors d'obtenir une image de viscosité quantitative.

Etalonnage

Le paramètre d'ajustement $\gamma(\eta)$ a été mesuré dans plusieurs milieux tests via l'ajustement du spectre hétérodyne par la fonction (2.22) (voir figure 2.7). Des solutions composées d'eau et de glycérol en proportions variables ont été préparées de manière à obtenir des viscosités η dans l'intervalle [1; 1.8] mPa.s, calculées pour chaque milieu en utilisant [88]. Afin d'éviter toute variation de viscosité, la température de l'échantillon est stabilisée à l'aide du contrôleur présenté à la section 1.6.5, avec une précision estimée à $\pm 0.5^\circ\text{C}$. Les barres d'erreurs correspondantes sont tracées sur la figure 2.7. Comme attendu avec les équations (2.6) et (2.21), $\gamma(\eta)$ suit un comportement en $\eta^{-\frac{1}{2}}$. Le meilleur ajustement dans cette configuration utilisant un objectif $\times 50$, ON 0.5 est obtenu pour $\gamma(\eta) = 1.7 \pm 0.2 + (0.023 \pm 0.007)\eta^{-\frac{1}{2}}$ SI.

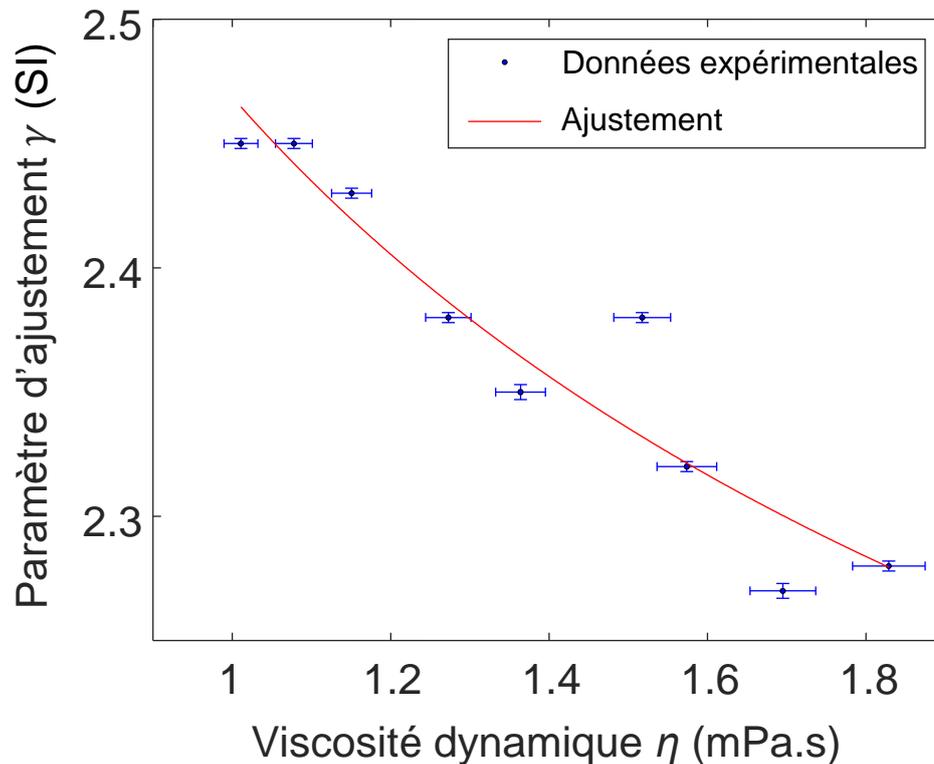


Figure 2.7 – Valeurs du paramètre d'ajustement γ obtenues pour 9 valeurs de viscosité. Le meilleur ajustement donne la courbe d'étalonnage (rouge) d'expression $\gamma(\eta) = 1.7 \pm 0.2 + (0.023 \pm 0.007)\eta^{-\frac{1}{2}}$ SI. Cette relation peut être utilisée pour extraire les valeurs des viscosités à partir des spectres hétérodynes.

Cette fonction $\gamma(\eta)$ étant à présent déterminée, il est possible d'évaluer la viscosité en tout point d'une image, en effectuant un ajustement à chaque pixel.

Imagerie quantitative de viscosité

L'étalonnage permet l'obtention d'une image quantitative de viscosité en ajustant le spectre hétérodyne pour chaque pixel de l'image reconstruite [73]. Pour démontrer l'efficacité de la méthode, deux milieux constitués de mélanges aqueux contenant respectivement 5% et 15% de glycérol ($\eta = 0.9 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ et $1.3 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ à 30°C respectivement [88], concentration en nanobâtonnets $6 \cdot 10^7 \mu\text{L}^{-1}$) sont injectés dans deux compartiments microfluidiques adjacents et imagés avec un objectif de microscope $\times 4$, ON 0.13. Dans cette configuration, l'étalonnage mène à la relation $\gamma(\eta) = (0.107 \pm 0.005)\eta^{-\frac{1}{2}}$ SI. L'image de viscosité quantitative correspondante est présentée sur la figure 2.8a. La taille d'un pixel virtuel ($1.6 \mu\text{m}$)⁵ ainsi que la fonction d'étalement du point ($3.7 \mu\text{m} = 2.3$ pixels virtuels)⁶ sont plus grandes que la longueur de translation caractéristique d'un nanobâtonnet ($\sqrt{\langle \Delta r^2 \rangle} = 1.5 \mu\text{m}$)⁷. Ce n'est donc pas la translation qui limite la résolution, et la valeur de viscosité en chaque pixel est significative. Un signal parasite est visible au niveau de la paroi de $300 \mu\text{m}$ séparant les deux compartiments : en effet, des artefacts de normalisation y surviennent puisque cette zone ne contenant pas de clignotement, le signal y est proche de 0, mais la valeur de normalisation (composantes statiques) est également proche de 0 puisque aucune nanoparticule diffusante ne s'y trouve.

Les valeurs de viscosité obtenues dans chaque compartiment sont en accord avec les valeurs attendues : en moyennant sur tous les pixels de chaque zone, on obtient à gauche la valeur $\eta_1 = 0.9 \pm 0.1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ pour une valeur attendue $\eta_{th,1} = 0.93 \pm 0.02 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ correspondant à 5% de glycérol à $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$; et à droite, $\eta_2 = 1.2 \pm 0.1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ pour une valeur attendue $\eta_{th,2} = 1.28 \pm 0.02 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, correspondant à 15% de glycérol à $30 \pm 0.5^\circ\text{C}$ [88]. Les erreurs relatives sont $\left| \frac{\eta_i - \eta_{th,i}}{\eta_{th,i}} \right| \approx 5 \pm 2\%$. L'écart-type entre les pixels, qui vaut $0.1 \text{ mPa}\cdot\text{s}$, donne une bonne estimation de l'erreur pour un pixel, puisque l'échantillon peut être considéré comme homogène.

Ainsi, grâce à l'étalonnage du paramètre d'ajustement des signaux que l'on mesure par balayage de la fréquence hétérodyne, chaque nanobâtonnet permet la reconstruction d'un pixel de viscosité quantitative. Avec une répartition homogène, on cartographie alors précisément le milieu.

Les mesures menant à la figure 2.8a nécessitent une durée d'acquisition de l'ordre de 10 min : elles consistent en un balayage de 100 fréquences correspondant à un temps d'acquisition de quelques secondes chacun. Cependant, une acquisition plus rapide est possible puisque deux mesures suffisent en principe à obtenir un ajustement. Pour évaluer le potentiel d'obtention rapide d'images de viscosité quantitatives, la figure 2.8c a été calculée à partir de seulement deux fréquences $f = 3 \text{ kHz}$ et 18 kHz du spectre tracé sur la figure 2.8b. Le rapport signal à bruit y est visiblement réduit, mais on observe toujours une image de viscosité et des valeurs quantitativement en accord avec la mesure complète (et les valeurs attendues). Ici, le temps d'acquisition de l'image est réduit pour atteindre l'ordre de la seconde, ce qui valide la possibilité de produire des vidéos de viscosité quantitative avec une résolution temporelle de l'ordre de la seconde, ce qui est suffisant pour l'étude de nombreux processus biologiques en temps réel. La résolution spatiale ultime est alors imposée par le libre parcours moyen d'un nanobâtonnet pendant cette durée, à savoir $5 \mu\text{m}$ d'après l'équation (2.1) pour nos dimensions de nanobâtonnets $150 \times 50 \text{ nm}$ dans l'eau. Il est envisageable de diviser le temps d'acquisition par deux par un multiplexage en fréquence hétérodyne, abordé dans le chapitre 1, section 1.6.

5. Taille d'un pixel de la caméra $6.5 \mu\text{m}$ divisé par le grandissement M .

6. Extension latérale du point avec un faisceau cohérent : $\frac{1.22\lambda}{2ON}$.

7. Calculé d'après l'équation (2.1) avec Δt égal au temps d'acquisition d'une image hétérodyne démodulée à 4 phases $\frac{4}{f_{acq}}$.

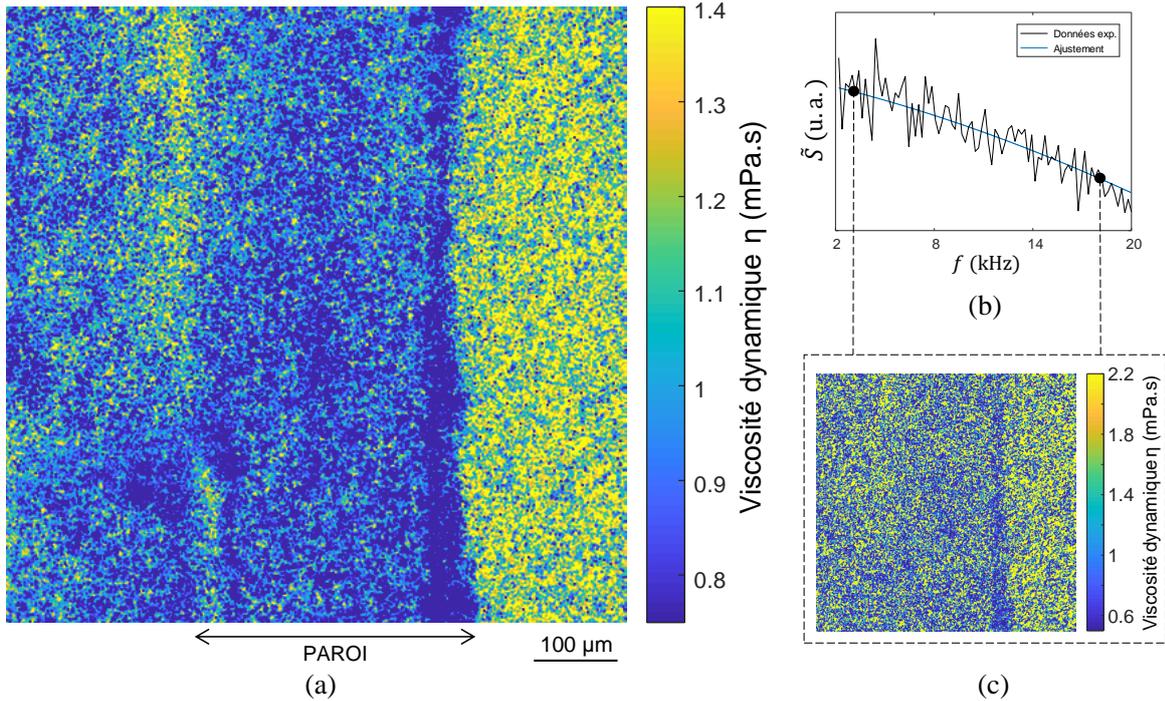


Figure 2.8 – (a) Image de viscosité quantitative de deux mélanges eau-glycérol de viscosités théoriques 0.9 (gauche) et 1.3 mPa.s (droite). Les deux fluides sont contenus dans des chambres séparées par une paroi de PDMS de 300 μm (centre). (b) Exemple de spectre de rotation brownienne utilisé pour calculer la viscosité sur un pixel via le paramètre d’ajustement γ . (c) Une procédure d’ajustement n’utilisant que deux fréquences du spectre (3 et 18 kHz, points noirs sur (b)) résulte en une image de plus faible rapport signal à bruit, mais de précision raisonnable en viscosité, et de temps d’acquisition fortement réduit (~ 1 s contre ~ 10 min pour le spectre à 100 fréquences).

En raison du volume limité des chambres microfluidiques, il est légitime de s’interroger sur l’effet des parois sur la mobilité des nanoparticules présentes à leur voisinage. Cependant, l’influence de la paroi décroît dès que la particule s’en éloigne d’une distance de l’ordre de quelques longueurs de leur grand axe [89]. Dans notre configuration, cette distance critique est typiquement de 500 nm, ce qui correspond à moins d’un tiers de pixel dans les images acquises avec un grossissement $\times 4$. Les mesures présentées ici peuvent clairement être considérées comme non affectées par la présence de parois, ce qui autorise la transposition de cette technique aux milieux biologiques. Dans ce nouveau contexte, le surplus de complexité provient de la présence de composants intracellulaires qui interagiraient fortement avec les sondes. Il faut ici noter que la notion de viscosité, dans des milieux hétérogènes à petite échelle, dépend de la taille de la sonde utilisée pour la mesurer. Il est alors possible de diminuer la taille des bâtonnets et d’augmenter la vitesse d’acquisition. Le paramètre clé est la longueur de translation quadratique moyenne $\langle \Delta r^2 \rangle$ couverte pendant le temps d’acquisition. Dans nos conditions et d’après les équations (2.1) et (2.5), cette longueur L peut être réduite au déplacement $\sqrt{\langle \Delta r^2 \rangle} = 90$ nm pour un bâtonnet de dimensions 150×50 nm dans l’eau. Corrélativement, la sensibilité aux gradients de viscosité peut être améliorée en respectant le critère $|\vec{\nabla} \eta| \ll \frac{\eta}{L}$.

2.2.6 Conclusion

Dans cette section du chapitre 2, nous avons montré qu'**une imagerie quantitative de viscosité est possible via l'analyse de la rotation brownienne de nanobâtonnets par holographie hétérodyne**. La diffusion plasmonique des nanoparticules d'or associée à la forme anisotrope des bâtonnets traduit la rotation en un clignotement. Afin d'analyser le spectre de ce clignotement, nous avons proposé un montage d'holographie hétérodyne utilisant une faible puissance laser (~ 10 mW sur le champ de vue de 10^{-3} à 0.5 mm² et ~ 1 mW dans la voie de référence). Un compromis peut être réalisé entre rapport signal à bruit et résolution temporelle, comme discuté à propos de la figure 2.8c. Les dimensions des nanobâtonnets utilisés doivent correspondre à la gamme de viscosité attendue, qui doit donc être estimée en amont. En l'état présenté ici, la méthode est assez sensible pour mesurer de faibles variations de viscosité (~ 0.1 mPa s) autour de valeurs de l'ordre du mPa s.

Cette étude ouvre la voie vers la possibilité de produire une image de viscosité dans une cellule injectée de nanobâtonnets. Un volume intracellulaire pourra ainsi potentiellement être imagé en 3D grâce à la reconstruction holographique des fonctions d'étalement du point de la diffusion des nanobâtonnets associée à une localisation au-delà de la limite de diffraction [90]. Cependant, une grande difficulté de mise en œuvre de cette approche de microrhéologie passive découle de la fragilité de la traduction du mouvement de rotation brownienne en un signal suffisant : **la rotation tridimensionnelle des nanobâtonnets n'est analysée que sous sa projection sur un plan**. De plus, malgré les considérations de concentrations établies afin d'éviter les effets d'obstacles, la restriction aux mouvements browniens du modèle semble problématique lors de l'exploration des nanoparticules d'un milieu plus complexe qu'un simple fluide homogène. **L'évolution vers une approche de microrhéologie active qui contourne ces difficultés est présentée dans la section suivante.**

2.3 Imagerie de viscosité via la rotation induite de bâtonnets magnétiques

La méthode de la section précédente a démontré la possibilité de sonder la viscosité par la mesure des fréquences de clignotements de nanobâtonnets en rotation brownienne sous illumination laser. Cette rotation aléatoire est répartie sur une vaste plage de fréquences, mais comme nous l'avons vu, l'acquisition d'un spectre complet est longue. Il est bien plus efficace de se concentrer sur une fréquence choisie. De plus, l'amplitude de clignotement mesurée n'est que la projection sur le plan de collection d'une rotation tridimensionnelle. Elle pourrait être bien plus élevée avec une rotation suivant certains axes de symétrie du bâtonnet, pour optimiser le contraste.

Afin d'augmenter sensiblement l'amplitude du signal de clignotement, la configuration adoptée dans cette nouvelle section consiste à contraindre la rotation des bâtonnets dans le plan (x, z) , orthogonal au plan de collection (x, y) . Pour cela, la méthode est adaptée à une rotation non plus passive, mais magnétiquement induite.

2.3.1 Rotation magnétiquement induite

L'aimantation d'un matériau a deux origines quantiques possibles : le moment magnétique permanent des ions lié au spin des électrons et à la configuration cristallographique, et le moment magnétique induit lié au mouvement des électrons de conduction. Selon la configuration orbitale des électrons des atomes constitutifs, ces deux phénomènes peuvent intervenir de diverses manières, donnant naissance à différents types de magnétisme, qui peuvent coexister. Une rotation forcée de bâtonnets peut être observée en faisant appel à plusieurs de ces types de magnétisme. L'approche la plus intuitive serait d'utiliser un matériau ferro- (ou ferri-) magnétique : on se trouverait alors en présence d'aiguilles de boussoles, qui possèdent un moment magnétique permanent et qui s'alignent simplement sur un champ magnétique appliqué. Le matériau utilisé ici, la maghémite, un polymorphe de l'oxyde de fer III de formule $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$, est en effet ferrimagnétique à température ambiante. Mais la formation de nanoparticules ferro ou ferrimagnétiques fait émerger un ordre différent et tout aussi intéressant pour l'application recherchée : le superparamagnétisme [91, 92].

Différents ordres magnétiques

L'émergence du superparamagnétisme est expliquée dans cette section, ainsi que sa comparaison à d'autres ordres magnétiques [93]. Dans une approche semi-classique assimilant, par abus de langage, les électrons de conduction à leur spin ou moment magnétique, l'émergence d'un ordre magnétique donné dépend du ratio entre les énergies d'interaction magnétique entre spins et l'énergie thermique.

Paramagnétisme L'ordre paramagnétique, par exemple, peut être décrit classiquement par un ensemble de spins indépendants, du fait d'une agitation thermique dominante. La résultante de tous ces moments magnétiques microscopiques orientés aléatoirement ne prend donc une valeur non nulle qu'en présence d'un champ magnétique extérieur, brisant la répartition uniforme des orientations des spins (voir la courbe bleue de la figure 2.9). La susceptibilité magnétique χ (paramètre adimensionnel décrivant la capacité à s'aimanter) d'un matériau paramagnétique⁸ varie entre 10^{-3} et 10^{-5} , et peut atteindre 10^{-1} dans le cas de matériaux paramagnétiques synthétiques comme les ferrofluides.

8. Comme le tungstène, le césium ou l'aluminium à température ambiante.

Ferromagnétisme Il existe des matériaux dans lesquels cette compensation macroscopique des moments individuels n'a plus lieu à plus petite échelle : des forces magnétiques peuvent agir localement et créer des domaines d'aimantation non nulle, dans lesquels les spins sont alignés entre eux. On parle alors d'ordre ferromagnétique⁹, qui tient son nom du fer, célèbre représentant de ce type de magnétisme notamment car il reste ferromagnétique jusqu'à une température très élevée : 768 °C. Cette température critique est en effet la température à atteindre pour que les effets thermiques l'emportent sur ces formations de domaines. Dans ces matériaux, la présence d'un champ magnétique extérieur a pour effet, comme dans les matériaux paramagnétiques, de diminuer l'entropie d'alignement inter-spins. En conséquence, les parois des domaines magnétiques se déplacent pour former des domaines de spins parallèles au champ extérieur de plus en plus grands, et l'annulation de l'aimantation globale est alors perdue. Du fait de ces regroupements naturels de spins de même orientation, la susceptibilité χ est nettement plus élevée que dans un matériau paramagnétique : de 10^1 à 10^5 . Une particularité supplémentaire du ferromagnétisme se manifeste lors du retrait du champ magnétique extérieur : en effet, l'équilibre est alors atteint non pas dans la situation initiale de micro-domaines dont les moments se compensent, mais dans une configuration intermédiaire d'aimantation non nulle, appelée aimantation rémanente M_R . L'application d'un champ magnétique d'amplitude opposée, appelé champ coercitif, est alors nécessaire pour forcer l'annulation de la rémanence (voir la courbe rouge de la figure 2.9).

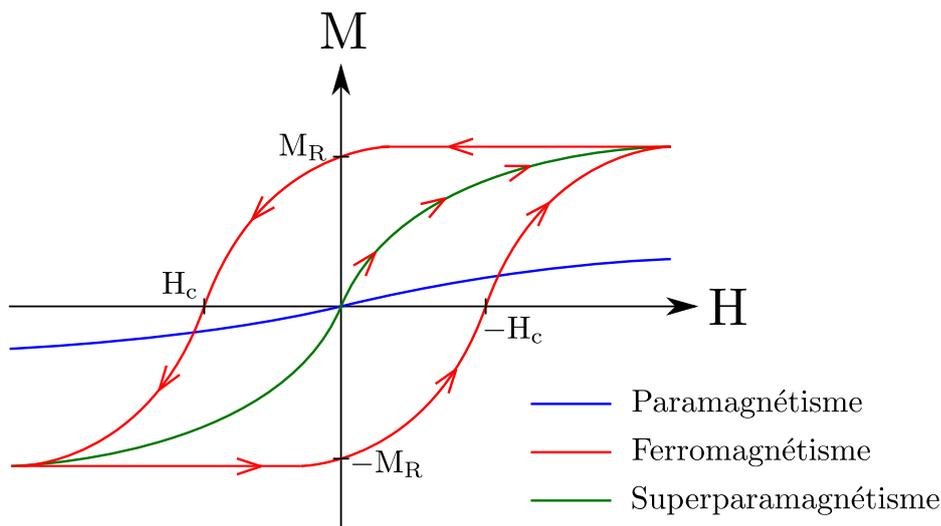


Figure 2.9 – Courbes d'aimantation des trois ordres magnétiques considérés.

La susceptibilité χ est la pente $\frac{M}{H}$ des droites obtenues lorsque $M, H \rightarrow 0$.

Paramagnétisme : à champ extérieur H nul, les moments magnétiques sont orientés aléatoirement donc leur résultante i.e. l'aimantation M est nulle. Lorsque H augmente, l'aimantation augmente lentement jusqu'à une aimantation de saturation correspondant à la situation où tous les moments sont alignés.

Ferromagnétisme : l'évolution de l'aimantation à partir d'un champ H nul est représentée par les flèches. Lorsque H devient non nul, les moments s'alignent, regroupés en des domaines de plus en plus grands, jusqu'à l'aimantation de saturation. Puis, lorsque H diminue jusqu'à 0, les parois de domaines se déplacent jusqu'à un équilibre où une aimantation rémanente M_R persiste. A aimantation nulle, un champ coercitif H_c doit être appliqué pour supprimer les domaines.

Superparamagnétisme : un matériau ferromagnétique dont la taille est typiquement égale à celle d'un domaine magnétique se comporte comme un unique moment magnétique géant.

9. Ou ferrimagnétique dans le cas d'une alternance de spins opposés d'amplitudes différentes.

Superparamagnétisme Si la taille d'un matériau ferromagnétique est réduite jusqu'à la taille typique d'un tel domaine (~ 100 nm), la notion de parois de domaines est perdue et le système peut s'approximer par un "macro-spin" [91, 92]. Cet unique domaine ne présentant qu'un seul état magnétique stable pour un champ extérieur donné, la courbe d'aimantation ne comporte plus d'hystérésis. On retrouve alors les propriétés du paramagnétisme dans le cas d'un moment magnétique géant : on parle alors de superparamagnétisme (voir la courbe verte de la figure 2.9).

Sans champ extérieur, le moment magnétique de la particule à un instant t est orienté aléatoirement. La courbe d'aimantation sans hystérésis passant par 0 est valable pour l'aimantation résultante d'une assemblée de particules, ou, par ergodicité, d'une particule unique évoluant pendant un temps $\tau_{mes} > \tau_N$, où le temps de Néel τ_N est la durée de moyennage du moment magnétique au dessus de laquelle le moment résultant est nul. Dans nos conditions, τ_N est de l'ordre de la nanoseconde : toute observation expérimentale la plus rapide soit-elle sera bien celle d'une particule superparamagnétique. τ_N peut s'exprimer par l'expression suivante :

$$\tau_N = \tau_0 e^{\frac{E_b}{k_B T}} \quad (2.23)$$

où τ_0 est un temps caractéristique du matériau, T est la température, et E_b est l'énergie de barrière à franchir pour retourner le moment magnétique. Cette énergie E_b est donc proportionnelle au facteur d'anisotropie magnétique $\Delta\chi$ qui sera défini à l'équation (2.30) : le retournement sur un axe de grande susceptibilité coûte plus en énergie s'il requiert de passer par un axe de plus faible susceptibilité.

Rotation forcée de bâtonnets superparamagnétiques

En termes énergétiques, la condition superparamagnétique $\tau_{mes} \gg \tau_N$ équivaut à $k_B T_N \ll k_B T$, où la température de Néel $T_N = \frac{E_b}{k_B} \ln \frac{\tau_0}{\tau}$ prend le rôle de grandeur critique (d'après l'équation (2.23)). L'énergie de barrière E_b est donc négligeable dans cette condition [91]. L'énergie magnétique se réduit alors uniquement au terme Zeeman $E_{pmag} = -\vec{m} \cdot \vec{B}$. Sa minimisation entraîne l'alignement du moment magnétique \vec{m} sur la direction du champ \vec{B} . Loin de la saturation¹⁰, pour une particule superparamagnétique de volume V dont l'aimantation résulte en un macro-spin \vec{m} ,

$$\vec{m} = \bar{\chi} V \frac{\vec{B}}{\mu_0} \quad (2.24)$$

où le tenseur de susceptibilité $\bar{\chi}$ s'écrit dans le cas d'un bâtonnet superparamagnétique dont les susceptibilités des grand et petits axes sont respectivement notées χ_{\parallel} et χ_{\perp} :

$$\bar{\chi} = \begin{pmatrix} \chi_{\parallel} & 0 & 0 \\ 0 & \chi_{\perp} & 0 \\ 0 & 0 & \chi_{\perp} \end{pmatrix} \quad (2.25)$$

Les expressions (2.24) et (2.25) impliquent que le moment magnétique \vec{m} du bâtonnet superparamagnétique s'aligne sur une superposition linéaire des composantes du champ magnétique \vec{B} pondérées par les éléments du tenseur de susceptibilité $\bar{\chi}$ ¹¹.

10. Au vu des faibles valeurs de champs magnétiques utilisées expérimentalement (\sim mT), cette condition sera considérée comme toujours vérifiée.

11. De façon analogue à la polarisation électrique du nanobâtonnet d'or qui s'aligne sur une superposition linéaire des composantes du champ électrique \vec{E} pondérées par les éléments du tenseur de polarisabilité $\bar{\alpha}$ (équation (2.14)).

On peut noter que la force magnétique $\overrightarrow{F}_{mag} = \overrightarrow{\nabla}(\overrightarrow{m} \cdot \overrightarrow{B})$ appliquée sur le bâtonnet est nulle pour un champ uniforme (on a bien $\overrightarrow{\nabla} \cdot \overrightarrow{B} = 0$ et $\overrightarrow{\nabla} \times \overrightarrow{B} = \overrightarrow{0}$ à un instant donné) donc le centre de masse du bâtonnet ne se déplace pas. En revanche, si $\chi_{\parallel} \neq \chi_{\perp}$, il entre en rotation en réaction au couple $\overrightarrow{\tau} = \overrightarrow{m} \times \overrightarrow{B}$, si l'orientation initiale de \overrightarrow{m} est différente de celle de \overrightarrow{B} . Dans ce cas, il existe deux positions d'équilibre : l'une stable si \overrightarrow{B} est aligné sur le grand axe, l'autre instable si \overrightarrow{B} est dans le plan des petits axes. C'est donc l'anisotropie de susceptibilité $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ qui est responsable de la rotation de la particule superparamagnétique.

En notant \overrightarrow{u}_i l'orientation de l'axe i du bâtonnet avec $i \in \{\parallel, \perp\}$, l'équation d'évolution, démontrée en annexe D, s'écrit :

$$\begin{aligned} \frac{d\overrightarrow{u}_i}{dt} &= (M^r \overrightarrow{\tau}) \times \overrightarrow{u}_i \\ &= \frac{1}{\mu_0} \left(M^r \overline{\chi} V \overrightarrow{B} \times \overrightarrow{B} \right) \times \overrightarrow{u}_i \end{aligned} \quad (2.26)$$

M^r est la matrice de mobilité rotationnelle, diagonale puisque les trois axes du bâtonnet sont orthogonaux, dont les éléments parallèle et perpendiculaires ont pour expression : [94]

$$M_{\parallel}^r = \frac{N_{\perp}}{2\eta V} \quad (2.27)$$

$$M_{\perp}^r = \frac{1}{2\eta V} \frac{L^2 N_{\parallel} + D^2 N_{\perp}}{L^2 + D^2} \quad (2.28)$$

où η est la viscosité dynamique, V le volume du bâtonnet de longueur L et de diamètre D , et $N_{\parallel, \perp}$ sont les facteurs de dépolarisation sphéroïdaux définis aux équations (2.11) et (2.12).

Pour une direction du champ \overrightarrow{B} donnée, la susceptibilité magnétique n'intervient qu'à travers son facteur d'anisotropie $\Delta\chi = \chi_{\parallel} - \chi_{\perp}$ du fait du produit vectoriel dans l'équation (2.26). Pour un bâtonnet constitué d'un matériau isotrope comme la maghémite, l'anisotropie magnétique découle directement de l'anisotropie de forme. Pour une particule de susceptibilité massive χ , on définit géométriquement les susceptibilités axiales : [95]

$$\chi_{\parallel, \perp} = \frac{\chi}{1 + N_{\parallel, \perp} \chi} \quad (2.29)$$

Le facteur d'anisotropie de susceptibilité magnétique $\Delta\chi$ a donc pour expression :

$$\Delta\chi = \frac{\chi^2 (N_{\perp} - N_{\parallel})}{(1 + N_{\parallel} \chi)(1 + N_{\perp} \chi)} \quad (2.30)$$

Sous champ magnétique tournant La mesure de viscosité par des aiguilles de maghémite a été démontrée dans des travaux antérieurs en utilisant un champ tournant [96-98]. En effet, en introduisant un champ magnétique d'expression $\overrightarrow{B} = B(\cos(\omega t)\overrightarrow{u}_x + \sin(\omega t)\overrightarrow{u}_y)$ dans l'équation (2.26), sa résolution fait intervenir une fréquence critique $f_c = \frac{\omega_c}{2\pi}$ d'expression¹² :

$$f_c = \frac{1}{2\pi\mu_0} \frac{\Delta\chi B^2}{\eta} h\left(\frac{L}{D}\right) \quad (2.31)$$

où $h\left(\frac{L}{D}\right)$ est le facteur géométrique de l'élément de matrice de rotation M_{\perp}^r de l'équation (2.28), d'expression $h\left(\frac{L}{D}\right) = M_{\perp}^r \eta V = \frac{L^2 N_{\parallel} + D^2 N_{\perp}}{2(L^2 + D^2)}$.

12. Les travaux de référence sur champ tournant utilisent une définition différente de $\Delta\chi$ [97, 98]. L'expression (2.31) a été harmonisée en conséquence afin de la rendre consistante avec notre approche.

Cette fréquence de rotation du champ magnétique f_c marque une coupure entre deux régimes d'évolution du bâtonnet :

- $f \ll f_c$: la période d'oscillation du champ \vec{B} est suffisamment longue pour laisser le temps au bâtonnet de s'y aligner. La rotation du bâtonnet suit alors celle du champ magnétique.
- $f \gg f_c$: la période d'oscillation du champ \vec{B} est plus courte que le temps caractéristique d'alignement du moment magnétique \vec{m} . L'orientation moyenne du grand axe reste alors bloquée dans une direction.

En forçant la rotation des bâtonnets grâce à un tel champ magnétique tournant dans un plan perpendiculaire au plan échantillon du microscope, la mesure de leur fréquence de clignotement par holographie hétérodyne indique dans lequel des ces deux régimes ils se trouvent. En balayant la fréquence de rotation du champ avec la fréquence hétérodyne, la détection de la fréquence de coupure f_c mène à une mesure de viscosité locale via l'équation (2.31). Une image de viscosité peut alors être obtenue comme à la section 2.2.

Sous champ magnétique oscillant Sur notre montage holographique, pour des raisons d'encombrement, un champ oscillant plutôt que tournant s'est avéré plus simple à mettre en place expérimentalement¹³ (voir figure 2.12). Un champ constant \vec{B}_0 est superposé à un champ oscillant \vec{B}_\sim . Le champ magnétique s'écrit alors $\vec{B} = B_\sim \cos(\omega t)\vec{u}_z + B_0\vec{u}_x$ où B_\sim est l'amplitude du champ oscillant parallèle à l'axe optique Oz , et B_0 est l'amplitude d'un champ fixe dans la direction de polarisation de la lumière. Ces deux positions extrêmes, représentées sur la figure 2.10, permettent d'optimiser le contraste : dans la position (b), la diffusion par le bâtonnet est maximale, tandis qu'elle est proche d'un minimum dans la situation (a)¹⁴.

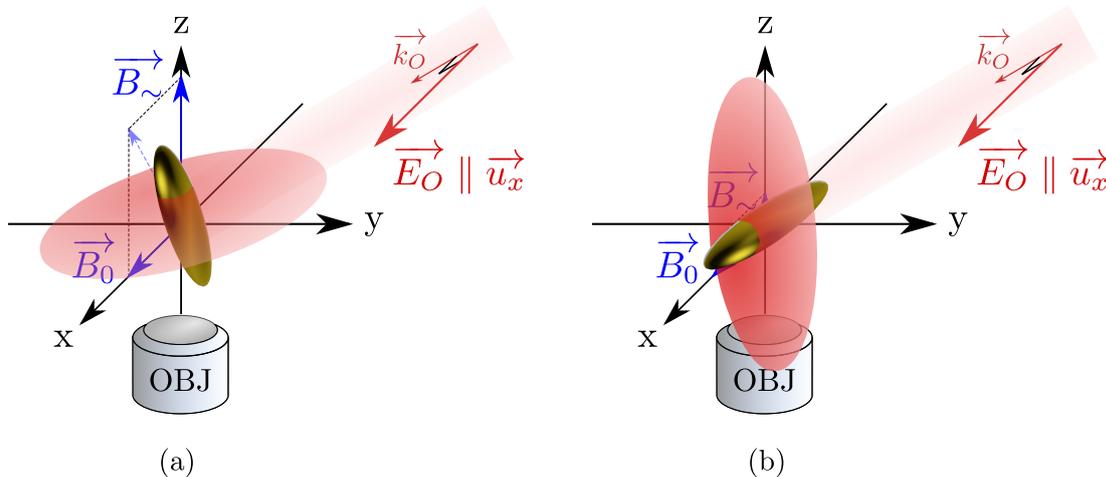


Figure 2.10 – Représentation d'un bâtonnet superparamagnétique sous illumination polarisée dans un champ magnétique oscillant. (a) Lorsque la composante de champ oscillante B_\sim atteint son maximum, l'alignement du bâtonnet est au plus proche de l'axe optique, et sa diffusion de forme torique (voir figure 2.3) n'est pas ou peu collectée par l'objectif de microscope. (b) Lorsque $|B_\sim|$ diminue, le bâtonnet pivote et sa diffusion est collectée par l'objectif. De plus, sa diffusion est alors maximale car il est parallèle à la polarisation du faisceau lumineux grâce à l'orientation de \vec{B}_0 .

13. La difficulté du champ tournant est de placer une paire de bobines verticales ainsi qu'une paire de bobines horizontales autour de la chambre contenant l'échantillon surmontée par le prisme, tout en produisant des amplitudes de champs égales.

14. NB : \vec{B} ne peut pas être parfaitement parallèle à Oz , à moins d'avoir $B_\sim \gg B_0$.

Cette expression de champ, introduite dans l'équation (2.26), fait également apparaître une **fréquence caractéristique marquant une transition** entre deux régimes similaires à ceux rencontrés dans le cas du champ tournant. La différence est la continuité entre les deux régimes : plutôt qu'une coupure entre un régime de rotation synchrone du bâtonnet et un régime d'oscillation autour d'une position bloquée, on observe une diminution de l'amplitude d'exploration angulaire du bâtonnet dans le plan (\vec{u}_x, \vec{u}_z) . Cette fréquence de transition notée f_t a la même expression que la fréquence de coupure du champ tournant f_c pour un module carré de champ moyenné temporellement $B^2 = B_0^2 + \frac{B_z^2}{2}$:

$$f_t = \frac{1}{2\pi\mu_0} \frac{\Delta\chi B^2}{\eta} h\left(\frac{L}{D}\right) \quad (2.32)$$

La mesure de f_t par holographie hétérodyne mène donc à une mesure locale de la viscosité η du fluide environnant le bâtonnet, si l'on connaît les dimensions du bâtonnet, sa susceptibilité magnétique, ainsi que l'amplitude du champ magnétique.

2.3.2 Synthèse des bâtonnets micrométriques d'oxyde de fer

La synthèse des bâtonnets de maghémite $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (polymorphe d'oxyde de fer) a été effectuée avec l'équipe ayant mis au point le protocole [97-103]. Celui-ci consiste en l'assemblage de nanoparticules sphériques de maghémite entre elles à l'aide de polymères, en présence d'un champ magnétique rectiligne qui induit la forme de tige. La taille des aiguilles obtenues est contrôlée par la densité de sphères et de polymères dans le mélange initial. Le protocole de base étant établi pour la synthèse d'aiguilles de plusieurs dizaines de μm , nous avons testé différentes valeurs de densités afin d'obtenir des bâtonnets de plus petites dimensions possibles avec un bon rendement. Le protocole qui m'a permis de synthétiser ces bâtonnets micrométriques de maghémite est présenté en annexe C.

On mesure dans nos échantillons synthétisés les longueurs des bâtonnets $L = 1020 \pm 240$ nm et leurs diamètres $D = 440 \pm 70$ nm (moyennes et écart-types pris sur un échantillon de 50 bâtonnets, aperçu sur la figure C.1c). L'orientation de la croissance par le champ magnétique explique la plus faible dispersion sur leurs diamètres.

On estime donc le rapport d'aspect des bâtonnets à $\frac{L}{D} = 2.3 \pm 0.9$. Cette grande dispersion dans les dimensions est sans doute la plus importante source d'incertitudes dans notre méthode. Une piste possible de réduction de cette dispersion consisterait en un tri des bâtonnets sous microscope électronique à balayage, mais cette méthode requiert un effort rédhibitoire. Cependant, leur détection optique, discutée dans le paragraphe suivant, accroît la sélectivité et permet de réduire la dispersion effective de la distribution qui intervient dans les signaux mesurés à $\frac{L}{D} = 2.8 \pm 0.5$ (voir équation (2.33)).

2.3.3 Diffusion optique par des bâtonnets d'oxyde de fer

Les matériaux magnétiques n'étant pas plasmoniques, leur efficacité de diffusion est faible par rapport aux nanoparticules d'or utilisées dans la section 2.2. L'idéal serait probablement d'utiliser des nanobâtonnets magnétiques recouverts d'or, mais cette section démontre cependant que la diffusion par le matériau utilisé, la maghémite, reste largement exploitable, en particulier grâce aux dimensions relativement grandes des bâtonnets synthétisés, mais aussi grâce à la sélectivité en fréquence de l'holographie hétérodyne.

Le spectre de diffusion par un bâtonnet d'oxyde de fer III Fe_2O_3 est calculé par approximation discrète dipolaire [84] et tracé sur la figure 2.11 pour trois rapports d'aspect différents, dans les orientations parallèle et orthogonale (i.e. grand axe parallèle ou orthogonal à la polarisation

de la lumière excitatrice). Les rapports d'aspect $\frac{L}{D}$ choisis correspondent aux valeurs extrêmes ($\frac{L}{D} = 1.4$ et 3.2) et moyenne ($\frac{L}{D} = 2.3$) présentes dans l'échantillon.

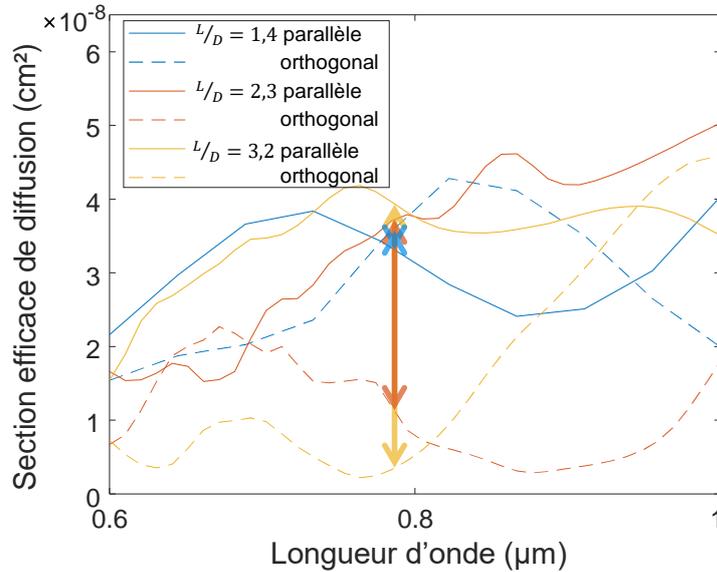


Figure 2.11 – Spectres de diffusion de bâtonnets d'oxyde de fer en suspension dans l'eau, pour trois rapports d'aspects $\frac{L}{D}$ différents et une longueur commune $L = 800$ nm, calculés par approximation discrète dipolaire (DDA) [84] pour les deux orientations parallèle (traits pleins) et orthogonale (traits pointillés) du grand axe du bâtonnet par rapport à la polarisation de l'onde lumineuse excitatrice. Le contraste de diffusion maximal à la longueur d'onde d'excitation est indiqué par une flèche pour chaque rapport d'aspect.

On observe sur la figure 2.11 premièrement que pour les dimensions de bâtonnets synthétisés, l'ordre de grandeur de la section efficace de diffusion est $\sigma_{\text{Fe}_2\text{O}_3} = 10^{-8} \text{ cm}^2$, que l'on peut comparer à celui des nanobâtonnets d'or de la section 2.2, figure 2.2 : $\sigma_{or} = 10^{-9} \text{ cm}^2$. On en déduit que malgré l'utilisation d'un matériau non plasmonique, les grandes tailles utilisées ($L = 1020$ nm, $D = 440$ nm, volume 500 fois supérieur aux particules évoquées à la section 2.2) confèrent à ces objets une section efficace de diffusion suffisante et même supérieure d'un ordre de grandeur à celle des nanobâtonnets d'or pris comme référence.

Outre la valeur absolue de cette section efficace, le système est sensible à l'amplitude de clignotement, c'est-à-dire à l'écart relatif de diffusion entre les deux orientations extrêmes du bâtonnet par rapport à la polarisation du faisceau laser. A la longueur d'onde utilisée, $\lambda = 785$ nm, les variations $\Delta\sigma$ pour les trois rapports d'aspect $\frac{L}{D} = \{1.4, 2.3, 3.2\}$ représentatifs de ceux présents dans l'échantillon valent, d'après la figure 2.11 :

$$\Delta\sigma_{\frac{L}{D}=1.4} = 0.2 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$$

$$\Delta\sigma_{\frac{L}{D}=2.3} = 2.5 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$$

$$\Delta\sigma_{\frac{L}{D}=3.2} = 3.7 \cdot 10^{-8} \text{ cm}^2$$

La détection optique contribue ainsi à sélectionner une classe particulière d'objets, dont le rapport $\frac{L}{D}$ est favorable. En pondérant les valeurs de $\frac{L}{D}$ par ces valeurs de contraste, la distribution en rapport d'aspect, initialement égale à $\frac{L}{D} = 2.3 \pm 0.9$, devient la suivante :

$$\frac{L}{D} = 2.8 \pm 0.5 \quad (2.33)$$

Cette valeur de $\frac{L}{D}$ permet à présent d'affiner celle de $\Delta\chi$ (équation (2.30)). La susceptibilité χ des nanosphères de maghémite constituant les bâtonnets a été calculée par étalonnage dans les travaux initiaux [97] et vaut 6.5 pour la taille de nanosphères utilisée (voir annexe C). Les bâtonnets sont alors caractérisés par le **facteur d'anisotropie magnétique** $\Delta\chi = 2.0 \pm 0.1$ d'après l'équation (2.30).

2.3.4 Montage expérimental

Le champ magnétique oscillant est mis en place au niveau du porte-échantillon du microscope du montage holographique (voir section 1.6). Un champ \vec{B}_{\sim} parallèle à l'axe optique est créé par deux bobines placées de part et d'autre de la lame de microscope, et un champ fixe \vec{B}_0 d'amplitude proche de B_{\sim} , parallèle à la polarisation TE du laser, est créé par un aimant permanent au néodyme (voir figure 2.12). Les bobines sont alimentées par un courant alternatif de fréquence f_B variable en utilisant un générateur basse fréquence associé à un amplificateur audio délivrant jusqu'à 100 V et 200 W. Ainsi, en régime permanent et en dehors de la contribution brownienne au mouvement¹⁵, la rotation des bâtonnets s'effectue uniquement dans le plan (Oz, \vec{E}_O) , à la fréquence f_B . Lorsque le champ $B_{\sim} \cos(2\pi ft)$ est nul, les bâtonnets sont alignés sur la direction de \vec{B}_0 , parallèle à \vec{E}_O , et leur diffusion est maximale (voir figures 2.10 et 2.11). Lorsque $|B_{\sim} \cos(2\pi ft)|$ atteint son maximum B_{\sim} , la projection du grand axe des bâtonnets sur Oz est maximale et le signal de diffusion collecté par l'objectif de microscope est minimal. Le bâtonnet est orienté dans des sens opposés lorsque $B = -|B_{\sim}|$ et $B = +|B_{\sim}|$. Au vu de la symétrie de sa forme, ces deux positions sont équivalentes du point de vue de la diffusion optique. On observe donc un clignotement dont la composante principale correspond à la fréquence $2f_B$ ¹⁶.

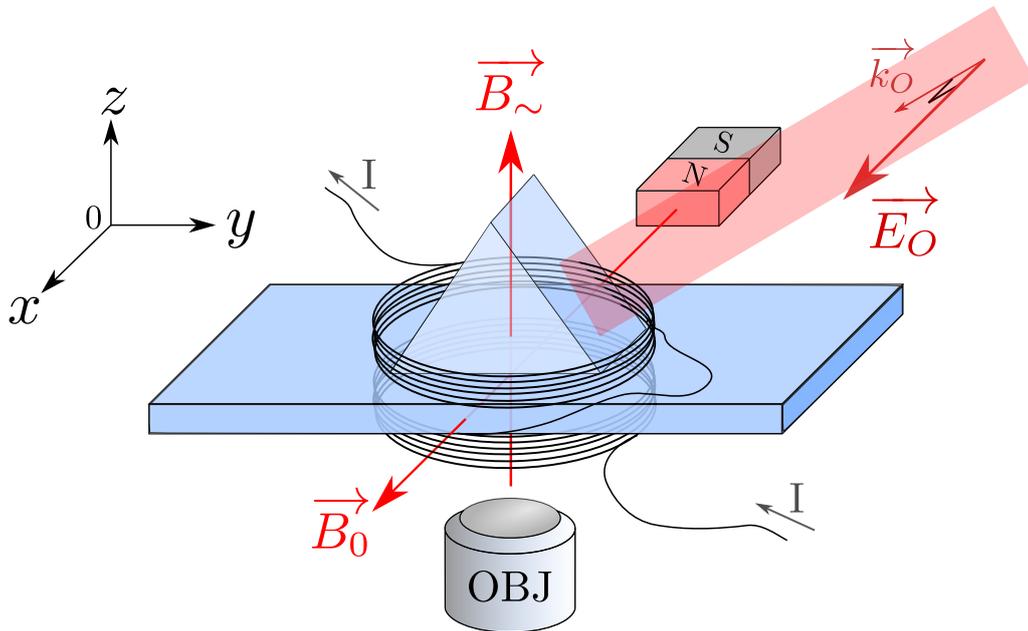


Figure 2.12 – Lame de microscope et prisme (voir section 1.6.3) avec les bobines créant un champ oscillant \vec{B}_{\sim} et l'aimant permanent créant un champ fixe \vec{B}_0 parallèle au champ électrique \vec{E}_O du faisceau lumineux. La collection par l'objectif de microscope s'effectue dans l'axe de \vec{B}_{\sim} de manière à observer l'échantillon dans le plan du clignotement (voir figure 2.10).

15. Discutée en annexe D.

16. Le facteur 2 se comprend par le fait que lors d'une oscillation du bâtonnet, deux positions de diffusion minimale sont empruntées.

Les bobines sont constituées d'un fil de cuivre de diamètre $59\ \mu\text{m}$ enroulé sur un support de plastique fabriqué par impression 3D et ont pour résistance $R_m = 8.4\ \text{k}\Omega$. Le bobinage mesurant $l = 4\ \text{mm}$ en hauteur et en épaisseur, on estime le nombre de tours par bobine à $N = \frac{(4\ \text{mm})^2}{(59\ \mu\text{m})^2} = 4600$ et le nombre de tours par unité de longueur $n = \frac{N}{4\ \text{mm}} = 1.2 \cdot 10^6\ \text{m}^{-1}$. L'aimant fixe est composé d'une superposition de deux aimants de néodyme de dimensions $4 \times 2 \times 1\ \text{cm}$ placée à $15\ \text{cm}$ du centre de l'échantillon. Le champ statique B_0 au niveau de l'échantillon est alors du même ordre de grandeur que l'amplitude de B_{\sim} [104].

Expérimentalement, on mesure B_{\sim} avec une sonde à effet Hall sur une gamme de fréquences $f_B \in [60, 2000]\ \text{Hz}$ ¹⁷, voir figure 2.13. Les données sont ajustées par la relation $\frac{B_{\sim}}{U_0}(f_B)$ établie avec l'expression d'un champ magnétique au centre d'un solénoïde infini $B_{\sim} = \mu_0 n i(t)$. Le courant $i(t)$ y vaut $\frac{U}{Z}$ où $U = U_0 \cos(2\pi f_B t)$ est la tension appliquée et $Z = |R + i2\pi f_B \mathcal{L}|$ est l'impédance, \mathcal{L} étant l'inductance des bobines. La fonction d'ajustement est alors la suivante :

$$\frac{B_{\sim}}{U_0}(f_B) = \frac{\mu_0 n K}{\sqrt{R^2 + (2\pi \mathcal{L})^2 f_B^2}} \quad (2.34)$$

Les paramètres n , R , \mathcal{L} et la constante K d'étalonnage de la sonde Hall sont laissés libres dans l'ajustement des données de la figure 2.13 par la fonction (2.34). On obtient les valeurs $nK = 0.2 \cdot 10^6\ \text{m}^{-1}$, $R = 8.0\ \text{k}\Omega \approx R_m$ et $\mathcal{L} = 2.5\ \text{H}$ ¹⁸.

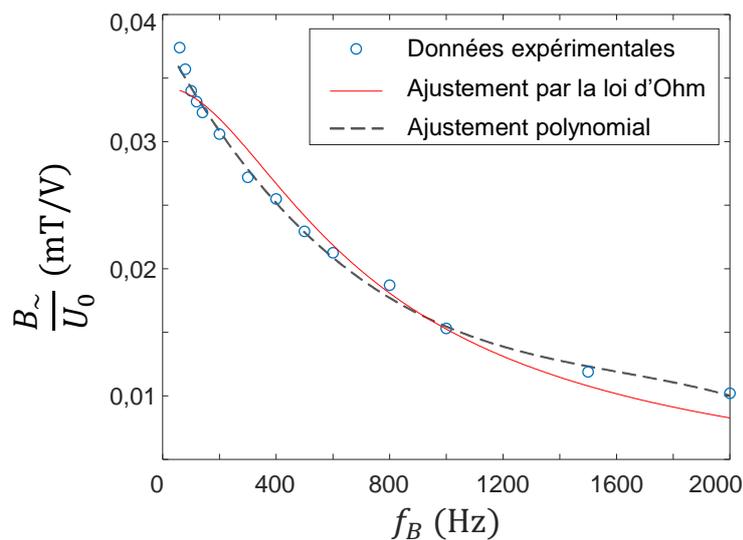


Figure 2.13 – Mesure de l'amplitude du champ magnétique B_{\sim} divisée par la tension $U_0 = 100\ \text{V}$ appliquée aux bornes des bobines, en fonction de la fréquence f_B du signal alternatif. Les données expérimentales sont ajustées par la fonction (2.34) en rouge, et par un polynôme d'expression $\frac{B_{\sim}}{U_0} \text{ (mT V}^{-1}) = 4 \cdot 10^{-2} - 4 \cdot 10^{-5} f_B + 2 \cdot 10^{-8} f_B^2 - 5 \cdot 10^{-12} f_B^3$ en pointillés.

On peut ainsi utiliser la relation (2.34) avec ces valeurs de paramètres pour **calculer la tension U_0 à appliquer afin de maintenir une amplitude de champ B_{\sim} constante pour chaque fréquence f_B** . L'ajustement obtenu confirme la validité de notre modélisation du champ. Cependant, étant donné les défauts de l'ajustement constatés en rouge sur la figure 2.13, un ajustement polynomial de degré 3 a été préféré pour établir une relation $U_0(f_B)$ plus fidèle au montage réel. En effet, des écarts entre le dispositif et le modèle du solénoïde parfait sont probables¹⁹.

17. Les signaux de fréquence inférieure à 60 Hz ne sont pas accessibles avec l'amplificateur audio utilisé.

18. On trouve une valeur proche de l'inductance théorique d'un solénoïde $\mathcal{L}_{th} = \frac{N^2 \mu_0 \pi r^2}{l} \approx 3\ \text{H}$.

19. Notamment l'écart entre la position de la sonde à effet Hall et le centre du solénoïde.

2.3.5 Mesure de la rotation magnétiquement induite

Détection de la rotation

La figure 2.14 présente la reconstruction holographique de l'image d'un bâtonnet à la fréquence d'analyse $f = 10$ Hz telle que $f < f_t$ d'une tige de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ de dimensions $10 \times 3 \mu\text{m}$ ²⁰ et la moyenne du signal holographique sur toute l'image au cours du temps. Dans la situation initiale, les bobines ne sont pas alimentées. La tige s'aligne alors sur le champ statique créé par l'aimant. Le signal démodulé provient donc de la composante des bruits et des mouvements browniens du bâtonnet à la fréquence 10 Hz. A l'instant t_1 , les bobines sont alimentées par un courant alternatif de fréquence $f_B = 10$ Hz, égale à la fréquence d'analyse f . Le signal augmente considérablement puisque l'on image un clignotement de fréquence f_B égal à la fréquence d'investigation f . Puis à l'instant t_2 le courant alternatif est coupé et le signal chute immédiatement jusqu'à sa valeur initiale.

On met ainsi clairement en évidence la capacité de notre champ à induire une rotation, mais aussi la capacité de l'holographie hétérodyne à filtrer et mesurer une oscillation à la fréquence du champ oscillant.

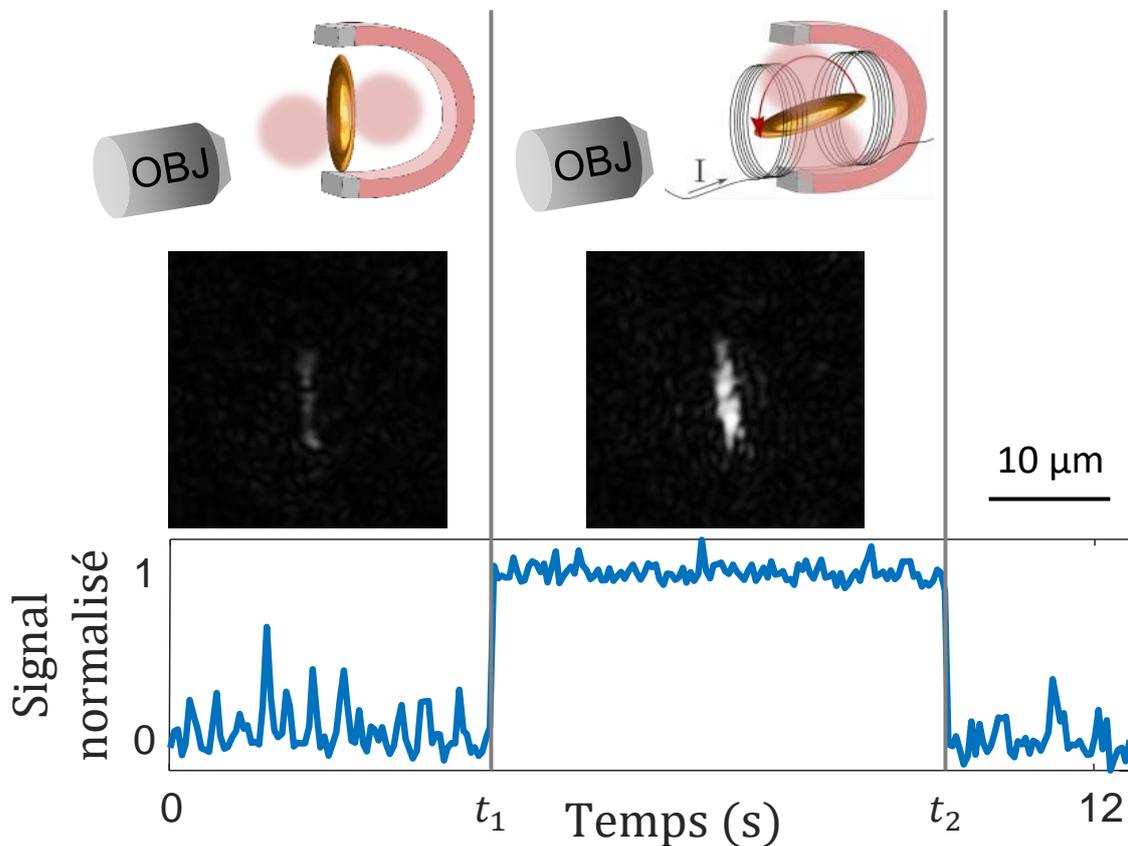


Figure 2.14 – Image et signal moyen holographiques démodulés acquis à la fréquence d'analyse f d'une tige de maghémite.

$t \in [0, t_1[\cup [t_2, +\infty[$: la tige est fixe, alignée sur le champ statique de l'aimant.
 $t \in [t_1, t_2[$: la tige est en rotation dans le plan perpendiculaire à l'image, à la fréquence de champ oscillant égale à la fréquence d'analyse f . L'augmentation du signal traduit la présence d'un clignotement à cette fréquence.

20. Preuve de principe réalisée avant la synthèse de bâtonnets (sub)micrométriques.

Spectre du clignotement induit

Le spectre en fréquence hétérodyne d'un ensemble de bâtonnets dans l'eau soumis au champ oscillant à la fréquence $f_B = 150$ Hz est tracé sur la figure 2.15. Comme à la section 2.2, les fréquences étudiées sont choisies comme étant des multiples de la cadence d'acquisition par la caméra. Ainsi, on se place systématiquement entre les pics de la fonction de transfert instrumentale, ce qui permet une lecture plus aisée des variations mesurées. L'influence des pics de Dirac décrits au chapitre 1 est ainsi gommée, mais on observe cependant le sinus cardinal de la fonction de transfert, dont le premier zéro est ici égal à $t_{int}^{-1} = 1$ kHz. Cette enveloppe est surmontée de deux pics centrés sur $f_B = 150$ Hz et $2f_B = 300$ Hz, élargis par la convolution à la fonction de transfert. Il s'agit bien de la fondamentale f_B et de la première harmonique $2f_B$ du signal de clignotement à $f_B = 150$ Hz comme attendu compte tenu des symétries du bâtonnet. **La détection de la rotation à la fréquence du champ magnétique oscillant dans le régime $f < f_t$ est ainsi validée.**

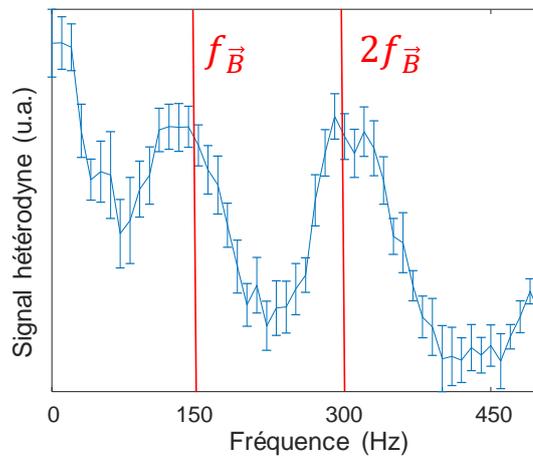


Figure 2.15 – Spectre de rotation mesuré par holographie hétérodyne d'un ensemble de bâtonnets de maghémite dans l'eau soumis à un champ oscillant à la fréquence $f_B = 150$ Hz. On y observe l'enveloppe de la fonction de transfert instrumentale (voir section 1.4.2) surmontée des pics de la composante fondamentale et la première harmonique du signal de clignotement.

2.3.6 Mesure de la fréquence de transition

Comme vu à la section 2.3.1, la fréquence d'oscillation des bâtonnets de maghémite suit celle du champ magnétique oscillant typiquement jusqu'à une fréquence de transition au-delà de laquelle la particule ne parvient plus à suivre les oscillations. Le moment magnétique reste alors aligné sur le champ fixe \vec{B}_0 . Cette fréquence de transition f_t dépend du système via l'expression (2.32). Ainsi, la fréquence f_t correspondant au point d'inflexion de la décorrélation du clignotement des bâtonnets à l'oscillation du champ magnétique indique une valeur quantitative de la viscosité.

Modélisation

Pour mesurer f_t , on balaye de manière synchrone les fréquences d'analyse et d'oscillation du champ ($f = f_B$). Comme décrit en annexe D, la transition entre le régime de rotation avec \vec{B}_\sim puis d'alignement sur \vec{B}_0 peut être modélisée par une fonction

spectrale du signal \tilde{g} de forme sigmoïdale :

$$\tilde{g}(f) \propto \frac{1}{1 + e^{(f-f_t)t_0}} \quad (2.35)$$

où t_0 est le temps caractéristique de la transition d'un régime à l'autre.

La convolution de \tilde{g} avec l'enveloppe de la fonction de transfert instrumentale²¹ $|\text{sinc}(ft_{int})|$ est simulée et représentée sur la figure 2.16 pour une sigmoïde \tilde{g} de paramètres arbitraires $t_0 = 1$ s et $f_t = 300$ Hz, et $t_{int} = 15$ ms (voir équation (2.35)).

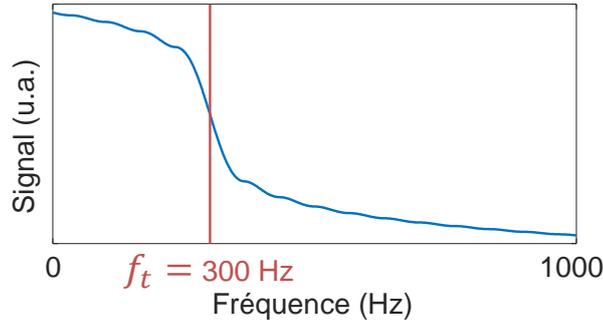


Figure 2.16 – Simulation du signal de clignotement obtenu lors du balayage de la fréquence d'analyse et d'oscillation du champ magnétique $f = f_B$. Le signal est la convolution entre l'enveloppe de la fonction de transfert instrumentale $|\text{sinc}(ft_{int})|$ (section 1.4.2) et une sigmoïde caractérisée par son temps et sa fréquence de transition t_0 et f_t (équation (2.35)). Les paramètres pris ici en exemple sont $f_t = 300$ Hz, $t_0 = 1$ s, et $t_{int} = 15$ ms.

Critère temporel

Pour pouvoir résoudre temporellement la fréquence de transition même après l'élargissement dû à la convolution, la largeur fréquentielle de la fonction de transfert instrumentale $|\text{sinc}(ft_{int})|$ doit lui être inférieure, soit $t_{int}^{-1} < f_t$. Cette limite vient du fait qu'en considérant la fonction \tilde{g} seulement sur la demi-droite des fréquences positives, on ajoute des effets de convolution en $f = 0$. La valeur du temps d'intégration t_{int} doit alors être choisie la plus élevée possible²², sans trop compromettre la fréquence d'acquisition qui reste un paramètre crucial à la localité. En pratique, si l'on s'attend par exemple à des valeurs minimales de f_t supérieures à environ 50 Hz, on peut choisir $t_{int} = 50$ ms, ce qui restreint la fréquence d'acquisition par la caméra f_{acq} à une dizaine de Hz.

Quant à t_0 , il se trouve limité par la résolution temporelle t_{int} , ce qui n'a pas de conséquence importante lorsque la valeur recherchée est celle de f_t .

2.3.7 Basses fréquences : holographie homodyne

Les fréquences de la gamme $f \in [0, \frac{f_{acq}}{4}]$ (c'est-à-dire typiquement $[0, 40$ Hz] avec notre caméra) sont mesurables simplement par détection homodyne, c'est-à-dire dans notre montage pour $\Delta F = 0$, puis démodulation à 4 phases (voir section 1.4.1). Ainsi, en balayant la fréquence d'acquisition f_{acq} ainsi que la fréquence du champ oscillant f_B , en respectant

21. On peut réduire la fonction de transfert instrumentale à son enveloppe à condition que les fréquences d'analyse soient multiples de la cadence d'acquisition par la caméra de manière à ce que les points soient situés entre deux pics du peigne (voir figure 2.5).

22. On remarque que ce critère sur t_{int} est contradictoire à celui posé dans la section 2.2. En effet, tandis qu'ici le temps d'intégration doit être le plus long possible afin d'enregistrer le relativement large signal de transition (~ 1 à 100 ms), il doit être cependant le plus court possible si l'on cherche à détecter des clignotements très rapides, jusqu'à des dizaines de μ s dans les mesures spectrales de rotation brownienne.

$f_B = \frac{f_{acq}}{4}$, les fréquences $f = f_B$ sont analysées sélectivement sur l'image démodulée. Une phase constante est maintenue entre le signal déclencheur de la caméra et le signal alternatif qui alimente les bobines afin d'échantillonner la rotation de manière à garder identiques les positions successives des bâtonnets.

La figure 2.17 montre deux milieux contenus dans des chambres séparées par une paroi horizontale de PDMS de $300\ \mu\text{m}$. Chaque compartiment contient des bâtonnets de quelques μm de longueur²³ à une concentration de l'ordre de $10^3\ \mu\text{L}^{-1}$ (on image alors ~ 1 bâtonnet par fonction d'étalement du point avec l'objectif utilisé $\times 4$, ON 0.13). Le milieu du haut est un mélange aqueux à 27% de glycérol ($\eta = 2.6\ \text{mPa}\cdot\text{s}$) et celui du bas est de l'eau pure ($\eta = 1.0\ \text{mPa}\cdot\text{s}$). Cette expérience préliminaire a été effectuée avant l'ajout d'un amplificateur (100 V – 200 W) et utilise un champ modulé d'amplitude modeste, $B_{\sim} = 1.3 \pm 0.3\ \text{mT}$. De meilleurs rapports signal à bruit sont actuellement possibles. Quant à la composante statique B_0 , faute de mesure précise, on extrait sa valeur de l'une des mesures suivantes de $f_t(\eta)$.

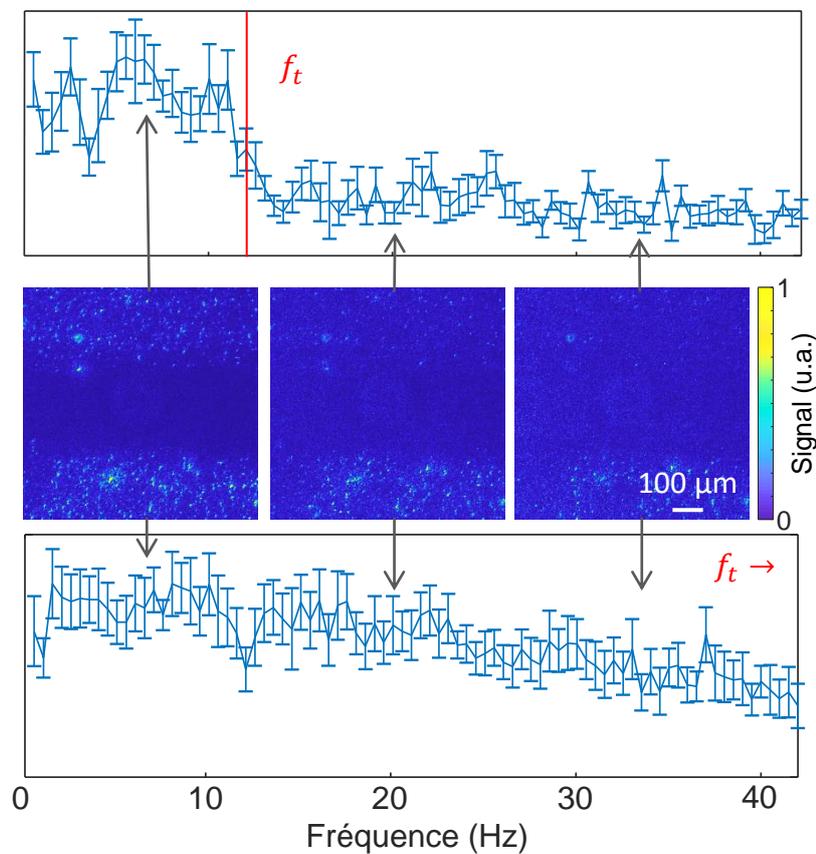


Figure 2.17 – Images reconstruites d'hologrammes homodynes de bâtonnets soumis à un champ oscillant à la fréquence $f_B = \frac{f_{acq}}{4}$. Les bâtonnets sont répartis dans deux chambres séparées par une cloison horizontale. Le compartiment du haut contient un mélange eau-glycérol de viscosité $\eta = 2.6\ \text{mPa}\cdot\text{s}$, celui du bas contient de l'eau de viscosité $\eta = 1.0\ \text{mPa}\cdot\text{s}$. Les images correspondent à 3 fréquences extraites du spectre complet, tracé à côté de chaque milieu. La fréquence de transition du milieu visqueux est visible sur le spectre (haut), et se manifeste sur les images par une diminution d'intensité soudaine dans la zone concernée. Puisque la fréquence de transition $f_t = 32 \pm 22\ \text{Hz}$ du milieu du bas (eau) ne se situe pas dans la gamme étudiée ici, cette transition n'est pas visible dans le compartiment du bas, mettant ainsi en évidence le contraste de viscosité entre les deux compartiments.

23. NB : expérience effectuée avant la synthèse des plus petits bâtonnets de maghémite.

Le spectre de fréquences mesuré dans chaque compartiment dans la gamme $f \in [0.5, 42]$ Hz (avec un pas $\delta f = 0.5$ Hz) est tracé. Chaque point représente le signal moyenné sur 80 hologrammes, soit 20 images démodulées à 4 phases. Les images correspondant à trois fréquences du spectre sont également présentées ($f = \{7, 20, 32\}$ Hz).

Dans le milieu du haut de plus haute viscosité, on observe une transition à la fréquence $f_t = 12 \pm 1$ Hz. Avec la valeur $\Delta\chi = 2.0 \pm 0.1$ établie précédemment, l'équation (2.32) prédit $f_t = 12 \pm 7$ Hz pour $B_0 = 0.9 \pm 0.3$ mT. Dans le milieu du bas, de viscosité plus basse, on s'attend pour ces paramètres à $f_t = 32 \pm 22$ Hz. La fréquence de transition semble dépasser la gamme de fréquences sondées pour ce milieu, soit $f_t > 42$ Hz ce qui peut concorder avec l'intervalle d'incertitudes. Néanmoins, **les images reconstruites aux fréquences comprises entre les deux valeurs de f_t présentent un contraste de viscosité** : dans le milieu du haut, plus visqueux, la fréquence de rotation du champ est trop élevée pour permettre aux bâtonnets de le suivre compte tenu de la viscosité, tandis que dans le milieu moins visqueux cette fréquence de rotation est encore suivie par les bâtonnets.

La fréquence de transition f_t a été mesurée par ce moyen dans plusieurs mélanges aqueux à concentrations de glycérol variables, dans la gamme de viscosités $[1, 10]$ mPa s. Les valeurs de transitions mesurées sont tracées en fonction de la viscosité sur la figure 2.18. L'ajustement linéaire de ces données est optimisé pour une valeur du coefficient déduit de l'équation (2.32) $f_t\eta = \frac{\Delta\chi B_0^2 h(\frac{L}{D})}{2\pi\mu_0} = 0.026 \pm 0.003$ Pa. Pour les paramètres $\Delta\chi = 2.0 \pm 0.1$ et $B = 1.3 \pm 0.2$ mT établis ici, on obtient la valeur calculée de ce paramètre 0.03 ± 0.01 Pa.

La proportionnalité attendue entre f_t et η^{-1} est ainsi validée, ainsi que la cohérence des mesures avec le modèle.

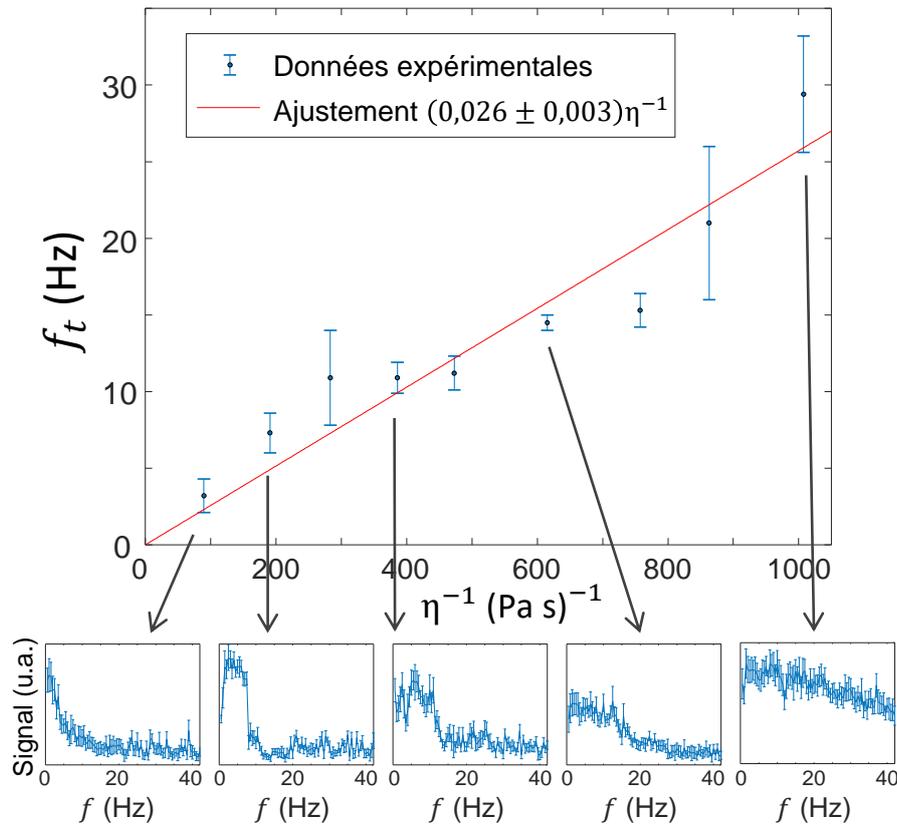


Figure 2.18 – Fréquence de transition en fonction de l'inverse de la viscosité, mesurée par holographie homodyne dans plusieurs milieux composés de mélanges aqueux à proportions de glycérol allant de 0 à 55%. Les barres d'erreur correspondent à la dispersion des résultats obtenus sur un échantillon statistique d'environ 10 mesures (10 bâtonnets différents dans le même milieu).

2.3.8 Hautes fréquences : holographie hétérodyne

La création d'un champ magnétique oscillant d'amplitude plus élevée (grâce à l'ajout d'un amplificateur de signal) permet d'augmenter quadratiquement avec B_{\sim} les valeurs de f_t d'après l'équation (2.32). L'intérêt est d'ainsi **réduire le bruit de fluctuation brownienne** : plus l'amplitude de champ magnétique est faible, moins elle restreint la contribution de l'agitation thermique au signal. En fixant le critère $\frac{mB}{k_B T} > 10^3$ sur le ratio entre l'énergie magnétique et l'énergie d'activation brownienne, l'amplitude de champ nécessaire pour neutraliser le bruit brownien est $B \geq 3.5$ mT pour nos dimensions et compositions de bâtonnets. D'après l'équation (2.32), cela correspond à des valeurs de f_t augmentant quadratiquement à partir de 200 Hz dans de l'eau, ce qui demanderait alors une capacité d'acquisition en mode d'acquisition homodyne au grand minimum de 400 Hz, et de façon plus réaliste $\gg 1$ kHz puisque l'acquisition de point de fréquences supérieures à f_t sont nécessaires afin de bien définir la transition.

Les performances des caméras limitent la borne supérieure en fréquence en mode de détection homodyne à des dizaines voire centaines de Hz selon les modèles, sans oublier le facteur $\frac{1}{4}$ imposé par la démodulation à 4 phases. L'holographie hétérodyne est donc utilisée pour investiguer toute fréquence supérieure à quelques dizaines de Hz.

Image de viscosité quantitative

Des images quantitatives de viscosité d'un milieu test ont été réalisés avec les bâtonnets sub-micrométriques et les bobines alimentées par une tension variable de manière à produire l'amplitude de champ ici $B = 3.9$ mT (en utilisant la relation de la figure 2.13).

L'échantillon test est constitué d'une solution présentant un gradient de viscosité formé par la mise en contact entre un gel d'Agar à 0.5% et de l'eau. Pour visualiser ce gradient, des fluorophores Alexa 488 à 1% sont placés dans l'un des deux milieux (l'eau) et une image de fluorescence en lumière blanche est acquise en amont. Ainsi, l'image du gradient de fluorescence, sur la figure 2.19a, est également une image (en contraste inversé) de la concentration en Agar, donc de la viscosité. Les bâtonnets sont répartis de façon homogène dans tout l'échantillon (voir figure 2.19b) à une concentration de $10^5 \mu\text{L}^{-1}$. Pour l'objectif de microscope utilisé $\times 4$ ON 0.13, cela correspond à une centaine de bâtonnets par fonction d'étalement du point.

Pour chacune des 27 fréquences du scan allant de 80 à 1000 Hz, 100 hologrammes (tels que celui de la figure 2.19b) acquis à $f_{acq} = 10$ Hz, $t_{int} = 50$ ms sont démodulés 4 à 4 puis moyennés pour donner une image reconstruite. Ces 27 images sont ensuite découpées en macropixels de 40×40 pixels, sur lesquels le signal est moyenné puis tracé en fonction de la fréquence hétérodyne. La taille des macropixels est choisie comme compromis entre résolution spatiale et précision de l'ajustement automatique des spectres du signal moyenné sur le macropixel. Ici, la taille choisie, 40 pixels soit $65 \mu\text{m}$ dans l'espace objet permet un relativement bon ajustement, comme présenté à la figure 2.19c. Un de ces spectres est donc obtenu pour chaque macropixel. L'ajustement est effectué par une simple sigmoïde, donnée par l'équation (2.35), en omettant la convolution par le sinus cardinal par souci de rapidité de calcul. La valeur de f_t est extraite de l'ajustement. Pour pallier les éventuelles variations d'illumination ou de répartition de bâtonnets entre les échantillons, présentes malgré la normalisation de chaque quadruplet d'hologrammes par sa valeur moyenne, on ajoute également un terme de décalage libre. Quant au paramètre t_0 , on le fixe à la valeur du temps d'intégration t_{int} comme expliqué à la section 2.3.6.

La figure 2.19d présente une image quantitative de viscosité obtenue par ajustement sur chaque macropixel. L'image est composée des macropixels dont l'échelle de couleur indique la valeur de la fréquence de transition $f_t(\eta)$. La direction verticale du gradient allant des basses viscosités vers les hautes (i.e. des hautes f_t vers les basses) est retrouvée, conformément à

ce qu'indique le gradient de fluorescence (donc de viscosité) de la figure 2.19a. Concernant la direction horizontale, il est possible que le gradient ait évolué par diffusion au cours des 5 min d'acquisition²⁴. Les valeurs de f_t obtenues dans la gamme imagée, [245, 275] Hz, correspondent d'après l'équation (2.32) à l'intervalle de viscosité [1.1, 1.3] mPa.s. Ces valeurs indiquent que l'image a été prise dans une zone du gradient constituée majoritairement d'eau pure, c'est-à-dire avec une concentration en Agar faible. Ceci souligne la sensibilité de la méthode, qui permet d'identifier un gradient entre des valeurs extrêmes très proches.

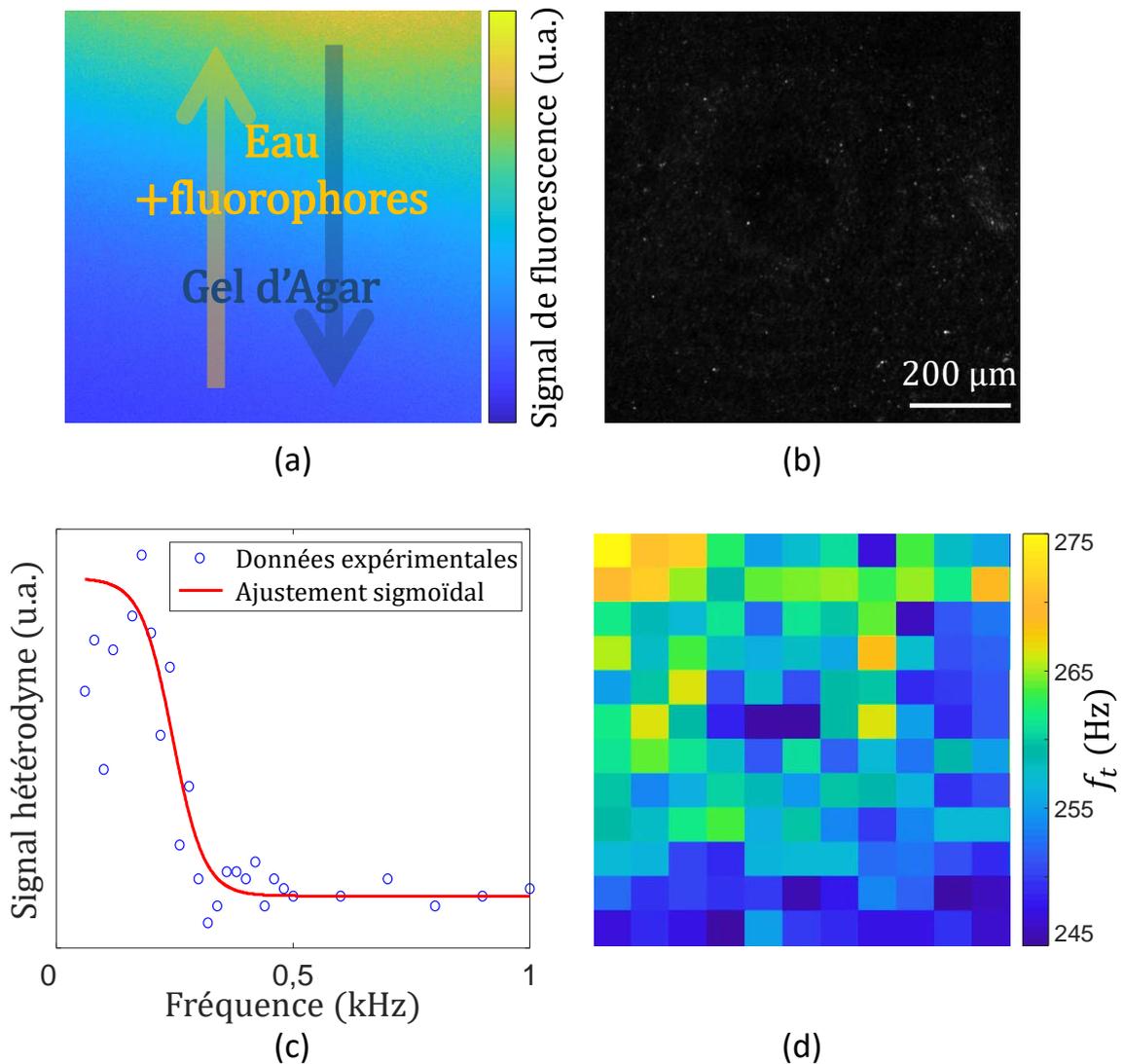


Figure 2.19 – Image de viscosité quantitative d'un milieu test. (a) Visualisation de l'échantillon : le milieu est un gradient entre de l'eau et un gel d'Agar à 0.5%. Des fluorophores (Alexa 488, 1%) sont introduits dans l'eau afin de visualiser qualitativement le gradient par fluorescence en amont de l'acquisition holographique. (b) Exemple d'hologramme. Le contraste ne permet pas de distinguer les franges d'interférences, mais on y voit des taches de lumière diffusées par les bâtonnets. (c) Exemple de signal ajusté pour l'un des macropixels. Le paramètre d'ajustement f_t est extrait automatiquement, de même qu'un décalage vertical laissé en paramètre libre. (d) Image de viscosité du gradient composée de tous les macropixels dont la valeur est issue de l'ajustement (c). L'échelle de couleur représente les valeurs de f_t , allant de 245 Hz à 275 Hz. L'écart de viscosité correspondant est compris dans une gamme étroite 1.1 mPa.s – 1.3 mPa.s.

24. Durée d'acquisition de 27 mesures composées chacune de 100 hologrammes à $f_{acq} = 10$ Hz.

Suivi tridimensionnel de bâtonnet unique

L'amélioration de la précision de la méthode, aussi bien en termes de résolution spatiale que de robustesse face à la complexité du milieu, réside dans la localité de la mesure. Tandis que sur le résultat présenté sur la figure 2.19 le signal est moyenné sur l'aire de chaque macropixel, qui contient un grand nombre de bâtonnets, on peut réduire considérablement cette surface à condition qu'elle suive la translation tridimensionnelle du bâtonnet. On tire pour cela parti de la reconstruction de la fonction d'étalement du point en 3D permise par l'holographie. La particule est localisée au barycentre de cette structure, calculé via un ajustement gaussien dans les trois dimensions spatiales. Ainsi, la limite de diffraction peut être surpassée, et on parle dans ce cas de superlocalisation. Des précisions de quelques dizaines de nm ont ainsi été démontrées, en 3D [90, 105].

Les trajectoires d'une particule pendant différentes durées sont tracées sur la figure 2.20. Tandis que la figure 2.19 utilise 100 hologrammes (i.e. 25 images après démodulation) moyennés pour chaque point du spectre, on montre que seulement 40 hologrammes (10 images) par fréquence suffisent à l'obtention d'un rapport signal à bruit permettant l'ajustement sigmoïdal tel que celui de la figure 2.19c. Au cours de l'acquisition, qui dure alors $40 \times 50 \text{ ms} = 2 \text{ s}$ avec une fréquence d'acquisition $f_{acq} = 20 \text{ Hz}$ ²⁵, le bâtonnet se déplace de manière brownienne à l'intérieur d'un volume de $0.5 \mu\text{m}^3$, comme représenté à la figure 2.20.

Dans l'hypothèse où l'on ne prendrait qu'une mesure (un seul point de fréquence), ce qui serait possible par un multiplexage en fréquences hétérodynes (voir figure 1.14), la valeur $0.5 \mu\text{m}^3$ indique donc à ce stade la meilleure résolution atteignable.

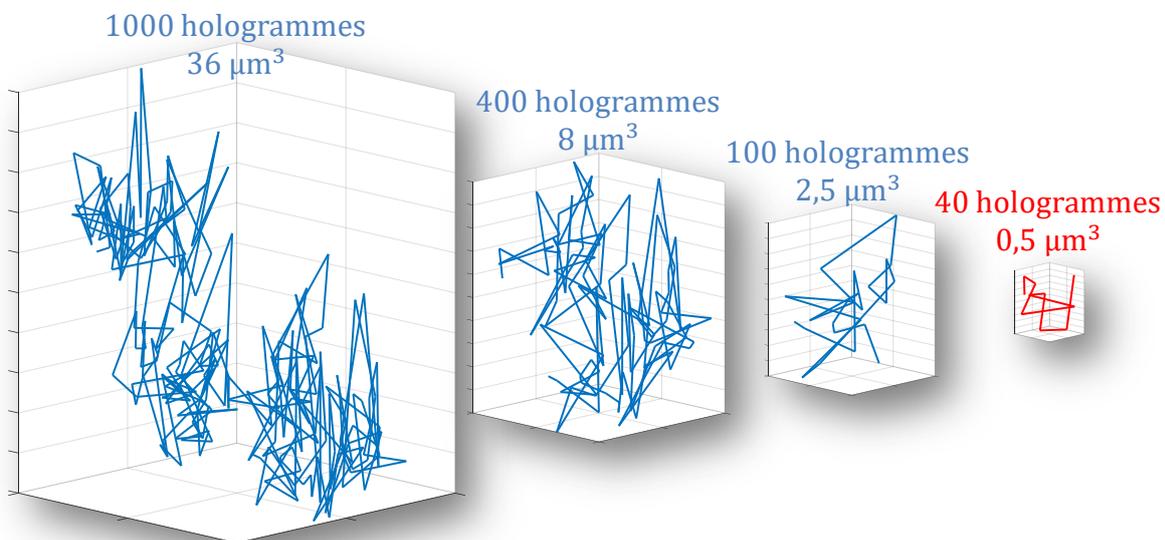


Figure 2.20 – Volume exploré par un bâtonnet de maghémite lors d'une mesure en holographie hétérodyne sous champ magnétique oscillant, selon le nombre d'hologrammes acquis pour être ensuite moyennés.

25. La limite sur cette valeur est discutée au paragraphe **Critère temporel** ci-dessus.

Les spectres de trois bâtonnets en rotation ainsi suivis dans l'espace en 3D dans des mélanges eau-glycérol de viscosités 1.0 ± 0.1 , 2.1 ± 0.2 et 3.0 ± 0.4 mPa s dans deux champs différents d'amplitudes 3 et 3.5 ± 0.2 mT sont tracés sur la figure 2.21. A 9 fréquences $f = f_B$ comprises entre 60 et 1000 Hz, 40 hologrammes sont acquis à la fréquence $f_{acq} = 20$ Hz.

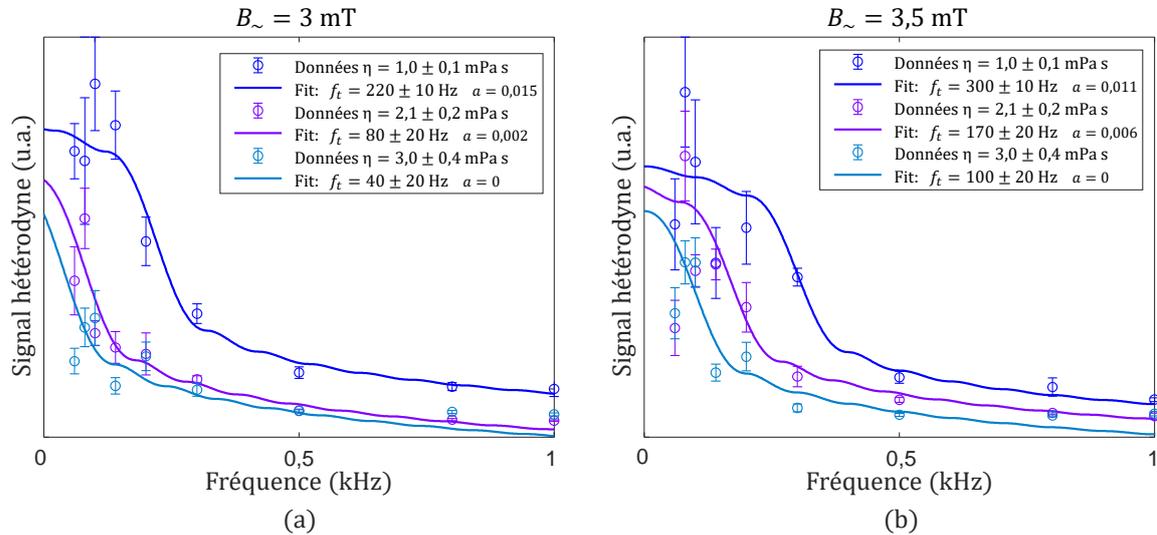


Figure 2.21 – Spectres de rotation de bâtonnets magnétiques uniques suivis en 3D dans des milieux aqueux à 3 concentrations de glycérol connues de viscosités 1.0 ± 0.1 , 2.1 ± 0.2 et 3.0 ± 0.4 mPa s dans une amplitude de champ magnétique (a) 3 mT et (b) 3.5 mT. Les ajustements sont faits par la convolution entre le sinus cardinal de la fonction de transfert instrumentale et la fonction sigmoïde (équation (2.35)) à deux paramètres libres : la fréquence de transition f_t et l'offset a .

La comparaison entre les valeurs de viscosité théoriques et les valeurs correspondantes calculées par l'équation (2.32) à partir des valeurs de f_t mesurées sur la figure 2.21 est présentée dans le tableau 2.1. La fiabilité de la mesure est caractérisée par des erreurs relatives $\left| \frac{\eta_{cal} - \eta_{th}}{\eta_{th}} \right|$ dispersées autour de 25%, et ne dépassant jamais les 80%.

B_{\sim} (mT)	f_t (Hz)	η théorique (mPa s)	η calculé (mPa s)	Erreur relative (%)
3.0 ± 0.2	220 ± 10	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	20 ± 13
3.0 ± 0.2	80 ± 20	2.1 ± 0.2	2.3 ± 0.3	10 ± 18
3.0 ± 0.2	40 ± 20	3.0 ± 0.4	4.5 ± 0.6	50 ± 28
3.5 ± 0.2	300 ± 10	1.0 ± 0.1	0.8 ± 0.1	20 ± 13
3.5 ± 0.2	170 ± 20	2.1 ± 0.2	1.4 ± 0.2	33 ± 11
3.5 ± 0.2	100 ± 20	3.0 ± 0.4	2.5 ± 0.3	17 ± 15

Table 2.1 – Récapitulatif des résultats tirés de la figure 2.21.

Grâce à ce suivi tridimensionnel, **la résolution de l'image de viscosité peut être poussée jusqu'à (et même au-delà de) la limite de diffraction** si la durée de la mesure est assez courte. La difficulté de produire un milieu test présentant des variations de viscosité significatives à cette échelle est ce qui nous limite pour l'instant aux basses résolutions telles que celle de la figure 2.19d, où le faible grandissement nécessaire pour visualiser un gradient empêche la résolution et donc le suivi des bâtonnets. Néanmoins, les résultats de la figure 2.21 promettent une imagerie basée sur une mesure quantitative de viscosité **à l'échelle du bâtonnet unique**.

2.3.9 Conclusion

La méthode basée sur la rotation forcée de bâtonnets magnétiques permet une mesure de viscosité plus efficace : contrairement à la méthode passive de la section 2.2, **toute l'amplitude de rotation est exploitée et contribue au signal mesuré**. De plus, cette méthode présente l'avantage d'être moins limitée en termes de valeurs de viscosité mesurables contrairement à la méthode brownienne. Le seul inconvénient notable par rapport à la méthode utilisant des bâtonnets d'or est la diminution du signal de diffusion optique, puisque les matériaux magnétiques ne bénéficient pas des intenses diffusions issues des résonances plasmoniques. Dans l'étude présentée ici, la raison pour laquelle l'efficacité de diffusion des bâtonnets magnétiques est largement suffisante est simplement leur grande taille, contrainte par les performances actuelles du protocole de synthèse chimique présenté en annexe C. Mais si l'on dispose bientôt de nanobâtonnets magnétiques de plus petites dimensions, la diminution de leurs sections efficaces de diffusion pourra être compensée par leur enrobage avec une pellicule d'or [106]. On tirerait ainsi parti des bénéfices de la diffusion plasmonique de l'or tout en réalisant la mesure de microrhéologie active de cette section.

Les travaux qui ont inspiré cette section [96-98] mesurent la fréquence de rotation d'aiguilles de maghémite dont la longueur est de l'ordre de $10\ \mu\text{m}$, donc bien résolue par le microscope. L'adaptation de cette approche au montage holographique supprime la contrainte sur la taille des aiguilles, puisqu'on détecte le clignotement produit par la rotation des bâtonnets sous illumination polarisée, **sans le besoin de les résoudre optiquement**. La synthèse de bâtonnets (sub)micrométriques réalisée en collaboration avec cette équipe a ainsi permis de passer de la mesure de viscosité à l'imagerie de viscosité. Notre système a ainsi permis de **baisser d'un ordre de grandeur** la résolution spatiale des mesures de viscosité par bâtonnets magnétiques. De meilleures résolutions sont clairement possibles. Pour les atteindre, en plus de la réduction du volume des particules sondes, la localité de la mesure doit être optimisée. Cette optimisation passe par la rapidité de mesure.

D'une part, l'étude du signal vise à réduire le nombre de points de fréquences nécessaires pour résoudre la transition caractéristique. En théorie, seules deux fréquences pourraient suffire pour déduire une fréquence de transition si des prédictions préalables permettent de réduire la gamme de recherche. Le multiplexage holographique présenté à la figure 1.14 peut aussi être mis en place pour acquérir plusieurs points du signal en une seule mesure.

D'autre part, le rapport signal sur bruit augmente avec l'amplitude de champ magnétique. La production d'une amplitude de champ magnétique la plus haute possible impose l'emploi de l'hétérodynage puisque la dépendance en B de la fréquence de transition est quadratique (voir équation (2.32)). C'est pour cet objectif de grande amplitude de champ que la configuration du champ oscillant a été choisie. En effet, la géométrie propre au montage holographique, la direction verticale de la rotation qu'elle impose et la présence du prisme (voir section 1.6.3) complique l'utilisation du champ tournant créé par quatre bobines identiques [96-98]. La configuration de champ oscillant schématisée sur la figure 2.10 fut un bon compromis entre simplicité de fabrication et valeur d'amplitude de champ. Le prix à payer est que le phénomène critique qui mène à la viscosité perd en définition : en champ tournant, on observe une coupure nette, tandis qu'en champ oscillant on est forcé de considérer le point d'inflexion d'une transition plus large. C'est pourquoi l'ingénierie d'un champ tournant adapté à la géométrie du montage holographique serait un atout considérable à la réduction des incertitudes sur la mesure de viscosité.

2.4 Conclusion et perspectives de l'imagerie de viscosité par holographie hétérodyne de nanobâtonnets en rotation

Bien qu'invasif, le sondage de la viscosité par des nanoparticules ou des molécules exprimées par modification génétique [65, 66] est le seul moyen actuel de produire une cartographie microscopique de viscosité dans un environnement fermé comme une cellule. Les nanobâtonnets utilisés ont l'avantage d'être biocompatibles : l'or est assez inerte même sous forme de nanoparticule, et les oxydes de fer sont des espèces déjà présentes dans l'organisme et leur interaction avec l'environnement intracellulaire a été étudiée et validée [107]. De plus, ces bâtonnets sont facilement accessibles dans le commerce ou par la synthèse chimique, et leur illumination par un laser de faible puissance (\sim mW) suffit à la détection de leur mouvement.

L'illumination laser de particules métalliques, réputées pour leur grande section efficace d'absorption, a pour conséquence un échauffement local de la solution. Dans notre application, un tel échauffement non maîtrisé mènerait à une perturbation de la mesure puisque la viscosité est fonction de la température. Cela n'est pas le cas dans le régime de faible intensité lumineuse de notre approche : pour une puissance d'illumination de l'ordre de 10 mW répartie sur le champ de vue de 0.6 mm^2 , l'intensité lumineuse vaut $I = 1 \text{ W cm}^{-2}$. A l'équilibre, le bilan entre la puissance apportée par le nanobâtonnet et la puissance dissipée par l'eau à la surface d'une sphère fictive de rayon r englobant le bâtonnet²⁶ indique une élévation de température de l'ordre de 0.001° à seulement $r = 1 \text{ nm}$ du bâtonnet. Des applications qui, au contraire, visent à tirer parti de cet échauffement comme en thérapie photothermique dans le cadre de traitement de cancers [108], utilisent des intensités lumineuses de l'ordre de 10^5 W cm^{-2} pour des échauffements locaux allant jusqu'à des milliers de degrés.

La méthode développée produit des images de viscosité dont la résolution spatiale est limitée par la durée d'acquisition, elle-même limitée principalement par le nombre de mesures nécessaires à la définition du signal spectral. En combinant l'approche de rhéologie active avec la superlocalisation, et éventuellement le multiplexage holographique, une résolution latérale de l'ordre de la limite de diffraction, voire inférieure, peut être atteinte. La direction axiale est également accessible puisque les images sont reconstruites depuis des hologrammes. Même si l'extension de la fonction d'étalement du point est bien plus grande dans la direction axiale²⁷, la localisation tridimensionnelle des particules (figures 2.20 et 2.21) peut permettre une cartographie 3D de viscosité. En revanche, sans localisation, un pixel contient la moyenne des signaux de plusieurs plans (figure 2.19). Il n'y a pas de sectionnement axial, hormis la pondération des signaux hors-plan de focalisation selon leur étalement en pixels. Ceci peut être problématique dans le cas d'échantillons épais et diffusants, comme par exemple des organoïdes (voir chapitre 3). Pour instaurer un sectionnement axial à l'excitation, une hybridation holographie-OCT consistant en l'utilisation d'une source faiblement incohérente sur le montage holographique a été explorée à la section 1.6.6.

Dans le cadre de notre collaboration avec le centre de recherche interdisciplinaire en biologie dirigé par Marie-Hélène Verlhac, les nanobâtonnets sont injectés dans des ovocytes de souris [9, 11-14]. L'image de viscosité d'un ovocyte sera un apport crucial à l'étude des forces à l'œuvre dans le cytoplasme [15]. En effet, l'activité cytoplasmique lors de la méiose agit comme une organisation multi-échelles dont la viscosité est une grandeur caractéristique. En particulier, la position et les déplacements du noyau de l'ovocyte via les forces exercées par le cytosquelette déterminent les axes de développement de l'embryon dans de nombreux modèles, comme chez la drosophile où l'asymétrie de la migration du noyau est responsable de l'axe dorso-ventral de l'insecte. Dans les ovocytes de mammifères, l'inhibition du centrage

26. $\sigma_{abs}I = \kappa_{eau} \nabla T \ 4\pi r^2$ avec $\nabla T \approx \frac{\Delta T}{r}$, $\kappa_{eau} = 0.6 \text{ W m}^{-1} \text{ K}^{-1}$ et $\sigma_{abs} = 3 \cdot 10^{-11} \text{ cm}^2$ pour un nanobâtonnet d'or homogène de volume $V = 6 \cdot 10^{-22} \text{ m}^3$ [108].

27. Selon le critère de Rayleigh, la résolution latérale vaut $\Delta r = \frac{\lambda}{2ON}$ et la résolution axiale $\Delta z = \frac{2\lambda}{ON^2}$, où n est l'indice de réfraction du milieu et ON l'ouverture numérique.

du noyau conduit à l'échec de la méiose. Par conséquent, l'étude de la viscosité dans les ovocytes de mammifères est essentielle pour aborder la façon dont le gamète femelle acquiert son potentiel de développement.

Le projet est à présent en phase d'essai en milieu biologique en collaboration avec M. Almonacid et M.H. Verlhac. De nouvelles contraintes surviennent : la diffusion optique et les mouvements des constituants cellulaires ajoutent un bruit au signal. Le multiplexage en longueur d'onde présenté sur la figure 1.14 est une stratégie envisagée pour s'en affranchir : si les bâtonnets sont résonants à l'une des longueurs d'onde d'illumination mais pas l'autre, alors le signal acquis à la longueur d'onde hors-résonance ne contient que la diffusion modulée introduite par d'autres mouvements dans la cellule²⁸ et peut être soustrait au signal à résonance [48]. Pour le succès de cette approche, les bâtonnets utilisés doivent être constitués ou recouverts d'un matériau plasmonique comme l'or, sans quoi leur diffusion ne présente pas de résonance particulière (on passerait du spectre de la figure 2.11 à celui de la figure 2.2).

Le bilan des performances des expériences de microrhéologie réalisées dans ce chapitre incite à privilégier l'emploi de nanobâtonnets magnétiques recouverts d'or sous champ tournant pour la suite de ce projet.

28. Information par ailleurs précieuse, comme nous le verrons au chapitre 3.

Deuxième partie

Analyse de front d'onde pour imager les dynamiques intracellulaires

Chapitre 3

Imagerie de phase de dynamiques intracellulaires

Sommaire

3.1	Formalisme	73
3.2	Microscopie à contraste de phase	75
3.2.1	Contraste de phase de Zernike	75
3.2.2	Contraste interférentiel différentiel	77
3.3	Imagerie de phase quantitative par holographie numérique	79
3.4	Imagerie de front d'onde	81
3.4.1	Analyseur de Shack-Hartmann	81
3.4.2	Interféromètre à décalage quadri-latéral (ID4L)	82
3.4.3	Imagerie de front d'onde avec un diffuseur fin (DiPSI)	85
	Principe et effet mémoire	85
	Reconstruction de la phase	86
	Algorithme de recalage non-rigide	87
	Intégration des gradients de phase	88
	Découplage de la phase et de l'intensité	88
	Résolution spatiale et limites de la mesure de phase	90
3.4.4	Conclusion sur le choix de méthode d'imagerie de phase	90
3.5	Microscopie quantitative de phase DiPSI	91
3.5.1	Illumination	91
3.5.2	Réimagerie du diffuseur	92
3.5.3	Traitements de l'image de phase	92
3.6	Imagerie de dynamiques cellulaires par imagerie de front d'onde	94
3.6.1	Contexte biologique	95
3.6.2	Traitement numérique et représentation colorimétrique	96
	Représentation RVB	97
	Représentation TSV	99
	Valeur	100
	Étude du spectre : teinte et saturation	101
3.6.3	Images de dynamiques intracellulaires	103
	Evolution et compartimentation intracellulaires	103
	Dynamiques de cicatrisation	106
3.6.4	Conclusion	107
3.7	Gain en sensibilité de phase par filtrage spatial : qSCAT	108
3.7.1	Modèle théorique	109
	Principe d'amplification du déphasage	109
	Généralisation pour un masque de transmission complexe	110
	Extraction de valeurs quantitatives	111
3.7.2	Simulations	112

Champ complexe	112
Amplification du déphasage mesuré	112
Quantitativité	114
Influence du diamètre du filtre	114
3.7.3 Montage optique	115
3.7.4 Résultats expérimentaux	117
3.8 Conclusion et perspectives de l'imagerie de phase de dynamiques intracellulaires	120

Dans la partie I, nous avons développé une méthode d'imagerie de viscosité intracellulaire basée sur l'utilisation de sondes exogènes et exploitant les avantages propres à l'holographie. Parmi ces derniers, le montage interférométrique nous a permis une détection hétérodyne des mouvements des sondes, donnant accès à de hautes fréquences jusqu'à des dizaines de kHz. De plus, le gain apporté par le terme d'interférence produit avec le faisceau de référence a rendu possible l'imagerie de sondes de taille nanométrique en illumination en champ sombre.

Après l'exploitation des mouvements de ces nanoparticules injectées dans les cellules, nous cherchons maintenant à mesurer **les mouvements intrinsèques des composants cellulaires**. Les dynamiques intracellulaires apportent en effet des informations précieuses sur les processus métaboliques [7] : on peut ainsi étudier une infection virale [109], les mécanismes de dégénérescence rétinienne [110], ou encore la différenciation d'un organoïde [111]. De plus, le développement d'un contraste basé sur ces dynamiques est un moyen de **gagner en sectionnement optique et en spécificité** [112]. C'est d'ailleurs dans le domaine de l'OCT plein champ qu'a émergé ce type de contraste : même en l'absence de modulation du bras de référence, J. Scholler *et al* [111] ont constaté que des signaux modulés apparaissaient, et les ont rapidement attribués aux mouvements propres des organites.

Ce type de contraste est en réalité accessible à toute technique capable de détecter les organites transparents et peu diffusants d'une cellule. La technique doit être de préférence sans marquage afin de limiter tout risque de toxicité et d'altération des phénomènes étudiés. L'imagerie de phase quantitative répond à tous ces critères puisqu'elle est sensible aux faibles déphasages subis par les ondes lumineuses à la traversée de tels échantillons. Basée sur une illumination en transmission, elle fournit des valeurs quantitatives de phase, proportionnelle à la masse sèche [113, 114], ce qui a ouvert la voie notamment à des études de croissance cellulaire [115, 116] et d'identification de l'état du cycle [117] ou du processus de mort cellulaire [118, 119].

Ce chapitre présente l'état de l'art des méthodes d'imagerie de phase, d'abord qualitatives puis quantitatives, avec un attachement particulier à la recherche de solutions facilement transférables aux laboratoires de biologie. Pour cela, nous nous intéressons aux techniques d'imagerie de phase dites *auto-référencées*. Celles-ci ont l'avantage de s'affranchir des contraintes de stabilité et d'encombrement liées à l'interférométrie. En particulier, l'imagerie de front d'onde *DiPSI* [120] a un fort potentiel de dissémination de par la simplicité de son implémentation. Nous présentons ensuite des résultats obtenus avec cette dernière technique associée au traitement numérique permettant une restitution visuelle de la dynamique, initialement proposée pour l'OCT plein champ dynamique [18, 111] afin de produire **des images d'activité intracellulaire**.

Une problématique émerge de ces résultats : la sensibilité de phase accessible limite l'observation aux plus gros organites et donc aux dynamiques les plus lentes. Afin d'y remédier, et d'approfondir les performances de l'imagerie de front d'onde, nous proposons finalement une méthode apportant **un gain en sensibilité de phase** grâce à un filtrage spatial novateur.

3.1 Formalisme

Au préalable, posons les bases du formalisme utilisé tout au long de ce chapitre pour décrire les amplitudes et les déphasages des champs électromagnétiques en jeu lors d'une observation microscopique en transmission.

Comme illustré sur la figure 3.1, considérons un objet semi-transparent imagé à travers un microscope optique en transmission. L'image obtenue correspond à l'interférence entre la lumière incidente non impactée par l'échantillon et celle diffractée par l'échantillon. Cette section définit les champs électromagnétiques associés à chacune des contributions afin d'introduire la notion de contraste de phase.

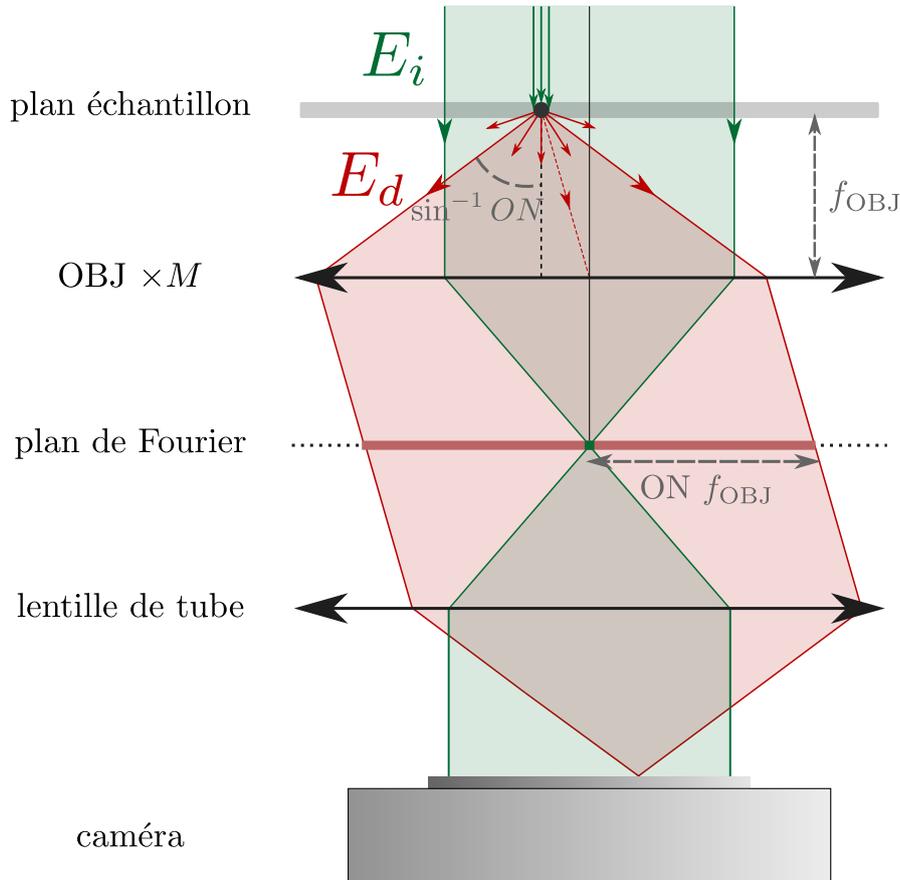


Figure 3.1 – Illustration du plan de l'objectif de microscope de grandissement M et d'ouverture numérique ON , et ses plans focaux avant (échantillon) et arrière (Fourier). Une partie des rayons incidents (en vert, caractérisés par le champ E_i) illumine un objet diffusant dans le plan échantillon. La diffusion (représentée ici isotrope) donne lieu aux rayons représentés en rouge, caractérisés par le champ E_d . Le champ E_d est alors réparti dans la pupille de l'objectif tandis que le champ E_i , en illumination parallèle, est concentré au centre.

Considérons un faisceau incident parallèle à l'axe optique, c'est-à-dire un front d'onde plan. On note E_i le champ électrique scalaire associé. Ce faisceau illumine en transmission le plan objet. Les ondes lumineuses transmises (collectées après interaction avec l'échantillon) sont caractérisées par le champ complexe scalaire E_t . En partant du postulat que l'objet est non-absorbant et faiblement diffusant, on peut écrire que le champ total collecté (ou champ transmis) E_t est la somme des champs incident et diffracté :

$$E_t = E_i + E_d \quad (3.1)$$

D'autre part, dans le cas d'un échantillon faiblement diffractant, le module $|E_d|$ du champ diffusé est largement inférieur à celui du champ incident $|E_i|$. Cette hypothèse permet d'écrire le champ total collecté E_t comme étant simplement égal au champ incident E_i déphasé de $\Delta\varphi$ d'expression :

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda}\delta \quad (3.2)$$

où $\delta = e\Delta n$ est la différence de chemin optique. On a alors :

$$E_t = E_i e^{-i\Delta\varphi} \quad (3.3)$$

En d'autres termes, à la traversée d'une inhomogénéité d'indice optique Δn sur une épaisseur e , les photons du faisceau incident ont accumulé le retard $\tau = \frac{e\Delta n}{c}$ où c est la célérité de la lumière dans le vide [121]. La relation (3.3) est illustrée sur la figure 3.2.

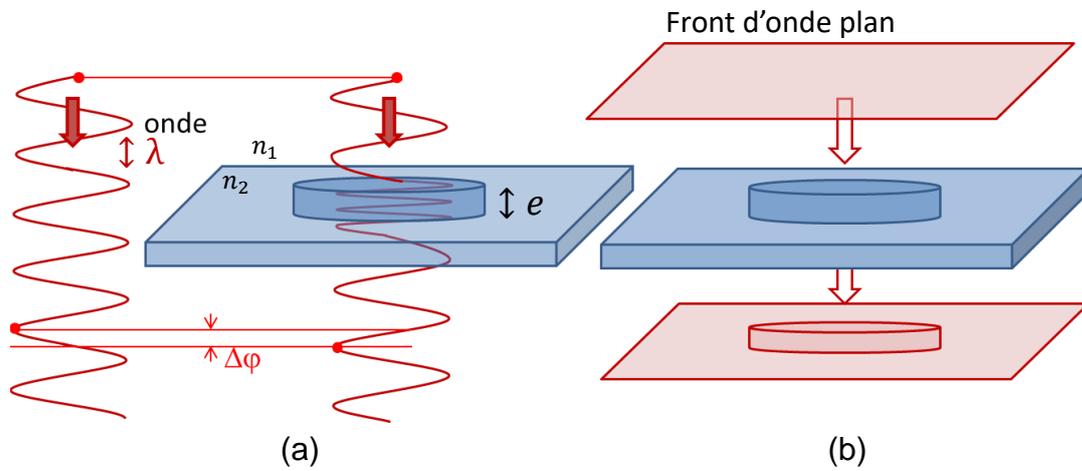


Figure 3.2 – Rappel de la figure 1.2. (a) Le déphasage $\Delta\varphi$ accumulé par une onde de longueur λ traversant une variation d'indice de réfraction $\Delta n = n_2 - n_1$ sur une épaisseur e vaut $\Delta\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} e\Delta n$. (b) La forme des fronts d'onde porte les reliefs associés aux variations d'indice et d'épaisseur de l'objet illuminé.

Les valeurs typiques de déphasages dans les milieux biologiques sont cependant généralement faibles : par exemple, une vésicule de taille 500 nm a une différence d'indice de l'ordre de 10^{-2} par rapport au cytoplasme [122], d'où $\delta = 5$ nm et $\Delta\varphi \approx 0.05$ rad. Sous cette hypothèse de faibles déphasages, E_t peut être approximé par son développement de Taylor au premier ordre en $\Delta\varphi$:

$$E_t = E_i (1 - i\Delta\varphi) \quad (3.4)$$

Par identification avec l'expression (3.1), on peut alors écrire le champ diffusé E_d comme le champ incident E_i atténué de $\Delta\varphi$, et déphasé de $\frac{\pi}{2}$ [121] :

$$E_d = -i\Delta\varphi E_i \quad (3.5)$$

Ce déphasage correspond à une différence de chemin de $\frac{\lambda}{4}$ entre E_d et E_i . L'utilisation de ce formalisme qui suppose la cohérence temporelle des ondes incidente, diffusée et transmise est donc justifié si la longueur de cohérence $L_c \sim \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}$ de la source lumineuse est supérieure à $\frac{\lambda}{4}$, c'est-à-dire si sa largeur de bande $\Delta\lambda$ vérifie la condition (3.6) :

$$\frac{\lambda^2}{\Delta\lambda} > \frac{\lambda}{4} \Leftrightarrow \Delta\lambda < 4\lambda \quad (3.6)$$

Cette condition inclut quasiment tout type de source lumineuse, et sera donc toujours supposée vérifiée¹. La figure 3.3 illustre la conformation des trois champs E_i , E_t et E_d dans l'espace complexe donnée par les équations (3.1), (3.3) et (3.5).

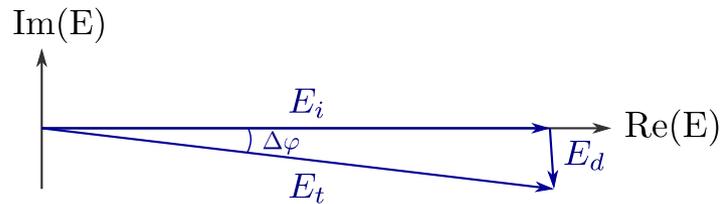


Figure 3.3 – Représentation complexe des champs scalaires incident E_i , diffusé E_d et transmis E_t . Le champ incident est supposé réel car de phase nulle. Le déphasage entre E_d et E_i est proche de $-\frac{\pi}{2}$ d'après l'équation (3.5). Le champ total collecté est la somme des champs incident et diffusé (équation (3.1)) et est environ égal au champ incident déphasé de $\Delta\varphi$ d'après l'équation (3.3).

D'après l'équation (3.4), l'intensité mesurée par un microscope classique vaut $I = |E_t|^2 \approx E_i^2$. L'information sur la phase $\Delta\varphi$ y est perdue². Des stratégies ont du être développées pour rendre l'intensité mesurée dépendante des déphasages. La section suivante présente deux célèbres microscopes à contraste de phase qualitatif, avant de passer à d'autres méthodes quantitatives.

3.2 Microscopie à contraste de phase

En 1953, Frederik "Frits" Zernike fut récompensé par le prix Nobel de physique pour l'invention d'un nouveau type de microscopie permettant de convertir des variations de phase en un contraste d'intensité. De nos jours, ces méthodes d'imagerie sont très répandues dans les laboratoires de biologie cellulaire puisque la plupart des cellules, généralement transparentes, présentent un contraste de phase bien plus important que celui produit naturellement en intensité.

Cette section présente deux dispositifs permettant de traduire en intensité une variation de phase, premièrement dans un microscope doté d'une modification pensée par Zernike, puis dans un autre microscope développé plus tard par Nomarski. Ces remarquables innovations posent d'une part le contexte du contraste de phase, dans la filiation duquel s'inscrivent nos travaux sur l'imagerie de phase quantitative présentés plus loin. D'autre part, ils constituent ainsi la base d'un des concepts de filtrage en phase dans le plan de Fourier, sur lequel nous nous appuyerons en section 3.7 afin d'améliorer contraste et sensibilité de nos images de phase.

3.2.1 Contraste de phase de Zernike

L'idée de base de F. Zernike [123, 124] est d'agir sur la lumière incidente non diffusée par l'objet (caractérisée par le champ E_i selon l'équation (3.1), avec $E_i = |E_i|$ en illumination parallèle) afin d'une part de la faire interférer avec la lumière diffusée (caractérisée par E_d), et d'autre part de l'atténuer pour amplifier le contraste venant des déphasages.

Dans le plan de Fourier, la distribution en fréquences spatiales correspondant au champ de l'expression (3.4) est la suivante :

$$\widetilde{E}_t(k_x, k_y) = |E_i|(\delta(k_x, k_y) - i\Delta\varphi\widetilde{\varphi}(k_x, k_y)) \quad (3.7)$$

1. Y compris en cas de grande valeur de déphasage compromettant les relations (3.4) et (3.5).

2. Notons que pour un échantillon transparent, des modulations d'intensité peuvent être tout de même visibles si l'échantillon induit localement des gradients de phase supérieurs à l'ouverture numérique de collection.

Dans l'expression (3.7), le delta de Dirac du premier terme correspond aux fréquences spatiales nulles et traduit l'hypothèse d'illumination en onde plane parallèle à l'axe optique.

Un filtre spatial de faible diamètre peut alors être placé à l'origine ($k_x = 0, k_y = 0$) du plan de Fourier (au niveau du plan focal arrière de l'objectif) de manière à affecter principalement le champ incident. Ce filtre possède un faible facteur de transmission t_0 et induit un déphasage de $\frac{\pi}{2}$ ³. En considérant que la présence du filtre n'altère pas les fréquences spatiales de l'objet, l'expression du champ dans le plan de Fourier devient par conséquent :

$$\widetilde{E}_t'(k_x, k_y) = i|E_i|(t_0\delta(k_x, k_y) - \Delta\varphi(k_x, k_y)) \quad (3.8)$$

Le champ correspondant dans l'espace des positions s'écrit :

$$E_t'(x, y) = i|E_i|(t_0 - \Delta\varphi(x, y)) \quad (3.9)$$

A l'ordre 1 en $\Delta\varphi(x, y)$, l'intensité mesurée vaut alors :

$$\begin{aligned} I'(x, y) &= |E_t'(x, y)|^2 \\ &\approx (t_0|E_i|)^2 \left(1 - \frac{2\Delta\varphi}{t_0}\right) \end{aligned} \quad (3.10)$$

Alors que le terme $\Delta\varphi$ était évidemment absent de l'intensité, il est présent dans l'expression de I' . L'intensité mesurée fait donc apparaître un contraste de phase, d'autant plus grand que la transmission t_0 du champ incident est faible.

En représentation complexe, l'action du déphasage du filtre de Zernike change la configuration des champs incident, diffracté et transmis de la figure 3.4a en celle de la figure 3.4b. En présence du facteur d'atténuation t_0 appliqué à E_i , on obtient la figure 3.4c.

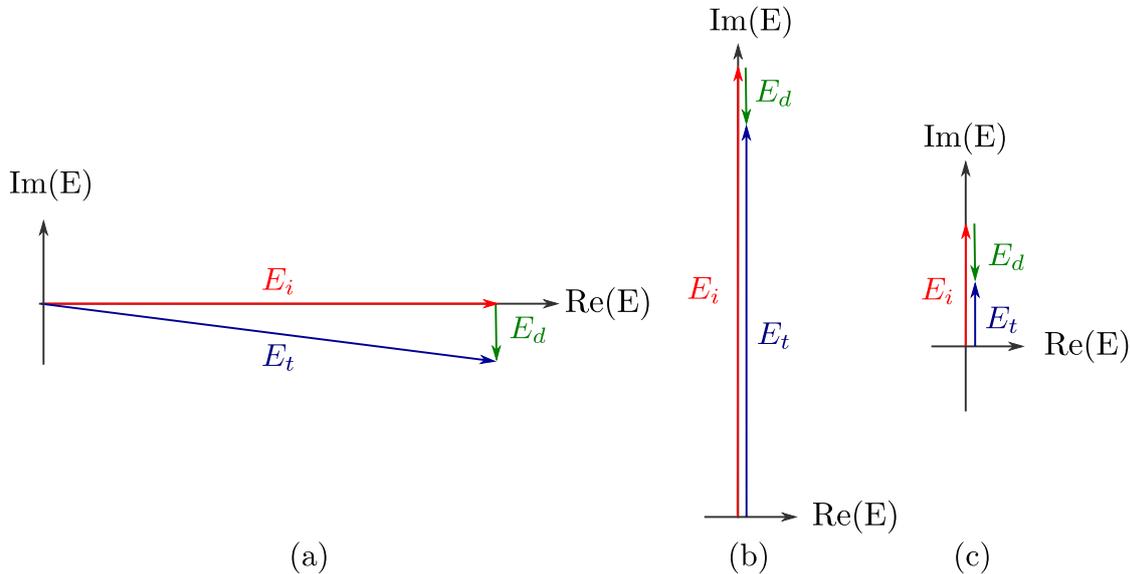


Figure 3.4 – Représentation des champs incident, diffracté et transmis en représentation complexe d'après la figure 3.3. (a) Sans filtre de Zernike. (b) Avec déphasage $+\frac{\pi}{2}$ de E_i : les champs E_i et E_d sont maintenant tous deux imaginaires purs, et la contribution de E_d à l'intensité $I = |E_i + E_d|^2$ est ainsi maximisée. (c) Avec déphasage et atténuation de E_i : le module de E_d n'est plus négligeable devant E_i : le contraste de la phase portée par E_d est amplifié.

3. Son épaisseur e et son indice optique n vérifient $n(e) = n_{air} + \frac{\pi}{2} \frac{\lambda}{2\pi e} = n_{air} + \frac{\lambda}{4e}$. On parle de lame quart d'onde.

En pratique, les microscopes à contraste de phase de Zernike utilisent une illumination et un filtre annulaires afin de ne pas atténuer les basses fréquences spatiales de l'objet (voir figure 3.5a). La démonstration précédente est alors valide en remplaçant le delta de Dirac central par une distribution en anneau, idéalement de rayon supérieur à la taille de la distribution en fréquences spatiales $\frac{2\pi}{k_{x,y}}$ de l'objet. Il est à noter également que des lames de phase utilisées doivent être achromatiques, sauf à se restreindre à l'utilisation de lumière monochromatique.

Un exemple d'image de cellule imagée par ce type de méthode est présenté sur la figure 3.7b. Celle-ci bénéficie d'un fort gain en contraste par rapport à l'image d'intensité en fond clair (voir figure 3.7a). On remarque cependant que l'image est dégradée par des artefacts sous forme de halo autour des structures. C'est pourquoi un autre microscope de phase, basé sur un contraste interférentiel différentiel, est davantage utilisé en imagerie cellulaire.

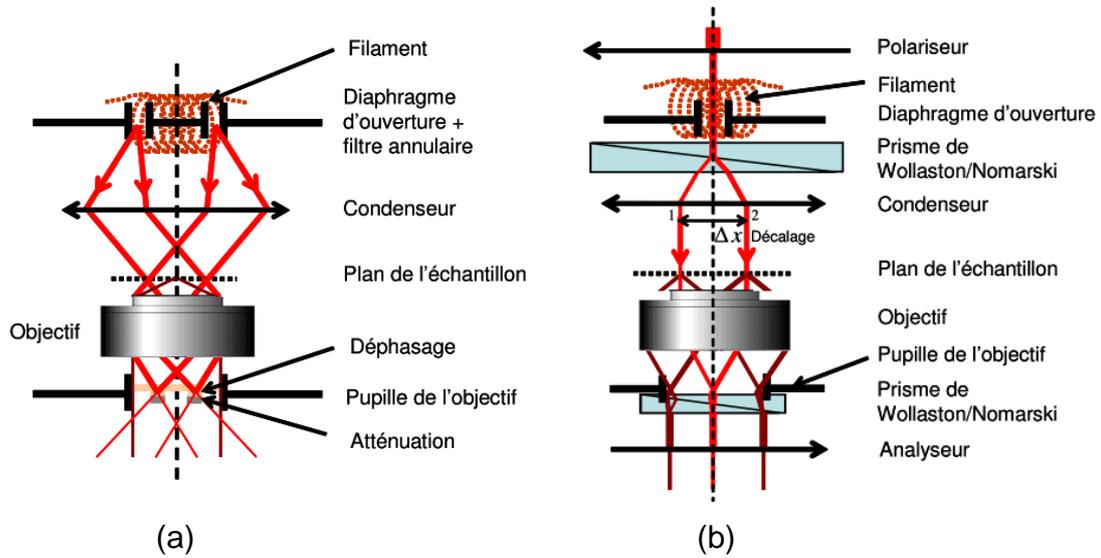


Figure 3.5 – Illustrations schématiques des microscopes à contraste de phase (a) de Zernike et (b) interférentiel différentiel, tirées de [125].

3.2.2 Contraste interférentiel différentiel

Cette autre méthode, développée par Georges Nomarski dans les années 1950 [126], est sensible non pas directement à la phase, mais à son gradient dans une direction donnée, et supporte de ce fait de plus grands déphasages que le microscope de Zernike.

Comme schématisé sur la figure 3.5b, le microscope fonctionne avec une source de lumière incohérente polarisée rectilignement. Un bi-prisme biréfringent (de Wollaston ou de Nomarski) sépare angulairement le faisceau incident en deux composantes de polarisation orthogonales, qui sont ensuite envoyées parallèlement sur l'échantillon avec un faible décalage latéral Δx de l'ordre de 100 nm. Cet ordre de grandeur est inférieur à la longueur de cohérence $L_c \sim \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}$ typique d'une source de longueur d'onde centrale λ , même pour une source à large bande $\Delta\lambda$. Ainsi, après recombinaison des faisceaux par un deuxième bi-prisme puis projection de leurs composantes sur un même analyseur, des interférences entre les deux composantes sont possibles. En effet, en notant $E_{t,1}$ et $E_{t,2}$ les champs électriques transmis de chaque composante après le deuxième prisme, l'intensité I mesurée vaut :

$$\begin{aligned} I &= |E_{t,1} + E_{t,2}|^2 \\ &= 2I_t + 2I_t \cos\left(\frac{2\pi}{\lambda}\delta\right) \\ &= 4I_t \cos^2\left(\frac{\pi}{\lambda}\delta\right) \end{aligned} \quad (3.11)$$

où I_t est l'intensité lumineuse transmise par chacun des deux faisceaux ($I_t \approx \frac{I_i}{2}$ pour un échantillon transparent), δ est leur différence de chemin, et λ la longueur d'onde. C'est donc la composante suivant x du gradient du déphasage, proportionnelle à la différence de chemin δ mesurée sur la largeur Δx , qui conditionne la valeur d'intensité mesurée. L'interférence entre deux rayons déphasés différemment par leur point d'impact respectif sur l'échantillon produit de cette manière un contraste d'intensité artificiel qui évoque visuellement un effet de relief, comme illustré sur la figure 3.6.

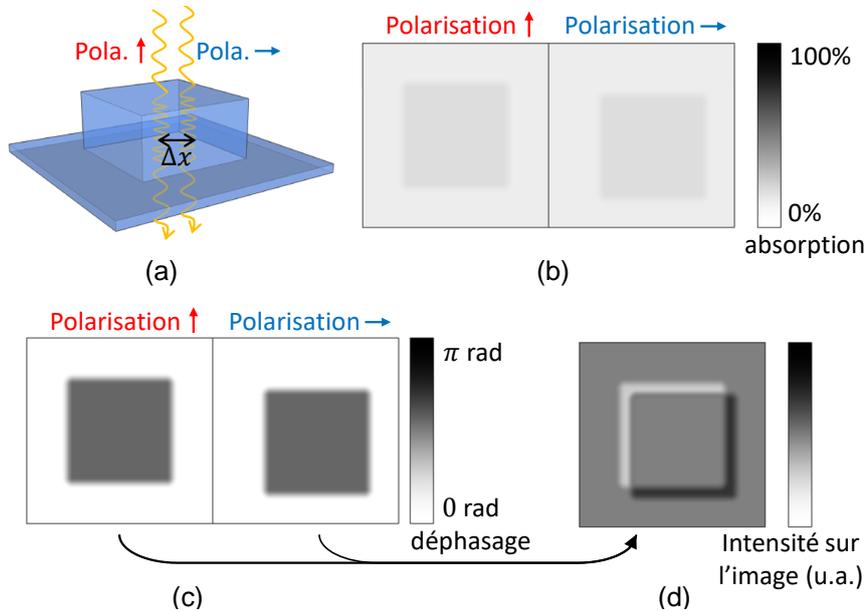


Figure 3.6 – Origine du relief observé en microscopie à contraste interférentiel différentiel. (a) Un objet transparent est illuminé par deux faisceaux de polarisations orthogonales décalés d'une faible distance Δx . (b) L'objet étant transparent, les images qu'ils produisent en intensité ne présentent quasiment aucun contraste. (c) Mais les deux faisceaux sont déphasés par l'objet. En les faisant interférer par rééquilibrage de leurs polarisations, (d) des reliefs sont créés dans la direction du décalage entre les faisceaux. *Adapté de Wikipédia.*

La figure 3.7c montre un exemple d'une telle image de cellule présentant un faible contraste en imagerie d'intensité (figure 3.7a). L'effet de halo de la figure 3.7b n'est plus présent. Cependant, la mesure étant relative aux gradients de phase selon la direction x des prismes de Wollaston, il faut noter que l'ombre qui apparaît dans cette direction pour créer l'effet de relief est artificielle. Mais surtout, ces méthodes produisent des images de variations d'intensité qui peuvent être causées par des variations de phase ou par des variations d'intensité (inhomogénéité de l'illumination, mais aussi de l'absorption ou de la diffusion par l'échantillon), sans qu'il soit possible de les distinguer.

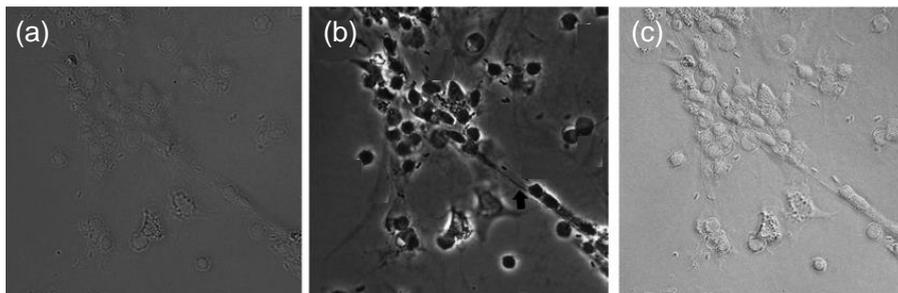


Figure 3.7 – Cellules d'un caillot sanguin imagées en (a) intensité plein champ, (b) contraste de phase de Zernike, (c) contraste interférentiel différentiel. [127]

3.3 Imagerie de phase quantitative par holographie numérique

Les méthodes présentées dans la section précédente ne sont donc pas quantitatives : le contraste de l'image représente uniquement des variations *qualitatives* de phase, mêlant information de phase et d'intensité. **Accéder à une valeur quantitative de la phase est crucial**, en particulier en imagerie biologique où l'intégrale de la phase sur le volume d'une cellule est proportionnelle à la quantité de matière sèche la constituant [113, 114]. En effet, le déphasage est proportionnel à l'indice optique, lui-même lié au nombre d'électrons et donc de protons. Donc une différence d'indice par rapport à l'eau indique la masse sèche du specimen. La mesure de cette densité permet en particulier l'étude de l'évolution de la croissance des cellules [115] qui, en fabriquant ou recrutant des espèces chimiques nouvelles, ont une masse sèche qui varie au cours du temps et traduit la nature des mécanismes du maintien du volume cellulaire : une croissance non linéaire est par exemple la signature d'activités régulatrices actives [116].

Pour cela, certaines approches permettent une imagerie semi-quantitative issue d'une hybridation intensité-phase, par exemple en associant la méthode du contraste interférentiel différentiel à un décalage de phase [128] ou à un algorithme de minimisation d'erreur [129], ou encore en établissant une proportionnalité entre la distribution en fréquences spatiales de l'illumination et la phase [130].

Cependant, pour accéder à une véritable mesure quantitative, **la phase et l'intensité de l'onde transmise doivent être découplées**. Parmi les méthodes quantitatives en phase, la microscopie holographique numérique est une puissante solution [131-134] : comme vu au chapitre 1, une imagerie de l'amplitude et de la phase du champ électromagnétique est possible en faisant interférer ce champ avec une onde de référence.

Tandis que les travaux présentés aux chapitres 1 et 2 exploitent une configuration en champ sombre pour des mesures intracellulaires exogènes, des montages holographiques (hors axe ou à décalage de phase) avec une illumination en transmission sont très répandus en microscopie pour l'imagerie de phase quantitative [135, 136].

Un tel montage est schématisé sur la figure 3.8a. Seule l'illumination, ici en transmission, diffère du montage utilisé aux chapitres 1 et 2. De ce fait, la reconstruction holographique s'opère comme décrit au chapitre 1 : l'hologramme (figure 3.8c) est la figure d'interférences entre le champ transmis à travers l'échantillon et le faisceau de référence. En configuration hors axe, sa transformée de Fourier spatiale (figure 3.8d) permet de distinguer les trois ordres d'interférence et d'isoler l'ordre +1 proportionnel au champ complexe diffusé par l'échantillon. En effet, les deux faisceaux d'illumination étant hautement cohérents puisque issus d'une même source laser, seuls les déphasages provoqués par l'échantillon sont conservés après filtrage et centrage numérique de l'ordre +1 (voir section 1.3.1).

L'argument de cette quantité complexe, après transformation de Fourier spatiale inverse, constitue l'image de phase quantitative (figure 3.8e). Les déphasages supérieurs en valeur absolue à π sont repliés dans l'intervalle $[-\pi; \pi]$ mais de nombreux algorithmes dits "de dépliement" permettent de reconstruire une image de phase continue [137, 138]. Indépendamment, l'image d'intensité peut aussi être reconstruite simplement à partir de l'amplitude au carré.

L'holographie est également célèbre pour l'imagerie 3D. Cependant, un hologramme résulte d'une projection de l'objet selon un seul angle d'illumination, donc la résolution de la reconstruction tridimensionnelle reste très limitée par la faible quantité de fréquences spatiales rendues accessibles dans l'espace de Fourier. Les informations d'indice et d'épaisseur sont couplées dans la phase mesurée $\varphi \propto \int n dz$, sans qu'il soit possible de discriminer laquelle des grandeurs n ou z est responsable des variations de phase mesurées. La dimension axiale des

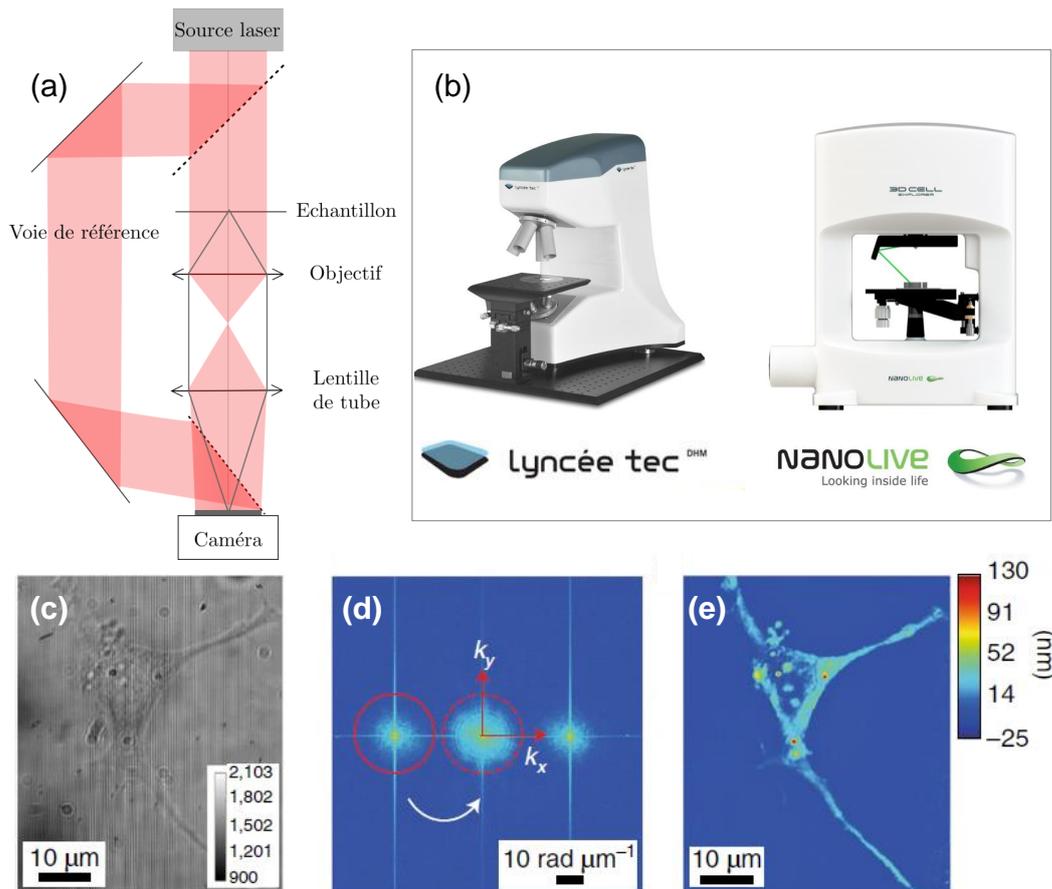


Figure 3.8 – (a) Schéma d'un montage holographique en transmission. (b) Microscopes holographiques industriels (standard à gauche, tomographique à droite). (c,d,e) Hologramme dans l'espace réel (c), dans l'espace des fréquences spatiales (d), et image de phase quantitative reconstruite (e) [116].

images holographiques ne provient que des considérations établies sur le système pour simuler la propagation ondulatoire (voir section 1.3.2) et va généralement reposer sur l'hypothèse assez restrictive d'un indice homogène. Pour produire une réelle exploration en 3D de haute résolution, aussi bien latéralement qu'axialement, il faut alors combiner des prises de vues acquises sous plusieurs angles (par rotation de l'échantillon [139-142] et/ou en variant l'angle d'illumination [143, 144]), afin d'étendre le support de fréquences accessibles dans les trois directions k_x , k_y et k_z . On parle alors de tomographie holographique ou diffractive [145-147]. Le "sectionnement" axial ainsi obtenu numériquement permet alors de découpler épaisseur (z) et indice de réfraction (n). La tomographie holographique est donc une puissante méthode permettant d'obtenir une vraie microscopie 3D d'indice.

La mesure de phase est cependant généralement limitée par les vibrations et dérives du bras de référence, ainsi que par des artefacts de cohérence expliqués en section 1.6.6. Ces derniers rendent par ailleurs la méthode difficilement compatible avec des échantillons épais diffusants. En pratique, la nécessité d'un bras de référence et d'une illumination cohérente temporellement (laser ou diode laser) impose la plupart du temps de disposer d'un microscope dédié. Des microscopes holographiques industriels clé en main sont d'ailleurs répandus (voir figure 3.8b). Quoique adeptes de l'holographie, force nous est de reconnaître qu'elle impose des contraintes instrumentales qui ne sont pas toujours compatibles avec des environnements exigeants, ou avec l'intégration d'une mesure multimodale (fluorescence, Raman, microscopie non-linéaire...).

3.4 Imagerie de front d'onde

Ces dernières années ont vu l'émergence de nombreuses techniques de microscopie de phase quantitatives dites "auto-référencées". En plus de **s'affranchir des contraintes de stabilité liées à l'interférométrie**, certaines de ces techniques sont **facilement implémentables** sur des microscopes conventionnels qui peuvent alors être utilisés de façon multimodale.

Par exemple, les méthodes basées sur l'équation du transport de l'intensité retrouvent la phase à partir de deux images d'intensité prises dans deux plans z différents en exploitant des considérations de propagation du spectre angulaire [148], comme expliqué à la section 1.10 du chapitre 1. Une autre approche, la ptychographie, remonte à la valeur de phase à partir des recouvrements de figures d'intensité obtenues avec différents angles d'illumination [149]. L'idée du contraste de Zernike a également été déclinée dans une version quantitative, en produisant le déphasage des faisceaux incidents non diffusés non pas avec un filtre, mais avec un modulateur spatial de lumière (SLM) [150]. Dans un montage similaire, une spirale de phase en rotation créée par le SLM dans le plan de Fourier atténue les faisceaux incidents mais produit aussi un gradient de phase entre les rayons diffusés pour accentuer le contraste [151].

Ces techniques agissent sur la lumière uniquement en sortie du microscope, ce qui est un véritable atout pour en faire des outils versatiles. Cependant, elles reposent toutes soit sur une acquisition séquentielle d'images, soit sur une ingénierie de l'illumination.

Pour notre application d'imagerie de dynamiques, nous nous intéressons dans ce chapitre à une catégorie de techniques auto-référencées qui permet de **cartographier la phase quantitativement en une seule prise d'image** : l'analyse de front d'onde. Celle-ci repose simplement sur l'ajout d'un masque de phase et/ou d'amplitude à quelques millimètres en amont d'une caméra. L'imagerie de phase quantitative peut donc simplement être mise en place en plaçant ces "caméras de phase" sur le port de sortie d'un microscope conventionnel. Ces méthodes ont de plus l'avantage de **s'affranchir de la nécessité d'une illumination cohérente temporellement** et peuvent directement exploiter l'illumination native large bande des microscopes (source halogène associée à un éclairage Köhler, par exemple). Trois méthodes d'analyse de front d'onde sont présentées dans cette section.

3.4.1 Analyseur de Shack-Hartmann

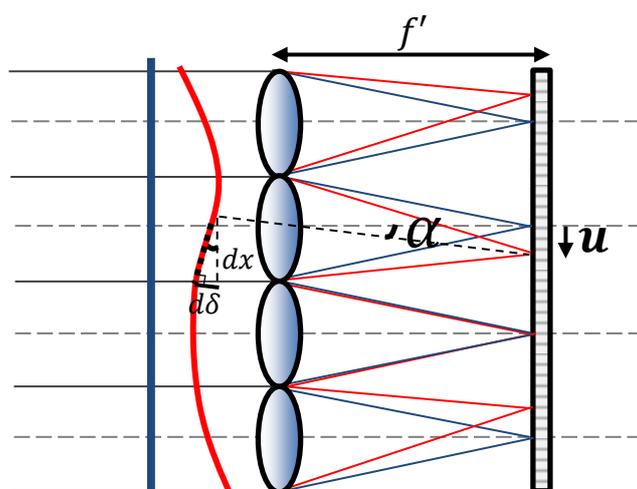


Figure 3.9 – Schéma de principe de l'analyseur de Shack-Hartmann. Le front d'onde incident est échantillonné par des micro-lentilles. Un front d'onde plan (bleu) se focalise en plusieurs points du détecteur, sur l'axe optique de chaque micro-lentille. Les points d'un front d'onde déformé (rouge) se focalisent avec un décalage u proportionnel au gradient transverse de la différence de chemin optique δ (dans l'approximation des petits angles de déformation α).

L'analyseur de front d'onde le plus répandu est celui de Shack-Hartmann [152]. Il consiste en une matrice de micro-lentilles placée à distance focale f' du détecteur. Le front d'onde est alors échantillonné par cette matrice, et selon sa pente locale, le point focal de chaque lentille est translaté différemment sur le détecteur. En notant α l'angle associé à cette déviation par rapport à l'axe optique (voir figure 3.9), le déplacement u entre ce point focal et le centre de la lentille vaut $f' \tan \alpha$. D'autre part, on note $d\delta$ la différence de marche entre la portion du front d'onde déformé concernée, approximée par un segment, et un front d'onde plan. Le module de la composante transverse du gradient de différence de marche δ , $\nabla_{\perp} \delta$, vaut $\sin \alpha$. Dans l'approximation des petits angles $\alpha \approx \sin \alpha \approx \tan \alpha$, on a donc :

$$\nabla_{\perp} \delta \equiv \frac{\nabla_{\perp} \varphi}{k_0} \approx \frac{u}{f'} \quad (3.12)$$

où φ est la phase dans le macropixel délimité par la lentille et k_0 est le module du vecteur d'onde d'illumination. Une intégration bidimensionnelle des gradients de phase permet finalement de remonter à la carte de phase quantitative.

La méthode *LIFT* [153] permet de calculer des modes de déformation d'ordres supérieurs à la simple pente locale moyenne sur le macropixel, grâce à l'ajout d'un astigmatisme de valeur contrôlée aux micro-lentilles. Ainsi, cette méthode d'analyse est très efficace pour mesurer des aberrations optiques. Cependant, comme le nombre de pixels de phase est limité par le nombre de micro-lentilles, soit quelques centaines en pratique, la "définition" de ce type d'analyseur est trop faible pour pouvoir être appliquée en imagerie. Pour cette raison, des techniques se prêtant à une augmentation du nombre de pixels de phase accessibles ont été développées.

3.4.2 Interféromètre à décalage quadri-latéral (ID4L)

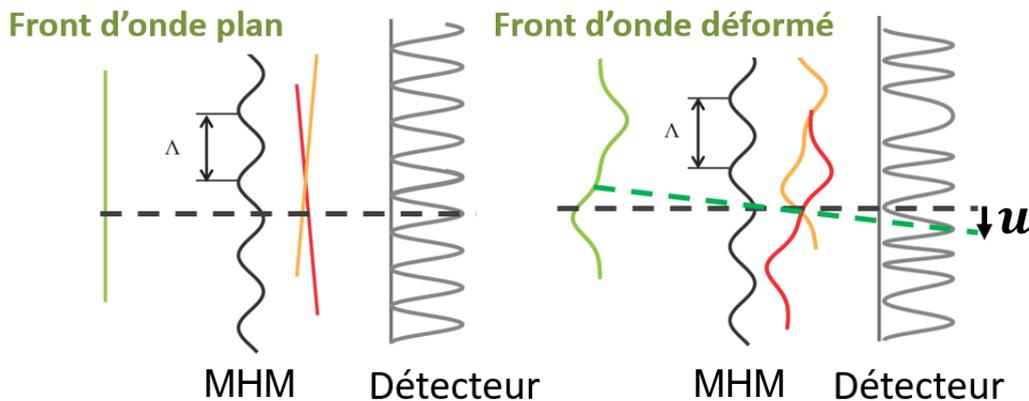


Figure 3.10 – Schéma de principe unidimensionnel de l'interféromètre à décalage quadri-latéral. La diffraction d'un front d'onde plan par un Masque de Hartmann Modifié (MHM), produit 4 répliques du front d'onde incident (deux situées dans le plan de la figure, et deux autres perpendiculairement). Après quelques millimètres de propagation, une figure d'interférences entre ces répliques est imagée. La déformation du front d'onde provoque des déplacements locaux u de la figure d'interférences qui vérifient l'équation (3.12).

En 1995, Primot *et al* proposèrent l'analyse de front d'onde par interférométrie à décalage quadri-latéral (ID4L) [154] notamment pour répondre aux limitations en termes de dynamique et de définition (nombre de pixels de phase) de l'analyseur de Shack-Hartmann. Le principe de cet analyseur, désormais commercialisé par l'entreprise Phasics, repose sur la mesure d'interférences entre 4 répliques légèrement inclinés du front d'onde incident (voir figure 3.10). En théorie, ces répliques pourraient être générés par un réseau de diffraction bidimensionnel de transmittance sinusoïdale.

En pratique, la réalisation d'un tel réseau est extrêmement complexe. Un *Masque de Hartmann Modifié*, schématisé sur la figure 3.11, permet cependant d'approcher une transmittance sinusoïdale : celui-ci consiste en la superposition d'un masque de Hartmann (réseau d'amplitude de période Λ) et d'un damier induisant des déphasages 0 ou π (réseau de phase de période 2Λ) [155].

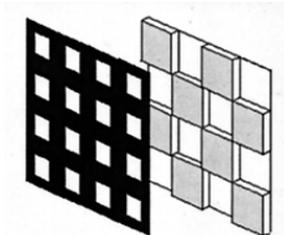


Figure 3.11 – Illustration schématique du Masque de Hartmann Modifié (MHM), composé d'un réseau d'amplitude (à gauche) superposé à un damier de déphasages $\{0, \pi\}$ (à droite). *Source* : [156]

La diffraction par ce masque génère ainsi quatre répliques de l'onde qui correspondent aux ordres $+1$ et -1 de diffraction dans les deux directions x et y . Ces ondes diffractées, légèrement inclinées, accumulent lors de leur propagation une différence de marche inférieure à la longueur de cohérence de la source lumineuse. Elles interfèrent après une distance de propagation d sur le détecteur. Une déformation du front d'onde caractérisée par la distribution de différence de chemin $\delta(x, y)$ décale localement la projection de chacun des quatre motifs (voir figure 3.10) d'une distance $u_{\pm x, y} = \pm d \nabla_{x, y} \delta$ de façon analogue à l'équation (3.12) établie pour l'analyseur de Shack-Hartmann (en y remplaçant f' par d). Le calcul de ces déplacements se fait par rapport à un interférogramme de référence que l'on acquiert en l'absence d'objet, en utilisant donc uniquement le front d'onde d'illumination et les éventuelles aberrations du montage (voir figure 3.12). Les gradients de phase dans les directions x et y sont calculés par la phase de la combinaison des ordres $+1$ d'interférences des interférogrammes, sélectionnés par transformation de Fourier numérique (voir figure 3.12b), et multipliés par le facteur $\frac{2\pi d}{\Lambda}$. La carte des déphasages $\varphi(x, y)$ est enfin déduite d'une intégration bidimensionnelle (voir figure 3.12d). En parallèle, l'image d'intensité peut également être calculée en appliquant simplement un filtre passe-bas à l'interférogramme objet (sélection de l'ordre 0 d'interférence sur la transformée de Fourier numérique), ou en le normalisant par l'interférogramme de référence (voir figure 3.12c).

Tandis que dans l'analyseur de Shack-Hartmann la distance d est fixée par la focale f' des microlentilles, elle peut ici être ajustée de manière à optimiser la sensibilité de phase déterminée par le ratio $\frac{\Lambda}{d}$. De plus, le grand nombre de points de mesure fournis par le Masque de Hartmann Modifié MHM (typiquement 3×3 pixels caméra pour un pixel de phase, soit plus petit d'environ un ordre de grandeur qu'un Shack-Hartmann) permet une utilisation en imagerie. On parle alors d'*imageur* de front d'onde.

Il est également à noter que la méthode est essentiellement achromatique. Cette propriété de l'ID4L provient de la compensation des effets chromatiques de la diffraction par le réseau, proportionnels à λ , par les effets du processus d'interférence, proportionnels à $\frac{1}{\lambda}$. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour une utilisation en microscopie dans la mesure où une source temporellement incohérente telle que la lumière blanche du microscope peut être utilisée pour l'illumination. En 2009, P. Bon *et al* [155] démontrèrent le fort potentiel de cette technique pour la mesure de phase quantitative en microscopie optique. L'inconvénient principal de cette technique est qu'elle nécessite la fabrication lithographique d'un masque de phase et d'amplitude dédié avec une précision nanométrique (masque de Hartmann modifié), ce qui entrave considérablement la diffusion de la technique.

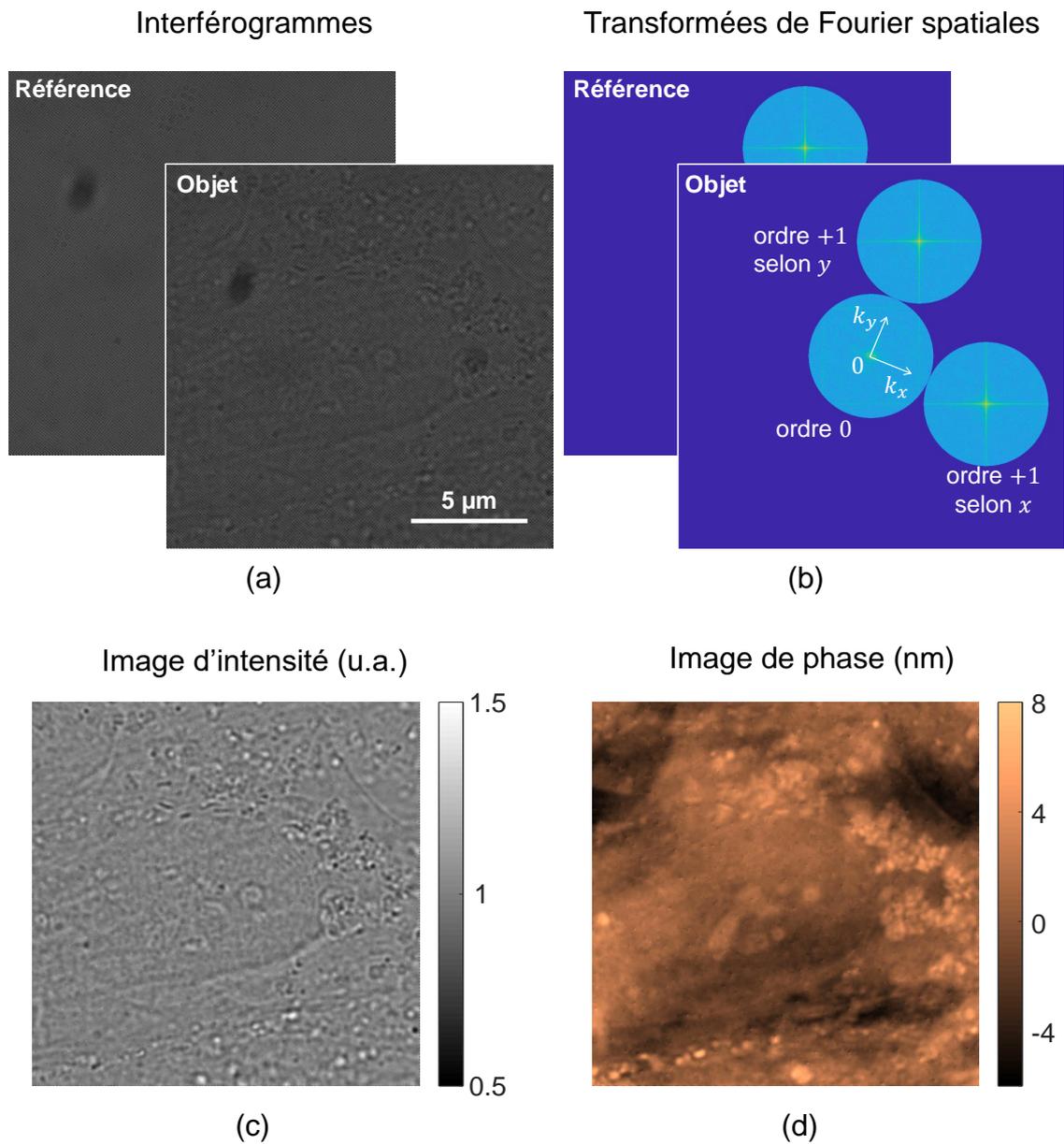


Figure 3.12 – Résultats acquis avec une adaptation d'un ID4L mise en place par B. Rogez, sur une cellule de Müller (cellule rétinienne de grande taille, voir section 3.6) avec une longueur d'onde $\lambda = 450 \text{ nm}$ et un objectif $\times 100$, $\text{ON}=1.4$. Le masque utilisé ici est un réseau de diffraction de période $\Lambda = 20 \mu\text{m}$ à $d = 0.5 \text{ mm}$ du plan image, dont les ordres de diffraction 0 et supérieurs à ± 1 sont bloqués par un diaphragme et une pastille opaque dans un plan de Fourier du montage. (a) Interférogrammes de référence (pris dans une zone de l'échantillon sans cellule) et objet. (b) Transformées de Fourier spatiales numériques des interférogrammes, sur lesquelles sont sélectionnés les ordres ± 1 d'interférence dans les deux directions x et y . (c) Image d'intensité, obtenue par division des interférogrammes ou filtrage passe-bas de l'interférogramme objet. (d) Image des différences de marche $\delta = \frac{\lambda}{2\pi}\varphi$ calculée par intégration des gradients de phase déduits des transformées de Fourier des interférogrammes [155].

3.4.3 Imagerie de front d'onde avec un diffuseur fin (DiPSI)

En 2017, P. Berto, H. Rigneault et M. Guillon proposèrent une méthode d'imagerie de front d'onde qui a l'avantage de s'affranchir d'une fabrication lithographique et utilise uniquement des composants disponibles "sur l'étagère". La méthode, appelée DiPSI pour "Diffuser Phase Sensing and Imaging", utilise comme masque de phase **un simple diffuseur fin** placé à faible distance d de la caméra [120]. Le principe de la méthode repose sur l'*effet mémoire* des diffuseurs.

Principe et effet mémoire

Une propriété remarquable d'un milieu diffusant est que, malgré le caractère aléatoire du milieu, l'information de phase d'une onde cohérente le traversant n'est pas perdue. En effet, considérons un front d'onde plan illuminant un diffuseur (figure 3.13a). Après propagation de l'onde, on observe un patron de *speckle*⁴, c'est-à-dire une figure d'interférence aléatoire. Supposons maintenant que ce front d'onde est incliné d'un angle α . Pour une certaine gamme angulaire, on observe la même figure de speckle, simplement translatée (figure 3.13b). Cette conservation du motif de speckle porte le nom d'effet mémoire angulaire [157]. Si cet angle est appliqué à une partie du front d'onde seulement, c'est-à-dire si le front d'onde est déformé localement, une partie correspondante du motif de speckle est localement décalée. Ainsi, la figure de speckle produite par la diffusion de l'onde, aussi arbitraire puisse-t-elle sembler, porte la signature du front d'onde. Dans le cas des diffuseurs fins ou surfaciques, cette gamme angulaire est infinie, et le speckle reste corrélé quel que soit l'angle d'inclinaison. La technique DiPSI consiste à (i) mesurer un speckle de référence obtenu par illumination par une onde plane et (ii) estimer les pentes locales du front d'onde distordu via la mesure de la translation locale u des grains de speckle [158] (voir figure 3.13c). De la même manière que pour l'analyseur de Shack-Hartmann et l'ID4L, la matrice u qui cartographie ces déplacements locaux est proportionnelle aux gradients de phase via l'équation :

$$\nabla_{\perp} \delta \equiv \frac{\nabla_{\perp} \varphi}{k_0} \approx \frac{u}{d} \quad (3.13)$$

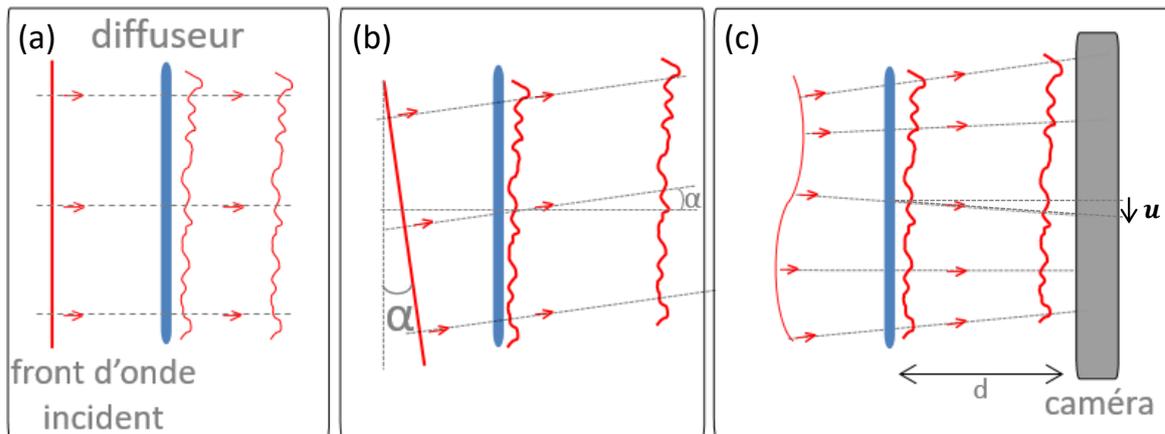


Figure 3.13 – (a) La diffusion d'une onde plane résulte en un motif de speckle caractéristique du diffuseur. (b) Une inclinaison d'un angle α du front d'onde produit un décalage du même angle du motif de speckle : c'est l'effet mémoire. (c) Plus généralement, les déformations du front d'onde se traduisent par des décalages locaux des grains de speckle. La carte des déformations du speckle par rapport à celui obtenu avec le front d'onde plan est la matrice u , comme pour l'analyseur de Shack-Hartmann (figure 3.9) et l'ID4L (figure 3.10).

4. Dont le nom français *tavelures* est peu utilisé.

L'utilisation de l'appellation *speckle* pour désigner le patron de diffusion que l'on observe nécessite d'être discutée. En effet, le diffuseur surfacique utilisé ici (Edmund Optics, York, Royaume-Uni) a un angle de diffusion caractéristique $\theta = 1^\circ$. Un tel diffuseur, après quelques millimètres de propagation (typiquement $d = 1.3 \text{ mm}$), formera une caustique (voir figure 3.14). Cette figure d'intensité rappelle celles observées typiquement au fond d'une piscine, qui sont induites par la réfraction par la surface de l'eau. Ainsi, à faible distance (typiquement $d < 2 \text{ mm}$), le système travaille dans un régime réfractif proche de l'analyseur de Shack-Hartmann : le diffuseur peut être perçu comme un vaste ensemble de micro-lentilles fortement aberrantes et de répartition aléatoire. Contrairement au Shack-Hartmann, chaque région du motif porte ici une signature aléatoire unique de distribution d'intensité qui permet de lever toute ambiguïté par rapport à ses voisins. Si on augmente la distance d , alors la quantité d'interférences augmente et la distribution tend vers une distribution de Rayleigh : on peut alors parler de speckle sans abus de langage (voir figure 3.14).

Sur la figure 3.14, on peut remarquer que les images de speckle, pourtant acquises en lumière blanche, restent fortement contrastées. Dans ce régime de Fresnel, les patrons de speckle restent en effet fortement corrélés lorsque l'on change la longueur d'onde. Cela est dû à un effet mémoire chromato-axial, récemment identifié par M. Guillon [159]. Cette caractéristique implique que la figure de speckle reste identique tant que l'on garde constant le produit λd . Dans notre cas, en travaillant avec des petits angles de diffusion (typiquement $\theta = 1^\circ$), la longueur de Rayleigh des grains de speckle est plutôt élevée, et produit donc des figures de speckle particulièrement corrélées en longueur d'onde jusqu'à une distance d d'environ 1 cm pour une largeur de bande de typiquement $\Delta\lambda = 100 \text{ nm}$. L'illumination native d'un microscope peut donc être utilisée, à condition que la distance d soit assez faible [120].

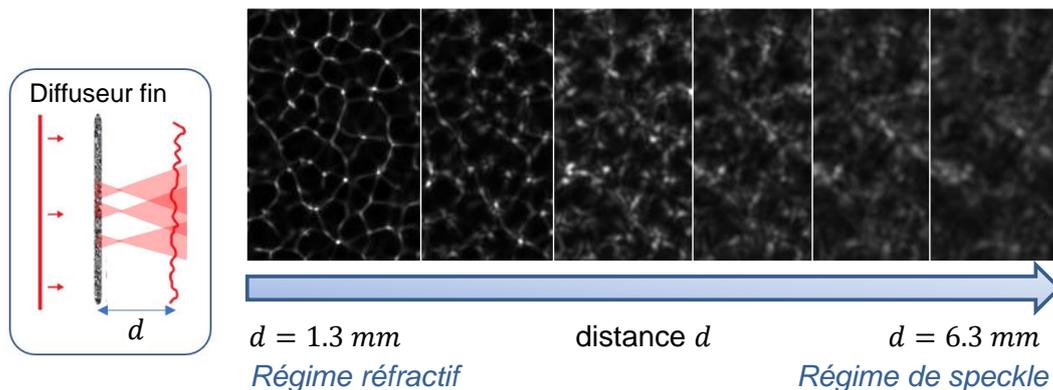


Figure 3.14 – Répartition de l'intensité observée après un diffuseur fin illuminé en lumière blanche, selon la distance d'observation d . Pour $d \gtrsim 2 \text{ mm}$, on observe une figure de speckle. Pour les plus petites valeurs de d , on se trouve dans un régime réfractif.

Parce qu'elle repose uniquement sur l'ajout d'un diffuseur devant une caméra, l'imagerie de front d'onde DiPSI constitue une méthode d'imagerie de phase quantitative simple à mettre en œuvre, et pouvant être facilement disséminée vers la communauté des biologistes [120]. La complexité expérimentale est ici déplacée vers une complexité algorithmique.

Reconstruction de la phase

Dans le cas d'une illumination homogène en intensité, le calcul de l'image de phase quantitative repose principalement sur deux étapes représentées sur la figure 3.15. Après acquisition des deux images de speckle, l'une en présence de l'objet à imager et l'autre dite de référence (comportant le front d'onde de l'illumination et les aberrations du montage), la matrice de transformation u est calculée numériquement. Puis les gradients de phase sont déduits de cette carte des déformations u .

Nous détaillons ci-dessous l'algorithme (algorithme des démons [160]) permettant d'estimer ces déplacements, ainsi que la méthode d'intégration des gradients de phase permettant d'accéder finalement à la phase.

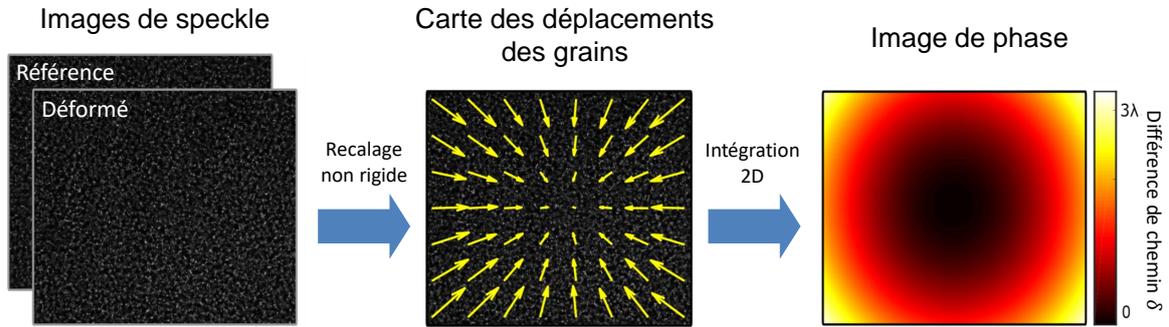


Figure 3.15 – Schématisation de la procédure algorithmique de reconstruction de l'image de phase. L'image de speckle déformée par la présence de l'objet est recalée sur celle de référence. La carte des déplacements associée est ensuite intégrée numériquement sur les deux directions spatiales.

Algorithme de recalage non-rigide Le calcul des transformations u menant de l'image de speckle objet S_{obj} à celle de référence S_{ref} consiste en un **recalage non-rigide** des deux images, c'est-à-dire en considérant des déplacements plus fluides que de simples translations. L'algorithme utilisé, l'algorithme des démons [160], se base sur un modèle diffusif des parois des structures. Son principe peut être formalisé simplement par un algorithme de recalage par descente de gradient [161] : il s'agit de calculer la matrice u itérativement en cherchant à minimiser le critère C défini par l'expression (3.14) à chaque pixel repéré par r :

$$C(u) = \int (S_{obj}(r - u) - S_{ref}(r))^2 dr \quad (3.14)$$

$S_{obj}(r - u)$ est l'image de speckle de l'objet transformée de sorte qu'elle tende à devenir identique à l'image de speckle de référence S_{ref} . Le critère C est minimal lorsque la matrice des déplacements u la mieux approchée de la transformation a été atteinte.

Numériquement, un développement de Taylor du critère $C(u_0)$ pour une transformation u_0 de départ arbitraire est effectué, ce qui permet d'accéder par identification à son gradient et à sa matrice Hessienne⁵, notés respectivement $\nabla C(u_0)$ et $H_C(u_0)$. La minimisation de C en présence de la perturbation u_1 , c'est-à-dire l'annulation de son gradient $\nabla C(u_0 + u_1) \simeq \nabla C(u_0) + H_C(u_0) \cdot u_1$, implique l'égalité $u_1 = -H_C^{-1}(u_0) \cdot \nabla C(u_0)$. Ainsi, la valeur du champ d'ajustement u_1 optimal à la transformation de départ u_0 est obtenue, et la matrice de transformation est $u = u_0 + u_1$.

La source des transformations est inspirée par les équations de flux optiques [162], dont l'expression est presque équivalente, à un facteur près, à celle de u obtenue par la méthode des démons. Le calcul s'effectue à plusieurs échelles appelées niveaux pyramidaux, c'est-à-dire plusieurs niveaux de résolution de comparaison des images. Pour chaque niveau, le nombre d'itérations du calcul peut être choisi. Une régularisation consistant en un lissage gaussien de largeur G est appliquée à chaque niveau pyramidal. Bien que perturbatif, ce calcul fonctionne pour de grands déplacements grâce à ce caractère multi-échelles. L'optimisation des paramètres a été étudiée et fixée pour les diffuseurs et fronts d'onde que nous avons étudiés à 3 niveaux pyramidaux de 3 itérations chacun, avec un lissage gaussien de largeur $G = 2$ px.

5. Matrice des dérivées secondes partielles.

Intégration des gradients de phase Les valeurs de déplacement des grains de speckle doivent être intégrées afin d'obtenir les valeurs de phase d'après l'équation (3.12). La technique d'intégration utilisée est un algorithme de transformation de Fourier rapide qui permet de forcer l'intégrabilité en tout point [163]. Cette intégration présente cependant des artefacts si des objets de phase sont situés aux bords de l'image. La solution à ce problème numérique est d'étendre l'image des gradients dans toutes les directions autour de l'objet coupant le bord, en dupliquant et en antisymétrisant l'image des gradients, afin d'assurer la continuité aux bords [164].

Découplage de la phase et de l'intensité

L'image d'intensité peut aussi être reconstruite à partir des images de speckle. En effet, l'image de speckle objet est la multiplication de l'image d'intensité transmise par l'objet par le motif de speckle.

Pour illustrer la contribution de l'intensité au processus de "recalage non-rigide", je considère ici un champ $E = \sqrt{I}e^{i\varphi}$ codant simultanément deux images : le terme de phase φ encode l'image de Mona Lisa (figure 3.16b), tandis que le terme d'intensité I encode le portrait de Leonard de Vinci (figure 3.16c). A partir de ce champ qui sera le résultat à retrouver, ou "ground truth", Tengfei Wu et Pascal Berto ont simulé les cartes de speckle typiquement mesurées par notre analyseur. Ces simulations modélisent (i) l'interaction du champ avec un diffuseur fin en introduisant un terme de phase aléatoire dont les statistiques reproduisent celles de notre diffuseur d'angle caractéristique $\theta = 1^\circ$ et (ii) la propagation de Fresnel du champ transmis jusqu'au capteur. Sur la figure 3.16a, on constate que cette image de speckle (déformé) diffère de celle obtenue par propagation d'une onde plane (référence) selon deux aspects. Premièrement, comme il est visible sur les agrandissements de la figure 3.16a, les gradients de phase locaux du front d'onde provoquent des déplacements locaux u des grains de speckle. Deuxièmement, la modulation d'intensité du champ se traduit dans l'énergie de chaque grain de speckle.

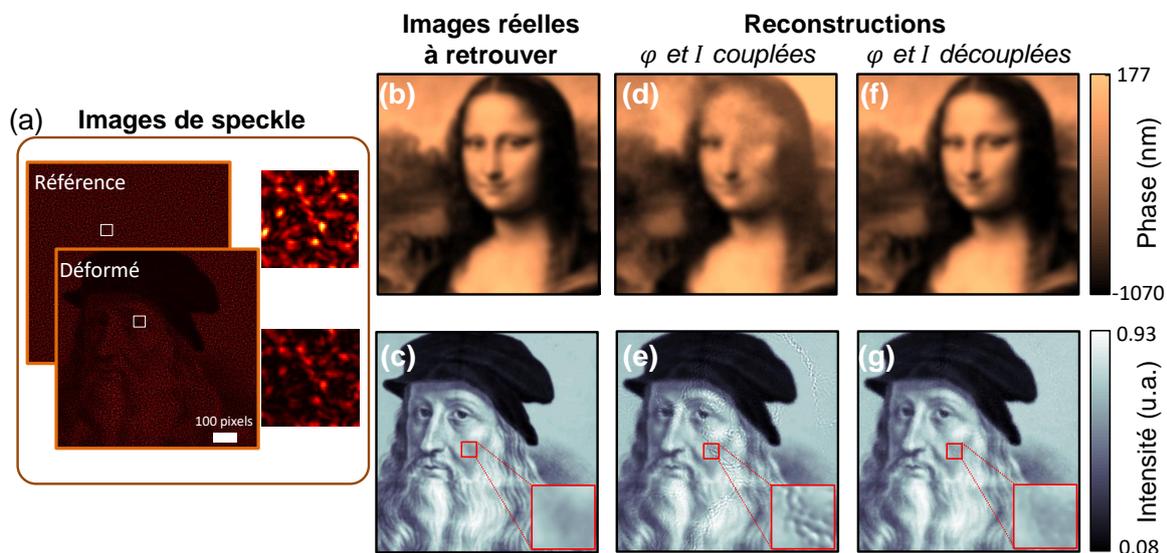


Figure 3.16 – Démonstration de la reconstruction d'images de phase et d'intensité découplées à partir du recalage d'une image de speckle déformé sur une image de speckle de référence. (a) Le speckle déformé est généré à partir de la simulation de la propagation à travers un diffuseur d'un champ dont la phase et l'intensité sont respectivement encodées par les images (b) et (c). L'algorithme de recalage produit à partir des speckles les images de phase et d'intensité (d) et (e). Des artefacts provenant du couplage entre phase et intensité dans le speckle déformé (a) surviennent, et sont éliminés sur les images (f) et (g) après multiplication itérative de l'image d'intensité à l'image de speckle déformé.

Les figures 3.16d,e présentent les images de phase et d'intensité respectivement obtenues par l'algorithme des démons. On y constate que dans les régions de forts gradients d'intensité, le recalage a partiellement échoué puisque les énergies des grains des images de speckle déformé et de référence ne sont plus comparables. Les erreurs sur le déplacement des grains u mènent donc à des erreurs sur l'estimation du gradient $\nabla_{\perp}\varphi = \frac{k_0 u}{d}$ (équation (3.13)) qui causent les forts artefacts visibles sur l'image de phase 3.16d. De plus, comme on peut le voir sur la figure 3.16e, des artefacts semblables à une granularité surviennent également sur l'image d'intensité calculée par normalisation de l'image de speckle déformée par celle de référence, venant des déplacements locaux u présents entre ces deux images de speckle.

Mon travail ici a consisté à inclure dans l'algorithme de recalage non-rigide une étape itérative de "réinjection de l'intensité" pour **découpler la phase et l'intensité**. En effet, la détermination des déplacements des grains de speckle est faussée lorsque les intensités sont trop différentes dans les images de référence et déformée (par exemple dans les agrandissements de la figure 3.16a). L'idée est ici d'utiliser une estimation de l'intensité pour renormaliser les images de speckle et en déduire de meilleures estimations de la phase.

L'algorithme est schématisé sur la figure 3.17. Une fois la matrice des transformations u du speckle objet vers celui de référence calculée par une première itération de l'algorithme de recalage, l'image d'intensité est obtenue en divisant l'image de speckle objet recalée $S_{obj}(r-u)$ par l'image de speckle de référence $S_{ref}(r)$.

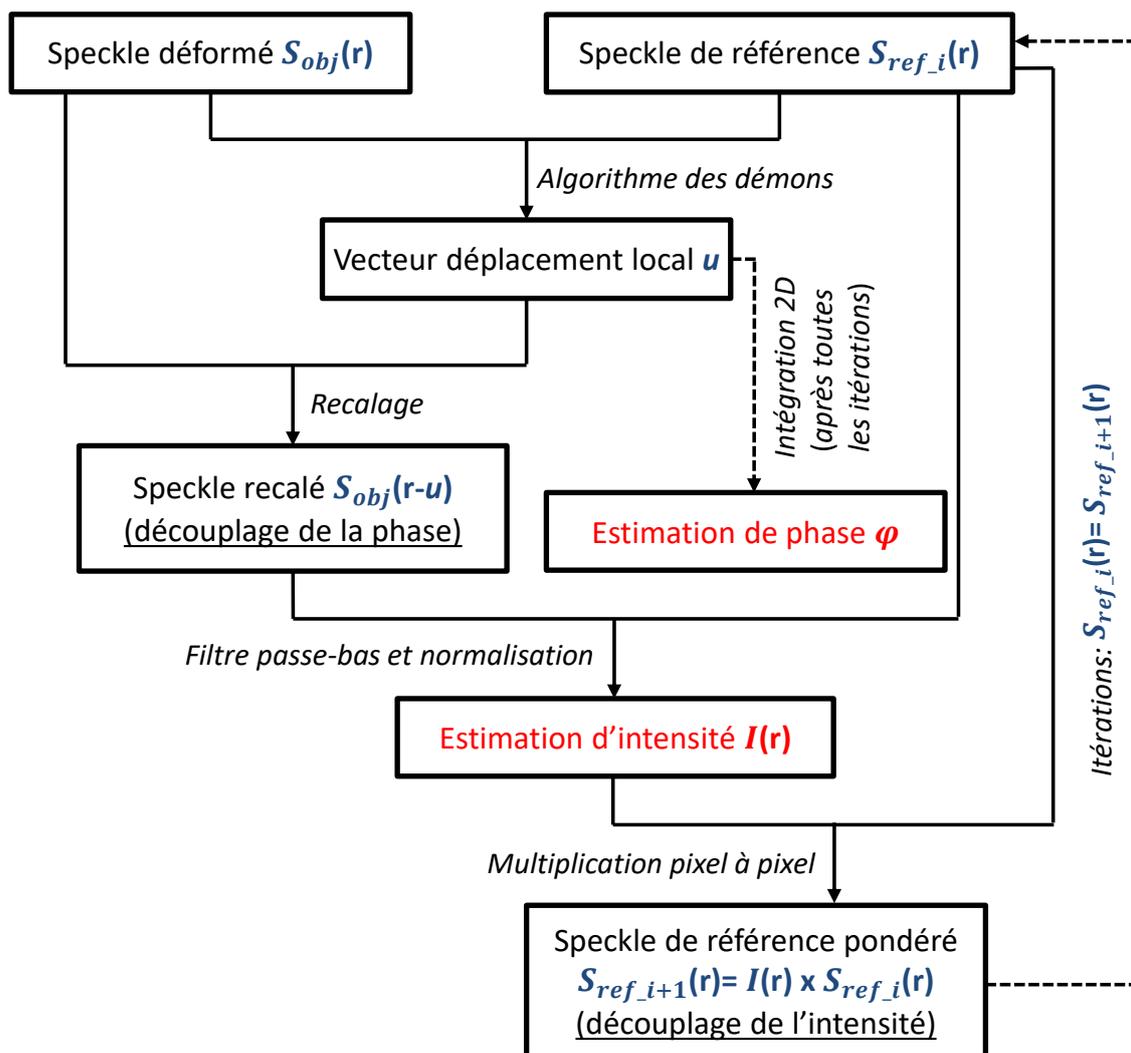


Figure 3.17 – Algorithme de recalage non-rigide de l'image de speckle déformé sur celle de référence avec découplage de la phase et de l'intensité.

Avant normalisation, il est nécessaire d'appliquer un filtrage passe-bas (convolution des images de speckle par une gaussienne de largeur 3 pixels) afin d'éviter une division par les "zéros" des zones sombres. L'intensité obtenue est ensuite re-multipliée itérativement au speckle de référence avant re-normalisation. De cette manière, les cartes de speckle S_{obj} et $I \times S_{ref}$ présentent des grains de speckle d'énergie équivalente, ce qui permet une meilleure estimation des déplacements u lors de l'étape de recalage par l'algorithme des démons. En pratique, une unique itération de ce processus de réinjection de l'intensité est suffisante pour supprimer toute granularité résiduelle sur les reconstructions de phase et d'intensité (voir figures 3.16f,g). Cette étape permet donc non seulement la reconstruction de l'image d'intensité pour une **caractérisation complète du champ complexe transmis**, mais aussi une contribution importante à l'**optimisation du calcul de u et donc de l'image de phase**.

Résolution spatiale et limites de la mesure de phase

La sensibilité de la mesure de phase par DiPSI dépend de la valeur de la distance diffuseur-plan image d : plus elle est élevée, plus les déplacements induits θd sont grands (effet de bras de levier) et donc mieux ils sont résolus. En revanche, ce gain de sensibilité en augmentant d se fait au détriment du nombre de pixels nécessaire pour définir un pixel de phase, puisque les faisceaux diffusés s'élargissent et la figure se floute. On peut donc ajuster la valeur de d pour trouver un compromis entre sensibilité et taille du pixel de phase. Il s'agit d'un avantage important de la technique DiPSI : **le choix de privilégier la sensibilité ou la résolution peut être adapté à l'échantillon**. Ceci n'est pas possible, par exemple dans le cas d'un Shack-Hartmann pour lequel la distance d est nécessairement égale à la focale des microlentilles f' .

En pratique, un compromis satisfaisant pour l'imagerie d'échantillons biologiques est atteint pour une valeur de typiquement $d \approx 3$ mm. On détermine dans cette configuration un bruit de phase d'environ 1.5 nm (pour une caméra PCO Panda) et une résolution spatiale définie par un pixel de phase d'environ 8×8 pixels⁶.

3.4.4 Conclusion sur le choix de méthode d'imagerie de phase

La capacité de mesurer de façon distincte l'intensité et la phase d'un champ électromagnétique est précisément ce qui différencie les méthodes d'imagerie de front d'onde de celles de microscopie à contraste de phase présentées à la section 3.2. L'intensité des images reconstruites ne provient plus d'un couplage entre l'intensité transmise et le déphasage par l'échantillon, mais indique de **véritables valeurs quantitatives**. Contrairement à l'holographie, l'imagerie de front d'onde ne mesure cependant pas une valeur absolue de phase car elle repose sur une mesure de gradient de phase. Pour l'imagerie de phase, cela n'est généralement pas problématique : la constante d'intégration est fixée en définissant comme déphasage nul une zone de l'échantillon dénuée d'objet (zone contenant uniquement le milieu de culture cellulaire).

L'analyseur DiPSI constitue une méthode d'imagerie d'intensité et de phase quantitative de haute définition. La simplicité du montage auto-référencé permet d'en réaliser un **simple accessoire compact de microscope**, sans la nécessité d'une table optique sur coussins d'air. De plus, contrairement aux masques de phase composés de matrices de micro-lentilles ou de réseaux de diffraction, le diffuseur fin est un objet simple, facilement disponible et peu coûteux. La technique a donc un **fort potentiel de dissémination**.

La suite de ce chapitre présente des travaux effectués avec la méthode DiPSI. La section suivante détaille l'implémentation expérimentale du montage optique, en vue de produire des images de dynamiques intracellulaires qui seront présentées en section 3.6.

6. En pratique, on fixe empiriquement le taux d'échantillonnage des images de phase à $\frac{1}{4}$ pixel.

3.5 Microscopie quantitative de phase DiPSI

Le montage expérimental de l'imageur DiPSI est schématisé sur la figure 3.18. Il se base sur un simple microscope inversé (Olympus IX71) dont le plan image est directement formé sur une caméra, précédée du diffuseur fin à une distance d . Le choix de la valeur $d = 3\text{ mm}$ est discuté dans la section précédente. Le plan de l'échantillon du microscope est illuminé en transmission par une source incohérente temporellement (typiquement une lampe halogène) en configuration d'illumination Köhler.

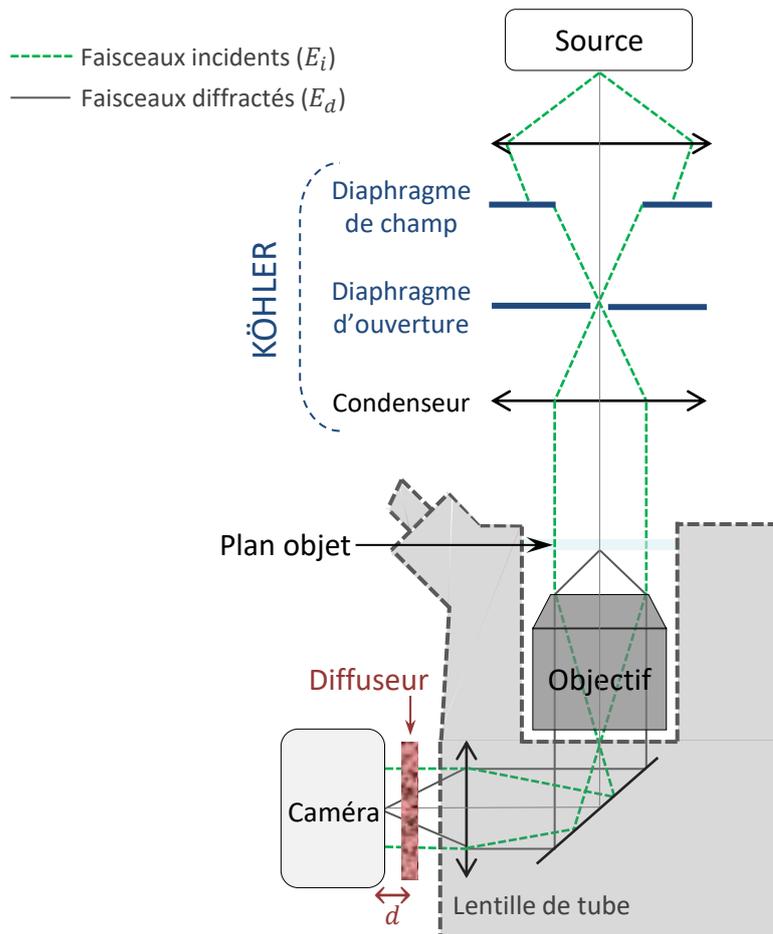


Figure 3.18 – Montage d'analyse de front d'onde avec un diffuseur fin (DiPSI). Le montage utilise un diffuseur fin placé à une distance d de la caméra en sortie d'un microscope standard illuminé par une onde plane. L'illumination en onde plane est obtenue par une configuration de Köhler. *Les distances de focalisation ne sont pas représentées à l'échelle par souci de compacité.*

3.5.1 Illumination

L'illumination doit être cohérente spatialement et parallèle à l'axe optique de manière à illuminer l'échantillon avec un front d'onde proche d'une onde plane. Dans ces conditions, la mesure de phase quantitative peut alors s'approximer à $\Delta\varphi(x, y) = \int n(x, y, z) dz$. La source est pour cela collimatée à l'aide d'une configuration de Köhler (voir figure 3.18) : une première lentille accolée à un diaphragme appelé diaphragme de champ image la source dans la pupille arrière du condenseur. La position axiale du condenseur est ajustée de manière à former l'image du diaphragme de champ dans le plan de l'échantillon observé. Une forte cohérence spatiale d'illumination est obtenue en maintenant le diaphragme d'ouverture à la limite de fermeture ($ON_{illumination} < 0.1$).

Une source blanche halogène (Olympus U-LH100-3) peut être utilisée en association à un filtre passe-bande (typiquement $\lambda = 576 \pm 50$ nm), délivrant après filtrage une puissance lumineuse de l'ordre de $100 \mu\text{W}$ avec les diaphragmes fermés. Pour des besoins de plus grande puissance, comme à la section 3.7, une source équipée de plusieurs diodes électroluminescentes (Lumencor Spectra X) de longueurs d'onde variables est couplée à une fibre multi-mode de largeur de cœur $200 \mu\text{m}$. La sortie de fibre est collectée par un collimateur de distance focale 10 mm. On a ainsi accès à une puissance d'illumination de l'ordre du mW.

3.5.2 Réimagerie du diffuseur

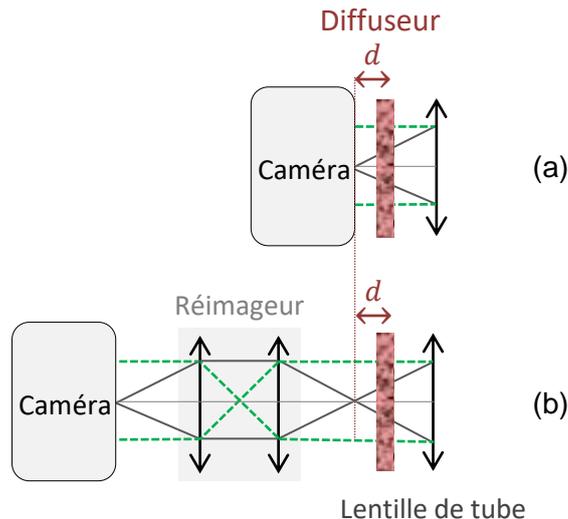


Figure 3.19 – (a) Montage d'analyse de front d'onde avec un diffuseur fin à distance d de la caméra (détail de la figure 3.18). (b) Montage d'analyse de front d'onde avec un diffuseur fin réimagé à la distance d de la caméra.

En pratique, la configuration présentée en figure 3.19a nécessite de placer le diffuseur à typiquement $d = 3$ mm de la caméra. Pour certaines caméras, cela pose des problèmes d'encombrement, notamment dus à la présence d'une fenêtre de protection devant le capteur. Plutôt que de placer physiquement le diffuseur devant le capteur, une solution consiste à réimager celui-ci avec un télescope de grandissement $M = 1$ à une distance $d = 3$ mm du capteur (voir figure 3.19b).

Cette solution présente l'avantage de faciliter l'étape de calibration de la distance d . Pour la configuration présentée en figure 3.19a, il est nécessaire de mesurer un objet de phase connu pour la calibrer. En revanche, pour la configuration présentée en figure 3.19b, le contrôle précis de d est effectué en plaçant le diffuseur sur une platine de translation.

3.5.3 Traitements de l'image de phase

L'obtention d'une image de phase requiert l'acquisition de deux images de speckle, l'une de référence et l'autre de l'objet. L'image de référence est acquise sans l'objet, généralement dans une zone vide de l'échantillon (qui contient seulement le milieu de culture dans le cas d'imagerie cellulaire). L'image de référence contient donc un speckle qui est déformé uniquement par les éventuelles aberrations du montage, qui sont ainsi éliminées lors du recalage non-rigide.

Deux exemples d'images d'intensité et de phase de cellules sont présentés sur les figures 3.20 et 3.21. Notons que l'échelle de couleur des images de phase indique la valeur de différence de chemin optique δ en nm. Par abus de langage, l'appellation *phase* sera dans la suite utilisée de façon interchangeable pour désigner δ et la phase réelle $\varphi = \frac{2\pi}{\lambda} \delta$ qui s'exprime en radians, dans la mesure où ces deux grandeurs ne diffèrent que d'un facteur constant $\frac{2\pi}{\lambda}$.

Comme attendu, ces images de phase présentent un contraste bien plus important que celles d'intensité. Afin de mieux distinguer les organites, un filtrage passe-haut des fréquences spatiales peut être appliqué sur l'image de phase (à droite sur les figures 3.20 et 3.21).

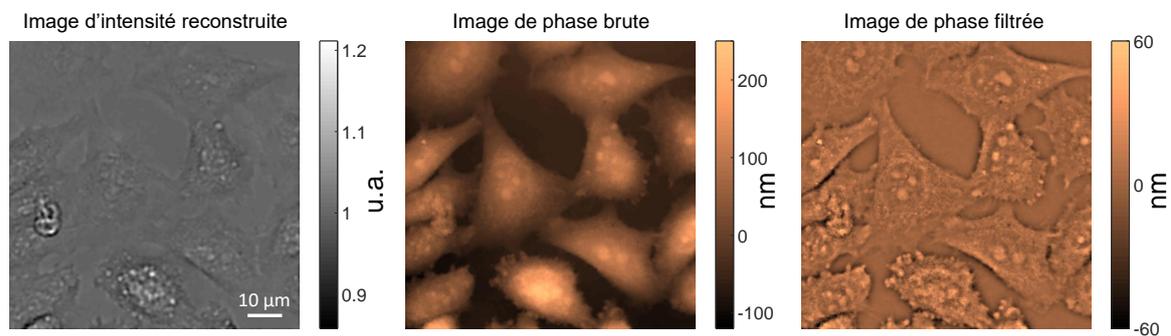


Figure 3.20 – Cellules ovariennes de hamster imagées par DiPSI.

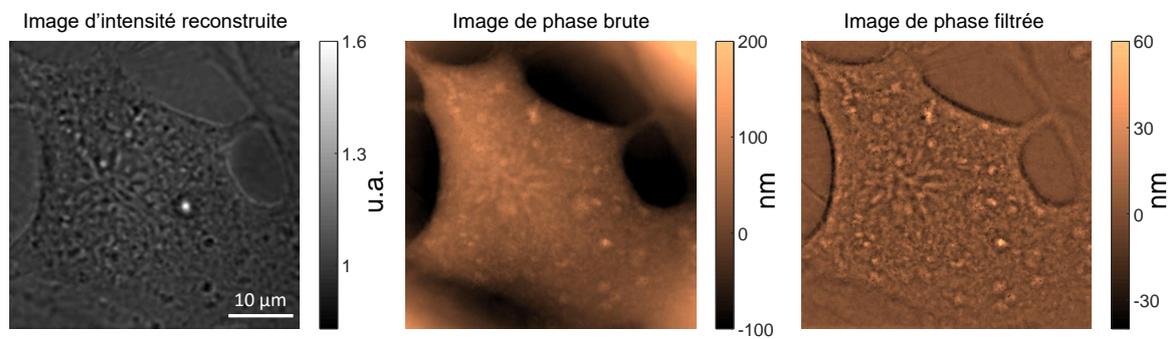


Figure 3.21 – Cellule de Müller (voir section 3.6) imagée par DiPSI.

Pour des acquisitions longues, ou plus exactement si un certain délai (typiquement plusieurs secondes) sépare l'acquisition de l'image de référence et la mesure, on observe une courbure sur les images de phase qui n'a pas de réalité physique dans l'échantillon. Celle-ci peut être induite par des dérives mécaniques du condenseur ou de l'objectif. Elle peut être également due à une dilatation du capteur causée par l'échauffement de la caméra durant l'acquisition. Ce type d'artefact dégrade l'estimation de la masse sèche et réduit le contraste de l'image de phase. Cette courbure de phase peut être néanmoins facilement estimée par un filtre polynomial bidimensionnel d'ordre 2 afin d'être soustraite à l'image brute.

Ce montage d'imagerie de front d'onde DiPSI ne requiert quasiment aucune modification d'un microscope standard. Les deux caractéristiques cruciales qu'il doit vérifier sont une **illumination de haute cohérence spatiale** et la présence d'un **diffuseur fin à quelques millimètres du plan image**. Le système doit également être protégé de sources extérieures de lumière et des flux d'air qui occasionnent des fluctuations parasites de la phase. Lorsqu'elles sont vérifiées, ces conditions se traduisent par l'obtention d'un bruit de phase faible, inférieur ou égal à 1.5 nm RMS. Ces images de phase, telles que celles des figures 3.20 et 3.21, sont reconstruites par l'algorithme de recalage non-rigide à partir de deux images de speckle : l'une acquise en présence de la cellule, l'autre acquise dans une zone vide de l'échantillon, c'est-à-dire ne contenant que le milieu de culture cellulaire. Ainsi, des images de phase quantitative de haute définition peuvent être obtenues **sans exiger de marquage ou d'expertise particulière**, à l'aide d'une instrumentation extrêmement simple.

La sensibilité de la méthode est mise à profit dans la section suivante pour mettre en contraste l'activité intracellulaire.

3.6 Imagerie de dynamiques cellulaires par imagerie de front d'onde

La microscopie de phase quantitative permet d'accéder non seulement à une information morphologique (ou structurelle) dénuée d'artefacts, mais aussi à la mesure de masse sèche d'une cellule ou d'un organite donné avec une précision de l'ordre du picogramme [117, 165, 166] (soit une erreur relative de l'ordre de 1% pour une cellule). Elle rend ainsi possible l'identification sans marquage des lysosomes ainsi que leur discrimination vis à vis d'autres vésicules [122]. La méthode permet non seulement de détecter le cytosquelette, mais également de différencier les filaments d'actine des microtubules [167]. Plusieurs travaux démontrent également la possibilité de discriminer différentes populations cellulaires : la détection d'anthrax dans une population de bacilles [34], ou encore la classification de spermatozoïdes [168]. La mesure de phase peut également être utilisée comme un marqueur de la viabilité cellulaire, permettant notamment d'identifier différents processus de mort cellulaire [118, 119]. Associée à une segmentation de cellules, elle permet finalement de suivre quantitativement des processus de division cellulaire et fournit des indications relatives à l'état du cycle dans lequel la cellule se trouve [117].

La méthode n'apporte évidemment pas le même degré de spécificité que la microscopie de fluorescence, mais elle a pour avantage de s'affranchir de certains inconvénients des marqueurs exogènes ou endogènes. Ces marqueurs impliquent en effet une complexité accrue pour l'expérimentateur, mais peuvent aussi induire un certain stress sur la cellule dont la physiologie normale peut être altérée. Dans certaines applications thérapeutiques, toute altération ou marquage fluorescent des cellules est d'ailleurs rédhibitoire si elles sont destinées à un patient. Un autre avantage notable des techniques sans marquage est de s'affranchir de tout blanchiment, donc de permettre de suivre des cellules sur des temps très longs.

Notons que **l'aspect dynamique de ce signal de phase**, relatif au suivi temporel de flux de matière, a jusqu'à présent été peu investigué. Pourtant, il **est une des caractéristiques fondamentales du métabolisme cellulaire** et est donc crucial à une étude complète des phénomènes biologiques.

Additionnellement à l'information dynamique, l'analyse différentielle des images met en valeur les fluctuations par rapport à un fond statique [169], et **le contraste peut s'en trouver fortement augmenté**. L'observation d'une infection virale à l'échelle intracellulaire requiert par exemple l'association d'une haute résolution spatiale à une étude dynamique pour discriminer le virus des milieux qu'il parcourt [109]. De plus, la discrimination des éléments selon leur dynamique est **un pas vers un gain en spécificité** pour notre méthode d'imagerie. En effet, ce caractère non spécifique de l'imagerie de phase est un inconvénient majeur par rapport aux méthodes utilisant des marqueurs fluorescents qui se fixent à des molécules particulières, ou la microscopie Raman dont le signal est composé de signatures spectrales des espèces chimiques.

Cette section vise à explorer l'information apportée par une mesure dynamique et quantitative de phase, dans la perspective de révéler des **informations sur le métabolisme** de la cellule ainsi que d'**accroître la spécificité**.

Tandis que tout type de cellule est un potentiel candidat intéressant à l'imagerie de dynamiques, nous nous concentrons ici majoritairement sur des cellules rétinienne.

3.6.1 Contexte biologique

Au centre hospitalier national ophtalmologique des Quinze-Vingts et à l'institut de la Vision, les recherches se focalisent sur le système visuel et en particulier sur la rétine. Ce tissu nerveux, responsable de la détection lumineuse, tapisse le fond de l'œil et est composé de la superposition de deux parties principales (voir figure 3.22) [170-172] :

- l'épithélium pigmenté rétinien, formé de cellules riches en mélanine en contact direct avec les photorécepteurs qui absorbent les photons résiduels non captés.
- la rétine neurale, structurée par des couches de neurones tel que les photorécepteurs à cônes (vision de jour) et à bâtonnets (vision de nuit), les interneurones (amacrine, horizontale et bipolaires) en relation avec les cellules ganglionnaires dont les axones forment le nerf optique.

Cette organisation est structurée par des cellules gliales de Müller, qui forment des armatures traversant la rétine neurale de part en part.

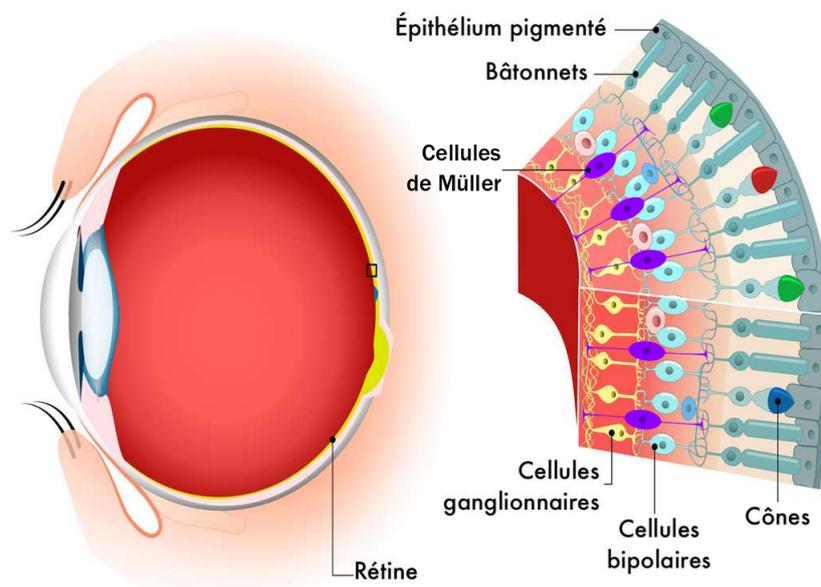


Figure 3.22 – Représentation schématique de la rétine (adaptée de [171] et [173]), tissu constitué de couches cellulaires recouvrant la paroi interne de l'œil. La lumière est focalisée par la cornée sur le fond de la rétine pour être traitée par les photorécepteurs (cônes et bâtonnets). Le signal est transféré aux cellules ganglionnaires dont les axones se regroupent pour former le nerf optique se projetant vers le cerveau. L'ensemble de la structure est maintenu par les cellules gliales de Müller.

In vivo, l'imagerie à haute résolution de la rétine requiert l'usage d'optique adaptative [174, 175] ou de corrections numériques [38] pour compenser les aberrations optiques apportées lors de la traversée du globe oculaire par la lumière (humeur aqueuse, cornée, et dans certains cas de la sclère), mais aussi et surtout par les variations du film lacrymal, additionnellement aux mouvements de l'œil. Quant à l'étude *ex vivo*, elle se pratique soit sur des rétines animales, soit sur des organoïdes rétinien, rétines en culture *in vitro* développées à l'institut de la Vision [176, 177] à partir de cellules souches pluripotentes induites.

Cellules souches pluripotentes induites (iPS : *induced Pluripotent Stem cells*)
 Cette innovation de Shinya Yamanaka [178], récompensée par le prix Nobel de médecine de 2012, permet de reprogrammer génétiquement une cellule somatique en cellule souche

pluripotente. Pour cela, quatre gènes spécifiques soutenant la pluripotence sont réactivés par leur introduction dans les cellules à reprogrammer. Ainsi, ces cellules iPS possèdent un caractère embryonnaire et peuvent se multiplier et se différencier en tout type de cellule du corps humain. Il est ainsi potentiellement possible de produire n'importe quel type cellulaire en quantité illimitée, si les conditions de différenciation sont adaptées.

Différenciation des cellules iPS en cellules rétiniennes Un protocole de différenciation de cellules iPS en organoïdes rétiniens a été développé à l'institut de la Vision par Sacha Reichman *et al* [176, 177]. Un organoïde est un tissu cellulaire complexe reproduisant un organe *in vitro*. La partie neurale de la rétine est ainsi reproduite en un organoïde rétinien tridimensionnel de diamètre pouvant atteindre le millimètre, qui présente une partie des caractéristiques morphologiques et fonctionnelles d'un œil. Certains types cellulaires de la rétine comme l'épithélium pigmentaire ou les cellules de Müller peuvent aussi être isolés et produits séparément à partir de ces organoïdes. Les recherches sur des maladies comme la rétinopathie pigmentaire [172] ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge [179] sont fortement facilitées et accélérées grâce à ces nouveaux modèles cellulaires *in vitro* humains.

Cellules iPS et thérapies Puisque les cellules et organoïdes ainsi produits portent le génome du patient, ils peuvent reproduire *in vitro* certaines pathologies, permettre d'en étudier la réponse à des molécules thérapeutiques, donc autoriser la mise au point de thérapies hautement personnalisées. On peut alors étudier la maladie héréditaire d'un patient spécifique de façon extrêmement peu invasive.

Pour la même raison, l'utilisation des cellules iPS se développe en médecine régénérative par, entre autres, la transplantation des dérivées dans les tissus malades dont des cellules ont dégénéré. Les cellules produites à partir d'iPS d'un patient sont susceptibles de constituer des autogreffes, qui minimisent tout risque de rejet pour le patient : on peut par exemple imaginer de produire à partir des propres cellules du patient des photorécepteurs destinés à remplacer ceux qui auraient été détruits par une pathologie. Leurs potentiels thérapeutiques en recherche biomédicale et clinique suscitant un grand intérêt, un approfondissement de leur caractérisation par des techniques innovantes dans le domaine, comme l'imagerie de dynamiques, est ici envisagée. Il est évidemment impossible d'utiliser des marquages fluorescents dans le contexte d'une utilisation chez l'humain, et l'utilisation d'une imagerie de phase ("*label-free*") prend ici tout son sens.

3.6.2 Traitement numérique et représentation colorimétrique

Pour observer l'activité biologique d'un spécimen, l'acquisition d'une série d'images dans le temps est incontournable puisqu'une image instantanée fige la scène à l'instant précis de l'acquisition, par intégration des signaux optiques pendant la durée d'exposition. C'est d'ailleurs l'une des principales forces des techniques optiques par rapport à la microscopie électronique, qui autorise une meilleure résolution mais ne peut travailler que sous vide, donc sur des échantillons morts et figés dans le temps. Ainsi, une vidéo permet d'analyser les dynamiques en jeu, à condition que sa résolution temporelle soit adéquate : les composantes de fréquences supérieures à la cadence d'acquisition n'y sont pas accessibles. Ainsi, dans une vidéo de haute résolution spatiale composée de N images acquises à la cadence f_{acq} , il est possible de calculer des fluctuations s'étalant sur une gamme de fréquences $\left[\frac{f_{acq}}{N}, \frac{f_{acq}}{2} \right]$. Une manière d'en produire un outil d'analyse visuelle est de **créer une image dont le contraste est basé sur les variations d'amplitude des signaux selon leur fréquence**. Les informations d'activité (intra)cellulaire quantitatives sont alors traduites par un codage colorimétrique.

Un traitement proposé et mis au point dans le domaine de l'OCT plein champ (FFOCT⁷) permet de coder dans les couleurs de l'image des données fréquentielles quantitatives associées aux dynamiques de l'échantillon [111]. Cette méthode, appelée OCT plein champ dynamique (D-FFOCT), propose d'analyser les fluctuations d'un échantillon afin de les coder de manière colorée, en utilisant différents espaces colorimétriques. Outre l'espace RVB (Rouge Vert Bleu) bien connu, l'espace d'encodage connu sous les acronymes TSV pour "Teinte Saturation Valeur" ou TSL pour "Teinte Saturation Luminance" (ou encore HSV en anglais pour "Hue Saturation Value") permet de coder efficacement 3 informations différentes sur chacun des canaux.

Le contraste de l'OCT plein champ diffère de celui de l'imagerie de front d'onde principalement de par son origine mixte en amplitude et en phase, sa capacité de sectionnement optique, et sa détection des signaux exclusivement rétrodiffusés. L'imagerie de phase quantitative, quant à elle, ne bénéficie pas d'un sectionnement optique, mais possède la capacité de suivre quantitativement des flux de matière de par sa capacité à mesurer une phase découplée de l'intensité. En effet, la mesure de densité de masse sèche [113, 114] a par exemple permis de développer une méthode de mesure de vitesse de transport actif et diffusif, par analogie avec la spectroscopie de diffusion dynamique de la lumière [180].

Cette section présente l'application du traitement dynamique développé pour l'OCT plein champ [18, 111] aux images de phase quantitatives telles que présentées à la section précédente, dans le but d'y ajouter une analyse d'activité quantitative ainsi qu'un gain en définition vis-à-vis des structures dynamiques d'intérêt.

Représentation RVB

La représentation d'un phénomène sur une image peut s'effectuer par le biais de plusieurs espaces d'encodage. Par exemple, l'utilisation de l'espace RVB résulte en une image en fausses couleurs dont chaque canal parmi les canaux rouge, vert et bleu encode une grandeur d'intérêt différente, ou un intervalle de valeurs différent de la grandeur d'intérêt.

Un premier traitement proposé ici utilise une pile d'images acquises à une fréquence f_{acq} , sur laquelle les fluctuations ont été extraites sur 3 gammes de fréquence, codées chacune par l'un des canaux R, V ou B.

On note $I(x, y, t)$ cette pile d'images. Les fluctuations temporelles peuvent être calculées pour chaque pixel (x, y) sur la troisième dimension t par transformée de Fourier temporelle. L'image d'amplitude de fluctuations, notée $V(x, y)$, sur l'intervalle de fréquences $[f_1; f_2]$ vaut alors : [18]

$$V(x, y) = \int_{f_1}^{f_2} \mathcal{F}[I(x, y, t)](f) df \quad (3.15)$$

Une séquence d'images de phase de cellules ovariennes de culture est acquise à la fréquence $f_{acq} = 1$ Hz. La figure 3.23a en présente la première et la dernière image, avec un filtrage spatial passe-haut permettant une meilleure visualisation, voir figure 3.20. Le calcul (3.15) est effectué sur trois intervalles de la gamme de fréquences $\left]0; \frac{f_{acq}}{2}\right]$ accessible par transformée de Fourier, sur des sous-piles de 180 images issues de la séquence.

La figure 3.23b en présente deux images résultantes, pour lesquelles on a associé les intervalles $[5, 250]$, $[250, 450]$ et $[450, 500]$ mHz aux canaux bleu, vert et rouge respectivement. De cette manière, la couleur de chaque pixel des images encode une composante de fréquence suivant le recouvrement des trois canaux en synthèse additive, les couleurs "chaudes" correspondant aux fréquences de fluctuation les plus élevées.

7. FFOCT est l'acronyme de "full-field optical coherence tomography".

Le contraste de l'image de fluctuations apporte une **nette compartimentation** entre les cellules et le fond statique, mais aussi entre le cytoplasme et le noyau, moins actif, ainsi qu'entre des organites très actifs et le reste du cytoplasme. Ce contraste permet une visualisation de l'image en termes d'activité biologique, car l'amplitude de fluctuation des dynamiques actives est fortement supérieure à celles des dynamiques browniennes [19]. Une interprétation plus approfondie de ces images de dynamiques sera faite à la section 3.6.3.

Notons qu'ici, les trois intervalles de fréquence ont été choisis arbitrairement de façon à optimiser le contraste pour cet échantillon. Pour une représentation plus naturelle, il peut être préférable de générer un codage colorimétrique sous forme d'une échelle linéaire de fréquences. C'est partiellement pour cette raison que nous utilisons dans la suite la représentation TSV également utilisée en D-FFOCT [19]. L'autre apport de cette représentation est un encodage plus riche, et visuellement accessible, des propriétés dynamiques.

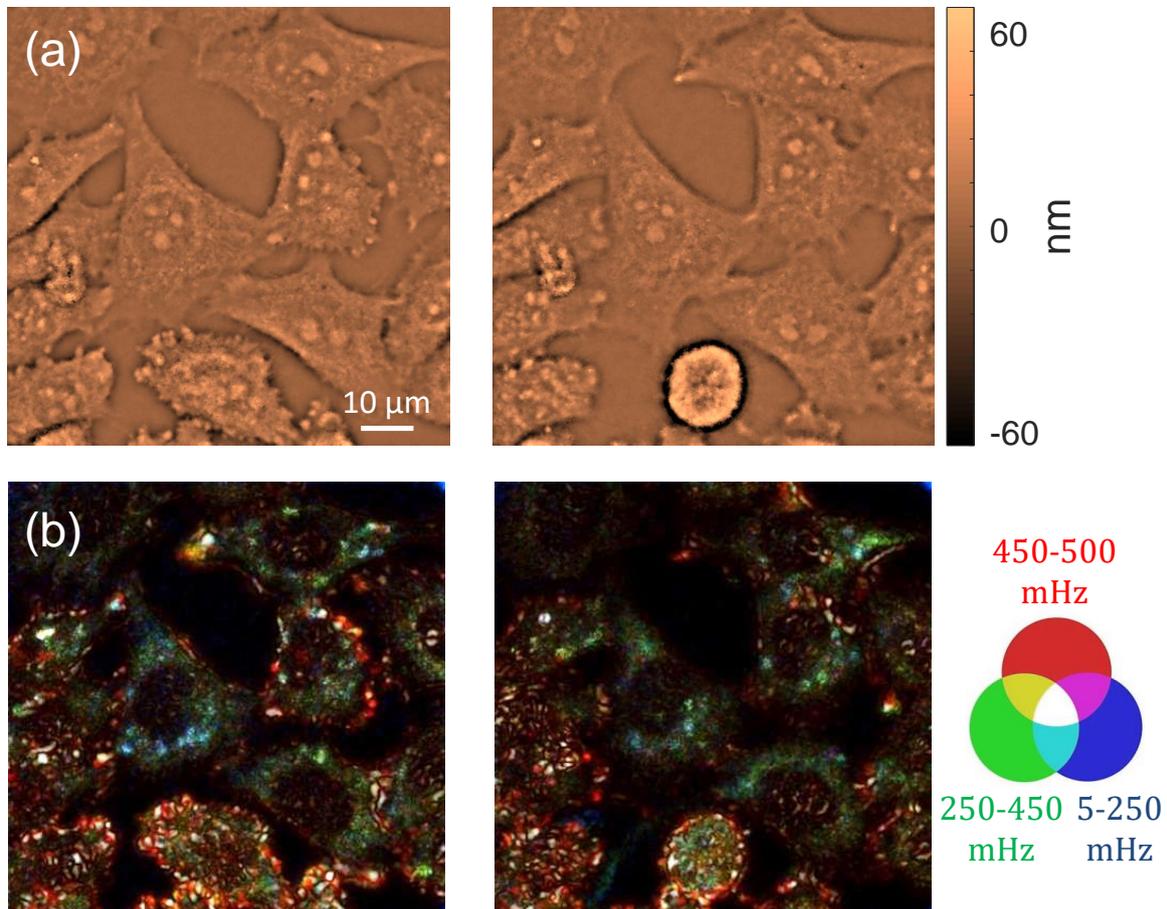


Figure 3.23 – (a) Images de phase de cellules ovariennes de hamster (*Chinese Hamster Ovarian cells* CHO) acquises par DiPSI et traitées par un filtrage passe-haut des fréquences spatiales. Délai entre les images représentées : 30 min. (b) Images de fluctuations sur la gamme $]0; \frac{f_{aca}}{2}]$ calculées par l'équation (3.15), représentées dans l'espace RVB. Le canal bleu code ici pour l'intervalle de fréquences $[5; 250]$ mHz, le vert pour $[250; 450]$ mHz, et le rouge pour $[450; 500]$ mHz.

Représentation TSV

L'espace colorimétrique TSV (Teinte, Saturation, Valeur) permet d'utiliser deux autres canaux orthogonaux à la couleur, ou teinte : la saturation et la valeur d'intensité, pour adjoindre deux autres grandeurs à l'image. La figure 3.24 est une manière de le représenter.

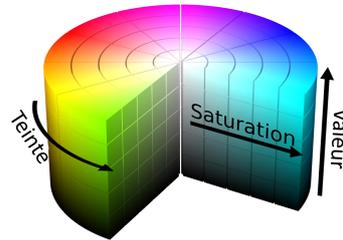


Figure 3.24 – Représentation schématique de l'espace TSV [181]. Un pixel de l'image code pour trois grandeurs représentées respectivement par :

- sa couleur sur une gamme choisie du spectre visible,
- la saturation de cette dernière allant du gris à une couleur vive,
- sa valeur d'intensité lumineuse allant du noir au clair.

Le choix des grandeurs assignées aux canaux T, S et V dans ce projet est identique à celui adopté en D-FFOCT [18, 111] :

- **Teinte** : valeur moyenne du spectre en fréquences temporelles.
- **Saturation** : largeur spectrale du spectre en fréquences temporelles.
- **Valeur** : amplitude des fluctuations à une fréquence caractéristique choisie.

Trois images encodant chacune de ces trois grandeurs sont générées par les calculs détaillés dans la suite, puis sont combinées en une image TSV. L'attribution de chaque canal à sa grandeur est schématisée à la figure 3.25 (d'après Kate Grieve *et al* [18, 111]).

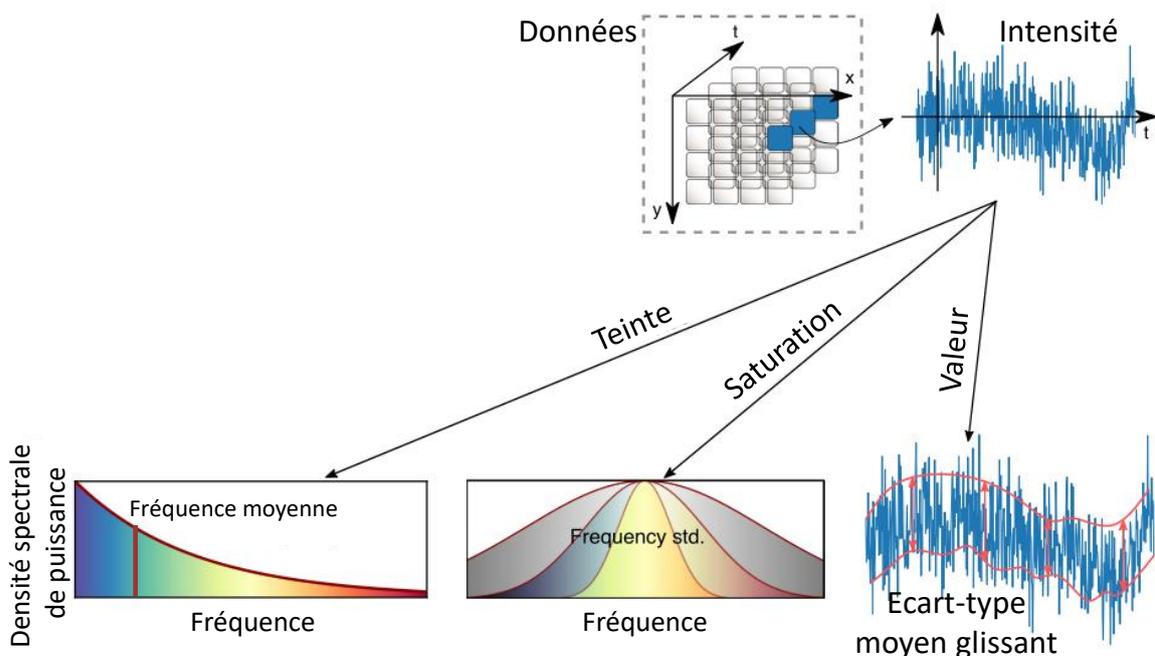


Figure 3.25 – Attribution des canaux de la représentation colorimétrique TSV à trois grandeurs caractéristiques du signal temporel mesuré sur chaque pixel : l'amplitude de ses fluctuations, la moyenne et l'écart-type de son spectre fréquentiel. Figure tirée des travaux de D-FFOCT [18, 111].

Valeur La grandeur associée au canal "valeur", l'amplitude des fluctuations, est la même que celle que nous avons calculée précédemment, sur trois intervalles de fréquence différents, pour la représentation RVB présentée à la figure 3.23.

Pour n'utiliser qu'un canal du code couleur, on peut aussi calculer l'amplitude des fluctuations à une fréquence spécifique $\frac{f_{acq}}{n}$, en moyennant l'écart-type sur les images espacées temporellement de $\tau = \frac{n}{f_{acq}}$. Si f_{acq} est la fréquence d'acquisition de la pile des N images, l'amplitude des fluctuations à la fréquence $\frac{f_{acq}}{n}$ est l'écart-type entre les images séparées de l'entier n , sur une sous-pile de taille N_s , moyenné sur toutes les sous-piles constituant la pile [182].

$$V(x, y) = \left\langle \sqrt{\frac{1}{N_s} \sum_{p=1}^{N_s} \left(I(x, y, \frac{np}{f_{acq}}) - \langle I(x, y, t) \rangle_t \right)^2} \right\rangle_{\frac{N}{N_s}} \quad (3.16)$$

Deux paramètres peuvent être modifiés dans cette expression : n est relatif à la fréquence choisie, $\frac{f_{acq}}{n}$, et pourra être fixé en fonction du phénomène étudié, et N_s détermine la durée de moyennage. Le choix de la taille des sous-piles N_s détermine le ré-échantillonnage de la vidéo initiale en une nouvelle vidéo d'images dynamiques : si $N_s = N$, on ne produit qu'une unique image représentant les dynamiques de toute la vidéo initiale, et si $N_s < \frac{N}{2}$, on peut générer plusieurs images dynamiques sur la dimension temporelle. N_s doit alors être choisi de manière à permettre une visualisation à la cadence voulue (pour ne pas risquer de manquer des phénomènes pertinents) tout en permettant le calcul sur un nombre significatif d'images (pour obtenir un rapport signal à bruit satisfaisant).

L'effet "stroboscopique" qui fige les composantes de fréquence $\frac{f_{acq}}{n}$ du signal est illustré sur la figure 3.26.

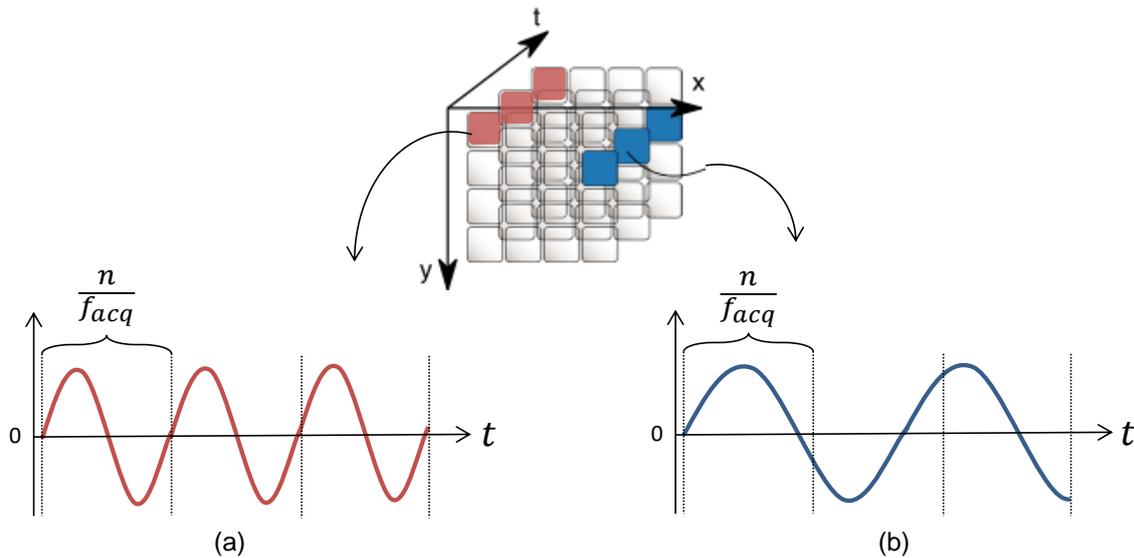


Figure 3.26 – Illustration de la mesure de l'amplitude d'une composante de fréquence $\frac{f_{acq}}{n}$ par la mesure de la moyenne des écart-types entre toutes les suites d'images séparées de n images (équation (3.16)). En réalité, le calcul est effectué de façon glissante sur toutes les images. (a) Sur un signal de fréquence $\frac{f_{acq}}{n}$, toutes les images espacées de n ont le même niveau de signal, dont l'écart-type est constant et sa moyenne V est maximale. Le signal sur le pixel contenant cette composante sera donc élevé. (b) Sur un signal de fréquence différente de $\frac{f_{acq}}{n}$, la moyenne des écart-types V tend vers zéro pour un grand nombre d'images moyennées. Le signal sur le pixel contenant cette composante sera donc proche de zéro.

La même séquence d'images de phase utilisée à la figure 3.23 est à présent traitée en utilisant l'équation (3.16) pour une fréquence $\frac{f_{acq}}{n} = \frac{1\text{Hz}}{10} = 100\text{mHz}$ sur des sous-piles de $N_s = 100$ images. Le nombre total d'images de la pile N étant ici égal à 1800, on a donc, après traitement glissant avec un pas de 4 images, un film de 425 images d'amplitudes de fluctuations $V(x, y)$. Deux d'entre elles sont présentées sur la figure 3.27 (de manière monochrome puisque seule la variable V est représentée ici). On retrouve clairement dans leur contraste la **compartimentation** observée sur le résultat en représentation RVB de la figure 3.23.

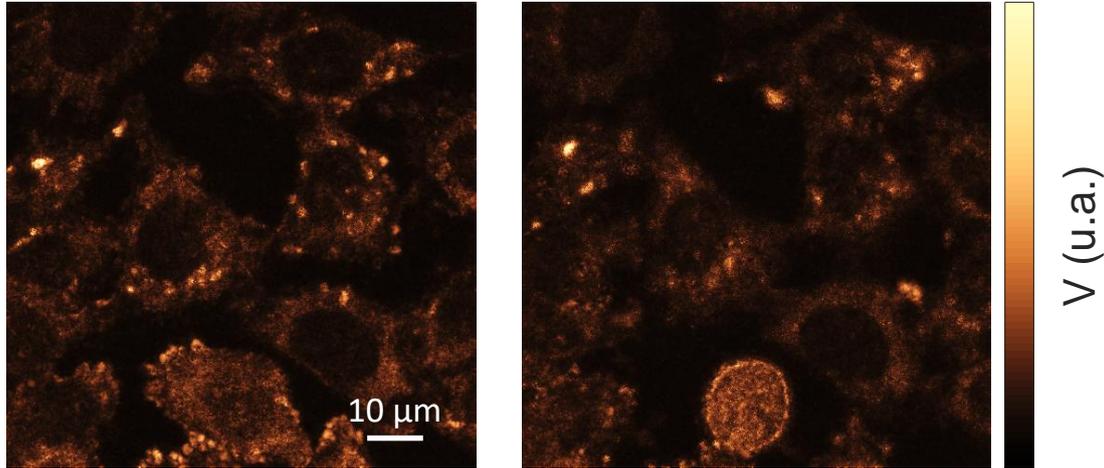


Figure 3.27 – Images de fluctuations des images de phase de la figure 3.23a calculées par l'équation (3.16) avec $n = 10$ et $N_s = 100$. Le contraste provient des variations d'amplitude des fluctuations à la fréquence $\frac{f_{acq}}{n} = 100\text{mHz}$.
Délai entre les images représentées : 30 min.

Étude du spectre : teinte et saturation Dans les canaux "teinte" et "saturation", nous encodons respectivement, pour chaque pixel, la fréquence moyenne et la largeur spectrale de la densité spectrale de puissance $P(x, y, f)$. Celle-ci est obtenue par transformée de Fourier temporelle du signal, puis par sa normalisation pour obtenir une distribution de probabilité : [111]

$$P(x, y, f) = \frac{\mathcal{F}[I(x, y, t)](f)}{\sum_f \mathcal{F}[I(x, y, t)](f)} \quad (3.17)$$

Afin de mettre en évidence un comportement spectral typique, deux spectres moyennés au sein du noyau et dans un organe du cytoplasme (des zones d'activité habituellement contrastées) sont tracés sur la figure 3.28a.

Ces deux courbes présentent des comportements visiblement différents qui peuvent être caractérisés par leur fréquence moyenne et leur écart-type. **La fréquence moyenne est ainsi clairement plus élevée dans le cytoplasme, plutôt actif, que dans le noyau.**

La valeur moyenne est alors calculée en une image qui constituera le canal "teinte", $T(x, y)$, par l'expression suivante :

$$T(x, y) = \vec{f} \cdot \overrightarrow{P(x, y)} \quad (3.18)$$

où \vec{f} est un vecteur que l'on génère sur la base des fréquences du spectre $P(x, y, f)$.

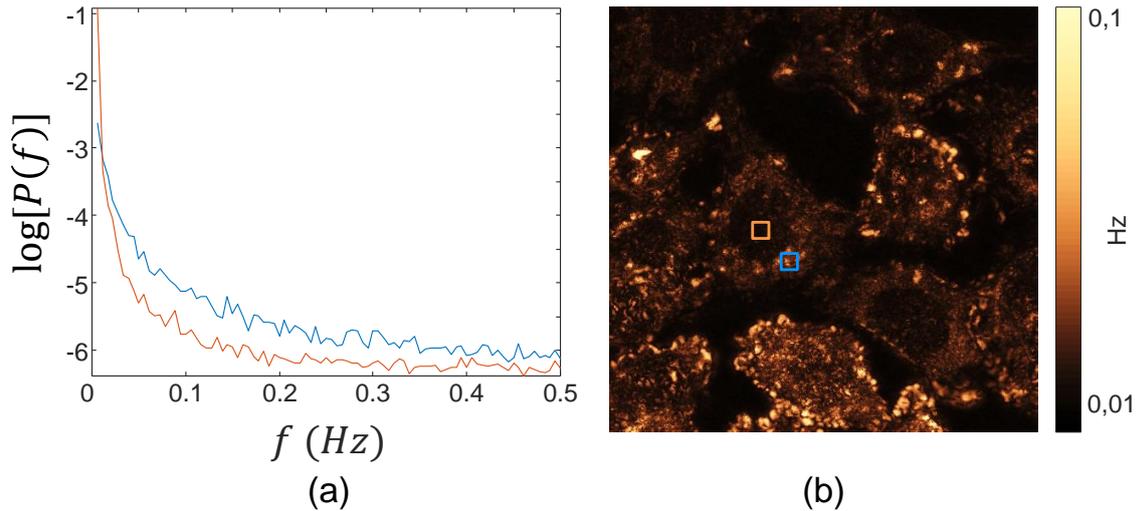


Figure 3.28 – (a) Spectres moyennés dans les deux zones indiquées sur l'image (b). La zone orange est dans le noyau et présente une valeur moyenne spectrale plus faible que la zone bleue, placée sur un organite actif. (b) Image de contraste quantitatif sur la fréquence moyenne du spectre $P(x, y, f)$ calculée par l'équation (3.18).

La figure 3.28b présente une image dont le contraste représente les variations quantitatives de la valeur moyenne du spectre de l'équation (3.17). Cette quantité sera encodée dans la teinte de l'image TSV. Ainsi, l'observateur bénéficiera d'une échelle de couleurs indiquant directement les valeurs quantitatives moyennes de fréquence des éléments de l'image, les couleurs "froides" encodant une fréquence moyenne plutôt faible, et les couleurs "chaudes" une activité de fréquence moyenne plus élevée.

L'écart-type de la distribution $P(x, y, f)$ (équation (3.17)) est également exploité afin de pondérer le codage couleur par l'écart-type à la valeur moyenne représentée des composantes. En encodant cette erreur dans la saturation de la teinte, les composantes ayant une fréquence bien définie, c'est-à-dire dans une bande étroite autour de leur fréquence moyenne, apparaissent en couleurs vives et sont mises en valeur par rapport aux composantes présentant une large distribution qui sont fréquemment plus indistinctes et se retrouvent plus grisées. À partir de $\overrightarrow{P(x, y)}$ et de \overrightarrow{f} , l'écart-type noté $S(x, y)$ car encodé dans le canal "saturation" de l'image TSV est calculé par :

$$S(x, y) = \sqrt{\overrightarrow{f}^2 \cdot \overrightarrow{P(x, y)} - (\overrightarrow{f} \cdot \overrightarrow{P(x, y)})^2} \quad (3.19)$$

Les trois images générées par les équations (3.16), (3.18) et (3.19) sont finalement combinées pour former les images en représentation TSV présentées dans la suite.

3.6.3 Images de dynamiques intracellulaires

Des séquences vidéo acquises par l'imageur de front d'onde DiPSI ont été traitées temporellement par l'approche présentée dans la section précédente.

D'une part, la distribution fréquentielle est calculée et normalisée (équation (3.17)). Sa valeur moyenne, calculée par l'équation (3.18), est encodée dans les couleurs de l'image, et son écart-type calculé par l'équation (3.19) est encodé dans la saturation des couleurs.

D'autre part, une fréquence caractéristique est choisie selon le phénomène recherché dans l'échantillon, et l'amplitude des fluctuations à cette fréquence est calculée par l'équation (3.16) et encodée dans la valeur d'intensité de l'image. Les images de dynamiques apparaissent donc colorées.

Par souci de clarté, un seul des 3 paramètres (probablement le plus significatif) est indiqué sur l'échelle de couleurs : la valeur moyenne des fréquences (canal "teinte", équation (3.18)).

Evolution et compartimentation intracellulaires

Outre l'information quantitative apportée par le code couleur, les images de phase de cellules bénéficient d'une compartimentation de leurs composants vis-à-vis de leur activité. La figure 3.29 montre les images microscopiques de phase quantitative d'une cellule de Müller et de cellules ovariennes de hamster, avant et après traitement dynamique. Tandis que l'image de phase quantitative (à gauche) présente un fort contraste permettant de distinguer de nombreux détails, tant dans le noyau que dans le cytoplasme des cellules, l'image de dynamiques en représentation TSV (à droite) apporte **un contraste supplémentaire de segmentation** des cellules par rapport au fond, mais aussi de certains organites mis en valeur pour leur forte activité par rapport aux composants plus statiques du cytoplasme. De la même manière, le noyau des cellules est clairement délimité et montre ici une faible activité.

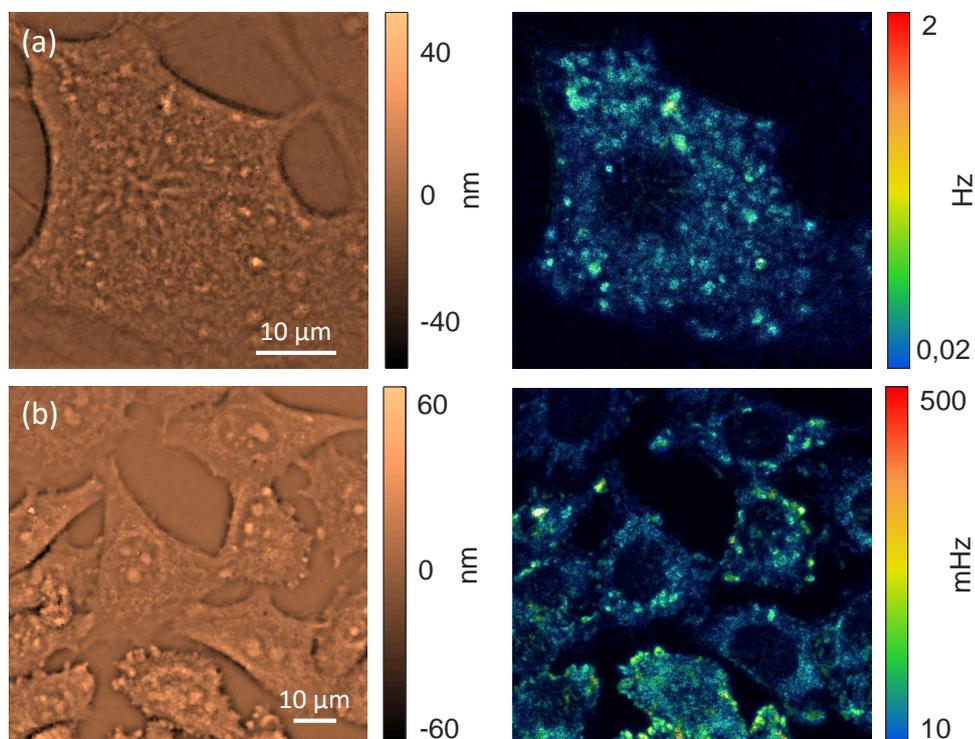


Figure 3.29 – Images de phase acquises par DiPSI et traitées par un filtrage passe-haut des fréquences spatiales. A droite, après traitement dynamique en représentation TSV. (a) Cellule de Müller. Paramètres temporels du traitement : $n = 10$, $N_s = 200$, $f_{acq} = 4$ Hz. (b) Cellules ovariennes de hamster. Paramètres temporels du traitement dynamique : $n = 10$, $N_s = 100$, $f_{acq} = 1$ Hz.

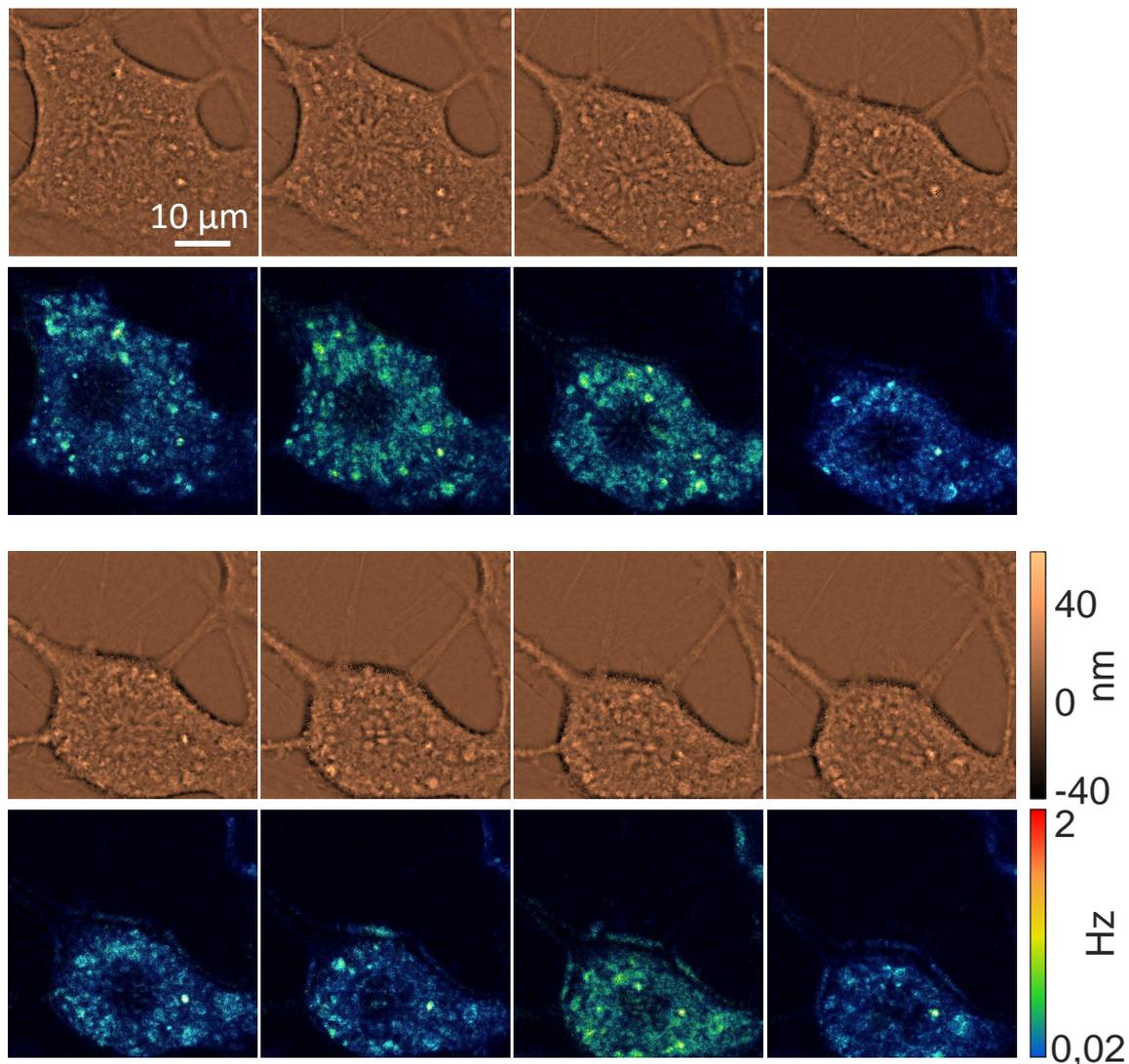


Figure 3.30 – Extraits d’une vidéo d’une cellule de Müller acquise avec l’analyseur de front d’onde avec un diffuseur fin (voir figure 3.21). Haut : images de phase filtrées. Bas : images de phase filtrées traitées en dynamiques en représentation TSV. Délai entre chaque image représentée : 9 min.

D’autres observations intéressantes découlent des séquences vidéo acquises sur ces échantillons. Sur la figure 3.30, on assiste probablement à l’apoptose de la cellule de Müller, dont le noyau, portant initialement une structure étoilée, se déstructure progressivement. Comme les nôtres, certaines études menées en OCT ont mis en évidence une activité accrue des cellules lors de certaines phases de l’apoptose. Les images de dynamiques aident à délimiter clairement le noyau, et on observe que ce contraste net entre le noyau et le cytoplasme diminue au cours de cette évolution.

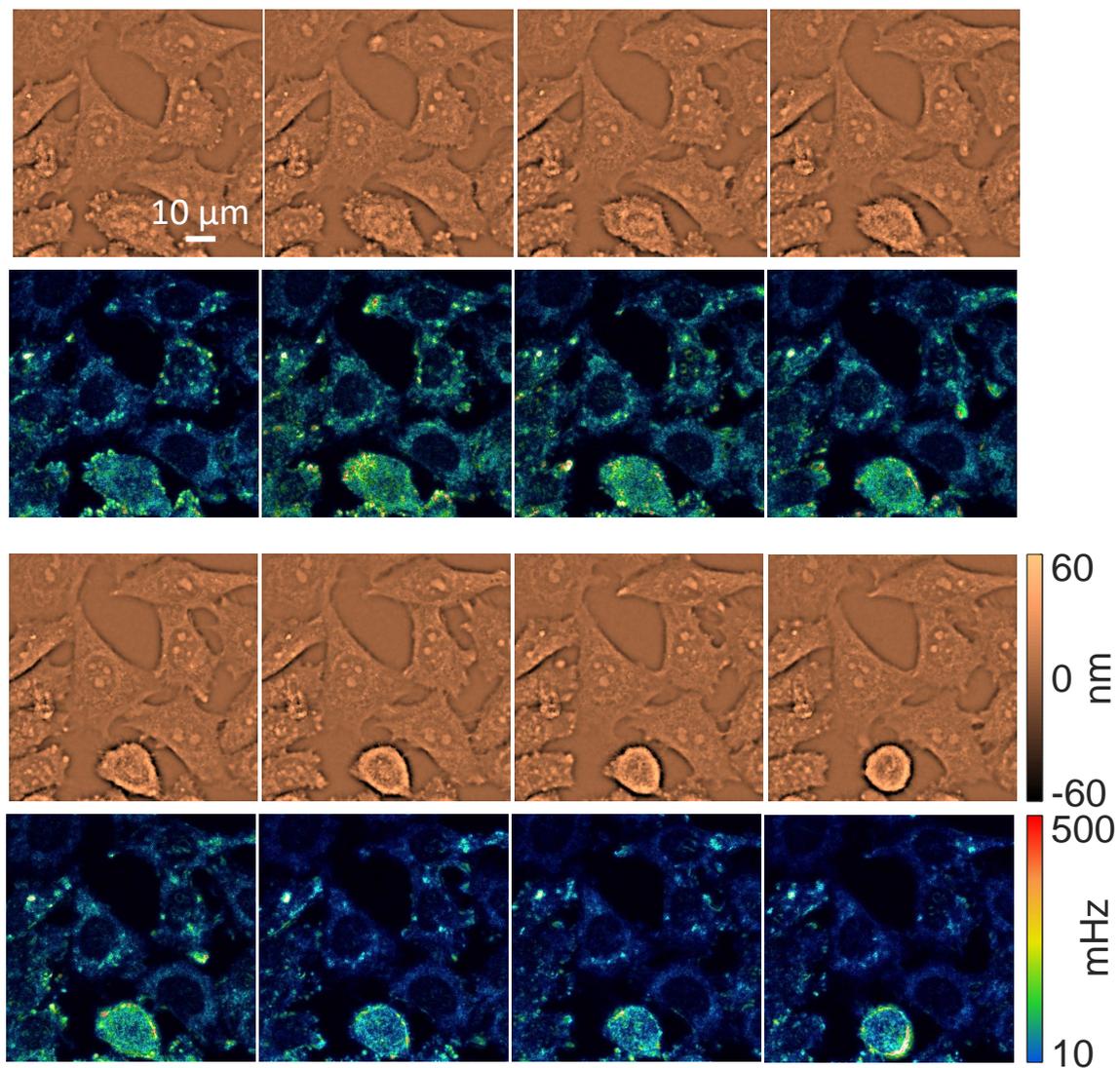


Figure 3.31 – Extraits d'une vidéo de cellules ovariennes de Hamster acquise avec l'analyseur de front d'onde avec un diffuseur fin (voir figure 3.20). Haut : images de phase filtrées. Bas : images de phase filtrées traitées en dynamiques en représentation TSV. Délai entre chaque image représentée : 3 min.

Sur les images de phase de cellules ovariennes (figure 3.31), on constate que l'une des cellules, située en bas et au milieu des images, subit une transformation au cours de l'acquisition : initialement d'apparence similaire aux autres, elle s'arrondit et présente un comportement caractéristique d'un détachement ou d'une entrée en division. Sur les images de dynamiques, cette cellule se distingue des autres dès la première image de la vidéo de par ses couleurs plus chaudes indiquant des fluctuations plus rapides, mais aussi plus vives et saturées, indiquant la présence d'une forte composante dynamique. **L'activité des composants de cette cellule trahissent donc son futur comportement à un stade plus précoce que sur les images de phase.**

Dynamiques de cicatrisation

Des dynamiques plus lentes sont étudiées sur la cicatrisation d'une plaie incisée au scalpel dans un épithélium rétinien (RPE pour Retinal Pigmented Epithelium). Ce protocole a été mis en place initialement par Cassandra Groux, Kate Grieve *et al* dans le but de reproduire *in vitro* l'un des symptômes associés à la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age, l'une des principales causes de cécité dans les pays développés) [179] : un déchirement progressif et spontané du tapis cellulaire constituant le RPE. Lorsque ce dernier ne remplit plus sa fonction de support des photorécepteurs, une cécité locale survient à l'aplomb de la déchirure, qui tend à s'élargir avec le temps chez les patients atteints de DMLA. L'observation des dynamiques cellulaires liées à la cicatrisation de ces blessures rétinienne a été effectuée en D-FFOCT et les résultats valident leur utilisation en tant que modèle artificiel de la maladie [110].

La figure 3.32 présente la première et la dernière image de phase d'une séquence vidéo durant 2.3 h. On visualise ici le rétrécissement de la largeur de l'incision. Tandis que sur les images de phase l'apparence des cellules est homogène indépendamment de leur proximité ou non à la plaie, les images de dynamiques révèlent une forte activité des cellules situées à proximité directe de la blessure. De ce fait, **le processus de fermeture de la plaie peut être étudié à l'échelle de l'activité cellulaire, de manière quantitative.**

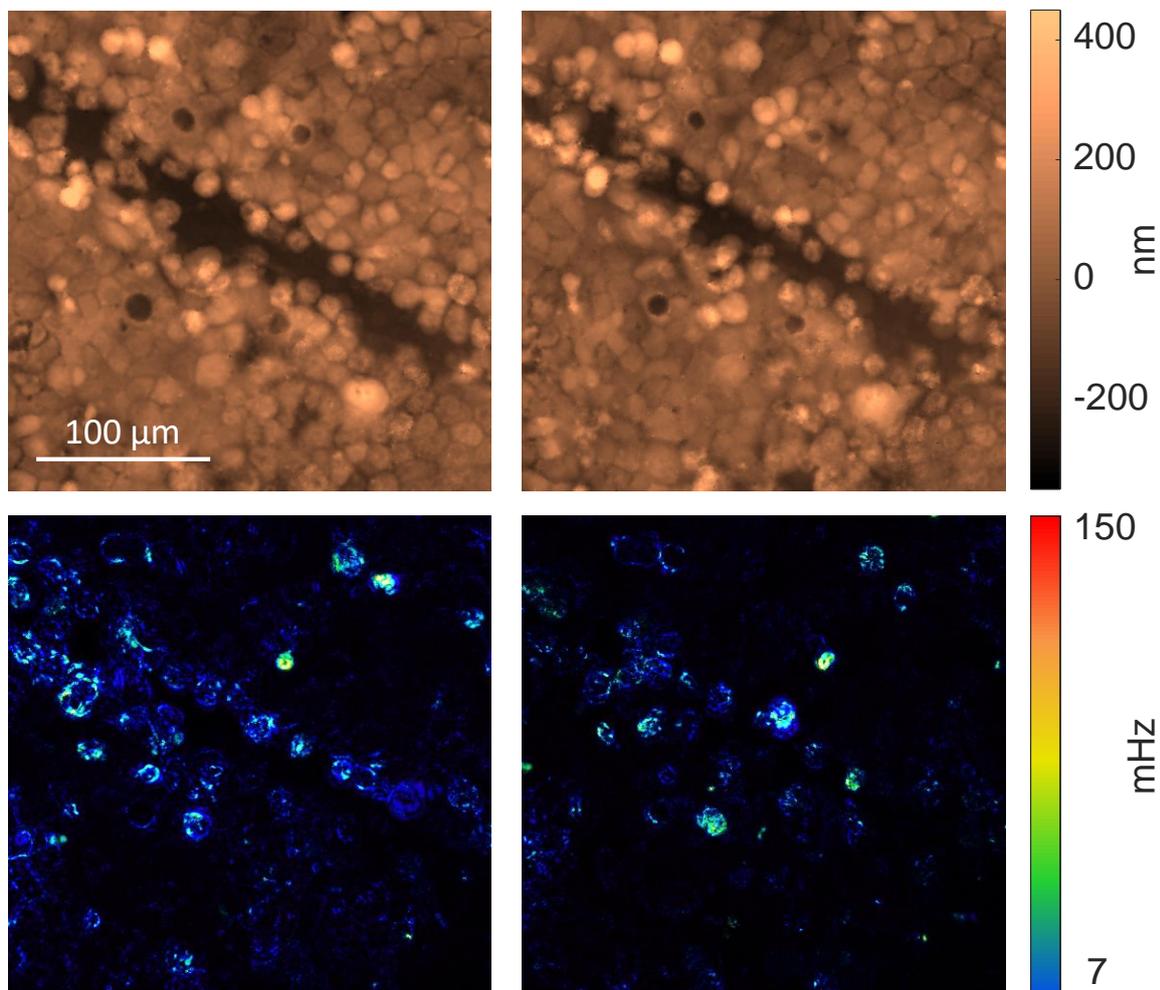


Figure 3.32 – Extraits d'une vidéo du processus de fermeture d'une plaie dans un épithélium de rétine acquise avec l'analyseur de front d'onde avec un dif-fuseur fin (voir figure 3.20). Haut : images de phase brutes. Bas : images de phase traitées en dynamiques en représentation TSV. Délai entre les images représentées : 2.3 h.

J'ai récemment amélioré la reproductibilité du protocole en pratiquant l'incision non plus au scalpel, mais à l'aide d'un laser (voir figure 3.33). La largeur de l'incision peut ainsi être contrôlée par la taille et la puissance du faisceau pour produire un modèle d'étude plus fiable. De plus, l'observation peut être effectuée en continu avant, pendant et après l'incision sans avoir à déplacer l'échantillon pour pratiquer l'incision.

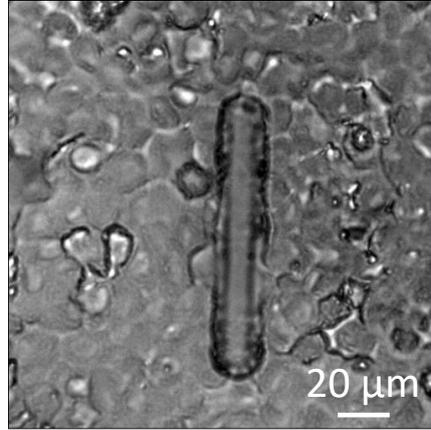


Figure 3.33 – Image en lumière blanche d'une incision verticale effectuée au laser dans un épithélium rétinien.

Pour concentrer une quantité d'énergie suffisante à la photoablation, c'est-à-dire la brûlure de l'épithélium, des impulsions laser de durées allant de la nano à la microseconde doivent être envoyées, avec une intensité comprise entre 10^7 et 10^{10} W cm^{-2} [183]. Le laser utilisé ici est un laser supercontinuum Leukos délivrant des impulsions de l'ordre de 10 ns sur une très large gamme de longueurs d'onde de 0.4 à 2.4 μm . Pour l'essentiel, ce sont les longueurs d'onde basses (autour de 400 nm) qui permettent une découpe efficace. Le faisceau est focalisé sur la surface de l'épithélium par un objectif de microscope de grandissement $\times 50$ et d'ouverture numérique 0.6. En notant $\Delta r = \frac{\lambda}{2ON}$ l'extension de la fonction d'étalement du spot laser latérale, la puissance crête P des pulses laser étant d'environ 3 W et leur cycle de travail $n = 40\%$, l'intensité déposée dans le plan de l'échantillon vaut $I_{x,y} = \frac{nP}{\Delta r^2} \approx 10^8$ W cm^{-2} . Ce protocole permettra **une bien meilleure reproductibilité** lors de l'étude des processus de cicatrisation ou de dégénérescence de ce type de plaie sur les images de phase dynamiques.

3.6.4 Conclusion

L'analyseur de front d'onde avec un diffuseur fin associé à un traitement numérique temporel du type de celui de D-FFOCT [111] fournit un protocole d'**imagerie de dynamiques intracellulaires facilement mis à disposition pour tout utilisateur**. Les mouvements des organites sont mis en contraste et leurs fréquences offrent un moyen supplémentaire de caractériser l'état des cellules imagées.

Tandis que la résolution temporelle n'est limitée que par l'acquisition, des signaux pertinents et exploitables ne sont observés qu'à des fréquences plutôt basses, et bien inférieures à celles auxquelles on peut avoir accès. En effet, les dynamiques les plus rapides présentées dans ces résultats sont celles de la figure 3.29 et sont de l'ordre du Hz, tandis que les caméras permettent facilement d'atteindre le kHz. La limitation ne réside donc pas ici dans l'acquisition, mais dans la sensibilité de la mesure. Les plus petits composants cellulaires qui produisent des déphasages typiquement inférieurs à quelques nm sont ceux qui ont le potentiel d'être en agitation à haute fréquence, et ils ne sont alors détectés ni en phase, ni en dynamique. Pour pouvoir étudier ces objets faiblement contrastés, **une méthode permettant de gagner en sensibilité de phase** a été développée et est présentée dans la prochaine section.

3.7 Gain en sensibilité de phase par filtrage spatial : qSCAT

Dans la section précédente, les composants cellulaires dont on détecte les mouvements sont ceux qui produisent des déphasages suffisamment élevés, typiquement supérieurs au nanomètre. Il reste difficile de détecter de plus petits objets dont le signal de phase est noyé dans le bruit de détection (typiquement $\sigma_\varphi = 1 \text{ nm}$).

La sensibilité est limitée par le fait que, dans notre configuration en transmission, l'amplitude du champ diffusé est très faible par rapport à celle du champ incident ($|E_d| \ll |E_i|$). Dans ces conditions, la composante du champ électrique qui est déphasée par le petit objet de phase est faible devant le fort champ électrique d'illumination, qui n'est pas déphasé. La figure d'interférences est alors faiblement contrastée.

Récemment, la microscopie *iSCAT* [184, 185] a démontré la possibilité de détecter l'intensité de nano-objets ayant une très faible section efficace de diffusion. La méthode repose sur une configuration en réflexion (voir figure 3.34b). Elle consiste à mesurer l'interférence entre le champ incident, faiblement réfléchi par la lamelle, et le champ diffusé par les nano-objets. Dans ces conditions, le déséquilibre entre les champs incident et diffusé est moins prononcé et mène à une figure d'interférences mieux contrastée. Comme la méthode d'holographie en champ sombre présentée au chapitre 1, ce régime bénéficie du gain interférométrique apporté par le signal de référence et fournit ainsi un rapport signal à bruit plus élevé qu'un champ sombre classique (voir figure 3.34a). L'avantage principal, par rapport à la configuration holographique, est que la mesure est auto-référencée et donc relativement exempte de bruits induits par des vibrations du bras de référence, ce qui permet d'améliorer le rapport signal à bruit du signal interférométrique. Dans la version *a-iSCAT* [186] ou la version en transmission *COBRI*⁸ [109, 187-189], un filtre spatial réfléchissant/absorbant est placé dans le plan focal arrière du microscope afin de mieux **rééquilibrer le rapport entre les intensités lumineuses incidente $|E_i|^2$ et diffusée $|E_d|^2$** (voir figure 3.34c).⁹ Le gain en sensibilité résultant permet de détecter des objets de taille allant jusqu'à la protéine unique [109, 189].

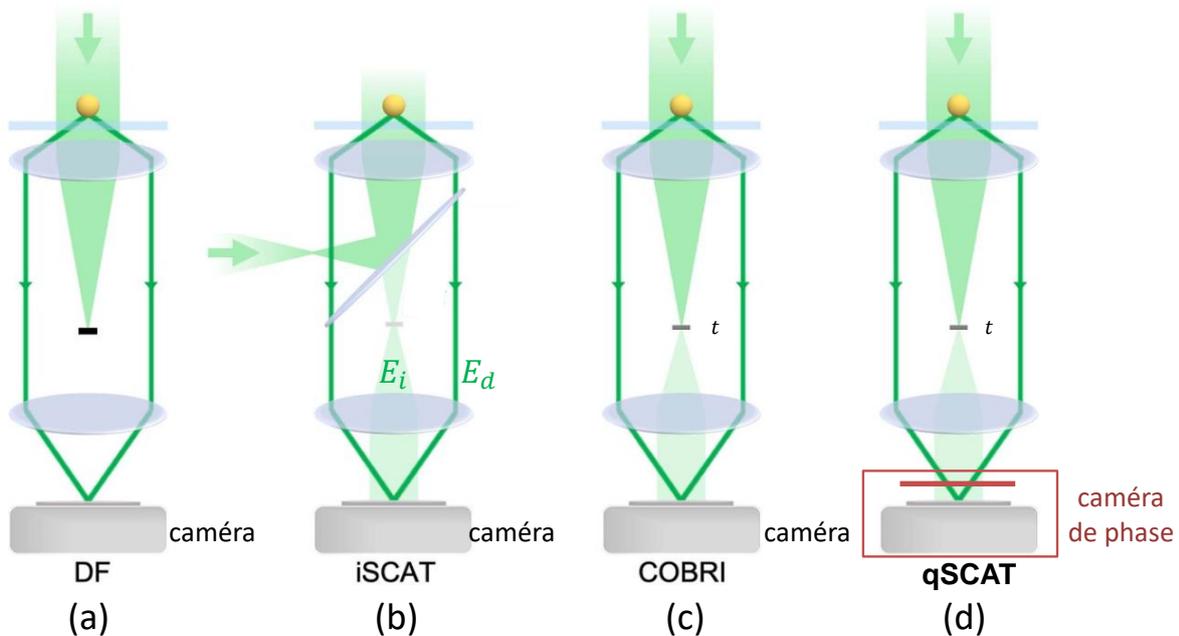


Figure 3.34 – Illustration des configurations microscopiques (a) en champ sombre (Dark Field), (b) *iSCAT*, (c) *COBRI* et (d) *qSCAT*. Figure adaptée de [185].

8. Pour *Coherent Brightfield*.

9. Le même procédé a été utilisé en holographie dans l'axe [190].

Bien que les imageries iSCAT et COBRI soient des méthodes interférométriques, elles ne permettent cependant pas de remonter quantitativement à la phase et l'estimation de la masse sèche est réalisée via une calibration contraignante de l'intensité [188, 189]. Notons que des travaux récents proposent de remonter à la phase grâce à une configuration d'interférométrie à décalage de phase basée sur une modulation photothermique de la phase du champ incident dans la pupille [191]. La méthode est cependant complexe à mettre en œuvre et nécessite l'acquisition de 4 images ce qui réduit la résolution temporelle, notamment pour les applications en imagerie de dynamique envisagées ici.

Dans cette section, nous proposons une méthode d'imagerie en une seule acquisition de la phase quantitative s'inspirant des techniques iSCAT/COBRI (voir figure 3.34d). Notre méthode, que nous appelons qSCAT pour "quantitative scattering", **amplifie le signal de phase** délivré par un montage d'imagerie de front d'onde par l'ajout d'un **simple filtre spatial dans le plan focal arrière de l'objectif**. Elle permet ainsi la détection et l'imagerie de phase quantitative de plus petits objets, ouvrant des perspectives d'observations de nouveaux phénomènes biologiques et dynamiques.

3.7.1 Modèle théorique

Nous avons déjà posé les bases du problème à la section 3.1 : le champ total collecté E_t est la somme du champ incident (n'ayant pas interagi avec l'échantillon) E_i et du champ diffusé par l'échantillon E_d (voir figure 3.34d).

$$E_t = E_i + E_d \quad (3.20)$$

Cette sous-section démontre dans un premier temps pourquoi l'atténuation du champ E_i seul mène à une amplification du déphasage mesuré. Nous proposons un modèle permettant d'ensuite retrouver la valeur de phase quantitative à partir de la mesure amplifiée.

Principe d'amplification du déphasage

Pour les objets transparents étudiés, l'amplitude du champ diffusé est très faible devant celle du champ incident non perturbé. L'équation (3.3) établit alors un simple déphasage φ entre E_t et E_i (voir figure 3.2) :

$$E_t \approx E_i e^{-i\varphi} \quad (3.21)$$

La relation (3.20) associée à la condition $|E_i| \gg |E_d|$ implique également que ce déphasage φ est très faible. La figure 3.35a représente les champs complexes et ce déphasage φ pour une configuration classique d'imagerie de phase quantitative, dans laquelle on observe une distribution ponctuelle du champ incident au centre de la fonction pupille arrière (plan de Fourier). Le principe de la méthode d'amplification est le suivant : **atténuer E_i a pour conséquence d'amplifier le déphasage entre les champs total collecté et incident**, notés E'_t et E'_i en présence du filtre. Cet effet est illustré sur la figure 3.35b.

Notons que l'annulation complète du champ incident $E'_i = 0$ produirait une illumination en champ sombre grâce à laquelle la diffusion serait contrastée au maximum sur l'image d'intensité. Cependant, en analyse de front d'onde, la production d'une image de phase nécessite d'accéder à une valeur de gradient de phase sur l'ensemble de l'image, ou a minima sur un domaine connexe à celui qui est étudié. Dans les régions d'intensité nulle du champ sombre, les gradients de phase n'étant pas définis, il serait impossible de les intégrer. Pour cette raison, il est préférable de ne pas totalement éteindre E_i mais de lui appliquer un facteur de transmission $t \neq 0$, idéalement choisi tel que $|E'_i| = |tE_i| \approx |E_d|$ afin d'atteindre le meilleur compromis entre atténuation de E_i et niveau de signal nécessaire à une bonne reconstruction de phase.

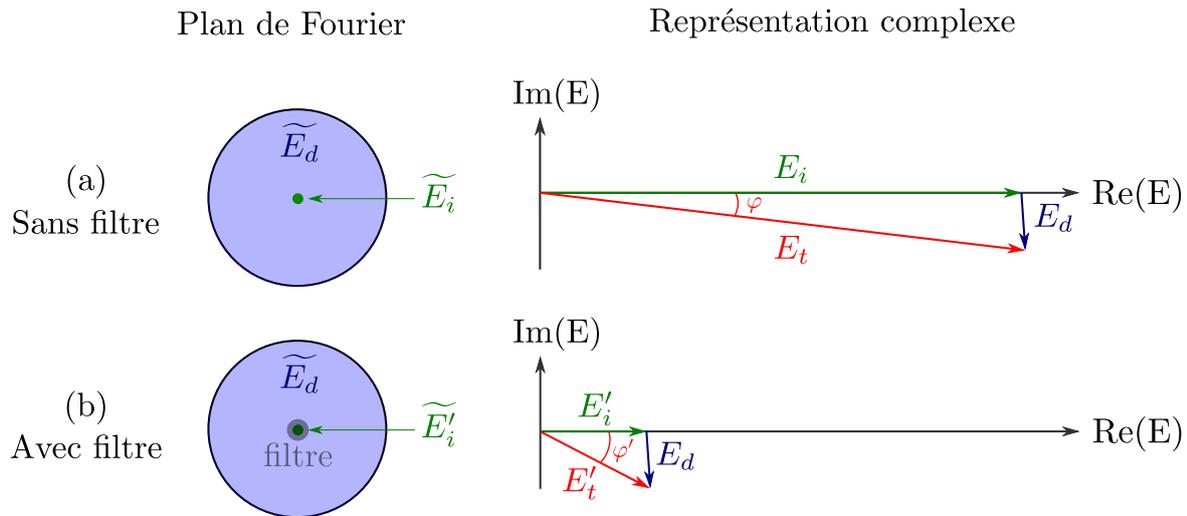


Figure 3.35 – Fonction pupille arrière et représentation complexe des champs scalaires incident E_i , diffusé E_d et total E_t pour un échantillon transparent tel que $E_i \gg E_d$. (a) Sans filtre, le champ total collecté E_t porte un déphasage φ par rapport à E_i (d’après l’équation (3.21) et la figure 3.3). (b) Avec filtrage de E_i seul dans le plan de Fourier, tel que E_i devient $E'_i < E_i$, alors le champ total $E'_t = E'_i + E_d$ porte un nouveau déphasage $\varphi' > \varphi$.

L’illumination étant considérée parallèle à l’axe optique et de forte cohérence spatiale, la distribution en fréquences spatiales du champ incident n’ayant pas interagi avec l’échantillon $\widetilde{E}_i(k_x, k_y)$ est idéalement concentrée dans le plan de Fourier en un point central (en vert sur la figure 3.35). Quant au champ diffusé, il est au contraire multidirectionnel, réparti sur une vaste gamme de vecteurs d’onde, et sa transformée de Fourier $\widetilde{E}_d(k_x, k_y)$ est répartie sur un disque remplissant la pupille de sortie de l’objectif (en bleu sur la figure 3.35). En plaçant un disque absorbant de transmission t et de rayon r_{fs} petit devant le rayon de la pupille r_p (en gris sur la figure 3.35b) au centre du plan de Fourier, **on atténue fortement** \widetilde{E}_i (contenu dans ce disque) mais **on affecte faiblement** \widetilde{E}_d .

Généralisation pour un masque de transmission complexe

Afin de traiter ce filtrage de manière plus réaliste, on considère maintenant que le filtre pupillaire induit non seulement une atténuation du champ, mais aussi un déphasage β (voir figure 3.36b) : on note la transmission complexe $t = t_0 e^{-i\beta}$. En affectant aux grandeurs du problème en présence du filtre spatial un *prime*, la somme (3.20) devient :

$$E'_t = E'_i + E'_d \quad (3.22)$$

$$= t_0 E_i e^{-i\beta} + E'_d \quad (3.23)$$

Cependant, la valeur du faible déphasage φ que l’on souhaite mesurer n’apparaît plus explicitement dans cette expression.

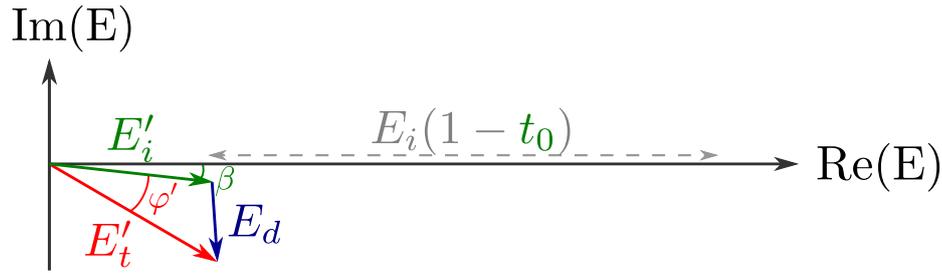


Figure 3.36 – Représentation complexe des champs scalaires incident E_i , diffusé E_d et transmis E_t . (a) Sans filtre spatial, le champ transmis E_t porte un déphasage φ par rapport à E_i (d'après l'équation (3.21) et la figure 3.3). (b) Avec le filtre spatial de transmission complexe $t = t_0 e^{-i\beta}$ appliquée sur E_i seul, $E'_t = t_0 E_i e^{-i\beta} + E'_d$ porte un nouveau déphasage $\varphi' > \varphi$ par rapport à E'_i .

Extraction de valeurs quantitatives

Nous venons de voir que l'ajout d'un filtre pupillaire permettait d'amplifier le signal de phase pour permettre à terme de gagner en rapport signal à bruit. Cette configuration ne permet cependant pas d'accéder à un déphasage quantitatif, typiquement mesuré sans filtre, et permettant de remonter par exemple à une mesure de masse sèche. En effet, on mesure une phase amplifiée, ce qui la rend plus facilement détectable, mais sa valeur ne correspond plus à la projection $\varphi = \int dn e$. Nous proposons ici un modèle simple permettant de **retrouver la valeur quantitative de la phase φ à partir de la mesure amplifiée φ'** . Celui-ci se base sur l'hypothèse que le champ diffusé E_d n'est pas impacté par la présence du filtre et reste donc identique avec ou sans le filtre spatial¹⁰.

$$E'_d = E_d \quad (3.24)$$

Cette hypothèse implique que (i) le rayon du filtre r_{fs} doit être petit devant celui de la pupille arrière de l'objectif et que (ii) la distribution angulaire du rayonnement diffusé est large. Cette dernière hypothèse est vérifiée si l'objet présente un diamètre sub-longueur d'onde impliquant une diffusion relativement isotrope, de type Rayleigh. Un objet de plus grand diamètre, présentant une diffusion de Mie "vers l'avant" (coefficient d'anisotropie g proche de 1) subirait une forte atténuation de son champ diffusé. Notons cependant que ce point n'est pas critique car ce développement vise l'imagerie quantitative de particules nanométriques, et se place donc implicitement sous l'hypothèse où le champ diffusé n'est pas impacté par le filtrage. Mais l'étendue de son application à des objets plus grands pourra être explorée en implémentant une méthode de déconvolution de E'_t en prenant en compte la transmission complexe du filtre.

A partir des équations (3.20), (3.23) et (3.24), on peut alors remonter à l'expression du champ complexe total mesuré traditionnellement en l'absence du filtre :

$$E_t = E'_t + (1 - t_0 e^{-i\beta}) E_i \quad (3.25)$$

Les caméras étant sensibles à l'intensité, on note I_t et I'_t les intensités relatives respectivement aux champs E_t et E'_t . On pose alors :

$$E_t = \sqrt{I_t} e^{-i\varphi} \quad (3.26)$$

$$E'_t = \sqrt{I'_t} e^{-i(\varphi'+\beta)} \quad (3.27)$$

10. Un critère de validité de cette hypothèse est établi sur le ratio entre le rayon du filtre et celui de la pupille arrière $\frac{r_{fs}}{r_p}$ au paragraphe suivant.

et l'équation (3.25) se réécrit ainsi :

$$\sqrt{I_t}e^{-i\varphi} = \sqrt{I'_t}e^{-i(\varphi'+\beta)} + (1 - t_0e^{-i\beta})E_i \quad (3.28)$$

En imagerie de front d'onde, l'intensité mesurée vient du quotient entre les interférogrammes (ou patrons de speckle) d'objet et de référence, c'est-à-dire qu'on ne mesure pas directement I_t et I'_t mais les ratios d'intensité I_m et I'_m définis par :

$$I_m = \frac{|E_t|^2}{|E_i|^2} = \frac{I_t}{|E_i|^2} \quad (3.29)$$

$$I'_m = \frac{|E'_t|^2}{|E_i|^2} = \frac{I'_t}{t_0^2|E_i|^2} \quad (3.30)$$

En termes d'intensité mesurée par l'analyseur de front d'onde, la relation (3.28) devient alors¹¹ :

$$\sqrt{I_m}e^{-i\varphi} = t_0\sqrt{I'_m}e^{-i(\varphi'+\beta)} + 1 - t_0e^{-i\beta} \quad (3.31)$$

La relation (3.31) permet donc de retrouver des valeurs quantitatives de la phase φ et de l'intensité I_m à partir de mesures plus précises φ' et I'_m puisque bénéficiant d'un gain.

3.7.2 Simulations

Champ complexe

Dans le cadre d'une collaboration, Pierre Bon du LP2N a simulé le champ complexe E_t résultant de l'imagerie en transmission (illumination en onde plane, $ON_{collection} = 1.4$) d'une bille de polystyrène de 100 nm dans l'eau, par la méthode du produit de convolution [192]. Comme illustré aux figures 3.37a et b, on dispose ainsi de valeurs d'amplitude et de phase correspondant à la lumière diffusée par une particule, auxquelles on se propose de faire subir numériquement le filtrage décrit plus haut.

Amplification du déphasage mesuré Afin de simuler le filtrage spatial, on effectue une transformée de Fourier spatiale du champ \widetilde{E}_t . Les valeurs des pixels compris dans un disque de rayon r_{fs} sont ensuite multipliés par la transmission complexe $t_0e^{-i\beta}$ du filtre, afin de simuler l'interaction avec le disque placé dans le plan de Fourier. On simule ainsi le champ \widetilde{E}'_t :

$$\widetilde{E}'_t = \begin{cases} t_0e^{-i\beta}\widetilde{E}_t & \text{pour } |k| \leq \frac{r_{fs}}{r_p}k_{max} \\ \widetilde{E}_t & \text{pour } |k| > \frac{r_{fs}}{r_p}k_{max} \end{cases} \quad (3.32)$$

L'intensité I'_m et la phase φ' , calculées respectivement par $\frac{|E'_t|^2}{t_0^2}$ et $\arg(E'_t)$, sont représentées sur les figures 3.37c,d pour des paramètres arbitraires $t_0 = 0.1$ et $\beta = 0$. On y vérifie l'obtention d'une amplification de phase, dont la valeur est nettement supérieure à celle de la figure 3.37a. Quant à la carte d'intensité, elle correspond comme prévu à une image en champ *partiellement* sombre, où la lumière diffusée par l'objet est prépondérante par rapport au fond.

11. L'illumination est parallèle à l'axe optique donc $E_i = |E_i|$.

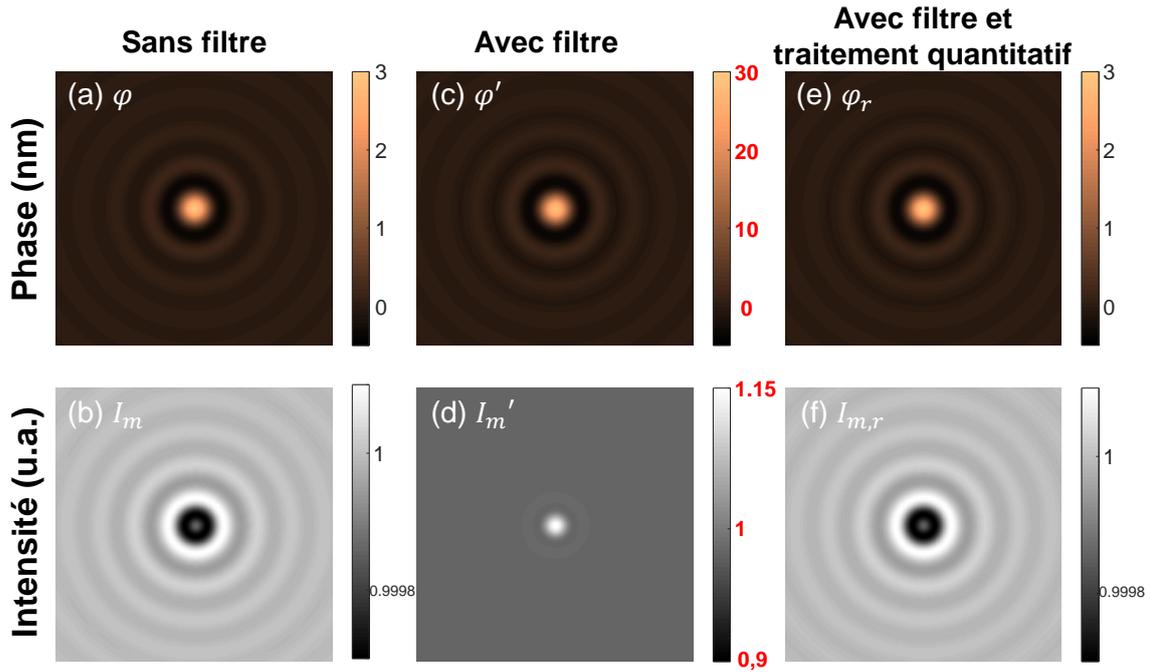


Figure 3.37 – Simulation numérique des images de phase et d'intensité d'un objet sphérique de 100 nm de diamètre illuminé par un faisceau parallèle de longueur d'onde $\lambda = 440$ nm imagé avec une ouverture numérique $ON = 1.4$. [192] (a,b) Sans filtrage spatial. (c,d) Avec un filtre de transmission $T = t_0^2 = 1\%$ et de déphasage $\beta = 0$ placé au centre du plan de Fourier : on observe un gain de phase, et une amplification du contraste d'intensité (noter les échelles de couleurs). (e,f) Avec filtrage spatial ($T = 1\%$, $\beta = 0$) et traitement (3.28) : les valeurs quantitatives des images (a,b) sont retrouvées, tout en bénéficiant du gain en sensibilité observé sur (c,d).

La figure 3.38 représente les amplifications en phase attendues au centre de la particule en fonction du coefficient de transmission T (tel que $t_0 = \sqrt{T}$) et du déphasage β du filtre spatial. Le ratio entre le rayon du filtre spatial r_{fs} et celui de la pupille arrière r_p y est fixé à 7%. Cette répartition indique que pour un déphasage β du filtre proche de 0 $[2\pi]$, l'amplification sera d'autant plus forte que la transmission T est faible, comme attendu : cela traduit que **la clé est le rééquilibrage du ratio $\frac{E_d}{E_i}$** .

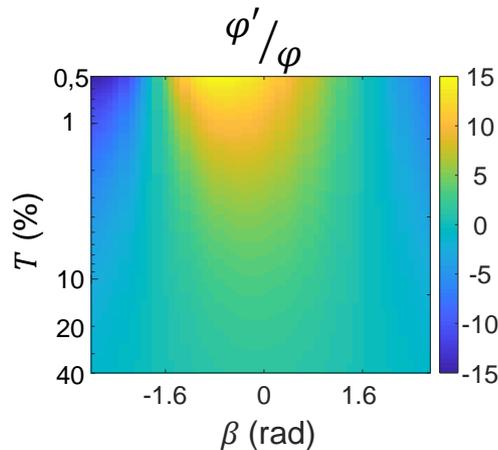


Figure 3.38 – Carte des valeurs de gain en phase simulée en fonction du coefficient de transmission T (en échelle logarithmique) et du déphasage β du filtre spatial, pour le ratio $\frac{r_{fs}}{r_p} = 7\%$.

Quantitativité Après l'amplification des valeurs de phase et de contraste d'intensité mesurées grâce au filtrage spatial, le caractère quantitatif de la mesure peut être retrouvé en appliquant l'équation (3.28), en prenant pour arguments les cartes de phase et d'intensité des figures 3.37c,d. Les figures 3.37e,f présentent les cartes de phase et d'intensité quantitatives retrouvées, très proches des images initiales des figures 3.37a,b.

Les erreurs relatives entre les valeurs retrouvées par le modèle ($\varphi_r, I_{m,r}$) et les "vraies" valeurs (*ground truth* φ, I_m), sont représentées sur la figure 3.39 en fonction du coefficient de transmission T et du déphasage β du filtre spatial, pour un ratio $\frac{r_{fs}}{r_p}$ de 7%. Des erreurs inférieures à 10^{-2} pour la phase et à 10^{-4} pour l'intensité démontrent **la validité du modèle quelles que soient les valeurs de T et β .**

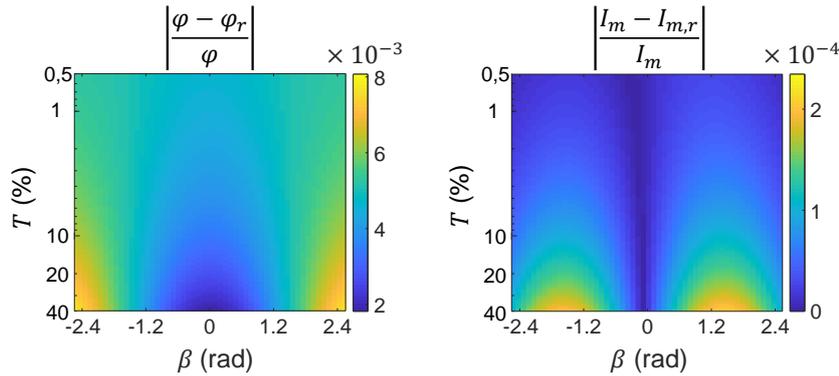


Figure 3.39 – Cartes des erreurs relatives prévues par le modèle en phase et en intensité simulées en fonction du coefficient de transmission T (en échelle logarithmique) et du déphasage β du filtre spatial, pour le ratio $\frac{r_{fs}}{r_p} = 7\%$.

Influence du diamètre du filtre Comme discuté précédemment, la validité de l'hypothèse (3.24) est compromise si le filtre est trop grand. Afin d'étudier le rôle de sa taille, la figure 3.40 représente ces erreurs relatives tracées en fonction du ratio entre le rayon du filtre et celui de la pupille arrière $\frac{r_{fs}}{r_p}$, en considérant comme paramètre une transmission complexe du filtre spatial caractérisée par les valeurs arbitraires $T = 1\%$ et $\beta = 0$.

On constate qu'au-dessous de $\frac{r_{fs}}{r_p} = 10\%$, les erreurs en phase sont inférieures à 1% et celles en intensité inférieures à $10^{-3}\%$. On établit alors cette valeur du ratio comme limite au-dessous de laquelle on considère raisonnable l'hypothèse (3.24). Comme on le verra plus loin, de telles valeurs sont parfaitement accessibles expérimentalement.

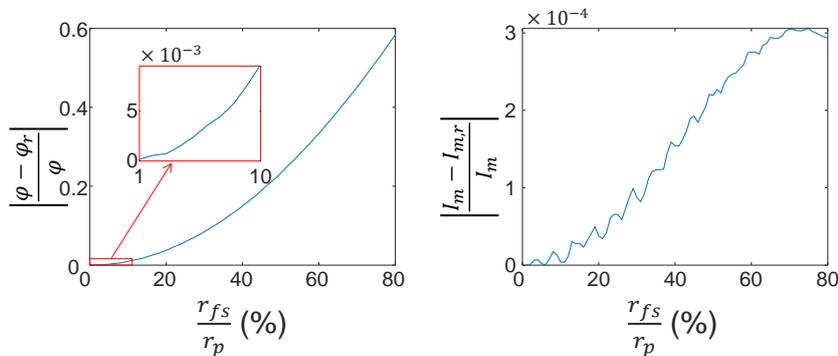


Figure 3.40 – Erreurs relatives en phase et en intensité en fonction du ratio entre le rayon du filtre spatial r_{fs} et le rayon de la pupille arrière de l'objectif r_p , pour les paramètres $T = 1\%$ et $\beta = 0$.

3.7.3 Montage optique

Pour des raisons pratiques nous avons utilisé ici un analyseur ID4L (voir section 3.4.2) développé par Benoit Rogez, post-doctorant dans le groupe. Le filtre spatial est une pastille composée d'une épaisseur de 80 nm d'or sur 5 nm de chrome déposée par lithographie sur une lame de verre à l'institut des NanoSciences de Paris par Laurent Belliard. Plusieurs filtres de diamètres allant de 25 à 500 μm ont été réalisés.

Le facteur de transmission T du filtre spatial est mesuré à 7% à $\lambda = 440$ et 550 nm. Le déphasage $\beta = 0.5$ rad est mesuré par l'ID4L.

Le plan focal arrière de l'objectif de microscope étant inaccessible car situé à l'intérieur de l'objectif, le filtre spatial est placé dans un plan conjugué à ce plan focal arrière, reporté après la lentille de tube par une lentille de focale notée f_1 (voir figure 3.41). Une imagerie de ce plan (figure 3.42) permet le placement précis du filtre spatial au centre de la pupille à l'aide de platines de translation.

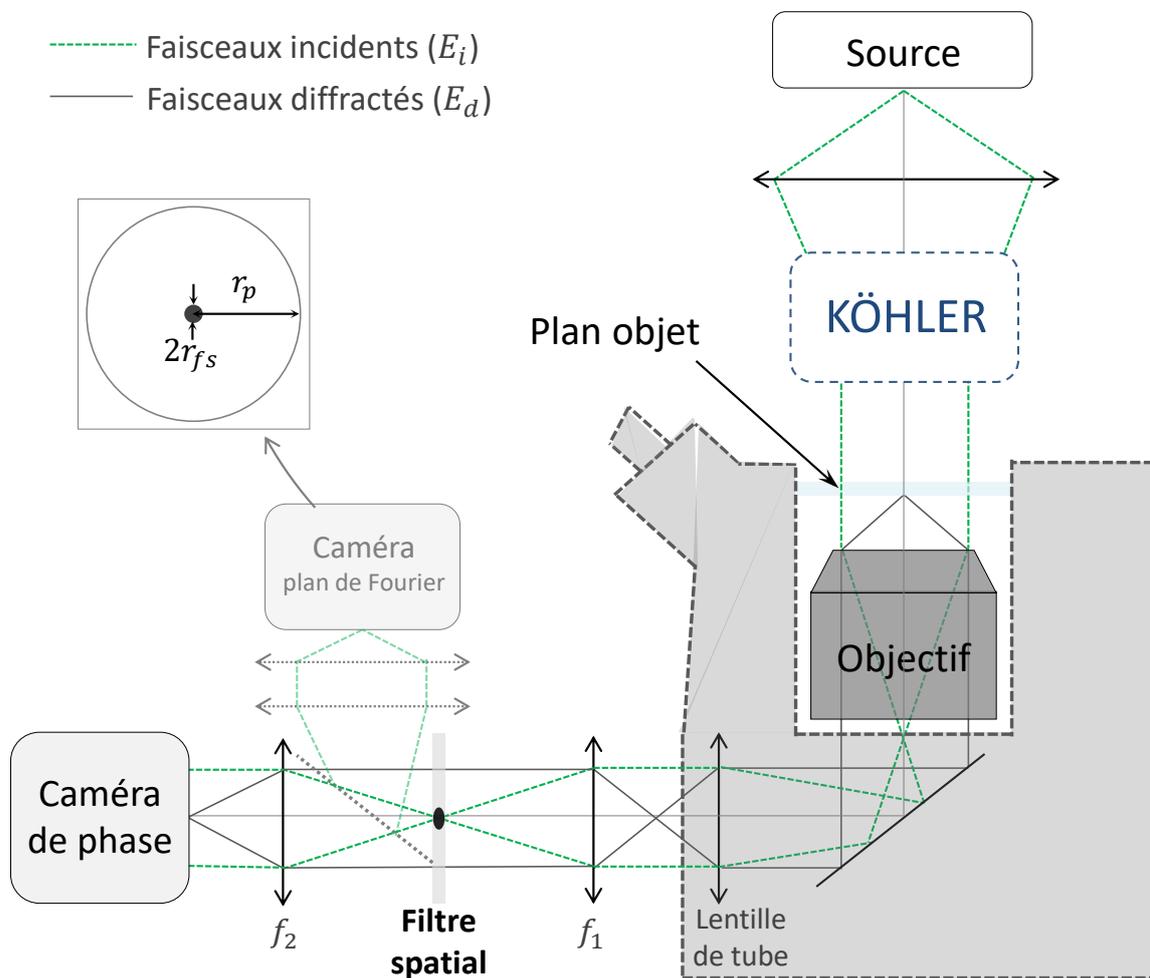


Figure 3.41 – Le montage consiste en l'analyseur de front d'onde de la figure 3.18 doté d'un télescope supplémentaire (lentilles $f_1 = f_2 = 100$ mm) donnant accès au plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif, où est positionné le filtre spatial de rayon r_{fs} , de transmission T et de déphasage β . Un miroir amovible permet d'imager le filtre spatial dans la pupille arrière de rayon r_p sur une deuxième caméra, voir figure 3.42. La caméra de phase désigne l'ensemble {masque de phase + caméra}. Les distances de focalisation ne sont pas représentées à l'échelle par souci de compacité.

Afin de visualiser le filtre spatial, on utilise comme échantillon un diffuseur épais induisant un intense signal de diffusion dans une large plage angulaire, ce qui permet de remplir la pupille (voir figure 3.42a). Le diamètre du filtre spatial est choisi de manière à recouvrir entièrement l'extension spectrale de l'illumination (ponctuelle dans une configuration de Köhler parfaite, figure 3.42b, mais évidemment plus étendue en pratique) tout en étant le plus petit possible pour satisfaire au mieux l'hypothèse (3.24). Dans les conditions d'illumination détaillées en section 3.5.1, un disque d'or de rayon $r_{fs} = 100 \mu\text{m}$ permet de recouvrir entièrement le champ incident dans le plan de Fourier (voir figure 3.42c).

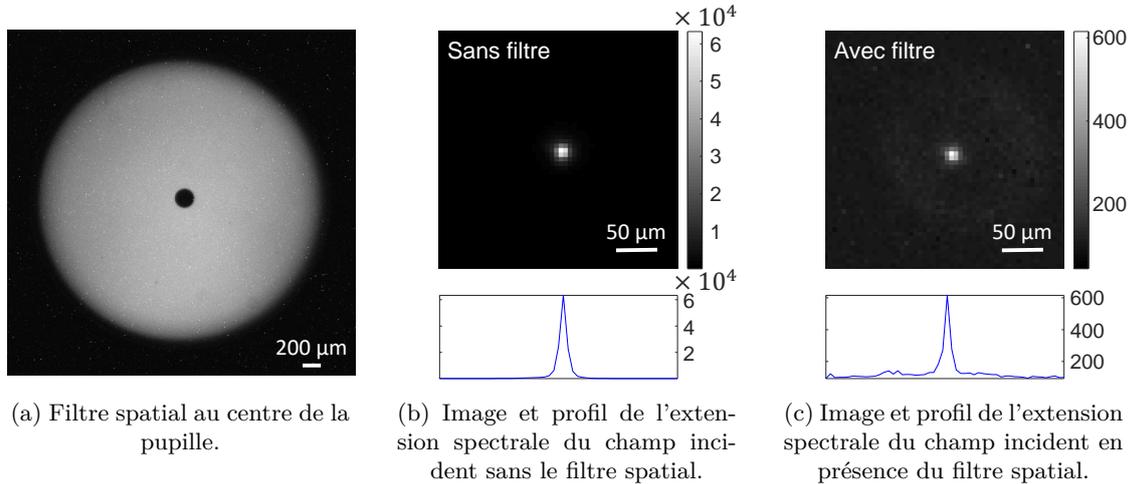


Figure 3.42 – Images du plan de Fourier dans lequel est placé le filtre spatial de rayon $r_{fs} = 100 \mu\text{m}$ (voir figure 3.41). L'objectif utilisé a pour grandissement $M = 60$ et ouverture numérique $ON = 0.9$. La longueur d'onde d'illumination est $\lambda = 440 \pm 20 \text{ nm}$.

Le rayon de l'image de la pupille arrière est égal à $\frac{ONf_1}{M} = 1.5 \text{ mm}$ pour l'objectif de microscope de grandissement $M = 60$ et d'ouverture numérique $ON = 0.9$ ainsi que la lentille de focale $f_1 = 100 \text{ mm}$ utilisée pour reformer le plan de Fourier après la lentille de tube (voir figure 3.41). Le ratio entre la taille du filtre spatial et celle de la pupille vaut donc $\frac{r_{fs}}{r_p} = \frac{100 \mu\text{m}}{1.5 \text{ mm}} = 7\%$, et **satisfait la condition** $\frac{r_{fs}}{r_p} < 10\%$ établie à partir de la figure 3.40 et nécessaire à la validation de l'hypothèse (3.24).

3.7.4 Résultats expérimentaux

Le gain en sensibilité est démontré expérimentalement dans cette section sur des objets calibrés. L'échantillon est composé de billes de polystyrène fluorescentes de diamètre $e = 100$ nm immobiles dans de l'eau. Les indices optiques du polystyrène et de l'eau valant respectivement $n_{poly} = 1.62$ ¹² et $n_{eau} = 1.33$, la différence de marche théorique au centre de la bille est $e\Delta n = 29$ nm. Une valeur plus faible est cependant attendue car le diamètre de ces billes est inférieur à la fonction d'étalement du point du système d'imagerie.

Afin de les localiser, les billes sont dans un premier temps identifiées par une image de fluorescence (voir figure 3.43). Elles sont pour cela éclairées par un laser de longueur d'onde $\lambda = 473$ nm proche de leur pic d'absorption à 505 nm. L'émission de fluorescence est ensuite isolée par une lame dichroïque qui rejette la plupart du rayonnement de longueur d'onde inférieure à 505 nm et un filtre passe-bande autour de leur pic d'émission à 515 nm.

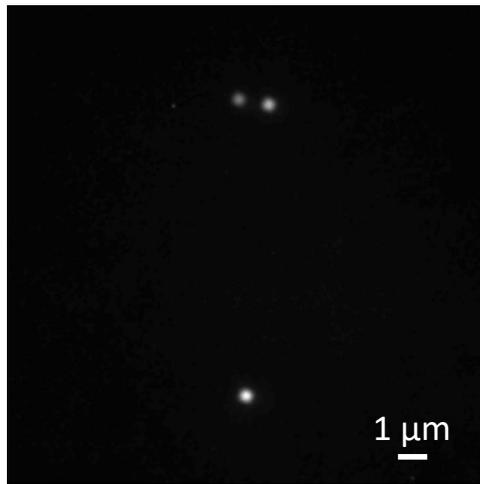


Figure 3.43 – Image de fluorescence de billes de polystyrène de diamètre théorique 100 nm.

Les images de phase des billes sont réalisées par l'ID4L (voir section 3.4.2) en plaçant le réseau de diffraction à la distance $d = 1.2$ mm du plan image. L'illumination est réalisée dans la configuration détaillée en section 3.5.1 à la longueur d'onde $\lambda = 440 \pm 20$ nm.

Les images d'intensité et de phase sont présentées dans chacune des trois configurations sans filtre spatial, avec filtre spatial, et avec filtre spatial et traitement numérique quantitatif sur la figure 3.44.

12. Pour $\lambda = 440$ nm.

L'image de phase sans filtre spatial, sur la figure 3.44a, montre un faible déphasage $\varphi = 3.5$ nm au niveau des billes. Avec le filtre spatial, sur la figure 3.44b, la phase des billes est mesurée à $\varphi' = 11$ nm : **cette image démontre expérimentalement qu'un gain d'un facteur $\frac{\varphi'}{\varphi} = 3$ est obtenu**, effectivement égal à la valeur prédite par le modèle pour les caractéristiques du filtre spatial $T = 7\%$, $\beta = 0.5$ rad et $\frac{r_{fs}}{r_p} = 7\%$ (voir la figure 3.38).

En intensité, les billes de polystyrène au plan de focalisation ne produisent pas de modulation d'intensité lorsque imagées sans filtre spatial sur la figure 3.44a. La présence du filtre spatial (figure 3.44b) produit la configuration en champ partiellement sombre attendue : les billes qui étaient quasiment invisibles en intensité apparaissent clairement après filtrage.

La figure 3.44c présente les images de phase et d'intensité acquises en présence du filtre spatial et traitées numériquement selon l'équation (3.31).

En intensité, les (faibles) valeurs de I_m sont retrouvées, et l'image d'intensité est de nouveau assimilable à une illumination en champ clair sur laquelle les billes transparentes ne sont que très peu visibles. Sur l'image de phase reconstruite, on retrouve la phase $\varphi_r = 3.5$ nm, égale à la valeur réelle φ de la figure 3.44a.

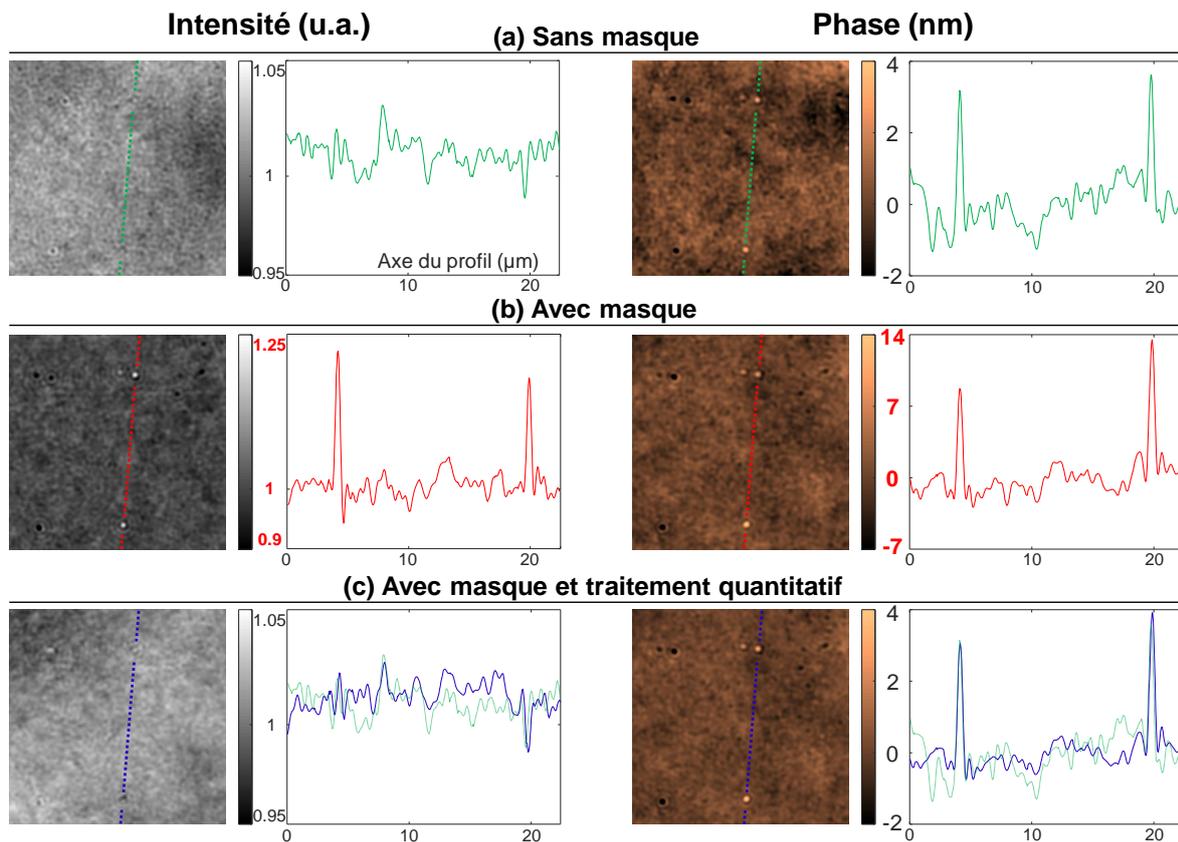


Figure 3.44 – Images d'intensité et de phase acquises en ID4L (a) sans filtre spatial, (b) avec filtre spatial et (c) avec filtre spatial et traitement quantitatif par l'équation (3.31). Les profils des images selon les segments représentés en couleur sont tracés à droite de chaque image. Les échelles de couleur des images et de l'axe des ordonnées des profils sont identiques en (a) et (c).

Les images de phase de la figure 3.44(a et c) sont agrandies sur la figure 3.45 afin d'apprécier visuellement le gain en rapport signal à bruit apporté par le filtrage. Le bruit de phase est calculé ici sur chaque image, en considérant l'écart-type du signal de phase sur une zone sans particules (délimitée en pointillés) où le signal devrait être théoriquement nul (si l'on néglige la rugosité de la lamelle). Il apparaît que le bruit sur l'image brute non filtré ($\sigma_\varphi = 0.42$ nm) est 1.5 fois plus important que sur l'image obtenue avec le filtre et sur laquelle le traitement quantitatif a été appliqué ($\sigma_\varphi = 0.29$ nm). Les valeurs de phase au niveau des billes étant les mêmes, on a donc un gain de 1.5 sur le rapport signal à bruit apporté par le filtrage spatial. Dans la mesure où la dynamique de la caméra est remplie quasiment de la même manière pour les deux acquisitions (niveau proche de la saturation, sans et avec filtre), nous nous attendions à obtenir un bruit de phase similaire sur les images brutes filtrées et non filtrées, conduisant à un gain en rapport signal à bruit proche de 3 après traitement quantitatif. Cela s'explique par les différences de temps d'acquisition pour les deux cas : les interférogrammes en présence du filtre spatial ont été acquis pendant un temps d'intégration de 5.5 s tandis que seulement 400 ms suffisent en l'absence du filtre spatial. Or, pour des temps d'acquisition supérieurs à la seconde, la mesure n'est généralement plus limitée par le bruit de photon mais par des dérives mécaniques et la convection, et c'est probablement ce phénomène qui limite l'amélioration à un facteur 1,5 dans notre cas. L'illumination sur le champ de vue est ici seulement de quelques centaines de μW (pour le diaphragme d'ouverture ouvert à $150 \mu\text{m}$) et nécessite à terme d'être augmenté pour réduire les temps d'acquisition.

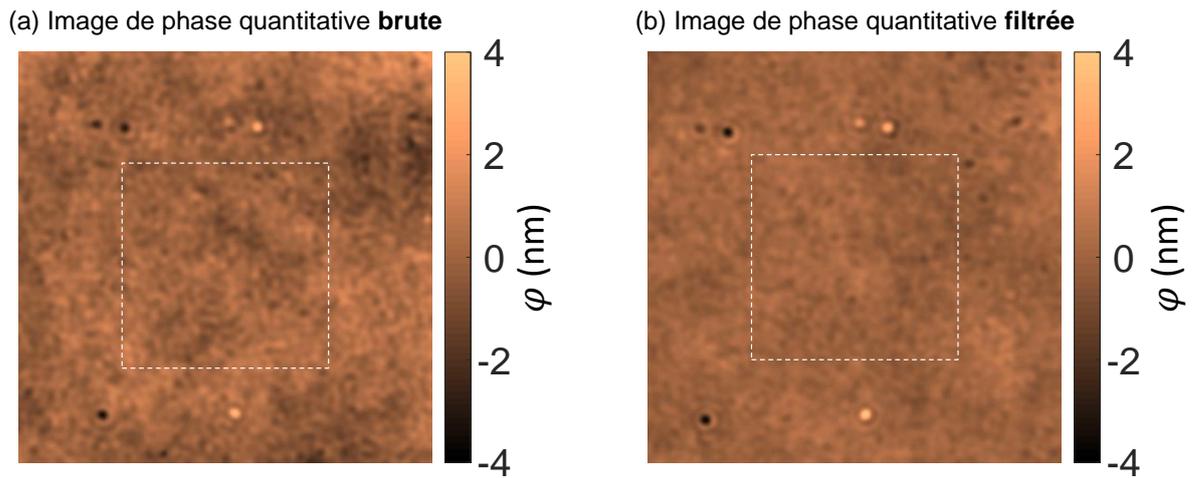


Figure 3.45 – Agrandissement des images de phase des figures 3.44a et c. Le bruit est calculé sur la zone délimitée en pointillés à 0.42 nm sur l'image brute (a) et 0.29 nm sur l'image filtrée (b).

Notons de plus que les caractéristiques du filtre spatial utilisé ici ($T = 7\%$ et $\beta = 0.5$ rad) mènent théoriquement et expérimentalement à un facteur 3 de gain en phase. D'après la figure 3.38, ce gain pourrait être de 10 pour une transmission $T = 1\%$ et en gardant une valeur de déphasage $\beta \leq 0.5$ rad. Les expériences présentées ici ont été réalisées à l'aide du masque de filtrage dont nous disposons, mais il est clairement possible de l'améliorer en optimisant T et β , ce qui est possible en jouant sur les épaisseurs et matériaux de la pastille, mais aussi en ajustant la longueur d'onde. La fabrication du filtre doit donc être optimisée de manière à produire une faible transmission tout en déphasant le moins possible (modulo 2π).

3.8 Conclusion et perspectives de l'imagerie de phase de dynamiques intracellulaires

L'imagerie de front d'onde est équivalente à une détection très sensible et quantitative de diffusion de la lumière [180, 193] où chaque fréquence spatiale mesurée est le transfert de vecteur d'onde entre les ondes incidente et diffusée. De ce fait, l'application de l'imagerie de phase à l'imagerie cellulaire permet non seulement la détection d'organites de très petite taille et faiblement diffusants, mais aussi l'analyse quantitative en termes de masse sèche de l'échantillon [114]. L'utilisation de l'imagerie DiPSI est en plus particulièrement accessible puisqu'elle ne repose expérimentalement que sur l'utilisation d'un simple diffuseur fin dans un montage de microscopie basique en transmission. Un diffuseur fin peut être créé à partir de divers matériaux, allant du diffuseur optique au morceau de papier adhésif rugueux, en passant potentiellement par un milieu diffusant biologique. En effet, on peut imaginer dans un projet d'application future d'appliquer le principe sur le milieu diffusant biologique de l'échantillon lui-même.

A partir de la technique DiPSI, ce chapitre propose une approche d'imagerie de dynamiques cellulaires. Son intérêt est qu'elle constitue **un outil d'imagerie métabolique** : non seulement les valeurs temporelles d'activité sont calculées et renseignées visuellement sur les images, mais l'organisation spatiale des cellules est aussi mise en contraste et **leurs différents organites se trouvent segmentés**. Un travail d'identification des composants cellulaires vis-à-vis de leurs fréquences d'activité pourra alors mener à une manière de bénéficier d'une spécificité sur les images de phase.

De plus, la méthode d'amplification de phase qSCAT proposée promet l'extension des observations biologiques en phase à d'autres phénomènes encore inexplorés. Par exemple, les potentiels d'action, signaux neuronaux électriques, sont généralement mesurés soit via des techniques de "patch clamp" basées sur l'utilisation invasive d'électrodes [194], soit sur l'utilisation de marqueurs fluorescents (imagerie calcique ou de voltage [195]) nécessitant un marquage de l'échantillon. Récemment, il a été démontré qu'un neurone subissant un potentiel d'action induit un faible déphasage, seulement de quelques dizaines de picomètres, et détectable uniquement à l'heure actuelle via un moyennage de milliers d'événements [196]. La détection de potentiel d'action unique et sans marquage via la méthode qSCAT serait un outil précieux pour l'optogénétique [197].

Pour l'imagerie d'activité intracellulaire, le couplage des deux méthodes présentées (DiPSI dynamique et qSCAT) **permettra de révéler des phénomènes biologiques en mouvement à de plus hautes fréquences, et donc potentiellement d'extraire de plus petits objets de phase très actifs du bruit de fond**. Mais outre l'extraction du bruit de fond de phase, une autre source de limitation est la présence de plus grosses structures diffusantes qui remplissent la dynamique de la caméra. Il serait à ce stade judicieux de s'inspirer d'une approche récemment proposée dans la configuration holographique dénommée ADRIFT [169]. La mesure du front d'onde naturellement limitée en sensibilité y est annulée par un modulateur spatial de lumière (SLM) placé sur la voie de collection dans un plan conjugué de manière à "compenser" les forts déphasages induit par ces structures. Le filtrage spatial des composantes de fréquence spatiale nulle élimine alors la majorité du signal, hormis les faibles variations temporelles du signal de phase. L'association d'un SLM à qSCAT permettrait alors d'annuler de la même façon les forts signaux "parasites" dominant les faibles signaux d'intérêt.

Additionnellement au gain en sensibilité que leur apportera qSCAT, les images dynamiques présentées dans ce chapitre ont aussi un potentiel d'analyse tridimensionnelle car elles semblent bénéficier qualitativement d'une forme de "sectionnement". Cela peut s'expliquer par un effet similaire observé en intensité observé par O. Thouvenin *et al* : la tomographie à transmission optique plein champ (FFOTT pour Full Field Optical Transmission Tomography) [112]. Ces

travaux démontrent que le déphasage de Gouy, le déphasage π observé de part et d'autre du plan de focalisation d'une onde, induit dans ce montage une dépendance linéaire du terme d'interférence en la distance au focus, seulement dans une faible épaisseur (d'environ la moitié de la profondeur de champ). Ainsi, en soustrayant deux images acquises dans cette épaisseur séparées d'un faible décalage axial, le signal hors focalisation est éliminé puisque constant avec le focus. Cette méthode, utilisant un simple montage en transmission de type COBRI (voir figure 3.34c, sans filtre spatial), propose donc une imagerie de dynamiques axiales bénéficiant d'une forme de sectionnement.

Notre imageur de front d'onde utilisant une source incohérente dans un montage auto-référencé en transmission, il ne produit pas de sectionnement optique. En revanche, le traitement temporel des images de phase, de manière équivalente au D-FFOTT, **élimine les signaux d'objets hors focus**. La fonction d'étalement de ces objets étant plus étendue sur l'image, leurs dynamiques effectives sont plus lentes. C'est pourquoi **nos images de phase dynamiques apportent, en plus d'une information d'activité métabolique et d'une compartimentation, une forme de sectionnement axial numérique**. Tandis que la reconstruction d'une image tridimensionnelle par tomographie s'effectue par une série d'acquisition de ces coupes le long de l'axe optique, la mesure simultanée de phase et d'intensité de notre méthode d'imagerie permet la propagation numérique à partir d'une seule prise d'image (comme vu en holographie à la section 1.10). Un volume intracellulaire comportant des phénomènes dynamiques pourra ainsi être sondé entièrement, sans contrainte de résolution temporelle associée à l'acquisition séquentielle dans différents plans.

Conclusion

Ce travail de thèse a essentiellement exploré deux nouvelles modalités d'imagerie microscopique, ayant pour points communs une mesure de phase et l'analyse de son spectre temporel.

La première de ces techniques exploite la capacité de l'holographie à détecter des mouvements de nano-objets à très hautes fréquences pour obtenir une imagerie de viscosité. Ce type d'imagerie est très attendu par les biologistes qui ont démontré des liens entre des variations de viscosité dans le cytoplasme et certains processus, notamment de migration intracellulaire. Ainsi, notre travail s'inscrit dans une collaboration avec l'équipe de M.-H. Verlhac ayant pour sujet d'étude principal les mécanismes complexes de la méiose [9-15], mais de nombreux champs de la biologie sont concernés, comme par exemple les méthodes d'identification des cellules cancéreuses [57]. Les mesures globales de viscosité des échelles macro- à microscopique sont bien établies et maîtrisées [61, 63, 72, 198, 199], mais les méthodes de cartographie de viscosité [65, 66, 200] demeurent moins accessibles et limitées en temps d'observation par le phénomène de photoblanchiment lorsqu'elles utilisent des fluorophores. La méthode que nous proposons utilise des nanoparticules non fluorescentes, biocompatibles (or ou oxyde de fer), et dont l'injection intracellulaire est maîtrisée par nos collaborateurs biologistes. De plus, leur protocole de fabrication, détaillé en annexe C, est relativement simple et fournit un très bon rendement de production de particules, qui restent stables pendant des années [99, 102]. La détection optique par holographie, en plus de permettre l'analyse fréquentielle, est optimisée pour l'imagerie d'objets faiblement diffusants grâce à la configuration en champ sombre utilisée, et au gain interférométrique apporté par la voie d'illumination de référence propre aux montages holographiques. Avec ces techniques, nous démontrons la possibilité de cartographier une distribution de viscosité avec une résolution pouvant aller au-delà de la limite de diffraction en utilisant la superlocalisation. Ces hautes performances ont été atteintes grâce à la mise en rotation rapide et forcée de ces particules en les choisissant magnétiques. Combinée à la détection hétérodyne, la mesure peut s'effectuer sur des temps caractéristiques suffisamment courts pour permettre une telle localité. De plus, la mesure de viscosité est assez sensible pour imager un gradient produit au contact entre deux fluides, et on peut s'attendre à ce qu'elle le devienne encore plus lorsque le montage sera adapté à un champ magnétique tournant et non plus oscillant.

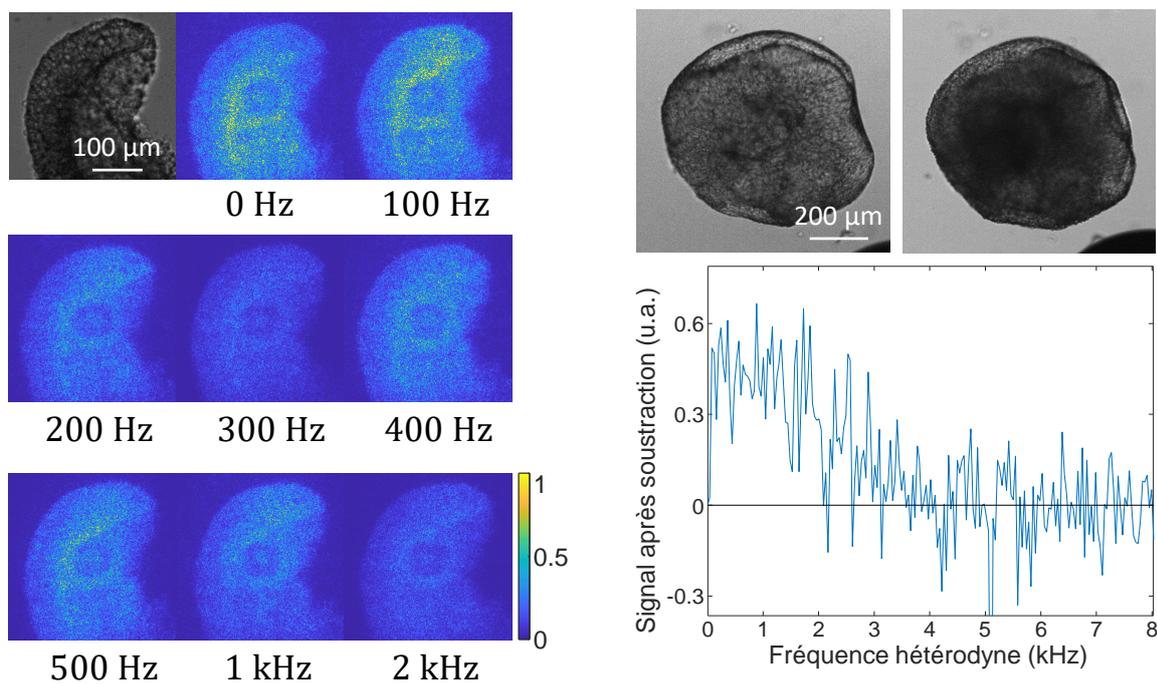
La deuxième technique étudiée ici est basée sur un montage simple, robuste aux vibrations et dérives mécaniques, lui aussi adapté à l'imagerie de phase quantitative d'objets faiblement diffusants en milieu transparent. A partir des images de phase ainsi acquises, nous avons montré qu'un traitement temporel mettant en évidence les mouvements, inspiré du D-FFOCT [18, 111], apporte un contraste différent. Des informations fréquentielles quantitatives permettent d'y révéler des structures initialement noyées dans le bruit de fond de phase. En ajoutant à cette imagerie de front d'onde une modalité d'analyse fréquentielle, une information nouvelle liée à l'activité métabolique des cellules apparaît, porteuse d'informations qui promettent d'être pertinentes en biologie tout en facilitant la compartimentation et en améliorant la spécificité cellulaire.

En cherchant à augmenter la gamme de dynamiques détectables par cette méthode, nous avons développé une technique permettant de produire un gain en sensibilité de phase applicable à notre méthode d'analyse de front d'onde, mais aussi potentiellement à d'autres. Cette technique, que nous avons baptisée *qSCAT*, est basée sur un filtrage en amplitude dans

l'espace de Fourier, ne compromet pas la simplicité d'utilisation de l'imagerie de front d'onde, et promet la détection de déphasages jusqu'alors trop faibles pour être distingués du bruit de fond. En particulier, en augmentant la sensibilité en phase, cette méthode devrait donner accès à des dynamiques plus rapides, et pourrait permettre la détection d'organites en agitation à des fréquences supérieures au Hz. De nombreuses perspectives sont ouvertes, que ce soit pour la détection de virus, exosomes, ou encore de potentiels d'action.

Il est probable que l'activité au sein des cellules s'étende bien au-delà des quelques Hz actuellement étudiés : si l'on considère de manière schématique un objet de la taille d'un petit organite (~ 100 nm) dont le mouvement est dominé par l'agitation brownienne, on peut s'attendre à des dynamiques caractéristiques allant jusqu'à la dizaine de kHz. En substance, l'amélioration de la sensibilité de phase doit permettre l'étude de plus petits objets, susceptibles de mouvements plus rapides, donc de dynamiques à hautes fréquences.

Une analyse complète de l'activité métabolique devant être idéalement multi-échelles, il devient à nouveau pertinent de se tourner vers l'holographie hétérodyne pour sonder d'éventuelles dynamiques au-delà des gammes de fréquences accessibles avec une caméra, même ultra-rapide. Cette technique initialement développée pour détecter la diffusion plasmonique de nanoparticules a montré que sa sensibilité permettait l'étude d'objets non plasmoniques, donc d'être appliquée à l'agitation d'organites cellulaires. Malgré leur faible diffusion optique, l'hétérodynage et le gain holographique permettent d'isoler les composants de l'échantillon actifs à une fréquence précise. Des résultats préliminaires, synthétisés sur la figure 3.0 et détaillés en annexe E, démontrent la détection d'activité jusqu'au kHz dans des organoïdes de rétine.



(a) Image en lumière blanche (première image) puis reconstructions holographiques d'un jeune organoïde de rétine aux fréquences hétérodynes allant de 0 à 2 kHz. On observe des variations de signal dynamique dans l'ensemble de l'organoïde, mais aussi selon la fréquence d'analyse : les images montrent par exemple plus d'activité à 400 Hz qu'à 300 Hz.

(b) Images en lumière blanche d'un organoïde avant (gauche) et après (droite) sa brûlure par laser. Après reconstruction et moyennage des images hétérodynes, la soustraction des spectres des dynamiques entre l'organoïde vivant et l'organoïde mort est positive jusqu'à 4 kHz. Une activité métabolique des cellules vivantes est donc probable sur la gamme [0, 4] kHz.

Figure 3.0 – Images d'organoïdes rétiens acquises par le montage d'holographie hétérodyne en champ sombre de la partie I. Ces travaux préliminaires sont détaillés en annexe E.

Pour cela, le spectre des variations obtenues sur un organoïde mort a été soustrait de celui obtenu sur un organoïde vivant. Un signal positif sur la gamme [0 – 4] kHz est une indication forte de l'existence d'une activité biologique dans cette gamme, mais de nombreux artefacts restent possibles. Sous l'hypothèse que ces composantes à hautes fréquences proviennent effectivement de l'agitation d'organites, ce système pourrait constituer une méthode alternative à qSCAT pour la détection de composants cellulaires rapides, c'est-à-dire de très petites dimensions.

Annexe A

Calcul du signal hétérodyne

Cette annexe démontre la convolution du signal dynamique mesuré à une fonction de transfert instrumentale liée à l'acquisition par la caméra et à l'hétérodyne (équation (1.17)).

Concrètement, les faisceaux objet et de référence sont respectivement modulés à $f_{\text{MAO}} = 80 \text{ MHz}$ et $f_{\text{MAO}} - \Delta F$. On note $f = \Delta F - \frac{f_{\text{acq}}}{4}$ la fréquence d'investigation que l'on contrôle expérimentalement via ΔF .

En approximant les deux faisceaux laser par des ondes planes polarisées suivant une direction \vec{u} , on écrit les ondes objet et de référence par les expressions suivantes :

$$\vec{E}_O(t, r) = \gamma E_O e^{i[(\omega + 2\pi f_{\text{MAO}})t + \vec{k}_O \cdot \vec{r}]} \vec{u} \quad (\text{A.1})$$

$$\vec{E}_R(t, r) = E_0 e^{i[(\omega + 2\pi(f_{\text{MAO}} - \Delta F))t + \vec{k}_R \cdot \vec{r}]} \vec{u} \quad (\text{A.2})$$

γ^2 est le rapport de répartition de l'intensité $|E_O|^2$ du faisceau laser entre les deux bras. Le bras de référence porte donc un déphasage temporel supplémentaire $-2\pi\Delta Ft$, ainsi qu'un déphasage spatial dû à la configuration hors-axe du système holographique. Le faisceau objet se propageant parallèlement à l'axe optique Oz , son terme de phase spatiale a pour expression :

$$\vec{k}_O \cdot \vec{r} = k_0 z \quad (\text{A.3})$$

où $k_0 = \frac{2\pi}{\lambda}$. Le terme de déphasage spatial du faisceau de référence a pour expression :

$$\vec{k}_R \cdot \vec{r} = k_0 [(x \cos \beta + y \sin \beta) \sin \alpha + z \cos \alpha] \quad (\text{A.4})$$

où α est l'angle entre les deux faisceaux et β est l'angle entre la projection du faisceau de référence sur l'espace (x, y) et l'axe Ox (voir figure 1.5a). En supposant $\beta = 0$, l'expression du déphasage spatial pour la référence est :

$$\vec{k}_R \cdot \vec{r} = k_0 (x \sin \alpha + z \cos \alpha) \quad (\text{A.5})$$

On note $g(t, r)$ le coefficient de diffusion par l'échantillon et donc $g(t, r) \vec{E}_O(t, r)$ le signal diffusé : son spectre décrit la distribution des fréquences de l'ensemble des éléments en mouvement dans l'échantillon.

Le signal enregistré sur la caméra $S(t, \Delta F, r)$ résulte de l'interférence entre le signal diffusé $g(t, r) \vec{E}_O(t, r)$ et l'onde de référence $\vec{E}_R(t, r)$.

$$\begin{aligned}
S(t, \Delta F, r) &= \left| g(t, r) \vec{E}_O(t, r) + \vec{E}_R(t, r) \right|^2 \\
&= \left| \gamma g(t, r) E_0 e^{i[\omega t + 2\pi f_{MAO} t + \vec{k}_O \cdot \vec{r}]} \vec{u} \right. \\
&\quad \left. + E_0 e^{i[\omega t + 2\pi(f_{MAO} - \Delta F)t + \vec{k}_R \cdot \vec{r}]} \vec{u} \right|^2 \\
&= |E_0|^2 \left[\left(1 + |\gamma g(t, r)|^2 \right) + \left(\gamma g(t, r) e^{ik_0 z(1 - \cos \alpha)} e^{i[2\pi \Delta F t - k_0 x \sin \alpha]} \right. \right. \\
&\quad \left. \left. + \gamma^* g^*(t, r) e^{-ik_0 z(1 - \cos \alpha)} e^{-i[2\pi \Delta F t - k_0 x \sin \alpha]} \right) \right] \\
&\equiv S_0(t, r) + S_{+1}(t, \Delta F, r) + S_{-1}(t, \Delta F, r)
\end{aligned} \tag{A.6}$$

Pour chacun des ordres ± 1 , les termes de phase $e^{\pm ik_0 z(1 - \cos \alpha)}$ sont constants dans un plan donné $z = z_0$ du détecteur de la caméra ou même nuls en $z_0 = 0$. Ils peuvent donc être omis. La configuration hors axe permet de filtrer l'ordre 0 (premier terme) et l'ordre -1 (dernier terme). Le centrage numérique de l'ordre $+1$ annule la phase $k_0 x \sin \alpha$ (voir section 1.3.1). Les champs d'excitation et de référence étant supposés homogènes, $|E_0|^2$ et γ sont des constantes que l'on peut intégrer à $g(t, r)$. On note alors :

$$S_{+1}(t, \Delta F, r) = g(t, r) e^{i2\pi \Delta F t} \tag{A.7}$$

Comme présenté à la section 1.4.1, mesurer ce signal avec la caméra consiste à le sommer pendant la durée d'exposition t_{int} , aux instants multiples de l'inverse de la fréquence d'acquisition f_{acq} . Notons cependant que $t_{int} < f_{acq}^{-1}$ en raison des délais d'acquisition. Quatre acquisitions successives sont ensuite traitées par démodulation pour produire une image. Chaque image est associée à un instant t et chacune des 4 acquisitions qui la constitue ($n = 0, 1, 2$ ou 3) démarre à l'instant $t + \frac{n}{f_{acq}}$. Le signal $S_{acq}^{(n)}(t, \Delta F, r)$ correspondant à la $n^{\text{ème}}$ acquisition a pour expression :

$$\begin{aligned}
S_{acq}^{(n)}(t, \Delta F, r) &= \int_{-\infty}^{+\infty} S_{+1}(t', \Delta F, r) \text{Rect} \left(\frac{t' - \left(t + \frac{n}{f_{acq}} \right)}{t_{int}} \right) dt' \\
&= \int_{-\infty}^{+\infty} g(t', r) e^{i2\pi \Delta F t'} \text{Rect} \left(\frac{t' - \left(t + \frac{n}{f_{acq}} \right)}{t_{int}} \right) dt' \\
&= \int_{-\infty}^{+\infty} g(t', r) e^{i2\pi \Delta F t'} \left(\text{Rect} \left(\frac{t'}{t_{int}} \right) * \delta \left[t' - \left(t + \frac{n}{f_{acq}} \right) \right] \right) dt'
\end{aligned} \tag{A.8}$$

La formation d'une image par démodulation à 4 phases consiste en la sommation de 4 acquisitions consécutives affectées de leurs phases respectives $0, \frac{\pi}{2}, \pi, \frac{3\pi}{2}$, sur une période du signal hétérodyne¹.

$$\begin{aligned}
S_{img}(t, \Delta F, r) &= \sum_{n=0}^3 e^{in\frac{\pi}{2}} S_{acq}^{(n)}(t, \Delta F, r) \\
&= \sum_{n=0}^3 e^{in\frac{\pi}{2}} \int_{-\infty}^{+\infty} g(t', r) e^{i2\pi\Delta Ft'} \left(\text{Rect} \left(\frac{t'}{t_{int}} \right) * \delta \left[t' - \left(t + \frac{n}{f_{acq}} \right) \right] \right) dt' \\
&= \int_{-\infty}^{+\infty} g(t', r) e^{i2\pi\Delta Ft'} \sum_{n=0}^3 e^{in\frac{\pi}{2}} \left(\text{Rect} \left(\frac{t'}{t_{int}} \right) * \delta \left[t' - \left(t + \frac{n}{f_{acq}} \right) \right] \right) dt'
\end{aligned} \tag{A.9}$$

Les instants de prise d'image t sont des multiples de $\frac{4}{f_{acq}}$ i.e. $t \equiv t_m = m \frac{4}{f_{acq}}$. L'acquisition globale par la caméra s'écrit :

$$\begin{aligned}
\tilde{S}_{cam}(\Delta F, r) &= \left| \sum_{m=-\infty}^{+\infty} S_{img}(t_m, \Delta F, r) \right| \tag{A.10} \\
&= \left| \sum_{m=-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} g(t', r) e^{i2\pi\Delta Ft'} \sum_{n=0}^3 e^{in\frac{\pi}{2}} \left(\text{Rect} \left(\frac{t'}{t_{int}} \right) * \delta \left[t' - \frac{4m+n}{f_{acq}} \right] \right) dt' \right| \\
&= \left| \int_{-\infty}^{+\infty} g(t', r) e^{i2\pi\Delta Ft'} \left(\text{Rect} \left(\frac{t'}{t_{int}} \right) \right) * \left(\sum_{n=0}^3 e^{in\frac{\pi}{2}} \sum_{m=-\infty}^{+\infty} \delta \left[t' - \frac{4m+n}{f_{acq}} \right] \right) dt' \right| \\
&= \left| \tilde{g}(-\Delta F, r) * \left([t_{int} \text{sinc}(\Delta F t_{int})] \left[\sum_{n=0}^3 \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{in\frac{\pi}{2}} e^{i2\pi\Delta F \frac{4m+n}{f_{acq}}} \right] \right) \right| \\
&= \left| \tilde{g}(-\Delta F, r) * \left([t_{int} \text{sinc}(\Delta F t_{int})] \left[\sum_{n=0}^3 \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{2i\pi n \left(\frac{4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right) + 2i\pi\Delta F \frac{4m}{f_{acq}}} \right] \right) \right| \\
&= \left| \tilde{g}(-\Delta F, r) * \left([t_{int} \text{sinc}(\Delta F t_{int})] \left[\sum_{n=0}^3 e^{2i\pi n \left(\frac{4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right)} \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{8i\pi m \frac{\Delta F}{f_{acq}}} \right] \right) \right|
\end{aligned}$$

La somme $\sum_{n=0}^3 e^{2i\pi n \left(\frac{4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right)}$ est celle des 4 premiers termes d'une suite géométrique de raison $q = e^{2i\pi \left(\frac{4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right)}$ et de premier terme 1. Elle vaut :

$$\begin{aligned}
\sum_{n=0}^3 e^{2i\pi n \left(\frac{4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right)} &= \frac{1 - q^4}{1 - q} \\
&= \frac{1 - e^{2i\pi \frac{4\Delta F}{f_{acq}}}}{1 - e^{i\pi \left(\frac{4\Delta F}{f_{acq}} + 1 \right)}} \\
&= \frac{e^{i\pi \frac{4\Delta F}{f_{acq}}} e^{-i\pi \frac{4\Delta F}{f_{acq}}} - e^{i\pi \frac{4\Delta F}{f_{acq}}}}{e^{i\pi \left(\frac{4\Delta F}{f_{acq}} + 1 \right)} - e^{-i\pi \left(\frac{4\Delta F}{f_{acq}} + 1 \right)} - e^{i\pi \left(\frac{4\Delta F}{f_{acq}} + 1 \right)}} \\
&= e^{i\pi \left(\frac{3\Delta F}{f_{acq}} - \frac{1}{4} \right)} \frac{\sin \left(4\pi \frac{\Delta F}{f_{acq}} \right)}{\sin \left[\frac{\pi}{f_{acq}} \left(\Delta F + \frac{f_{acq}}{4} \right) \right]} \tag{A.11}
\end{aligned}$$

1. La phase devant se dérouler dans le sens inverse du signe de ΔF dans $f_{MAO} + \Delta F$, pour rattraper son gain de phase par rapport au premier hologramme. Ici le signe de ΔF est négatif donc on ajoute une phase $+n\frac{\pi}{2}$.

que l'on remplace :

$$\tilde{S}_{cam}(\Delta F, r) = \left| \tilde{g}(-\Delta F, r) * \left(t_{int} \text{sinc}(\Delta F t_{int}) \left[\frac{\sin(4\pi \frac{\Delta F}{f_{acq}})}{\sin \left[\frac{\pi}{f_{acq}} (\Delta F + \frac{f_{acq}}{4}) \right]} \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{8i\pi m \frac{\Delta F}{f_{acq}}} \right] \right) \right| \quad (\text{A.12})$$

On peut calculer $\sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{8i\pi m \frac{\Delta F}{f_{acq}}}$ en posant $x = \frac{4\Delta F}{f_{acq}}$ puis $X = e^{2i\pi x}$ et en utilisant la relation :

$$\begin{aligned} \sum_{m=-N}^{+N} X^m &= \sum_{m=0}^N X^m + \sum_{m=0}^N X^{-m} - 1 \\ \sum_{m=-N}^{+N} e^{2i\pi m x} &= \frac{1 - X^{N+1}}{1 - X} + \frac{1 - X^{-(N+1)}}{1 - X^{-1}} - 1 \\ &= \frac{X^{-(N+\frac{1}{2})} - X^{N+\frac{1}{2}}}{X^{-\frac{1}{2}} - X^{\frac{1}{2}}} \\ &= \frac{e^{-2i\pi(N+\frac{1}{2})x} - e^{2i\pi(N+\frac{1}{2})x}}{e^{-i\pi x} - e^{i\pi x}} \\ &= \frac{\sin \left[2\pi(N + \frac{1}{2})x \right]}{\sin(\pi x)} \\ \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{8i\pi m \frac{\Delta F}{f_{acq}}} &= \lim_{N \rightarrow +\infty} \sum_{m=-N}^{+N} e^{8i\pi m \frac{\Delta F}{f_{acq}}} \\ &= \lim_{N \rightarrow +\infty} \frac{\sin \left[2\pi(N + \frac{1}{2}) \frac{4\Delta F}{f_{acq}} \right]}{\sin \left(4\pi \frac{\Delta F}{f_{acq}} \right)} \end{aligned} \quad (\text{A.13})$$

Si l'on considère que $f = \Delta F - \frac{f_{acq}}{4}$ est la fréquence sondée dans l'échantillon, alors $\frac{\Delta F}{f_{acq}} = \frac{f}{f_{acq}} + \frac{1}{4}$ et l'image enregistrée a pour amplitude :

$$\tilde{S}_{cam}(f, r) = \left| \tilde{g}(-f, r) * \left(\left[t_{int} \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \right] \left[\frac{\sin(4\pi \frac{(f + \frac{f_{acq}}{4})}{f_{acq}})}{\sin \left[\frac{\pi f}{f_{acq}} + \frac{\pi}{2} \right]} \frac{\sin \left[2\pi(N + \frac{1}{2}) \left(\frac{4f}{f_{acq}} + 1 \right) \right]}{\sin \left[\pi \left(\frac{4f}{f_{acq}} + 1 \right) \right]} \right] \right) \right| \quad (\text{A.14})$$

Etude de l'ordre -1 Les résultats précédents offrent des interprétations intéressantes sur le lien entre les ordres ± 1 holographiques et la fonction de transfert instrumentale. Si l'on sélectionne l'ordre -1 au lieu de $+1$, le signal hétérodyne de l'échantillon est (voir équation (A.7)) :

$$S_{-1}(t, \Delta F, r) = g^*(t, r) e^{-i2\pi \Delta F t} \quad (\text{A.15})$$

En reprenant au calcul de $\tilde{S}_{cam}(\Delta F, r)$:

$$\begin{aligned}
\tilde{S}_{cam-1}(\Delta F, r) &= \left| \int_{-\infty}^{+\infty} g^*(t', r) e^{-i2\pi\Delta Ft'} \left(\text{Rect} \left(\frac{t'}{t_{int}} \right) \right) * \left(\sum_{n=0}^3 e^{in\frac{\pi}{2}} \sum_{m=-\infty}^{+\infty} \delta \left[t' - \frac{4m+n}{f_{acq}} \right] \right) dt' \right| \\
&= \left| \tilde{g}^*(\Delta F, r) * \left([t_{int} \text{sinc}(\Delta Ft_{int})] \left[\sum_{n=0}^3 \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{in\frac{\pi}{2}} e^{-i2\pi\Delta F \frac{4m+n}{f_{acq}}} \right] \right) \right| \\
&= \left| \tilde{g}^*(\Delta F, r) * \left([t_{int} \text{sinc}(\Delta Ft_{int})] \left[\sum_{n=0}^3 \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{2i\pi n \left(\frac{-4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right) - 2i\pi\Delta F \frac{4m}{f_{acq}}} \right] \right) \right| \\
&= \left| \tilde{g}^*(\Delta F, r) * \left([t_{int} \text{sinc}(\Delta Ft_{int})] \left[\sum_{n=0}^3 e^{2i\pi n \left(\frac{-4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right)} \sum_{m=-\infty}^{+\infty} e^{-8i\pi m \frac{\Delta F}{f_{acq}}} \right] \right) \right|
\end{aligned} \tag{A.16}$$

La somme géométrique devient :

$$\sum_{n=0}^3 e^{2i\pi n \left(\frac{-4\Delta F + f_{acq}}{4f_{acq}} \right)} = e^{i\pi \left(-\frac{3\Delta F}{f_{acq}} - \frac{1}{4} \right)} \frac{\sin(4\pi \frac{\Delta F}{f_{acq}})}{\sin \left[\frac{\pi}{f_{acq}} \left(\Delta F - \frac{f_{acq}}{4} \right) \right]}$$

et on a alors pour l'ordre -1 :

$$\tilde{S}_{cam,-1}(f, r) = \left| \tilde{g}^*(f, r) * \left(t_{int} \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \left[\frac{\sin(4\pi \frac{(f + \frac{f_{acq}}{4})}{f_{acq}})}{\sin \left[\frac{\pi f}{f_{acq}} \right]} \frac{\sin \left[2\pi \left(N + \frac{1}{2} \right) \left(\frac{4f}{f_{acq}} + 1 \right) \right]}{\sin \left[\pi \left(\frac{4f}{f_{acq}} + 1 \right) \right]} \right] \right) \right| \tag{A.17}$$

En comparant les équations (A.14) et (A.17), on remarque les deux différences suivantes :

- Le premier membre de la convolution de l'ordre $+1$ est $\tilde{g}(-f, r)$ tandis que celui de l'ordre -1 est $\tilde{g}^*(f, r)$.
- Un terme $+\frac{\pi}{2}$ est présent dans le premier sinus au dénominateur de la fonction de transfert de l'ordre $+1$ et non de l'ordre -1 . Cela équivaut à un déphasage π entre les deux fonctions.

On le voit aussi sur l'expression simplifiée de la fonction (voir figure 1.8) :

$$\begin{aligned}
\tilde{S}_{ins,1,+1}(f) &= \left| \sum_n \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \delta(f - n f_{acq}) \right| \\
\tilde{S}_{ins,1,+1}(\Delta F) &= \left| \sum_n \text{sinc}(\Delta F t_{int}) \delta \left(\Delta F - \frac{f_{acq}}{4} - n f_{acq} \right) \right| \\
\tilde{S}_{ins,1,-1}(\Delta F) &= \left| \sum_n \text{sinc}(\Delta F t_{int}) \delta \left(-\Delta F - \frac{f_{acq}}{4} - n f_{acq} \right) \right| \\
\tilde{S}_{ins,1,-1}(f) &= \left| \sum_n \text{sinc} \left(\left(f + \frac{f_{acq}}{4} \right) t_{int} \right) \delta \left(-f - \frac{f_{acq}}{2} - n f_{acq} \right) \right|
\end{aligned}$$

Il y a un décalage $\frac{f_{acq}}{2}$ entre la première et dernière ligne (déphasage π).

En outre, sélectionner l'ordre -1 au lieu de l'ordre $+1$ mène à un résultat équivalent si $|\tilde{g}^*(f, r)| = |\tilde{g}(-f, r)|$, avec le décalage $f \rightarrow f + \frac{f_{acq}}{2}$; généralisé à $f \rightarrow f + \frac{2}{n} f_{acq}$ pour une démodulation à n phases.

Ceci est une illustration du fait qu'en parcourant la fréquence d'investigation et donc le peigne de Dirac, les ordres ± 1 s'allument et s'éteignent successivement en opposition de phase, à la fréquence f_{acq} (voir figure A.1).

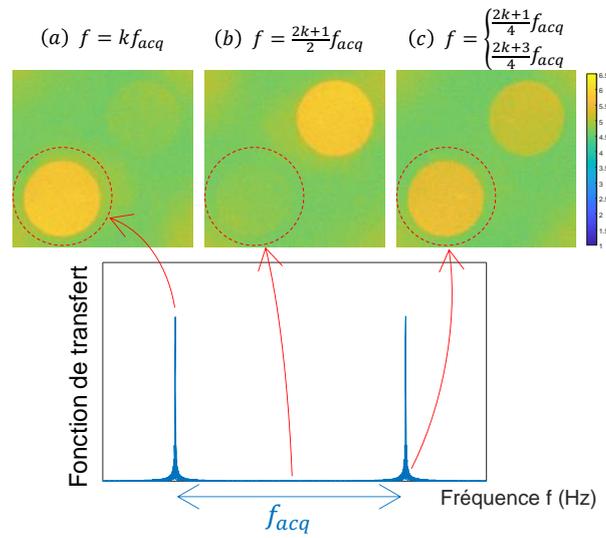
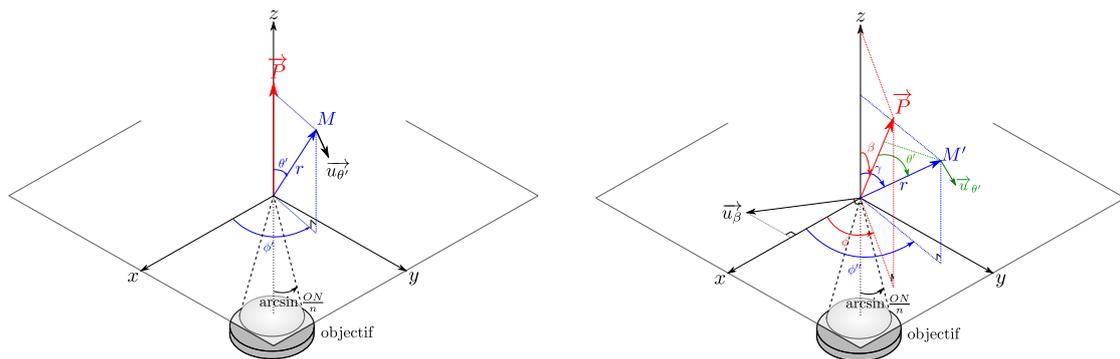


Figure A.1 – Transformée de Fourier spatiale d'un hologramme acquis avec trois ratios $\frac{f}{f_{acq}}$ différents (k est un nombre entier). En parcourant en fréquence la fonction de transfert instrumentale d'un pic à un zéro, l'énergie est transférée de l'un des ordres holographiques à l'autre.

Annexe B

Champ diffusé par un nanobâtonnet d'or en rotation

Nous présentons ici le calcul de la quantité de champ diffusé par le nanobâtonnet lors de sa rotation, c'est-à-dire en fonction des angles (β, ϕ) que forme \vec{P} avec le repère porté par l'axe optique (en se plaçant dans l'approximation du bâtonnet très isotrope où $\vec{P} \parallel \vec{u}_{\parallel}$). On appelle ce repère $\mathcal{R} = (\vec{u}_x, \vec{u}_y, \vec{u}_z)$, où Oz est l'axe optique, parallèle à l'objectif de microscope. Le signal collecté dépend aussi de l'ouverture numérique ON de l'objectif de microscope, qui découpe un angle solide $\frac{ON}{n}$ (où n est l'indice de réfraction du milieu) dans la figure de diffusion.



(a) Vecteur polarisation parallèle à l'axe optique Oz . Dans le repère porté par \vec{P} , le point d'observation M est repéré par les angles (θ', ϕ') .

(b) Vecteur polarisation formant un angle β avec Oz . Dans le repère \mathcal{R} , le point d'observation M' est repéré par les angles (γ, ϕ') .

Figure B.1 – Vecteur polarisation \vec{P} dans le repère du microscope \mathcal{R} . Le champ diffusé \vec{E}_{diff} est porté par le vecteur unitaire $\vec{u}_{\theta'}$ et s'applique au point M qui devient M' après rotation de \vec{P} autour de l'axe porté par \vec{u}_{β} . L'objectif de microscope dont l'ouverture numérique définit le cône de collection est parallèle à l'axe optique Oz .

Le champ dipolaire électrique lointain asymptotique est donné par l'équation (2.15). La direction de ce champ est le vecteur orthoradial que l'on note $\vec{u}_{\theta'}$. Si le vecteur polarisation \vec{P} est parallèle à l'axe optique \vec{u}_z (figure B.1a), $\vec{u}_{\theta'} = \cos \theta' \cos \phi' \vec{u}_x + \cos \theta' \sin \phi' \vec{u}_y - \sin \theta' \vec{u}_z$.

Rotation du repère lié à \vec{P}

Lorsque le repère $\mathcal{R} = (\vec{u}_x, \vec{u}_y, \vec{u}_z)$ subit une rotation définie par l'axe de rotation de vecteur unitaire $\vec{u}_{\beta} = \sin \phi \vec{u}_x - \cos \phi \vec{u}_y$ tel que représenté sur la figure B.1b, il se transforme en un repère $\mathcal{R}' = (\vec{u}_{x'}, \vec{u}_{y'}, \vec{u}_{z'})$. Le vecteur $\vec{u}_{\theta'}$ garde son expression en fonction de θ' et de ϕ' , mais

s'exprime dans le repère \mathcal{R} via la matrice $R_{\vec{u}_\beta}$ décrivant la rotation d'un angle β dans le sens anti-trigonométrique ($-\beta$) autour de l'axe porté par \vec{u}_β . Celle-ci a pour expression :

$$R_{\vec{u}_\beta} = \begin{bmatrix} \cos \beta \cos^2 \phi + \sin^2 \phi & -\sin \phi \cos \phi (1 - \cos \beta) & \cos \phi \sin \beta \\ -\cos \phi \sin \phi (1 - \cos \beta) & \cos \beta \sin^2 \phi + \cos^2 \phi & \sin \phi \sin \beta \\ -\cos \phi \sin \beta & -\sin \phi \sin \beta & \cos \beta \end{bmatrix}$$

On utilise le fait que la rotation d'un angle β est vue dans le sens trigonométrique, vecteur pointant vers l'observateur. L'angle de la rotation autour du vecteur \vec{u}_β , telle qu'elle est considérée, est donc de valeur $-\beta$ si β est positif.

On considère le point M' définissant le vecteur $\overrightarrow{OM'}$ unitaire dans le repère \mathcal{R}' lié au vecteur \vec{P} .

$$\overrightarrow{OM'} = \sin \theta' \cos \phi' \vec{u}_{x'} + \sin \theta' \sin \phi' \vec{u}_{y'} + \cos \theta' \vec{u}_{z'}$$

Si \mathcal{R}' , initialement confondu avec \mathcal{R} , subit une rotation de matrice $R_{\vec{u}_\beta}$, le vecteur transformé \overrightarrow{OM} de $\overrightarrow{OM'}$ par la rotation $R_{\vec{u}_\beta}$ s'écrit dans \mathcal{R} :

$$\begin{aligned} R_{\vec{u}_\beta} \overrightarrow{OM'} &= \begin{bmatrix} \cos \beta \cos^2 \phi + \sin^2 \phi & -\sin \phi \cos \phi (1 - \cos \beta) & \cos \phi \sin \beta \\ -\cos \phi \sin \phi (1 - \cos \beta) & \cos \beta \sin^2 \phi + \cos^2 \phi & \sin \phi \sin \beta \\ -\cos \phi \sin \beta & -\sin \phi \sin \beta & \cos \beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \sin \theta' \cos \phi' \\ \sin \theta' \sin \phi' \\ \cos \theta' \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} (\cos \beta \cos^2 \phi + \sin^2 \phi) \sin \theta' \cos \phi' - \sin \phi \cos \phi (1 - \cos \beta) \sin \theta' \sin \phi' + \cos \phi \sin \beta \cos \theta' \\ -\cos \phi \sin \phi (1 - \cos \beta) \sin \theta' \cos \phi' + (\cos \beta \sin^2 \phi + \cos^2 \phi) \sin \theta' \sin \phi' + \sin \phi \sin \beta \cos \theta' \\ -\cos \phi \sin \beta \sin \theta' \cos \phi' - \sin \phi \sin \beta \sin \theta' \sin \phi' + \cos \beta \cos \theta' \end{bmatrix} \\ &= \overrightarrow{OM} \end{aligned}$$

où $\overrightarrow{OM} = \sin \gamma \cos \phi'' \vec{u}_x + \sin \gamma \sin \phi'' \vec{u}_y + \cos \gamma \vec{u}_z$, alors, par identification, on obtient :

$$\begin{aligned} \sin \gamma \cos \phi'' &= \sin \theta' [\cos \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') + \sin \phi \sin (\phi - \phi')] + \cos \theta' \cos \phi \sin \beta \\ \sin \gamma \sin \phi'' &= \sin \theta' [\sin \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') - \cos \phi \sin (\phi - \phi')] + \sin \phi \sin \beta \cos \theta' \\ \cos \gamma &= \cos \beta \cos \theta' - \sin \beta \sin \theta' \cos (\phi - \phi') \end{aligned}$$

On en extrait :

$$\begin{aligned} \gamma &= \arccos[\cos \beta \cos \theta' - \sin \beta \sin \theta' \cos (\phi - \phi')] \\ \phi'' &= \arctan_2 \left[\frac{\sin \theta' [\sin \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') - \cos \phi \sin (\phi - \phi')] + \sin \phi \sin \beta \cos \theta'}{\sin \theta' [\cos \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') + \sin \phi \sin (\phi - \phi')] + \cos \phi \sin \beta \cos \theta'} \right] \end{aligned}$$

L'expression de $\cos \gamma$ garantit que $\gamma \in [0, \pi]$. ϕ'' possède des points de discontinuité qui apparaissent lorsque l'argument de \arctan_2 diverge et correspondent à l'équivalence $\phi'' = 0[2\pi]$.

L'expression réciproque s'obtient en substituant $\beta \rightarrow -\beta, \gamma \rightarrow \theta', \phi'' \rightarrow \phi'$:

$$\begin{aligned} \theta' &= \arccos[\cos \beta \cos \gamma + \sin \beta \sin \gamma \cos (\phi - \phi'')] \\ \phi' &= \arctan_2 \left[\frac{\sin \gamma [\sin \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi'') - \cos \phi \sin (\phi - \phi'')] - \sin \phi \sin \beta \cos \gamma}{\sin \gamma [\cos \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi'') + \sin \phi \sin (\phi - \phi'')] - \cos \gamma \cos \phi \sin \beta} \right] \end{aligned}$$

Condition de validité des expressions

γ est un angle azimutal. En conséquence, il prend ses valeurs dans l'intervalle $[0, \pi]$ de sorte que $\sin \gamma \geq 0$. Lorsque $\sin \gamma = 0$ est atteint, γ subit un rebroussement. Pour $\cos \gamma = +1$, celui-ci s'opère en $\gamma = 0$ tandis que pour $\cos \gamma = -1$, il est observé pour $\gamma = \pi$. La condition de rebroussement est :

$$\cos \beta \cos \theta' - \sin \beta \sin \theta' \cos(\phi - \phi') = \pm 1$$

Après résolution, les solutions sont :

$$\begin{aligned} \beta = 0 &\Rightarrow \begin{cases} \cos \theta' = \frac{1}{\cos \beta} \equiv 1 & \Rightarrow \theta' = 0, \gamma = 0 \\ \cos \theta' = \frac{-1}{\cos \beta} \equiv -1 & \Rightarrow \theta' = \pi, \gamma = \pi \end{cases} \\ \beta = \pi &\Rightarrow \begin{cases} \cos \theta' = \frac{1}{\cos \beta} \equiv 1 & \Rightarrow \theta' = 0, \gamma = \pi \\ \cos \theta' = \frac{-1}{\cos \beta} \equiv -1 & \Rightarrow \theta' = \pi, \gamma = 0 \end{cases} \\ \cos \theta' = +\cos \beta &\Rightarrow \theta' = \beta \Rightarrow \phi = \phi' \\ \cos \theta' = -\cos \beta &\Rightarrow \theta' = \pi - \beta \Rightarrow \phi = \phi' \pm \pi \end{aligned}$$

En cas d'intégration, les bornes ne doivent donc pas inclure l'un de ces points.

Expression du champ diffusé

Dans le repère \mathcal{R}' lié au dipôle

On a l'expression :

$$\vec{E}_{\text{diff}}(\vec{P}(\gamma, \phi'')) = -\frac{P \sin \theta'}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikr}}{r} (\cos \theta' \cos \phi' \vec{u}_x' + \cos \theta' \sin \phi' \vec{u}_y' - \sin \theta' \vec{u}_z')$$

En y remplaçant θ' et ϕ' par leurs expressions dans l'équation, on peut exprimer $\vec{E}_{\text{diff}}(P)$ dans le repère lié au dipôle \mathcal{R}' en fonction des angles (γ, ϕ'') (via $(\theta', \phi') = (\theta'(\gamma, \phi''), \phi'(\gamma, \phi''))$) qui décrivent la rotation du vecteur polarisation \vec{P} .

Dans le repère fixe \mathcal{R}

Pour l'exprimer dans le repère fixe du microscope \mathcal{R} , il faut appliquer à $\vec{u}_{\theta'}$ la matrice de rotation $R_{\vec{u}_{\beta}}$:

$$\begin{aligned} R_{\vec{u}_{\beta}} \vec{u}_{\theta'} &= \begin{bmatrix} \cos \beta \cos^2 \phi + \sin^2 \phi & -\sin \phi \cos \phi (1 - \cos \beta) & \cos \phi \sin \beta \\ -\cos \phi \sin \phi (1 - \cos \beta) & \cos \beta \sin^2 \phi + \cos^2 \phi & \sin \phi \sin \beta \\ -\cos \phi \sin \beta & -\sin \phi \sin \beta & \cos \beta \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \cos \theta' \cos \phi' \\ \cos \theta' \sin \phi' \\ -\sin \theta' \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} \cos \theta' [\cos \phi \cos \beta \cos(\phi - \phi') + \sin \phi \sin(\phi - \phi')] - \cos \phi \sin \beta \sin \theta' \\ \cos \theta' [\sin \phi \cos \beta \cos(\phi - \phi') - \cos \phi \sin(\phi - \phi')] - \sin \phi \sin \beta \sin \theta' \\ -\cos \beta \sin \theta' - \sin \beta \cos \theta' \cos(\phi - \phi') \end{bmatrix} \\ &= \begin{bmatrix} u_{\theta',x} \\ u_{\theta',y} \\ u_{\theta',z} \end{bmatrix} \end{aligned}$$

A l'issue de cette transformation, le vecteur $\vec{u}_{\theta'}$ reste tangent à la sphère d'émission de centre O et de rayon r . L'action de collimation de l'objectif de microscope revient à aplanir la sphère d'émission de rayon r . Si \mathcal{C}_r est l'ensemble des vecteurs unitaires tangents à cette sphère, on

définit la transformation unitaire :

$$\begin{aligned} \mathcal{C}_r &\rightarrow \mathcal{P}(\vec{u}_x, \vec{u}_y) \\ \vec{u}_{\theta'} &\mapsto \vec{u}_{xy} = \cos \phi''_{u_{\theta'}} \vec{u}_x + \sin \phi''_{u_{\theta'}} \vec{u}_y \end{aligned}$$

associant le vecteur unitaire du champ, $\vec{u}_{\theta'}$, tangent à la sphère d'émission, en un vecteur \vec{u}_{xy} appartenant au plan xOy ($\mathcal{P}(\vec{u}_x, \vec{u}_y)$), dont il faut déterminer l'orientation. On remarque, en effet, que $\vec{u}_{\theta'}$ n'est pas inclus dans le plan méridien, défini par le point d'observation et l'axe Oz et que \vec{u}_{xy} ne l'est a fortiori pas. Il n'est donc pas dans le prolongement du rayon vecteur du plan xOy et il faut non seulement repérer le point d'application de $\vec{u}_{\theta'}$ à l'aide des angles absolus (γ, ϕ'') de \mathcal{R} , mais également les angles $(\gamma_{u_{\theta'}}, \phi''_{u_{\theta}'})$ définissant l'orientation de $\vec{u}_{\theta'}$ et déterminant celle de \vec{u}_{xy} . (γ, ϕ'') sont définis par les correspondances établies précédemment pour une rotation (β, ϕ) prédéfinie.

Nous pouvons relier les 3 composantes cartésiennes $(u_{\theta',x}, u_{\theta',y}, u_{\theta',z})$ à celles recherchées dans le repère sphérique local $(r, \gamma_{u_{\theta'}}, \phi''_{u_{\theta}'})$. r étant constant et sachant que $|\vec{u}_{\theta'}| = 1$, on déduit :

$$\begin{aligned} \tan \phi''_{u_{\theta'}} &= \frac{u_{\theta',y}}{u_{\theta',x}} \\ &= \frac{\cos \theta' [\sin \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') - \cos \phi \sin (\phi - \phi')] - \sin \phi \sin \beta \sin \theta'}{\cos \theta' [\cos \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') + \sin \phi \sin (\phi - \phi')] - \cos \phi \sin \beta \sin \theta'} \\ \Rightarrow \phi''_{u_{\theta'}} &= \arctan_2 \left[\frac{\cos \theta' [\sin \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') - \cos \phi \sin (\phi - \phi')] - \sin \phi \sin \beta \sin \theta'}{\cos \theta' [\cos \phi \cos \beta \cos (\phi - \phi') + \sin \phi \sin (\phi - \phi')] - \cos \phi \sin \beta \sin \theta'} \right] \end{aligned}$$

et

$$\begin{aligned} \cos \gamma_{u_{\theta'}} &= u_{\theta',z} \\ &= -\cos \beta \sin \theta' - \sin \beta \cos \theta' \cos (\phi - \phi') \\ \Rightarrow \gamma_{u_{\theta'}} &= \arccos [-\cos \beta \sin \theta' - \sin \beta \cos \theta' \cos (\phi - \phi')] \end{aligned}$$

$\gamma_{u_{\theta'}}$ ne sera pas d'une grande utilité. Le redressement de courbure de champ que réalise l'objectif de microscope s'obtient par la transformation associant $\vec{u}_{\theta'}$ au vecteur \vec{u}_{xy} du plan xOy tel que :

$$\vec{u}_{xy} = \cos \phi''_{u_{\theta'}} \vec{u}_x + \sin \phi''_{u_{\theta'}} \vec{u}_y$$

Cette transformation a lieu dans le plan (\vec{r}, γ) défini par le point d'observation. Elle n'est valide que pour $\frac{\pi}{2} < \gamma \leq \pi$ et en pratique pour $\pi - \arcsin \frac{ON}{n} < \gamma \leq \pi$. Le vecteur \vec{u}_{xy} est attaché au point du plan xOy , ($z = r$) avec les coordonnées

$$\begin{aligned} x &= r \sin \gamma \cos \phi'' \\ y &= r \sin \gamma \sin \phi'' \\ z &= r \end{aligned}$$

Ainsi, le champ électrique $\vec{E}_{\text{diff}}(P)$ se transforme, via la transformation de $\vec{u}_{\theta'}$, en

$$\vec{E}_{\text{diff}}^{\infty}(P) = -\frac{P \sin \theta'}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} \vec{u}_{xy}$$

et se projette sur la référence $\vec{E}_R = E_R e^{ikx \sin \alpha} \vec{u}_x$ de sorte que :

$$\begin{aligned} \vec{E}_{\text{diff}}^\infty(P, \gamma, \phi'') \cdot \vec{E}_R &= -\frac{PE_R \sin \theta'(\gamma, \phi'')}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} \cos \phi''_{u_{\theta'}} e^{ikx \sin \alpha} \\ &= -\frac{PE_R}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} \sin [\arccos [\cos \beta \cos \gamma + \sin \beta \sin \gamma \cos(\phi - \phi'')]] \cos \phi''_{u_{\theta'}} e^{ikz \sin \gamma \cos \phi'' \sin \alpha} \end{aligned}$$

Cette valeur dépend du point du plan choisi via (γ, ϕ'') et de l'orientation du dipôle via (β, ϕ) et $\phi''_{u_{\theta'}}$ ($\beta, \phi, \theta'(\gamma, \phi''), \phi'(\gamma, \phi'')$). En posant :

$$\xi(\beta, \phi, \gamma, \phi'') = \cos \beta \cos \gamma + \sin \beta \sin \gamma \cos(\phi - \phi'')$$

$$\text{et } \zeta(\beta, \phi, \gamma, \phi'') =$$

$$\frac{\cos \theta'(\beta, \phi, \gamma, \phi'') [\sin \phi \cos \beta \cos(\phi - \phi'(\beta, \phi, \gamma, \phi'')) - \cos \phi \sin(\phi - \phi'(\beta, \phi, \gamma, \phi''))] - \sin \phi \sin \beta \sin \theta'(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}{\cos \theta'(\beta, \phi, \gamma, \phi'') [\cos \phi \cos \beta \cos(\phi - \phi'(\beta, \phi, \gamma, \phi'')) + \sin \phi \sin(\phi - \phi'(\beta, \phi, \gamma, \phi''))] - \cos \phi \sin \beta \sin \theta'(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}$$

et en utilisant les identités trigonométriques suivantes :

$$\sin [\arccos(\xi)] = \sqrt{1 - \xi^2} \quad \text{et} \quad \cos [\arctan(\zeta)] = \frac{1}{\sqrt{1 + \zeta^2}}$$

Il vient :

$$\begin{aligned} \vec{E}_{\text{diff}}^\infty(P, \gamma, \phi'') \cdot \vec{E}_R &= -\frac{PE_R}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} e^{ikz \sin \gamma \cos \phi'' \sin \alpha} \frac{\sqrt{1 - \xi^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}}{\sqrt{1 + \zeta^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}} \\ &= -\frac{N\alpha_{\parallel} E_O \vec{u}_x \cdot \vec{u}_{\parallel}}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} e^{ikz \sin \gamma \cos \phi'' \sin \alpha} \frac{\sqrt{1 - \xi^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}}{\sqrt{1 + \zeta^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}} \\ &= -\frac{N\alpha_{\parallel} \sin \beta \cos \phi E_O E_R}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} e^{ikz \sin \gamma \cos \phi'' \sin \alpha} \frac{\sqrt{1 - \xi^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}}{\sqrt{1 + \zeta^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}} \\ &\equiv E_{\text{coll}}(p, \gamma, \phi'') E_R \end{aligned}$$

où l'on a supposé que le bâtonnet ne se polarise que selon son grand axe \vec{u}_{\parallel} d'où

$$P = N\alpha_{\parallel} E_R \vec{u}_x \cdot \vec{u}_{\parallel} = \alpha_{\parallel} \sin \beta \cos \phi E_R^2.$$

$$E_{\text{coll}}(p, \gamma, \phi'') = -\frac{\alpha_{\parallel} \sin \beta \cos \phi E_O}{4\pi\epsilon_0\epsilon} k^2 \frac{e^{ikz}}{z} e^{ikz \sin \gamma \cos \phi'' \sin \alpha} \frac{\sqrt{1 - \xi^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}}{\sqrt{1 + \zeta^2(\beta, \phi, \gamma, \phi'')}}$$

On mesure en réalité $|E_{\text{coll}}(P, \gamma, \phi'') E_R|$, c'est-à-dire que le signal mesuré est proportionnel à $|E_{\text{coll}}(P, \gamma, \phi'')|$.

Lors de la mesure du spectre, on mesure pour chaque fréquence hétérodyne l'intensité totale reconstruite I_{tot} égale à :

$$I_{\text{tot}}(\beta, \phi) = E_R \int_{\phi''=0}^{2\pi} \int_{\gamma=\pi-\arcsin ON}^{\pi} |E_{\text{coll}}(p, \gamma, \phi'')| d\gamma d\phi''$$

Annexe C

Synthèse physico-chimique de bâtonnets d'oxyde de fer

Recouvrement des nanosphères de maghémite

Le point de départ est une solution acide de nanoparticules d'oxyde de fer γ - Fe_2O_3 (maghémite). La première étape consiste en leur enrobage par des polymères selon le protocole de précipitation-redispersion [99-101].

On détermine la taille des nanoparticules nues avec deux méthodes : la microscopie électronique à transmission (TEM) et la diffusion dynamique de lumière.

En TEM, les diamètres sont mesurés à 13.2 nm avec une dispersité $s = 0.23$.

D'autre part la mesure est effectuée par diffusion dynamique de la lumière [201] : on collecte à un certain angle par rapport à une illumination de longueur d'onde $\lambda \approx 600$ nm l'intensité lumineuse $I(t)$ diffusée par les particules en suspension pendant une durée τ . On mesure des fluctuations de $I(t)$ d'autant plus rapides que les particules sont petites, puisque leur agitation brownienne est plus grande. L'autocorrélation de ce signal est calculée sur un temps τ variable : $\langle I(t)I(t + \tau) \rangle$. Cette fonction décroît en fonction de τ , et son évolution est donnée par un temps caractéristique Γ^{-1} qui vérifie $\Gamma = D_t q^2$ où D_t est le coefficient de diffusion brownienne et q est le module du vecteur d'onde optique. Le rayon hydrodynamique R_H des sphères peut ainsi être calculé à partir de D_t et de la viscosité η de la solution par l'équation de Stokes-Einstein (équation 2.3) : $R_H = \frac{k_B T}{6\pi\eta D_t}$.

On mesure ainsi des diamètres hydrodynamiques¹ de sphères nues de 30 nm.

Les polymères utilisés pour le recouvrement de ces particules sont des chaînes de polyacrylate de sodium PANA. Leur poids moléculaire moyen est de 2000 g mol^{-1} dans le protocole retenu. On se réfère alors à la solution de polyacrylates par le nom PAA2K.

La solution de nanoparticules de 13.2 nm est mélangée goutte à goutte sous forte agitation à celle de PAA2K, toutes deux préparées au préalable à pH 2, ajusté par ajout d'acide nitrique HNO_3 . L'adsorption des polymères sur les nanoparticules est provoquée par interactions électrostatiques entre les deux espèces. En effet, les polymères sont faiblement chargés négativement, tandis que les nanoparticules sont chargées positivement car des complexes $\text{Fe} - \text{OH}_2^+$ se forment à leur surface au contact avec l'eau.

Le pH de la solution des nanoparticules ainsi précipitées est ensuite remonté jusqu'à 8 afin de les redisperser. Le protocole [100] demande d'assembler ces sphères, préalablement recouvertes de PAA2K puis redispersées, par un autre type de polymère dans la deuxième étape présentée au paragraphe suivant.

Le diamètre des nanoparticules recouvertes mesurée par diffusion dynamique de la lumière est 47 nm.

1. Le diamètre hydrodynamique est supérieur au diamètre réel de la particule étant donné qu'il prend en compte une couche du liquide qui adhère à sa surface.

Aggrégation en bâtonnets

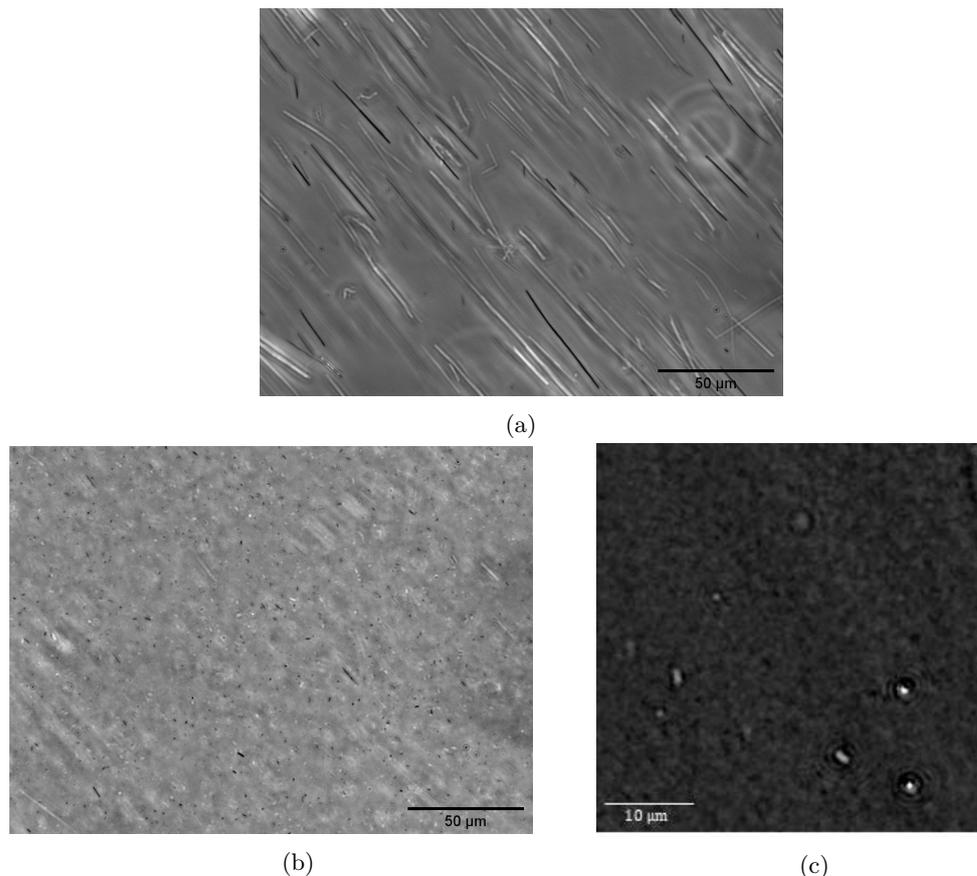


Figure C.1 – Images au microscope à contraste de phase des aiguilles de maghémite $\gamma - \text{Fe}_2\text{O}_3$. (a) Solution avant sonication. L'objectif utilisé a un grandissement $\times 40$ et une ouverture numérique de 0,55. La résolution est 665 nm. (b) Solution après 2 min de sonication. Les aiguilles sont brisées en bâtonnets (sub)micrométriques. Même imagerie que (a). (c) Image de phase quantitative avec un diffuseur fin (voir chapitre 3) de bâtonnets, prise avec un grandissement $\times 300$ et une ouverture numérique de 1,4. La résolution est 240 nm.

La deuxième étape consiste en la formation d'aiguilles par assemblage de ces nanoparticules recouvertes des polymères PAA2K chargés négativement [102, 103]. Le but est de les aggrégier grâce à des polymères chargés positivement (chlorure de polydiallyldiméthylammonium, PDADMAC de poids moléculaire 8500 g mol^{-1}). L'assemblage doit se faire de façon contrôlée dans un champ magnétique rectiligne constant de 300 mT afin que les particules s'aggrègent selon la direction du champ et forment ainsi des aiguilles. Ce protocole assure une très grande stabilité des aiguilles finales, sur des durées de plusieurs années [100].

Pour obtenir la solution définitive, le protocole [102] demande de respecter les proportions $Z = \frac{c_{(-)}}{c_{(+)}} = 7$, où $c_{(+,-)}$ sont les concentrations en porteurs de charges + et – respectivement ; ainsi qu'un ratio $\frac{Z}{X}$ égal à une constante caractéristique de la taille des nanoparticules sphériques de base : ici $\frac{Z}{X} = 0.171$ pour les particules de 13.2 nm, où X est le ratio des volumes $\frac{V_{particules}}{V_{PDADMAC}}$.

Les deux solutions sont préparées avec la même concentration c , puis sont mélangées en respectant les conditions $Z = 7$ et $\frac{Z}{X} = 0.171$. La concentration de base c est le paramètre clé pour contrôler la taille des aiguilles : plus elle est élevée, plus il y a de probabilité d'aggrégation en une même aiguille. Le compromis $c = 0.02\%$ a été trouvé entre petite taille de bâtonnet et rendement de la synthèse.

L'aggrégation se déroule de manière progressive et contrôlée : pour cela, lors du mélange entre les deux solutions, on sature la solution en sel NH_4Cl afin d'introduire une force ionique élevée (1 mol L^{-1}) qui écrante les interactions électrostatiques. Les nanoparticules restent ainsi en dispersion avec les polymères PDADMAC. Puis la force ionique est progressivement diminuée, permettant aux interactions électrostatiques de prendre le dessus et d'aggréger les nanoparticules. En pratique, ce processus s'effectue par dialyse : la solution contenant les nanoparticules, les polymères PDADMAC et le NH_4Cl est injectée dans une cassette formée de deux membranes poreuses, dont la taille des pores permet le passage des ions NH_4^+ et Cl^- formés dans l'eau². L'ensemble est plongé dans de l'eau déionisée sous agitation pour permettre le transfert des ions hors de la cassette, et est placé entre deux aimants afin d'imposer la direction d'aggrégation des nanoparticules. Après environ une heure de dialyse, la solution de nanoparticules précipitées en tiges est rincée afin d'éliminer un éventuel surplus de polymères. A ce stade, les aiguilles ont une longueur de quelques dizaines de μm (voir figure C.1a). Puis la solution est passée au bain à ultra-sons pendant 2 min pour casser les tiges en des bâtonnets dont la longueur varie de quelques centaines de nm à quelques μm (voir figure C.1b). Les plus grands bâtonnets micrométriques sont finalement éliminés par un tri à l'aide d'un aimant.

La calibration par la méthode des travaux initiaux [97] permet de déterminer le coefficient $\frac{\chi^2}{2+\chi} = 5$.

2. Thermo Scientific slide-A-Lyzer 10K Dialysis Cassettes : les membranes laissent passer les espèces de poids moléculaire inférieur à $10\,000 \text{ g mol}^{-1}$.

Annexe D

Evolution d'un objet magnétique sous champ dans un fluide

Equation d'évolution

Dans le régime des faibles nombres de Reynolds¹, on peut considérer une relation linéaire entre le torseur des vitesses d'une particule et celui des efforts (forces et moments) qu'elle subit [202]. Ainsi, en notant les vecteurs vitesses de translation \vec{U} et de rotation $\vec{\Omega}$, la résultante des forces \vec{F} et le moment des forces $\vec{\tau}$, on peut écrire :

$$\begin{pmatrix} \vec{U} \\ \vec{\Omega} \end{pmatrix} = M \begin{pmatrix} \vec{F} \\ \vec{\tau} \end{pmatrix} \quad (\text{D.1})$$

M est le tenseur de mobilité 6×6 , formé des sous-matrices 3×3 de translation M^t , de rotation M^r , et de couplage translation-rotation M^{tr} :

$$M = \begin{pmatrix} M^t & M^{tr} \\ (M^{tr})^T & M^r \end{pmatrix} \quad (\text{D.2})$$

Ces trois sous-matrices permettent de définir les matrices de diffusion translationnelle D^t , rotationnelle D^r et de couplage translation-rotation D^{tr} :

$$D^t = k_B T M^t \quad (\text{D.3})$$

$$D^r = k_B T M^r \quad (\text{D.4})$$

$$D^{tr} = k_B T M^{tr} \quad (\text{D.5})$$

A partir de l'équation (D.1), les équations d'évolution d'une particule de vecteur position \vec{r} et dont l'orientation est caractérisée par trois axes orthogonaux \vec{u}_i ($i \in \{||, \perp\}$ dans le cas d'un bâtonnet, voir figure D.1) s'écrivent :

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{r}}{dt} &= \vec{U} \\ &= M^t \vec{F} + M^{tr} \vec{\tau} \end{aligned} \quad (\text{D.6})$$

$$\begin{aligned} \frac{d\vec{u}_i}{dt} &= \vec{\Omega} \times \vec{u}_i \\ &= \left((M^{tr})^T \vec{F} + M^r \vec{\tau} \right) \times \vec{u}_i \end{aligned} \quad (\text{D.7})$$

1. $Re = \frac{vl\rho}{\eta}$ où v est la vitesse caractéristique du fluide, ρ sa masse volumique, η sa viscosité dynamique, et l la dimension caractéristique du contenant.

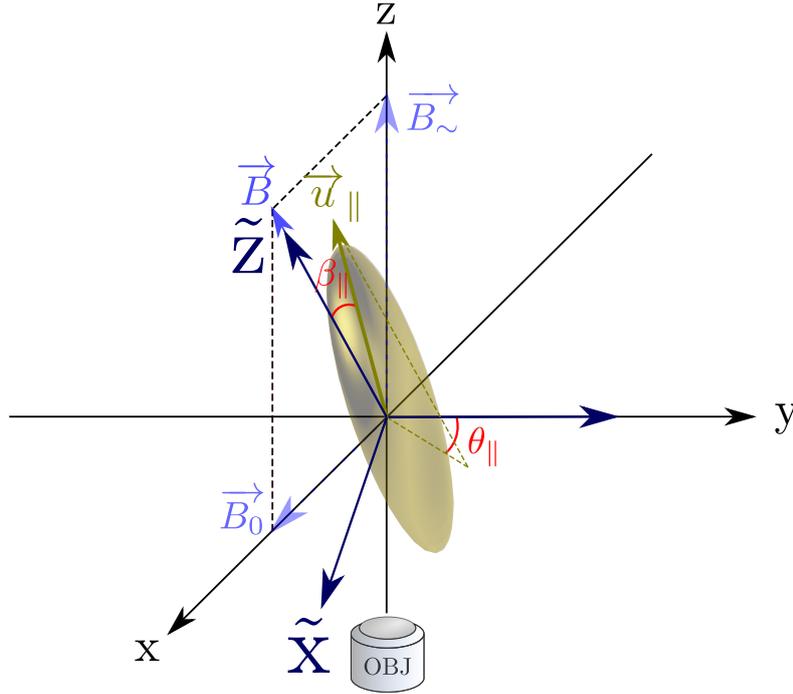


Figure D.1 – Bâtonnet représenté par ses axes \vec{u}_i , ($i \in \{\parallel, \perp\}$) dans le repère tournant d'axes $\tilde{z} \parallel \vec{B}$ et $\tilde{y} = y$. L'axe \vec{u}_i est repéré par ses coordonnées sphériques dans le repère tournant β_i, θ_i .

Dans le problème considéré à la section 2.3, un bâtonnet superparamagnétique de volume V , de moment magnétique \vec{m} et de susceptibilité $\bar{\chi}$ évolue dans un fluide de viscosité η sous un champ magnétique oscillant \vec{B} . Le champ \vec{B} étant supposé spatialement uniforme, la force $\vec{F} = \vec{\nabla}(\vec{m} \cdot \vec{B})$ est nulle. En ne considérant ainsi que des mouvements de rotation pure du bâtonnet, on a, en plus de $\vec{F} = \vec{0}$, $M^t = M^{tr} = 0$. Les équations (D.6) et (D.7) se réécrivent :

$$\frac{d\vec{r}}{dt} = \vec{0} \quad (\text{D.8})$$

$$\frac{d\vec{u}_i}{dt} = (M^r \vec{\tau}) \times \vec{u}_i \quad (\text{D.9})$$

On obtient donc l'équation déterministe d'évolution de l'axe \vec{u}_i du bâtonnet superparamagnétique soumis au couple $\vec{\tau} = \vec{m} \times \vec{B} = \frac{\bar{\chi}V}{\mu_0} \vec{B} \times \vec{B}$:

$$\frac{d\vec{u}_i}{dt} = \frac{1}{\mu_0} \left(M^r \bar{\chi} V \vec{B} \times \vec{B} \right) \times \vec{u}_i \quad (\text{D.10})$$

Les éléments de matrice M_i^r dépendent de η et de la géométrie de l'objet. Ils sont définis aux équations (2.27) et (2.28).

Les effets de diffusion brownienne sont pris en compte dans les simulations, en ajoutant à l'équation (D.10) un terme stochastique et à condition de ne raisonner qu'en valeurs d'orientation moyennes :

$$\frac{d\langle \vec{u}_i \rangle}{dt} = \frac{1}{\mu_0} \left(M^r \bar{\chi} V \vec{B} \times \vec{B} \right) \times \langle \vec{u}_i \rangle - \alpha_i^r \langle \vec{u}_i \rangle \quad (\text{D.11})$$

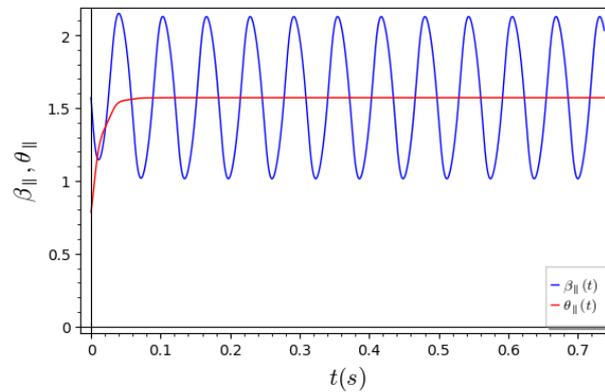
Le facteur d'amortissement α_i^r dépend de la matrice de mobilité rotationnelle M^r et de la température T via : $\alpha_i^r = k_B T (\text{Tr}(M^r) - M_i^r)$ [203].

Cependant, les résultats de simulation de l'orientation du bâtonnet dans ces conditions

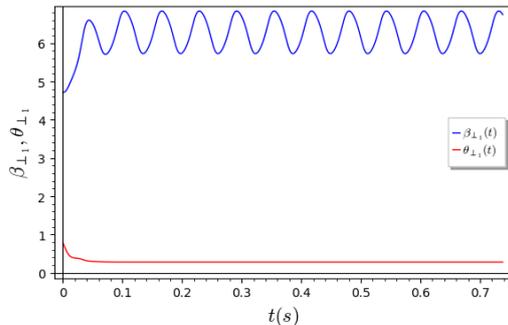
montrent premièrement que seule la direction transverse à la direction de rotation imposée par le champ est affectée par la contribution brownienne. De ce fait, l'agitation brownienne a seulement pour effet de diminuer l'amplitude de rotation dans le plan d'intérêt, et donc l'amplitude du signal, sans modification de la fréquence de rotation. De plus, la direction moyenne du grand axe tend inévitablement à s'aligner dans le plan du champ oscillant, quelle que soit l'ampleur de la contribution brownienne.

Solutions numériques

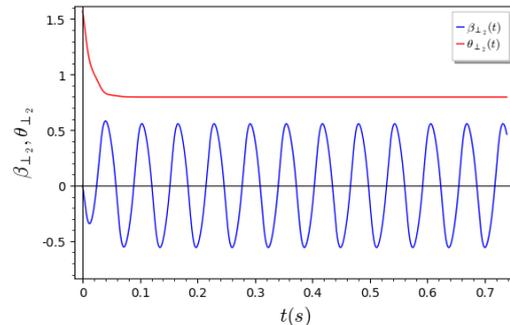
On repère les trois axes du bâtonnet \vec{u}_i par les angles β_i et θ_i dans un système sphérique attaché au champ magnétique (voir figure D.1). Ainsi, l'évolution temporelle de chaque axe est obtenue par la résolution numérique de l'équation (D.11), et est représentée sur la figure D.2a pour des conditions initiales arbitraires des β_i et θ_i et des amplitudes de champs magnétiques $B_\sim = B_0 = 1.3 \text{ mT}$, menant à la fréquence de coupure $f_t \approx 15 \text{ Hz}$ (en l'absence de prise en compte d'un mouvement brownien).



(a) Evolution du grand axe. Conditions initiales : $\beta_{\parallel}(0) = \frac{\pi}{2}$, $\theta_{\parallel}(0) = \frac{\pi}{4}$.



(b) Evolution de l'un des petits axes. Conditions initiales : $\beta_{\perp 1}(0) = \frac{3\pi}{2}$, $\theta_{\perp 1}(0) = \frac{\pi}{4}$.



(c) Evolution de l'un des petits axes. Conditions initiales : $\beta_{\perp 2}(0) = 0$, $\theta_{\perp 2}(0) = \frac{\pi}{2}$.

Figure D.2 – Evolution temporelle des trois axes \vec{u}_i ($i \in \{\parallel, \perp_1, \perp_2\}$) du bâtonnet superparamagnétique, repérés par les angles β_i, θ_i correspondant à leurs coordonnées dans un repère sphérique local attaché au champ magnétique tournant, définis sur la figure D.1. Les trois conditions initiales sont choisies de sorte que \vec{u}_{\parallel} , \vec{u}_{\perp_1} et \vec{u}_{\perp_2} forment un trièdre direct.

Sur la figure D.2a, l'évolution de l'angle θ_{\parallel} du grand axe \vec{u}_{\parallel} vers $\frac{\pi}{2}$ indique que le bâtonnet tend très rapidement à se stabiliser dans le plan défini par les deux composantes du champ magnétique \vec{B}_{\sim} et \vec{B}_0 . L'évolution de l'angle β_{\parallel} traduit l'oscillation du grand axe induite par celle de la composante \vec{B}_{\sim} , de part et d'autre de la composante fixe \vec{B}_0 d'après la valeur

moyenne $\langle \beta_{\parallel} \rangle = \frac{\pi}{2}$. C'est l'amplitude de l'oscillation de β_{\parallel} que l'on mesure par holographie, et qui va diminuer lors de la transition vers le régime $f_B > f_t$.

On représente sur la figure D.3 les solutions de l'équation (D.11) pour la composante de \vec{u}_{\parallel} dans le plan de détection (x, y) , dans le domaine des fréquences où l'on ne retient que la composante de fréquence f_B .

On y remarque qu'à basse fréquence, les bâtonnets ont une réponse quasiment uniforme jusqu'à ce qu'elle s'approche de f_t . Pour $f_B \approx f_t$, une décroissance de la réponse s'amorce, jusqu'à tendre vers 0 pour $f_B \gg f_t$. Ce comportement justifie la modélisation sigmoïdale de la réponse posée à l'équation (2.35).

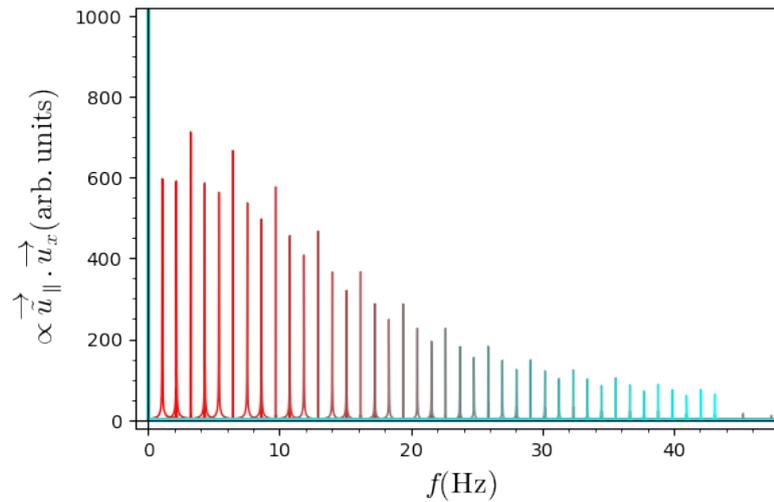


Figure D.3 – Spectre en fréquence $f = f_B$ de la projection du grand axe \vec{u}_{\parallel} sur le plan de détection (x, y) . L'enveloppe du spectre est une sigmoïde dont le point d'inflexion est proche de f_t , conformément à la modélisation effectuée à l'équation (2.35).

Annexe E

Imagerie de dynamiques à très hautes fréquences par holographie hétérodyne

Images spectrales à haute fréquence d'un organoïde rétinien

Nous avons observé avec notre montage d'holographie hétérodyne en champ sombre, sur la figure E.1, un organoïde de rétine âgé de 49 semaines depuis le stade de cellule souche. Sur la figure E.1a, l'organoïde vivant est imagé par holographie hétérodyne à plusieurs fréquences multiples de la cadence d'acquisition (selon la procédure établie aux chapitres 1 et 2¹) allant de 0 à 2 kHz. On remarque tout d'abord que l'activité a lieu majoritairement sur l'axe médian visible sur l'image en lumière blanche. En augmentant la fréquence d'analyse, on observe des variations de l'amplitude du signal ainsi que sa répartition dans l'organoïde : par exemple, on mesure davantage d'activité à 400 Hz qu'à 300 Hz.

En guise de contrôle, les figures E.1b et E.1c présentent des images de l'évolution du même organoïde après 1 et 5 jours respectivement passés sur le microscope sans oxygène ni chauffage, donc vraisemblablement mort. Contrairement à ce qui pourrait être attendu, un signal relativement fort est ici observé. Il peut être attribué à deux causes possibles : comme observé en D-FFOCT, la mise en apoptose des cellules s'accompagne de forts signaux dynamiques. D'autre part, aux temps longs (5 jours) et dans le contexte de notre laboratoire d'optique non stérile, le développement de bactéries est très probable. La grande amplitude de signal révèle donc probablement la présence de ces bactéries, mais la série d'images spectrales montre une évolution fréquentielle plus constante, ce qui tend à valider que les variations observées sur la figure E.1a ont une cause biologique.

Le spectre issu de la moyenne des signaux sur la surface de l'organoïde est tracé sur la figure E.2 pour chaque stade de la vie de l'organoïde imagé sur la figure E.1. Cependant, la fiabilité du contrôle utilisé est discutable puisque l'expérience revient alors à comparer deux phénomènes différents sans pertinence de l'un par rapport à l'autre.

1. Le temps d'intégration est de plus choisi tel que $t_{int}^{-1} \gg f$ pour rendre négligeable la modulation par la fonction de transfert instrumentale, voir chapitre 1.

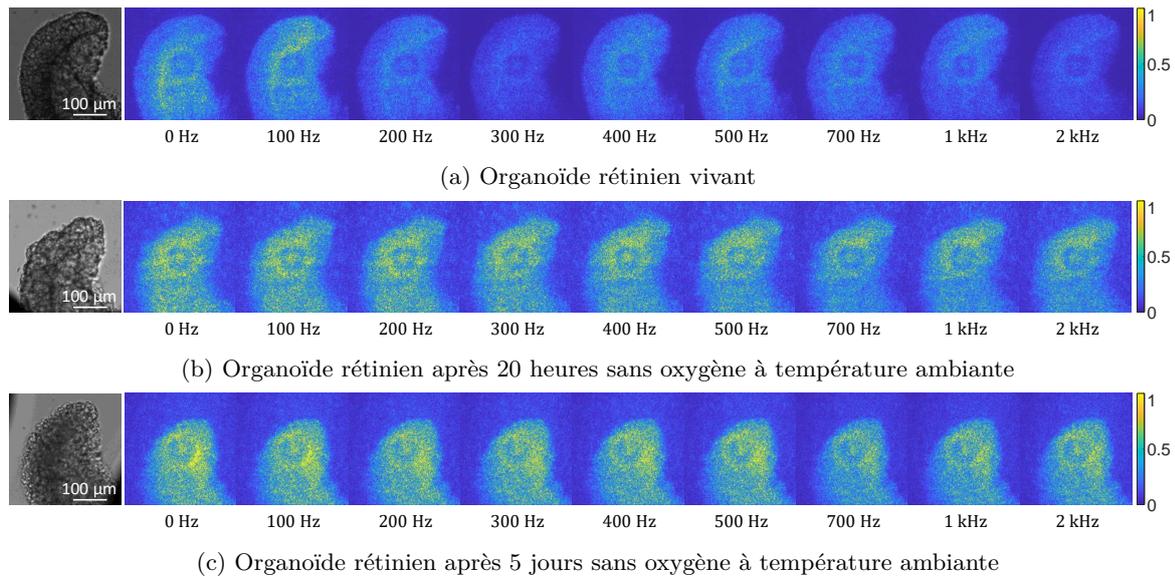


Figure E.1 – Images reconstruites d’hologrammes hétérodynes d’un jeune organoïde de rétine neurale (49 semaines depuis la reprogrammation de la cellule souche). Les hologrammes sont acquis à $f_{acq} = 100$ Hz pendant $t_{int} = 0.1$ ms avec un objectif $\times 10$, ON 0.25. Les images résultent de la moyenne de 250 images (i.e. 1000 hologrammes démodulés à 4 phases). La première image en nuances de gris est prise en lumière blanche.

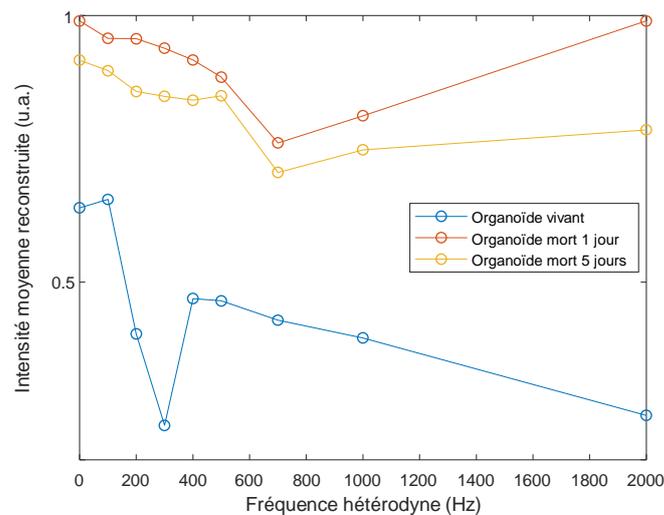


Figure E.2 – Evolution de la valeur moyenne des images reconstruites d’organoïde rétinien de la figure E.1 en fonction de la fréquence hétérodyne, pour les trois états de l’organoïde imagés.

Etude spectrale avant et après focalisation d'un faisceau laser de haute intensité

Pour éviter l'évolution incontrôlée de l'organoïde observée sur la figure E.1, le faisceau d'un laser continu de forte puissance (≈ 7 W) a été focalisé, lors d'une autre expérience, sur un organoïde pour provoquer son apoptose. L'acquisition sur organoïde vivant et celle sur organoïde mort sont donc séparées de seulement quelques minutes, évitant la prolifération de bactéries. Les hologrammes hétérodynes de fréquence allant jusqu'à 8 kHz reconstruits de cet organoïde âgé de 56 semaines depuis le stade de cellule souche sont présentés sur la figure E.3.

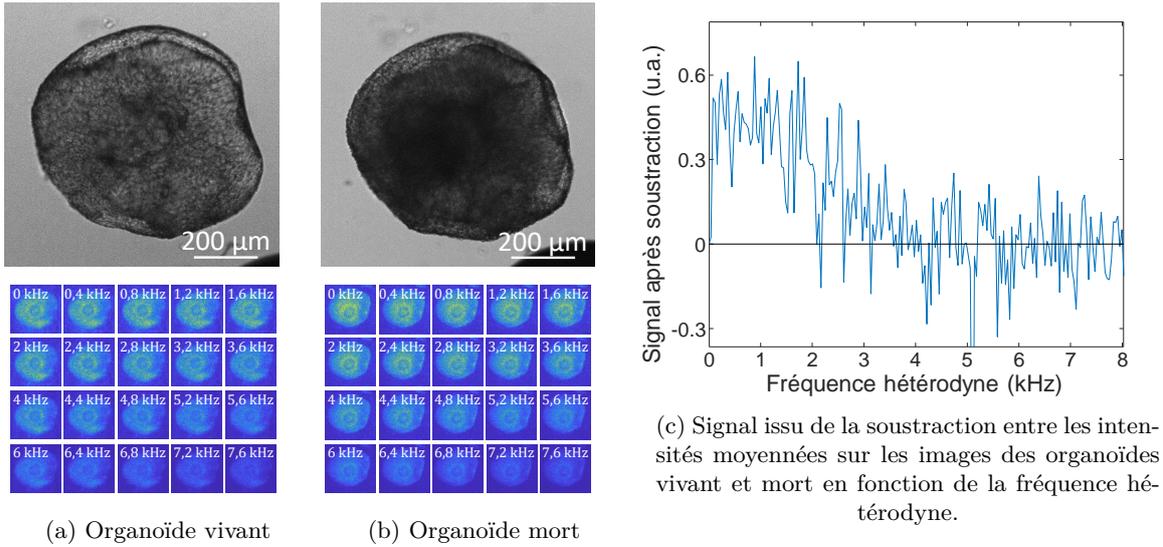


Figure E.3 – (a,b) Images reconstruites d'hologrammes hétérodynes d'un organoïde de rétine neurale d'âge 56 semaines. Les hologrammes sont acquis à $f_{acq} = 40$ Hz pendant $t_{int} = 0.1$ ms avec un objectif $\times 10$, ON 0.25. Les images résultent de la moyenne de 25 images (i.e. 100 hologrammes démodulés à 4 phases). La première image en nuances de gris est prise en lumière blanche. La mort de l'organoïde (b) est provoquée par la focalisation d'un faisceau laser infrarouge continu d'environ 7 W pendant ~ 1 s.

Les figures E.3a et E.3b présentent des images en lumière blanche ainsi qu'une série d'images reconstruites d'hologrammes hétérodynes. Après la focalisation du laser de haute puissance, l'organoïde présente un aspect plus opaque en lumière blanche. L'évolution fréquentielle sur les images de dynamiques est dominée par la modulation par la fonction de transfert, un sinus cardinal (voir chapitre 1) dont le premier zéro est ici à $t_{int}^{-1} = 10$ kHz, et on ne vérifie alors pas $t_{int}^{-1} \gg f$. Cependant, la soustraction des deux spectres (dont chaque point est la moyenne sur toute la surface de l'organoïde) tracée sur la figure E.3c révèle une nette supériorité du signal de l'organoïde vivant jusqu'à environ 4 kHz.² La reproductibilité de ce résultat a été vérifiée en répétant la même expérience sur un autre organoïde.

2. Il est important de noter que le signal $\tilde{s}(f)$ issu de la soustraction comprend l'élargissement par la convolution par la fonction de transfert, donc la valeur 4 kHz n'est qu'une borne supérieure à la fréquence maximale de dynamiques détectées. En effet, en notant $\tilde{S}(f)$ la fonction de transfert instrumentale et $\tilde{g}_v(f)$ et $\tilde{g}_m(f)$ les spectres de l'organoïde respectivement vivant et mort, le signal tracé sur la figure E.3c s'écrit :

$$\begin{aligned}\tilde{s}(f) &= (\tilde{g}_v * \tilde{S})(f) - (\tilde{g}_m * \tilde{S})(f) \\ &= ((\tilde{g}_v - \tilde{g}_m) * \tilde{S})(f)\end{aligned}$$

Bibliographie

- [1] K. I. Willig, B. Harke, R. Medda et S. W. Hell, “STED microscopy with continuous wave beams”, *Nature Methods* **4**, 915-918 (2007) (cf. p. 1).
- [2] I. M. Khater, I. R. Nabi et G. Hamarneh, “A Review of Super-Resolution Single-Molecule Localization Microscopy Cluster Analysis and Quantification Methods”, *Patterns* **1**, 100038 (2020) (cf. p. 1).
- [3] D. M. Jameson et J. A. Ross, “Fluorescence Polarization/Anisotropy in Diagnostics and Imaging”, *Chemical Reviews* **110**, 2685-2708 (2010) (cf. p. 1).
- [4] K. A. Antonio et Z. D. Schultz, “Advances in Biomedical Raman Microscopy”, *Analytical Chemistry* **86**, 30-46 (2013) (cf. p. 1).
- [5] A. Dubois et C. Boccara, “Full-field OCT”, *Medecine/Sciences* **22**, 859-864 (2006) (cf. p. 1, 27).
- [6] M. Debailleul, B. Simon, V. Georges, O. Haeberlé et V. Lauer, “Holographic microscopy and diffractive microtomography of transparent samples”, *Measurement Science and Technology* **19**, 8 (2008) (cf. p. 1).
- [7] L. Shi, C. Zheng, Y. Shen, Z. Chen, E. S. Silveira, L. Zhang, M. Wei, C. Liu, C. de Sena-Tomas, K. Targoff et W. Min, “Optical imaging of metabolic dynamics in animals”, *Nature Communications* **9**, 10.1038/s41467-018-05401-3 (2018) (cf. p. 1, 72).
- [8] J. L. Ross, “The Dark Matter of Biology”, *Biophysical Journal* **111**, 909-916 (2016) (cf. p. 2).
- [9] M. H. Verlhac, C. Lefebvre, P. Guillaud, P. Rassinier et B. Maro, “Asymmetric division in mouse oocytes : with or without Mos”, *Current Biology* **10**, 1303-1306 (2000) (cf. p. 2, 67, 123).
- [10] T. Ebner, M. Moser, M. Sommergruber, M. Puchner, R. Wiesinger et G. Tews, “Developmental competence of oocytes showing increased cytoplasmic viscosity”, *Human Reproduction* **18**, 1294-1298 (2003) (cf. p. 2, 123).
- [11] J. Azoury, K. W. Lee, V. Georget, P. Rassinier, B. Leader et M. H. Verlhac, “Spindle Positioning in Mouse Oocytes Relies on a Dynamic Meshwork of Actin Filaments”, *Current Biology* **18**, 1514-1519 (2008) (cf. p. 2, 67, 123).
- [12] S. Brunet et M. H. Verlhac, “Positioning to get out of meiosis : the asymmetry of division”, *Human Reproduction Update* **17**, 68-75 (2011) (cf. p. 2, 67, 123).
- [13] M. Almonacid, M. E. Terret et M. H. Verlhac, “Control of nucleus positioning in mouse oocytes”, *Seminars in Cell and Developmental Biology* **82**, 34-40 (2018) (cf. p. 2, 30, 67, 123).
- [14] A. Colin, G. Letort, N. Razin, M. Almonacid, W. Ahmed, T. Betz, M. E. Terret, N. S. Gov, R. Voituriez, Z. Gueroui et M. H. Verlhac, “Active diffusion in oocytes nonspecifically centers large objects during prophase I and meiosis I”, *Journal of Cell Biology* **219**, 10.1083/JCB.201908195/VIDEO-8 (2020) (cf. p. 2, 67, 123).
- [15] J. Xie, J. Najafi, R. L. Borgne, C. Durieu, J.-M. Verbavatz, J. Salle et N. MINC, “Contribution of cytoplasm viscoelastic properties to mitotic spindle positioning”, *bioRxiv*, 2021.10.21.465315 (2021) (cf. p. 2, 30, 67, 123).
- [16] K. O. Vasquez, C. Casavant et J. D. Peterson, “Quantitative Whole Body Biodistribution of Fluorescent-Labeled Agents by Non-Invasive Tomographic Imaging”, *PLoS ONE* **6**, sous la dir. de C. A. Boswell, e20594 (2011) (cf. p. 2).

- [17] R. B. Altman, D. S. Terry, Z. Zhou, Q. Zheng, P. Geggier, R. A. Kolster, Y. Zhao, J. A. Javitch, J. D. Warren et S. C. Blanchard, “Cyanine fluorophore derivatives with enhanced photostability”, *Nature Methods* **9**, 68-71 (2011) (cf. p. 2).
- [18] C. Apelian, C. Gastaud et A. C. Boccara, “Extracting relevant information for cancer diagnosis from dynamic full field OCT through image processing and learning”, in *Optical Coherence Tomography and Coherence Domain Optical Methods in Biomedicine XXI*, t. 10053, sous la dir. de J. G. Fujimoto, J. A. Izatt et V. V. Tuchin (fév. 2017) (cf. p. 3, 72, 97, 99, 123).
- [19] J. Scholler, “Imagerie optique 3D multimodale : traitements spatio-temporels, correction du front d’onde et classification automatique”, thèse de doct. (Université Paris sciences et lettres, 2020) (cf. p. 3, 98).
- [20] www.holographer.com (cf. p. 8).
- [21] www.litiholo.com (cf. p. 8).
- [22] W. L. Bragg, “Microscopy by Reconstructed Wave-fronts”, *Royal Society* **197**, 454-487 (1948) (cf. p. 9).
- [23] E. N. Leith, J. Upatnieks et K. A. Haines, “Microscopy by Wavefront Reconstruction”, *Journal of the Optical Society of America* **55**, 981 (1965) (cf. p. 9).
- [24] J. W. Goodman, *Introduction to Fourier optics* (2005) (cf. p. 10, 14).
- [25] Y. N. Denisyuk, Denisyuk et Y. N., “Photographic Reconstruction of the Optical Properties of an Object in Its Own Scattered Radiation Field”, *SPhD* **7**, 543 (1962) (cf. p. 10).
- [26] Stephen A. Benton, “Hologram reconstruction with extended incoherent sources”, *J. Opt. soc. Am* **59**, 1545 (1969) (cf. p. 10).
- [27] J. W. Goodman et R. W. Lawrence, “Digital image formation from electronically detected holograms”, *Applied Physics Letters* **11**, 77-79 (1967) (cf. p. 10).
- [28] U. Schnars et W. Jüptner, “Direct recording of holograms by a CCD target and numerical reconstruction”, *Applied Optics* **33**, 179 (1994) (cf. p. 10).
- [29] F. Verpillat, F. Joud, M. Atlan et M. Gross, “Digital holography at shot noise level”, *IEEE/OSA Journal of Display Technology* **6**, 455-464 (2010) (cf. p. 12, 26).
- [30] N. Verrier, D. Donnarumma, G. Tessier et M. Gross, “High numerical aperture holographic microscopy reconstruction with extended z range”, *Applied optics, Optical Society of America* **54**, 9540-9747 (2015) (cf. p. 12).
- [31] F. Roddier, *Distributions et transformation de Fourier a l’usage des physiciens et des ingenieurs* (Ediscience, 1978), p. 286 (cf. p. 14).
- [32] J.-c. Li, P. Tankam, Z.-j. Peng et P. Picart, “Digital holographic reconstruction of large objects using a convolution approach and adjustable magnification”, *Optics Letters* **34**, 572 (2009) (cf. p. 14).
- [33] A. Finizio, D. Alfieri, G. Pierattini, G. Coppola, P. Ferraro et S. D. Nicola, “Controlling image size as a function of distance and wavelength in Fresnel-transform reconstruction of digital holograms”, *Optics Letters* **29**, 854-856 (2004) (cf. p. 14).
- [34] Y. J. Jo, S. Park, J. H. Jung, J. Yoon, H. Joo, M. H. Kim, S. J. Kang, M. C. Choi, S. Y. Lee et Y. K. Park, “Holographic deep learning for rapid optical screening of anthrax spores”, *Science Advances* **3**, 10.1126/sciadv.1700606 (2017) (cf. p. 14, 94).
- [35] D. Claus, D. Iliescu et P. Bryanston-Cross, “Quantitative space-bandwidth product analysis in digital holography”, *Applied Optics* **50** (2011) (cf. p. 15).
- [36] D. Claus et D. Iliescu, “Optical parameters and space-bandwidth product optimization in digital holographic microscopy”, *Applied Optics* **52** (2013) (cf. p. 15).
- [37] Y. Baek, K. Lee, S. Shin et Y. Park, “Kramers–Kronig holographic imaging for high-space-bandwidth product”, *Optica* **6**, 45 (2019) (cf. p. 15).
- [38] L. Puyo, M. Paques, M. Fink, J.-A. Sahel et M. Atlan, “In vivo laser Doppler holography of the human retina”, *Biomedical Optics Express* **9**, 4113 (2018) (cf. p. 15, 17, 95).

- [39] I. Yamaguchi et T. Zhang, "Phase-shifting digital holography", *Optics Letters* **22** (1997) (cf. p. 15).
- [40] P. Gleyzes, F. Guernet et A. C. Boccarda, "Picometric profilometry. II. Multidetector approach and multiplexed lock-in detection", *Journal of Optics* **26**, 251-265 (1995) (cf. p. 16).
- [41] G. Jerolimski, "Imagerie thermique haute résolution de circuits intégrés en fonctionnement par thermoréfectance", thèse de doct. (jan. 2005) (cf. p. 17).
- [42] V. Westphal, S. Yazdanfar, A. M. Rollins et J. A. Izatt, "Real-time, high velocity-resolution color Doppler optical coherence tomography", *Optics Letters* **27** (2002) (cf. p. 17).
- [43] M. Gross, "Heterodyne Holography : An Optimal and Versatile 2D Detection Scheme", in *OSA Technical Digest* (juin 2015), pp.DM2A.1. (Cf. p. 18).
- [44] G. Tessier, S. Holé et D. Fournier, "Quantitative thermal imaging by synchronous thermorefectance with optimized illumination wavelengths", *Applied Physics Letters* **78**, 2267-2269 (2001) (cf. p. 18).
- [45] L. Yu et M. K. Kim, "Wavelength-scanning digital interference holography for tomographic three-dimensional imaging by use of the angular spectrum method", *Optics Letters* **30**, 2092 (2005) (cf. p. 21).
- [46] D. Dirksen, H. Droste, B. Kemper, H. Deléré, M. Deiwick, H. H. Scheld et G. Von Bally, "Lensless Fourier holography for digital holographic interferometry on biological samples", *Optics and Lasers in Engineering* **36**, 241-249 (2001) (cf. p. 23).
- [47] F. Druon, J. C. Cossec, M.-C. Potier, P. Georges, P. Blandin, S. Lécart, S. Lévêque-Fort et Z. Lenkei, "Time-gated total internal reflection fluorescence microscopy with a supercontinuum excitation source", *Applied Optics*, Vol. 48, Issue 3, pp. 553-559 **48**, 553-559 (2009) (cf. p. 24).
- [48] V. Rodríguez-Fajardo, V. Sanz, I. De Miguel, J. Berthelot, S. S. Aćimović, R. Porcar-Guezenec et R. Quidant, "Two-color dark-field (TCDF) microscopy for metal nanoparticle imaging inside cells", *Nanoscale* **10**, 4019-4027 (2018) (cf. p. 24, 68).
- [49] C. Yuan, G. Pedrini, G. Situ, J. Ma et W. Osten, "Resolution improvement in digital holography by angular and polarization multiplexing", *Applied Optics*, Vol. 50, Issue 7, pp. B6-B11 **50**, B6-B11 (2011) (cf. p. 24).
- [50] M. Rubin, G. Dardikman, S. K. Mirsky, N. A. Turko et N. T. Shaked, "Six-pack off-axis holography", *Optics Letters* **42**, 4611 (2017) (cf. p. 24).
- [51] P. Hosseini, R. Zhou, Y.-H. Kim, C. Peres, A. Diaspro, C. Kuang, Z. Yaqoob et P. T. C. So, "Pushing phase and amplitude sensitivity limits in interferometric microscopy", *Optics Letters* **41**, 1656 (2016) (cf. p. 26).
- [52] M. Kim, Y. Choi, C. Fang-Yen, Y. Sung, R. R. Dasari, M. S. Feld et W. Choi, "High-speed synthetic aperture microscopy for live cell imaging", *Optics Letters* **36**, 148 (2011) (cf. p. 27).
- [53] S. Kang, S. Jeong, W. Choi, H. Ko, T. D. Yang, J. H. Joo, J. S. Lee, Y. S. Lim, Q. H. Park et W. Choi, "Imaging deep within a scattering medium using collective accumulation of single-scattered waves", *Nature Photonics* **9**, 253-258 (2015) (cf. p. 27).
- [54] V. Bianco, P. Memmolo, M. Leo, S. Montessoro, C. Distanto, M. Paturzo, P. Picart, B. Javidi et P. Ferraro, "Strategies for reducing speckle noise in digital holography", *Light: Science and Applications* **7**, 10.1038/s41377-018-0050-9 (2018) (cf. p. 27).
- [55] J. Engmann, C. Servais et A. S. Burbidge, "Squeeze flow theory and applications to rheometry : A review", *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics* **132**, 1-27 (2005) (cf. p. 30).
- [56] F. Ortega, H. Ritacco et R. G. Rubio, "Interfacial microrheology : Particle tracking and related techniques", *Current Opinion in Colloid and Interface Science* **15**, 237-245 (2010) (cf. p. 30).

- [57] Y. Nematbakhsh, K. T. Pang et C. T. Lim, “Correlating the viscoelasticity of breast cancer cells with their malignancy”, *Convergent Science Physical Oncology* **3**, 034003 (2017) (cf. p. 30, 123).
- [58] M. Radmacher, M. Fritz, C. M. Kacher, J. P. Cleveland et P. K. Hansma, “Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope”, *Biophysical Journal* **70**, 556-567 (1996) (cf. p. 30).
- [59] L. Belliard, A. Huynh, B. Perrin, A. Michel, G. Abadias et C. Jaouen, “Elastic properties and phonon generation in Mo/Si superlattices”, *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics* **80**, 155424 (2009) (cf. p. 30).
- [60] R. M. Hochmuth et R. E. Waugh, “Erythrocyte membrane elasticity and viscosity”, *Ann. Rev. Physiol* **49**, 209-228 (1987) (cf. p. 30).
- [61] R. M. Hochmuth, “Micropipette aspiration of living cells”, *Journal of Biomechanics* **33**, 15-22 (2000) (cf. p. 30, 123).
- [62] S. Ramanujan et C. Pozrikidis, “Deformation of liquid capsules enclosed by elastic membranes in simple shear flow : Large deformations and the effect of fluid viscosities”, *Journal of Fluid Mechanics* **361**, 117-143 (1998) (cf. p. 30).
- [63] R. Holyst, A. Bielejewska, J. Szymański, A. Wilk, A. Patkowski, J. Gapiński, A. Zywoński, T. Kalwarczyk, E. Kalwarczyk, M. Tabaka, N. Zibacz et S. A. Wieczorek, “Scaling form of viscosity at all length-scales in poly(ethylene glycol) solutions studied by fluorescence correlation spectroscopy and capillary electrophoresis”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **11**, 9025-9032 (2009) (cf. p. 31, 123).
- [64] L. S. Madsen, M. Waleed, C. A. Casacio, A. Terrasson, A. B. Stilgoe, M. A. Taylor et W. P. Bowen, “Ultrafast viscosity measurement with ballistic optical tweezers”, *Nature Photonics*, 1-7 (2021) (cf. p. 31).
- [65] M. K. Kuimova, “Mapping viscosity in cells using molecular rotors”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **14**, 12651-13102 (2012) (cf. p. 31, 67, 123).
- [66] J. E. Chambers, M. Kubánková, R. G. Huber, I. López-Duarte, E. Avezov, P. J. Bond, S. J. Marciniak et M. K. Kuimova, “An Optical Technique for Mapping Microviscosity Dynamics in Cellular Organelles”, *ACS Nano* **12**, 4398-4407 (2018) (cf. p. 31, 43, 67, 123).
- [67] G. Pesce, A. Sasso et S. Fusco, “Viscosity measurements on micron-size scale using optical tweezers”, *Review of Scientific Instruments* **76**, 1-5 (2005) (cf. p. 31).
- [68] B. A. Nemet, Y. Shabtai et M. Cronin-Golomb, “Imaging microscopic viscosity with confocal scanning optical tweezers”, *Optics Letters* **27**, 264 (2002) (cf. p. 31).
- [69] R. M. Robertson-Anderson, “Optical Tweezers Microrheology : From the Basics to Advanced Techniques and Applications”, *ACS Macro Letters* **7**, 968-975 (2018) (cf. p. 31).
- [70] M. Atlan, P. Desbailles, M. Gross et M. Coppey-Moisan, “Parallel heterodyne detection of dynamic light-scattering spectra from gold nanoparticles diffusing in viscous fluids”, *Optics Letters* **35**, 787 (2010) (cf. p. 31).
- [71] R. K. Chhetri, K. A. Kozek, A. C. Johnston-Peck, J. B. Tracy et A. L. Oldenburg, “Imaging three-dimensional rotational diffusion of plasmon resonant gold nanorods using polarization-sensitive optical coherence tomography”, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **83**, 10.1038/mp.2011.182.doi (2011) (cf. p. 31).
- [72] J. F. Berret, “Microrheology of viscoelastic solutions studied by magnetic rotational spectroscopy”, *International Journal of Nanotechnology* **13**, 597 (2016) (cf. p. 31, 123).
- [73] C. Gentner, R. Kuszelewicz, P. Berto, H. Khelifa et G. Tessier, “Viscosity imaging using heterodyne holographic spectral analysis of Brownian nanorod rotation”, *Optics Express* **29**, 527 (2021) (cf. p. 32, 40, 45).

- [74] F. Perrin, "Mouvement Brownien d'un ellipsoïde (II). Rotation libre et dépolarisation des fluorescences. Translation et diffusion de molécules ellipsoïdales", *Journal de Physique et le Radium* **7**, 1-11 (1936) (cf. p. 33).
- [75] M. M. Tirado et J. G. De La Torre, "Rotational dynamics of rigid, symmetric top macromolecules. Application to circular cylinders", *The Journal of Chemical Physics* **73**, 1986-1993 (1980) (cf. p. 33).
- [76] S. A. Maier, *Plasmonics : fundamentals and applications* (Springer, 2007), p. 223 (cf. p. 34-35).
- [77] L. Novotny et B. Hecht, *Principles of Nano-Optics*, Cambridge (2006) (cf. p. 34-35, 38).
- [78] C. Noguez, "Surface plasmons on metal nanoparticles : The influence of shape and physical environment", *Journal of Physical Chemistry C* **111**, 3606-3619 (2007) (cf. p. 35).
- [79] T. Klar, M. Perner, S. Grosse, G. von Plessen, W. Spirkel et J. Feldmann, "Surface-plasmon resonances in single metallic nanoparticles", *Physical Review Letters* **80**, 4249-4252 (1998) (cf. p. 35).
- [80] C. Sönnichsen, T. Franzl, T. Wilk, G. von Plessen, J. Feldmann, O. Wilson et P. Mulvaney, "Drastic reduction of plasmon damping in gold nanorods", *Physical Review Letters* **88**, 10.1103/PhysRevLett.88.077402 (2002) (cf. p. 35).
- [81] O. Pluchery, R. Vayron et K.-M. Van, "Laboratory experiments for exploring the surface plasmon resonance", *European Journal of Physics* **32**, 585 (2011) (cf. p. 35).
- [82] R. Krahn, L. Manna, G. Morello, A. Figuerola, G. Chandramohan et S. Deka, *Physical Properties of Nanorods*, Springer (2013) (cf. p. 35-36, 38).
- [83] Craig F. Bohren ; Donald R. Huffman, *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (WILEY-VCH, 1988) (cf. p. 36).
- [84] P. K. Jain, N. Sobh, J. Smith, A. N. Sobh, S. White, J. Fauchaux et J. Feser, *nanoDDSCAT*, avr. 2013 (cf. p. 36-37, 53-54).
- [85] E. Sekko, G. Thomas et A. Boukrouche, "A deconvolution technique using optimal Wiener filtering and regularization", *Signal Processing* **72**, 23-32 (1999) (cf. p. 40).
- [86] B. Fisch, L. Harel, S. Amit, R. Kaplan-Kraicer, N. Mor, Y. Tadir, J. Ovadia et P. Merlob, "Viscosity and refractive index of follicular fluid in relation to in vitro fertilization", *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* **13**, 468-471 (1996) (cf. p. 43).
- [87] M. K. Kuimova, S. W. Botchway, A. W. Parker, M. Balaz, H. A. Collins, H. L. Anderson, K. Suhling et P. R. Ogilby, "Imaging intracellular viscosity of a single cell during photoinduced cell death", *Nature Chemistry* **1**, 69-73 (2009) (cf. p. 43).
- [88] N. S. Cheng, "Formula for the viscosity of a glycerol-water mixture", *Industrial and Engineering Chemistry Research* **47**, 3285-3288 (2008) (cf. p. 44-45).
- [89] M. D. Corato, F. Greco, G. D. Avino et P. L. Maffettone, "Hydrodynamics and Brownian motions of a spheroid near a rigid wall", *The Journal of Chemical Physics* **142**, 10.1063/1.4920981 (2015) (cf. p. 46).
- [90] A. Martinez-Marrades, J.-F. Rupprecht, M. Gross et G. Tessier, "Stochastic 3D optical mapping by holographic localization of Brownian scatterers", *Optics Express* **22**, 10.1364/oe.22.029191 (2014) (cf. p. 47, 64).
- [91] J. L. Dormann, "Le phénomène de superparamagnétisme. Revue de Physique Appliquée", *Revue Phys. Appl.* **16**, 275-301 (1981) (cf. p. 48, 50).
- [92] Miha Marolt, "Superparamagnetic materials", thèse de doct. (University of Ljubljana, Kranj, 2014) (cf. p. 48, 50).
- [93] D. Jiles, *Introduction to magnetism and magnetic materials*, Third edition. (CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, 2016), p. 588 (cf. p. 48).
- [94] S. Kim et S. J. Karrila, *Microhydrodynamics : Principles and Selected Applications* (Courier Dover Publications, 2013) (cf. p. 51).

- [95] P. Tierno, J. Claret, F. Sagués et A. Cãbers, “Overdamped dynamics of paramagnetic ellipsoids in a precessing magnetic field”, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **79**, 10.1103/PhysRevE.79.021501 (2009) (cf. p. 51).
- [96] B. Frka-Petesic, K. Erglis, J. F. Berret, A. Cebers, V. Dupuis, J. Fresnais, O. Sandre et R. Perzynski, “Dynamics of paramagnetic nanostructured rods under rotating field”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **323**, 1309-1313 (2011) (cf. p. 51, 66).
- [97] J. F. Berret, “Local viscoelasticity of living cells measured by rotational magnetic spectroscopy”, *Nature Communications* **7**, 10.1038/ncomms10134 (2016) (cf. p. 51, 53, 55, 66, 141).
- [98] L. Chevy, N. K. Sampathkumar, A. Cebers et J. F. Berret, “Magnetic wire-based sensors for the micro-rheology of complex fluids”, *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics* **88**, 10.1103/PhysRevE.88.062306 (2013) (cf. p. 51, 53, 66).
- [99] A. Sehgal, Y. Lalatonne, J. F. Berret et M. Morvan, “Precipitation-redispersion of cerium oxide nanoparticles with poly (acrylic acid) : Toward stable dispersions”, *Langmuir* **21**, 9359-9364 (2005) (cf. p. 53, 123, 139).
- [100] B. Chanteau, J. Fresnais et J.-F. Berret, “Electrosteric Enhanced Stability of Functional Sub-10 nm Cerium and Iron Oxide Particles in Cell Culture Medium”, *Langmuir* **25**, 9064-9070 (2009) (cf. p. 53, 139-140).
- [101] J. Fresnais, M. Yan, J. Courtois, T. Bostelmann, A. Bée et J. F. Berret, “Poly(acrylic acid)-coated iron oxide nanoparticles : Quantitative evaluation of the coating properties and applications for the removal of a pollutant dye”, *Journal of Colloid and Interface Science* **395**, 24-30 (2013) (cf. p. 53, 139).
- [102] J. Fresnais, J.-F. Berret, B. Frka-Petesic, O. Sandre et R. Perzynski, “Electrostatic Co-Assembly of Iron Oxide Nanoparticles and Polymers : Towards the Generation of Highly Persistent Superparamagnetic Nanorods”, *Advanced Materials* **20**, 3877-3881 (2008) (cf. p. 53, 123, 140).
- [103] J. Fresnais, C. Lavelle et J.-F. Berret, “Nanoparticle Aggregation Controlled by Desalting Kinetics”, *Journal of Physical Chemistry C* **113**, 16371-16379 (2009) (cf. p. 53, 140).
- [104] J. M. Camacho et V. Sosa, “Alternative method to calculate the magnetic field of permanent magnets with azimuthal symmetry”, *Revista mexicana de fisica. E* **59**, 8-17 (2013) (cf. p. 56).
- [105] P. Bon, N. Bourg, S. Lécart, S. Monneret, E. Fort, J. Wenger et S. Lévêque-Fort, “Three-dimensional nanometre localization of nanoparticles to enhance super-resolution microscopy”, *Nature Communications* **6**, 10.1038/ncomms8764 (2015) (cf. p. 64).
- [106] H. Maleki, A. Simchi, M. Imani et B. F. Costa, “Size-controlled synthesis of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and their surface coating by gold for biomedical applications”, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **324**, 3997-4005 (2012) (cf. p. 66).
- [107] M. Safi, M. Yan, M.-A. Guedeau-Boudeville, H. Conjeaud, V. Garnier-Thibaud, N. Boggetto, A. Baeza-Squiban, F. Niedergang, D. Averbeck et J.-F. Berret, “Interactions between Magnetic Nanowires and Living Cells : Uptake, Toxicity and Degradation”, *ACS Nano* **5**, 5354-5364 (2011) (cf. p. 67).
- [108] G. Baffou, R. Quidant et C. Girard, “Heat generation in plasmonic nanostructures : Influence of morphology”, *Applied Physics Letters* **94**, 153109 (2009) (cf. p. 67).
- [109] Y. F. Huang, G. Y. Zhuo, C. Y. Chou, C. H. Lin, W. Chang et C. L. Hsieh, “Coherent Brightfield Microscopy Provides the Spatiotemporal Resolution to Study Early Stage Viral Infection in Live Cells”, *ACS Nano* **11**, 2575-2585 (2017) (cf. p. 72, 94, 108).
- [110] K. Groux, A. Verschueren, C. Nanteau, M. Cléménçon, M. Fink, J.-A. Sahel, C. Boccara, M. Paques, S. Reichman et K. Grieve, “Non invasive live imaging of a novel

- retinal pigment epithelium stress model with Dynamic Full-Field Optical Coherence Tomography”, (2021) (cf. p. 72, 106).
- [111] J. Scholler, K. Groux, O. Goureau, J.-A. Sahel, M. Fink, S. Reichman, C. Boccara et K. Grieve, “Dynamic full-field optical coherence tomography : 3D live-imaging of retinal organoids”, Official journal of the CIOMP **9**, 2047-7538 (2020) (cf. p. 72, 97, 99, 101, 107, 123).
- [112] O. Thouvenin, S. Alhaddad, V. Mazlin, M. Boccara et C. Boccara, “Label free optical transmission tomography for biosystems : Intracellular structures and dynamics”, (2021) (cf. p. 72, 120).
- [113] G. Popescu, Y. Park, N. Lue, C. Best-Popescu, L. Deflores, R. R. Dasari, M. S. Feld et K. Badizadegan, “Optical imaging of cell mass and growth dynamics”, American Journal of Physiology - Cell Physiology **295**, 10.1152/AJPCELL.00121.2008 (2008) (cf. p. 72, 79, 97).
- [114] S. Aknoun, J. Savatier, P. Bon, F. Galland, L. Abdeladim, B. Wattellier et S. Monneret, “Living cell dry mass measurement using quantitative phase imaging with quadriwave lateral shearing interferometry : an accuracy and sensitivity discussion”, Journal of biomedical optics **20**, 10.1117/1.JBO.20.12.126009 (2015) (cf. p. 72, 79, 97, 120).
- [115] M. Mir, Z. Wang, Z. Shen, M. Bednarz, R. Bashir, I. Golding, S. G. Prasanth et G. Popescu, “Optical measurement of cycle-dependent cell growth”, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **108**, 13124-13129 (2011) (cf. p. 72, 79).
- [116] Y. K. Park, C. Depeursinge et G. Popescu, “Quantitative phase imaging in biomedicine”, Nature Photonics **12**, 578-589 (2018) (cf. p. 72, 79-80).
- [117] S. Aknoun, M. Yonnet, Z. Djabari, F. Graslin, M. Taylor, T. Pourcher, B. Wattellier et P. Pognonec, “Quantitative phase microscopy for non-invasive live cell population monitoring”, Scientific Reports **11**, 4409 (2021) (cf. p. 72, 94).
- [118] N. Pavillon, J. Kühn, C. Moratal, P. Jourdain, C. Depeursinge, P. J. Magistretti et P. Marquet, “Early cell death detection with digital holographic microscopy”, PLoS ONE **7**, e30912 (2012) (cf. p. 72, 94).
- [119] T. Vicar, M. Raudenska, J. Gumulec et J. Balvan, “The Quantitative-Phase Dynamics of Apoptosis and Lytic Cell Death”, Scientific Reports **10**, 1-12 (2020) (cf. p. 72, 94).
- [120] P. Berto, H. Rigneault et M. Guillon, “Wavefront-sensing with a thin diffuser”, Optics Letters **42**, 5117-5120 (2017) (cf. p. 72, 85-86).
- [121] R. P. Feynman, R. B. Leighton, M. Sands et E. M. Hafner, *The Feynman Lectures on Physics*, t. 1 (1965), Chapter 31 (cf. p. 74).
- [122] P. Bon, J. Savatier, M. Merlin, B. Wattellier et S. Monneret, “Optical detection and measurement of living cell morphometric features with single-shot quantitative phase microscopy”, Journal of Biomedical Optics **17**, 0760041 (2012) (cf. p. 74, 94).
- [123] F. Zernike, “Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects”, Physica **9**, 686-698 (1942) (cf. p. 75).
- [124] F. Zernike, “Phase contrast, a new method for the microscopic observation of transparent objects part II”, Physica **9**, 974-986 (1942) (cf. p. 75).
- [125] P. Bon, “Imagerie microscopique de champs électromagnétiques par interférométrie à décalage quadri-latéral. Applications à la biologie.”, thèse de doct. (Aix-Marseille Université, 2011) (cf. p. 77).
- [126] D. B. Murphy, *Fundamentals of light microscopy and electronic imaging* (Wiley-Liss, 2001) (cf. p. 77).
- [127] V. Chaikeratisak, A. Tassanakajon et P. B. Armstrong, “Interaction of pathogenic vibrio bacteria with the blood clot of the pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*”, Biological Bulletin **226**, 102-110 (2014) (cf. p. 78).

- [128] C. J. Cogswell, N. I. Smith, K. G. Larkin et P. Hariharan, “Quantitative DIC microscopy using a geometric phase shifter”, in Proc. SPIE, Three-Dimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing IV, t. 2984 (avr. 1997), p. 72-81 (cf. p. 79).
- [129] C. Preza et J. A. O’Sullivan, “Quantitative phase and amplitude imaging using Differential-Interference Contrast (DIC) microscopy”, in Proc. SPIE, Computational Imaging VII, t. 7246 (fév. 2009), p. 724604 (cf. p. 79).
- [130] C. Moser, D. Carpentras, M. Künzi et T. Laforest, “Effect of backscattering in phase contrast imaging of the retina”, Optics Express **26**, 6785-6795 (2018) (cf. p. 79).
- [131] E. Wolf, “Three-dimensional structure determination of semi-transparent objects from holographic data”, Optics Communications **1**, 153-156 (1969) (cf. p. 79).
- [132] B. Rappaz, P. Marquet, E. Cuche, Y. Emery, C. Depeursinge et P. J. Magistretti, “Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy”, Optics Express **13**, 9361 (2005) (cf. p. 79).
- [133] P. Jourdain, D. Boss, B. Rappaz, C. Moratal, M. C. Hernandez, C. Depeursinge, P. J. Magistretti et P. Marquet, “Simultaneous Optical Recording in Multiple Cells by Digital Holographic Microscopy of Chloride Current Associated to Activation of the Ligand-Gated Chloride Channel GABAA Receptor”, PLoS ONE **7**, e51041 (2012) (cf. p. 79).
- [134] B. Janicke, A. Kårsnäs, P. Egelberg et K. Alm, “Label-free high temporal resolution assessment of cell proliferation using digital holographic microscopy”, Cytometry Part A **91**, 460-469 (2017) (cf. p. 79).
- [135] V. Balasubramani et al., “Roadmap on Digital Holography-Based Quantitative Phase Imaging”, Journal of Imaging **7**, 252 (2021) (cf. p. 79).
- [136] A. Berdeu, T. Olivier, F. Momey, L. Denis, F. Pinston, N. Faure et C. Fournier, “Joint reconstruction of an in-focus image and of the background signal in in-line holographic microscopy”, Optics and Lasers in Engineering **146**, 106691 (2021) (cf. p. 79).
- [137] X. Su et W. Chen, “Reliability-guided phase unwrapping algorithm : A review”, Optics and Lasers in Engineering **42**, 245-261 (2004) (cf. p. 79).
- [138] W. Yin, Q. Chen, S. Feng, T. Tao, L. Huang, M. Trusiak, A. Asundi et C. Zuo, “Temporal phase unwrapping using deep learning”, Scientific Reports **9**, 1-12 (2019) (cf. p. 79).
- [139] M. Kujawińska, W. Krauze, A. Kus, J. Kostencka, T. Kozacki, B. Kemper et M. Dudek, “Problems and Solutions in 3-D Analysis of Phase Biological Objects by Optical Diffraction Tomography”, International Journal of Optomechatronics **8**, 357-372 (2014) (cf. p. 80).
- [140] M. Habaza, B. Gilboa, Y. Roichman et N. T. Shaked, “Tomographic phase microscopy with 180° rotation of live cells in suspension by holographic optical tweezers”, Optics Letters **40**, 1881 (2015) (cf. p. 80).
- [141] M. Habaza, M. Kirschbaum, C. Guernth-Marschner, G. Dardikman, I. Barnea, R. Korenstein, C. Duschl et N. T. Shaked, “Rapid 3D Refractive-Index Imaging of Live Cells in Suspension without Labeling Using Dielectrophoretic Cell Rotation”, Advanced Science **4**, 10.1002/adv.201600205 (2017) (cf. p. 80).
- [142] F. Merola, P. Memmolo, L. Miccio, R. Savoia, M. Mugnano, A. Fontana, G. D’Ippolito, A. Sardo, A. Iolascon, A. Gambale et P. Ferraro, “Tomographic flow cytometry by digital holography”, Light: Science and Applications **6**, e16241-e16241 (2017) (cf. p. 80).
- [143] S. Vertu, E. Maeda, J. Flügge, J.-J. Delaunay et O. Haeberlé, “Comparison of resolution in tomographic diffractive microscopy using combinations of sample rotation and illumination rotation”, in Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering (fév. 2011) (cf. p. 80).
- [144] L. Foucault, N. Verrier, M. Debailleul, J.-B. Courbot, B. Colicchio, B. Simon, L. Vonna et O. Haeberlé, “Versatile transmission/reflection tomographic diffractive microscopy approach”, Journal of the Optical Society of America A **36**, C18 (2019) (cf. p. 80).

- [145] M Debailleul, V Georges, B Simon, R Morin et O Haeberlé, “High-resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples”, *Optics Letters* **34**, 79 (2009) (cf. p. 80).
- [146] B. Simon, M. Debailleul, A. Beghin, Y. Tourneur et O. Haeberlé, “High-resolution tomographic diffractive microscopy of biological samples”, *Journal of Biophotonics* **3**, 462-467 (2010) (cf. p. 80).
- [147] B. Simon, M. Debailleul, M. Houkal, C. Ecoffet, J. Bailleul, J. Lambert, A. Spangenberg, H. Liu, O. Soppera et O. Haeberlé, “Tomographic diffractive microscopy with isotropic resolution”, *Optica* **4**, 460 (2017) (cf. p. 80).
- [148] C. Zuo, Q. Chen, W. Qu et A. Asundi, “Direct continuous phase demodulation in digital holography with use of the transport-of-intensity equation”, *Optics Communications* **309**, 221-226 (2013) (cf. p. 81).
- [149] P. Sidorenko et O. Cohen, “Single-shot ptychography”, *Optica* **3**, 9 (2016) (cf. p. 81).
- [150] G. Popescu, L. P. Deflores, J. C. Vaughan, K. Badizadegan, H. Iwai, R. R. Dasari et M. S. Feld, “Fourier phase microscopy for investigation of biological structures and dynamics”, *Optics Letters* **29**, 2503 (2004) (cf. p. 81).
- [151] S. Bernet, A. Jesacher, S. Fürhapter, C. Maurer et M. Ritsch-Marte, “Quantitative imaging of complex samples by spiral phase contrast microscopy”, *Optics Express* **14**, 3792 (2006) (cf. p. 81).
- [152] B. C. Platt et R. Shack, “History and principles of Shack-Hartmann wavefront sensing”, *Journal of Refractive Surgery* **17**, 10.3928/1081-597X-20010901-13 (2001) (cf. p. 82).
- [153] S. Meimon, T. Fusco, V. Michau et C. Plantet, “Sensing more modes with fewer sub-apertures : the LIFTed Shack-Hartmann wavefront sensor”, *Optics Letters* **39**, 2835 (2014) (cf. p. 82).
- [154] J. Primot et L. Sogno, “Achromatic three-wave (or more) lateral shearing interferometer”, *Journal of the Optical Society of America A* **12**, 2679 (1995) (cf. p. 82).
- [155] P. Bon, G. Maucourt, B. Wattellier et S. Monneret, “Quadriwave lateral shearing interferometry for quantitative phase microscopy of living cells”, *Optics Express* **17**, 13080 (2009) (cf. p. 83-84).
- [156] J. C. Chanteloup, “Multiple-wave lateral shearing interferometry for wave-front sensing”, *Applied Optics* **44**, 1559-1571 (2005) (cf. p. 83).
- [157] I. Freund, M. Rosenbluh et S. Feng, “Memory Effects in Propagation of Optical Waves through Disordered Media”, *Physical Review Letters* **61** (1988) (cf. p. 85).
- [158] S. Bernet, W. Harm, A. Jesacher et M. Ritsch-Marte, “Lensless digital holography with diffuse illumination through a pseudo-random phase mask”, *Optics Express* **19**, 25113-25124 (2011) (cf. p. 85).
- [159] L. Zhu, J. Boutet de Monvel, P. Berto, S. Brasselet, S. Gigan et M. Guillon, “Chromato-axial memory effect through a forward-scattering slab”, *Optica* **7**, 10.1364/OPTICA.382209 (2020) (cf. p. 86).
- [160] J. P. Thirion, “Image matching as a diffusion process : an analogy with Maxwell’s demons”, *Medical Image Analysis* **2**, 243-260 (1998) (cf. p. 87).
- [161] X. Pennec, P. Cachier et N. Ayache, “Understanding the “Demon’s Algorithm” : 3D Non-rigid Registration by Gradient Descent”, *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* **1679**, 597-605 (1999) (cf. p. 87).
- [162] S Beauchemin et J Barron, “The computation of optical flow”, *ACM Computing Surveys (CSUR)* **27**, 433-466 (1995) (cf. p. 87).
- [163] R. Frankot et R. Chellappa, “A Method for Enforcing Integrability in Shape from Shading Algorithms”, *IEEE Transactions on pattern analysis and machine intelligence* **10**, 10.1109/34.3909 (1988) (cf. p. 88).

- [164] P. Bon, S. Monneret et B. Wattellier, “Noniterative boundary-artifact-free wavefront reconstruction from its derivatives”, *Applied Optics* **51**, 5698-5704 (2012) (cf. p. 88).
- [165] R. Barer, “Determination of dry mass, thickness, solid and water concentration in living cells”, *Nature* **172**, 1097-1098 (1953) (cf. p. 94).
- [166] P. Girshovitz et N. T. Shaked, “Generalized cell morphological parameters based on interferometric phase microscopy and their application to cell life cycle characterization”, *Biomedical Optics Express* **3**, 1757 (2012) (cf. p. 94).
- [167] P. Bon, S. Lécart, E. Fort et S. Lévêque-Fort, “Fast Label-Free Cytoskeletal Network Imaging in Living Mammalian Cells”, *Biophysical Journal* **106**, 1588-1595 (2014) (cf. p. 94).
- [168] A. Butola, D. Popova, D. K. Prasad, A. Ahmad, A. Habib, J. C. Tinguely, P. Basnet, G. Acharya, P. Senthilkumaran, D. S. Mehta et B. S. Ahluwalia, “High spatially sensitive quantitative phase imaging assisted with deep neural network for classification of human spermatozoa under stressed condition”, *Scientific Reports* **10**, 1-12 (2020) (cf. p. 94).
- [169] K. Toda, M. Tamamitsu et T. Ideguchi, “Adaptive dynamic range shift (ADRIFT) quantitative phase imaging”, *Light: Science and Applications* **10**, 2047-7538 (2021) (cf. p. 94, 120).
- [170] M. Boulton et P. Dayhaw-Barker, “The role of the retinal pigment epithelium : Topographical variation and ageing changes”, *Eye* **15**, 384-389 (2001) (cf. p. 95).
- [171] *Définition / Rétine / Futura Santé* (cf. p. 95).
- [172] *Retinitis pigmentosa, institut-vision.org* (cf. p. 95-96).
- [173] H. Khabou et D. Dalkara, “La conception de vecteurs adaptés à la thérapie génique oculaire”, *médecine/sciences* **31**, 529-537 (2015) (cf. p. 95).
- [174] T. Laforest, M. Künzi, L. Kowalczyk, D. Carpentras, F. Behar-Cohen et C. Moser, “Transscleral optical phase imaging of the human retina”, *Nature Photonics* **14**, 439-445 (2020) (cf. p. 95).
- [175] E. Gofas-Salas, E. A. Rossi, J. A. Sahel, K. Grieve, M. Paques et R. D. Ferguson, “In vivo near-infrared autofluorescence imaging of retinal pigment epithelial cells with 757 nm excitation”, *Biomedical Optics Express*, Vol. 9, Issue 12, pp. 5946-5961 **9**, 5946-5961 (2018) (cf. p. 95).
- [176] S. Reichman, A. Terray, A. Slembrouck, C. Nanteau, G. Orioux, W. Habeler, E. F. Nandrot, J.-A. Sahel, C. Monville et O. Goureau, “From confluent human iPS cells to self-forming neural retina and retinal pigmented epithelium”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 8518-8523 (2014) (cf. p. 95-96).
- [177] S. Reichman, A. L. Slembrouck, G. Gagliardi, A. Chaffiol, A. Lique, C. L. Nanteau, A. Potey, M. Belle, O. Rabesandratana, J. Duebel, G. Orioux, E. F. Nandrot, J. A. Sahel et O. Goureau, “Generation of Storable Retinal Organoids and Retinal Pigmented Epithelium from Adherent Human iPS Cells in Xeno-Free and Feeder-Free Conditions”, *STEM CELLS* **35**, 1176-1188 (2017) (cf. p. 95-96).
- [178] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda et S. Yamanaka, “Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors”, *Cell* **131**, 861-872 (2007) (cf. p. 95).
- [179] *Dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) Inserm, La science pour la santé* (cf. p. 96, 106).
- [180] R. Wang, Z. Wang, L. Millet, M. U. Gillette, A. J. Levine et G. Popescu, “Dispersion-relation phase spectroscopy of intracellular transport”, *Optics Express* **19**, 20571-20579 (2011) (cf. p. 97, 120).
- [181] *Wikipedia : Hue Saturation Value* (cf. p. 99).

- [182] C. Apelian, F. Harms, O. Thouvenin et A. C. Boccara, “Dynamic full field optical coherence tomography : subcellular metabolic contrast revealed in tissues by interferometric signals temporal analysis”, *Biomedical Optics Express* **7**, 1511 (2016) (cf. p. 100).
- [183] S. Mordon, “Applications médicales du laser”, *Reflète de la physique*, 65-69 (2010) (cf. p. 107).
- [184] R. W. Taylor et V. Sandoghdar, “Interferometric Scattering Microscopy : Seeing Single Nanoparticles and Molecules via Rayleigh Scattering”, *Nano Letters* **19**, 4827-4835 (2019) (cf. p. 108).
- [185] J. Dong, D. Maestre, C. Conrad-Billroth et T. Juffmann, “Fundamental bounds on the precision of iSCAT, COBRI and dark-field microscopy for 3D localization and mass photometry”, *Journal of Physics D: Applied Physics* **54**, 10.1088/1361-6463/ac0f22 (2021) (cf. p. 108).
- [186] M. Liebel, J. T. Hugall et N. F. Van Hulst, “Ultrasensitive Label-Free Nanosensing and High-Speed Tracking of Single Proteins”, *Nano Letters* **17**, 1277-1281 (2017) (cf. p. 108).
- [187] C. L. Hsieh, “Label-free, ultrasensitive, ultrahigh-speed scattering-based interferometric imaging”, *Optics Communications* **422**, 69-74 (2018) (cf. p. 108).
- [188] C. Y. Cheng, Y. H. Liao et C. L. Hsieh, “High-speed imaging and tracking of very small single nanoparticles by contrast enhanced microscopy”, *Nanoscale* **11**, 568-577 (2019) (cf. p. 108-109).
- [189] Y.-T. Hsiao, C.-N. Tsai, T.-H. Chen et C.-L. Hsieh, “Label-Free Dynamic Imaging of Chromatin in Live Cell Nuclei by High-Speed Scattering-Based Interference Microscopy”, *ACS Nano*, 10.1021/acsnano.1c09748 (2021) (cf. p. 108-109).
- [190] A. Cazier, C. Fournier, N. Verrier et T. Fournel, “Co-design of an in-line holographic microscope with enhanced axial resolution : selective filtering digital holography”, *JOSA A*, Vol. 33, Issue 1, pp. 107-116 **33**, 107-116 (2016) (cf. p. 108).
- [191] H. M. Robert, K. Holanová, Bujak, M. Vala, V. Henrichs, Z. Lánský et M. Piliarik, “Fast photothermal spatial light modulation for quantitative phase imaging at the nanoscale”, *Nature Communications* **12**, 1-10 (2021) (cf. p. 109).
- [192] P. Bon, B. Wattellier et S. Monneret, “Modeling quantitative phase image formation under tilted illuminations”, *Optics Letters* **37**, 1718 (2012) (cf. p. 112-113).
- [193] H. Ding, Z. Wang, F. Nguyen, S. A. Boppart et G. Popescu, “Fourier transform light scattering of inhomogeneous and dynamic structures”, *Physical Review Letters* **101**, 238102 (2008) (cf. p. 120).
- [194] E. Neher et B. Sakmann, “The Patch Clamp Technique”, *Scientific American* **266** (1992) (cf. p. 120).
- [195] M. A. Lauterbach, E. Ronzitti, J. R. Sternberg, C. Wyart et V. Emiliani, “Fast Calcium Imaging with Optical Sectioning via HiLo Microscopy”, *PLoS ONE* **10**, 10.1371/journal.pone.0143681 (2015) (cf. p. 120).
- [196] T. Ling, K. C. Boyle, V. Zuckerman, T. Flores, C. Ramakrishnan, K. Deisseroth et D. Palanker, “High-speed interferometric imaging reveals dynamics of neuronal deformation during the action potential”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **117**, 10278-10285 (2020) (cf. p. 120).
- [197] E. Esposito, G. Spampinato, P. Yger, D. Dalkara, E. Ronzitti, E. Papagiakoumou, V. Emiliani, S. A. Picaud, O. Marre et J. Duebel, “Advanced Neural Circuit Analysis by Combining High-Resolution Optogenetic Stimulation, Two-Photon Imaging and Electrophysiology”, *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **58**, 2586-2586 (2017) (cf. p. 120).
- [198] D. Weihs, T. G. Mason et M. A. Teitell, “Bio-microrheology : A frontier in microrheology”, *Biophysical Journal* **91**, 4296-4305 (2006) (cf. p. 123).

- [199] Y. Wu, M. Štefl, A. Olzyńska, M. Hof, G. Yahioğlu, P. Yip, D. R. Casey, O. Ces, J. Humpolíčková et M. K. Kuimova, “Molecular rheometry : Direct determination of viscosity in Lo and Ld lipid phases via fluorescence lifetime imaging”, *Physical Chemistry Chemical Physics* **15**, 14986-14993 (2013) (cf. p. 123).
- [200] K. Suhling, “Mapping viscosity in living cells”, *SPIE Newsroom*, 10.1117/2.1200907.1686 (2009) (cf. p. 123).
- [201] R. Pecora, “Dynamic Light Scattering Measurement of Nanometer Particles in Liquids”, *Journal of Nanoparticle Research* **2**, 123-131 (2000) (cf. p. 139).
- [202] J. Happel et H. Brenner, *Low Reynolds number hydrodynamics*, t. 1, Mechanics of fluids and transport processes (Springer Netherlands, Dordrecht, 1981) (cf. p. 143).
- [203] M. Makino et M. Doi, “Brownian Motion of a Particle of General Shape in Newtonian Fluid”, *Journal of the Physical Society of Japan* **73**, 10.1143/JPSJ.73.2739 (2004) (cf. p. 144).

Résumé

L'holographie et l'imagerie de front d'onde sont sensibles non seulement à l'intensité, mais aussi à la phase optique. Cet attribut rend ces méthodes particulièrement adaptées à l'étude de la dynamique de micro- ou nano-objets à l'échelle microscopique. Le caractère interférométrique de l'holographie permet une mesure sélective de phénomènes à très hautes fréquences, par détection hétérodyne. Grâce à une configuration en champ sombre, la rotation de nanoparticules sondes anisotropes est observée sous forme de clignotements rapides. En étudiant la dynamique rotationnelle (brownienne ou magnétiquement activée) de ces nanoparticules, nous mesurons la viscosité de manière très locale et quantitative. Ainsi, nous produisons des images de viscosité quantitative dans des milieux fluides, comme le cytoplasme d'une cellule, dans lequel sont réparties ces nanoparticules.

Tandis que la cohérence temporelle de la source lumineuse est requise en holographie, l'imagerie de front d'onde est compatible avec un éclairage incohérent. Un simple diffuseur placé en sortie d'un microscope conventionnel permet d'obtenir un montage auto-référencé d'imagerie de phase quantitative, moins contraignant qu'un montage holographique. Celui-ci nous a permis de mettre en contraste, sans marquage, des mouvements révélateurs de l'activité intracellulaire. Cette application offre à la fois un outil d'analyse métabolique, et une segmentation des images de phase de cellules. Afin d'accéder à des dynamiques plus rapides, et plus généralement des déphasages plus faibles, nous proposons une méthode d'amplification de la sensibilité en phase compatible avec tout montage d'imagerie de front d'onde.

Abstract

Holography and wavefront imaging are not only sensitive to intensity but also to the optical phase. Because of this characteristic, these methods are particularly suitable to study the dynamics of micro- or nano-objects at the microscale. The interferometric character of holography allows a selective measurement of very high frequency phenomena, by heterodyne detection. In a dark field configuration, the rotation of anisotropic probe nanoparticles is observed as a fast blinking. By studying the rotational dynamics (brownian or magnetically activated) of these nanoparticles, we measure the viscosity in a very local and quantitative way. We show quantitative viscosity images of fluidic media, such as the cytoplasm of a cell, in which nanoparticles are distributed or injected.

While a high temporal coherence of the light source is required in holography, wavefront imaging is compatible with incoherent illumination. The addition of a simple diffuser at the output of a conventional microscope allows to produce a self-referenced quantitative phase imaging setup, which is much simpler than a holographic setup. This allowed us to obtain a label-free contrast based on movements revealing intracellular activity, even in a very transparent environment. This application offers both a metabolic analysis tool and a segmentation of cellular phase images. In order to detect faster dynamics, and more generally lower phase shifts, we propose a method to amplify the phase sensitivity of any wavefront imaging setup.