



HAL
open science

Microscopie de fluorescence par illumination structurée à démodulation rapide

Pierre Bourdoncle

► **To cite this version:**

Pierre Bourdoncle. Microscopie de fluorescence par illumination structurée à démodulation rapide. Physique [physics]. Université Paris Cité, 2023. Français. NNT : 2023UNIP7049 . tel-04522167

HAL Id: tel-04522167

<https://theses.hal.science/tel-04522167>

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.

Université Paris Cité

Ecole doctorale n°564 Physique en île-de France

Spécialité Physique Optique

Réalisé à l'Institut Langevin ESPCI Paris PSL UMR 7587 CNRS

Microscopie de fluorescence par illumination structurée à démodulation rapide

présentée par

Pierre BOURDONCLE

THÈSE DE DOCTORAT de physique

Dirigée par Emmanuel FORT

Soutenue le 11 décembre 2023

Devant le jury constitué de

Mme	Christine GRAUBY HEYWANG , Pr Univ de Bordeaux, Loma	Rapporteur
M.	Laurent HÉLIOT , IR CNRS, PhLAM, Univ de Lille	Rapporteur
Mme	Alexandra FRAGOLA , Pr Univ Paris Saclay	Examinatrice
M.	Vincent STUDER , DR CNRS, Bordeaux Neurocampus	Examineur
M.	Emmanuel FORT , Pr ESPCI, Institut Langevin	Directeur de Thèse

Remerciements

Institut Cochin :

Je commencerai par remercier chaleureusement mon équipe de la plate-forme IMAG'IC, Thomas Guilbert, Gabriel Le Goff et Julie Lesieur. En effet, depuis plus de sept ans, ils ont dû pallier à mes absences à l'Institut Cochin afin que je puisse mener à bien cette thèse. Et grâce à leur implication, la plate-forme a pu continuer à offrir le même niveau de service tout en maintenant la continuité de celui-ci. Et merci à Julie Lesieur de m'avoir confié ses lames de Tubuline.

Je remercie mes deux directeurs d'unité de l'Institut Cochin, Pierre-Oliver Couraud et Florence Niedergang qui m'ont autorisé à faire cette thèse ainsi que la délégation INSERM d'avoir accepté de prendre en charge les coûts de ma formation. De plus je remercie l'école doctorale de m'avoir accepté en thèse et d'avoir fait preuve de patience quant à la prolongation de celle-ci (4 fois!)

Institut Langevin :

Je tiens à remercier Claude Boccara d'avoir été mon parrain tout au long de cette thèse, pour la qualité de ses interventions et je le remercie pour le temps qu'il m'a consacré. Je remercie Ignacio Izeddin d'avoir accepté d'être mon tuteur, et d'avoir été toujours présent pour échanger autour de la microscopie. Et je le remercie d'avoir dû rédiger au dernier moment des lettres concernant mes demandes multiples de prolongations.

Je remercie Maxime Harazi pour son aide sur Matlab, Samuel Gresillon pour le prêt de la photodiode et pour la qualité de ses discussions et je remercie Michael Atlan pour le prêt du premier montage d'interféromètre et de la photodiode.

Je tiens à remercier sincèrement Emmanuel Fort, d'avoir pris le risque d'accepter pour cette thèse un biologiste n'ayant que peu de bases en physique. Je le remercie de m'avoir encadré, soutenu tout au long de ses sept années. Il a toujours été présent et patient pour m'expliquer d'une façon claire des notions complexes de physique qui m'étaient plus ou moins étrangères. Je salue sa capacité d'adapter ses explications par rapport à mes compétences dans ce domaine. J'espère avoir la chance de pouvoir prolonger avec lui nos longues discussions, dans des domaines très variés tels que la microscopie, l'actualité mais aussi le bricolage.

De plus je tiens à saluer le travail d'Alexandra Elbakyan pour Sci-Hub.org contribuant à rendre la science d'avantage accessible. Je remercie Aurélien Dauphin pour les images d'OMX, et Sandrine Lévêque-Fort pour les billes, l'AOTF.

Famille :

Un grand merci à mes parents qui ont eu la patience, le temps et l'énergie de m'avoir remplacé très très souvent dans le suivi et les travaux de ma maison tout au long de ces sept ans et qui sans eux nous cantonnerait encore à ce jour dans la véranda sous chauffée.

Et enfin, à ma compagne Laurence et à mon fils Paul pour m'avoir soutenu et accompagné de leur patience tout au long de ses sept années. Je remercie ma compagne d'avoir pris le temps de lire, de relire, de re lire, et de corriger « quelques » erreurs de syntaxe dans la rédaction de ma thèse le soir et le weekend sans comprendre grand-chose.

Merci à tous

Table des matières

Introduction	8
I. Etat de l'art en microscopie de fluorescence	10
A. Principe de la fluorescence	10
1. Principe	10
2. Mouvements cellulaires et moléculaires.....	14
3. Phototoxicité des fluorophores	15
B. Microscopie photonique	15
1. Techniques de microscopie photonique	16
2. Profondeur de champ.....	19
a) Les microscopies limitant la profondeur de champ à l'émission	22
(1) La microscopie confocale	22
(2) Microscopie spinning disk	24
(3) La microscopie SAF	26
b) Les microscopies limitant la profondeur de champ à l'excitation.....	28
(1) Microscopie TIRF (Total internal reflection fluorescence)	28
(2) Microscopie SPIM	29
C. Principe de la microscopie d'illumination structurée SIM	31
1. Les fréquences spatiales.....	31
2. Modèle de formation d'image 2D	34
3. Notion de FTO 3D et sectionnement optique	36
4. Principe de la microscopie par illumination structurée (SIM).....	38
a) Modèle usuel de formation d'images SIM 2D	39
b) Le SIM pour le sectionnement optique	40
c) SIM pour la super-résolution SR-SIM.....	42
5. Microscopie HiLo et algorithme de reconstruction des images.....	44
6. Conclusion	45
Bibliographie.....	47
II. Illumination structurée : partie excitation	51
A. Principe.....	52
B. Interféromètre de Mach-Zehnder	53
1. Source laser et fréquence de contrôle	53
2. Modulateur de phase, cellule de Pockels.....	57
3. Fréquence des interférences.....	58
C. Conclusion	63

III.	Illumination structurée : partie émission	65
A.	Démodulation du signal.....	65
1.	Synchronisation entre la modulation (Pockels) et la démodulation (PEM)	71
2.	Démodulation du signal par le modulateur Photoélastique PEM.....	72
3.	Démodulation du signal par 4 phases du réseau	74
4.	Modulation du signal par deux phases du réseau : LiveHiLo	76
5.	Compensation de la déformation des canaux de la caméra	78
6.	Traitement d'images, démodulation.....	82
B.	Conclusion	84
IV.	Caractérisation	88
A.	Performances du LiveHiLo en termes de sectionnement	88
1.	Sectionnement de billes micrométriques.....	88
2.	Balayage axial, sectionnement d'un volume	94
3.	Éclairage de l'échantillon.....	100
V.	Conclusion et perspectives.....	104
A.	Perspectives.....	104
B.	Conclusion	106
	Bibliographie.....	107
	Annexes	111
1.	Traitement d'images.....	111

Introduction

Introduction

Depuis la fin du dix-neuvième siècle, la microscopie photonique est devenue un outil indispensable à l'étude du vivant. Grâce à sa résolution, on peut observer des cellules eucaryotes de quelques micromètres, non distinguables à l'œil nu. Ce pouvoir résolutif de quelques centaines de nanomètres¹, limité par la diffraction ne permet toutefois pas l'observation distincte de toutes les briques, molécules, protéines constituant le monde du vivant.

Un des grands avantages de la microscopie photonique est bien sûr son pouvoir résolutif mais surtout sa capacité à observer des cellules *in vivo*. En opposition avec la microscopie électronique où l'échantillon est forcément fixé².

De nombreuses techniques en microscopie photonique sont concentrées sur ce gain en résolution car c'est la dimension qui nous semble la plus limitée pour accéder à l'échelle subcellulaire et moléculaire. Mais elles sont souvent en contradiction avec les objets observés qui sont en mouvement. Ce gain en résolution a systématiquement pour conséquence la diminution des fréquences d'acquisition et donc est peu compatible avec l'étude *in vivo*³.

L'observation de cellules vivantes en microscopie de fluorescence nécessite de prendre en compte plusieurs aspects essentiels.

Tout d'abord, il est crucial d'avoir une capacité de sectionnement optique permettant de distinguer les différents éléments présents dans le volume cellulaire. Si tous les éléments d'une cellule sont projetés sur une seule image, il devient difficile de déterminer les positions axiales relatives entre les plans et donc les structures, notamment les protéines qui ont une taille de quelques nanomètres. Un pouvoir de sectionnement fin facilite la reconstruction en trois dimensions des cellules observées. De plus, un bon pouvoir de sectionnement améliore le contraste, car plus l'image acquise représente un petit volume, plus les objets présents sont aisément discernables. Ainsi, le signal des objets d'intérêt n'est pas perturbé par les signaux provenant d'objets situés au-dessus ou en dessous.

Le deuxième aspect important dans l'observation de cellules vivantes concerne la fréquence d'acquisition. Les protéines constitutives des cellules, y compris les protéines de signalisation, peuvent se déplacer rapidement, atteignant des vitesses de plusieurs micromètres par seconde⁴. Par conséquent, il est nécessaire que le système d'acquisition puisse atteindre des fréquences supérieures à la vitesse de déplacement de ces protéines. Cependant, une augmentation de la fréquence d'acquisition peut entraîner une diminution de la sensibilité de la technique d'acquisition, ce qui réduit la plage dynamique du signal acquis et peut affecter le rapport signal/bruit.

¹ Abbe, « The Relation of Aperture and Power in the Microscope (Continued).* », *Journal of the Royal Microscopical Society* 2, n° 4 (1882): 460-73, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>.

² Parastou Tizro, Cecilia Choi, et Negar Khanlou, « Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy », *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1897 (2019): 417-24, https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_33.

³ Jaroslav Icha et al., « Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It », *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 39, n° 8 (août 2017), <https://doi.org/10.1002/bies.201700003>.

⁴ Jérémie Capoulade et al., « Quantitative Fluorescence Imaging of Protein Diffusion and Interaction in Living Cells », *Nature Biotechnology* 29, n° 9 (septembre 2011): 835-39, <https://doi.org/10.1038/nbt.1928>.

Le troisième aspect crucial concerne la résolution latérale. Une meilleure résolution latérale permet une meilleure capacité à distinguer deux objets situés sur le même plan. Cependant, l'augmentation de la résolution latérale est souvent associée à une augmentation du temps d'acquisition et de l'exposition de l'échantillon à la lumière, ce qui peut augmenter la phototoxicité.

Enfin, l'un des principaux défis de l'imagerie des cellules vivantes est la phototoxicité induite par l'utilisation de marqueurs, tels que les fluorochromes. Ces marqueurs sont utilisés pour marquer spécifiquement des molécules, des protéines ou des compartiments cellulaires. Cependant, lorsque les fluorochromes sont fortement excités, ils deviennent sensibles aux oxydants présents, tels que l'oxygène, et génèrent des radicaux libres qui peuvent être très toxiques pour les cellules. Par conséquent, il est important de limiter l'exposition aux puissances laser élevées afin de réduire la phototoxicité lors de l'imagerie des cellules vivantes ⁵.

Le sujet de ma thèse a été de développer une technique de microscopie à faible phototoxicité tout en améliorant le sectionnement optique, en utilisant l'illumination structurée comme base. La microscopie d'illumination structurée SIM⁶ (Structured Illumination Microscopy) est une méthode permettant de séparer le signal d'intérêt du bruit de fond provenant des plans hors focus. Cela est réalisé en projetant un motif, tel qu'une grille, sur l'échantillon, ce qui module uniquement le signal d'intérêt au plan focal. Pour démoduler ce signal d'intérêt, il est essentiel d'avoir au moins trois phases différentes de la grille. Cependant, cela entraîne la création d'un grand nombre d'images, une baisse de la fréquence d'acquisition et une augmentation de l'énergie lumineuse reçue par l'échantillon, augmentant ainsi la phototoxicité. Dans le cadre de cette technique, notre objectif a été de minimiser le nombre d'images nécessaires à la démodulation du signal, afin de réduire la phototoxicité pour les échantillons tout en améliorant le contraste et la vitesse d'acquisition.

Le premier chapitre est dédié à la partie excitation de la technique. Nous présenterons l'utilisation d'un interféromètre de Mach-Zehnder couplé à une cellule de Pockels pour moduler rapidement la phase et la fréquence d'un réseau projeté sur l'échantillon.

Dans le deuxième chapitre, nous décrivons la méthode développée pour démoduler rapidement le signal d'émission de fluorescence de l'échantillon, modulé par le réseau. Cette étape est souvent limitante en termes de fréquences d'acquisition dans les techniques de microscopie. Ici nous avons synchronisé la modulation du signal par une cellule de Pockel à un démodulateur photoélastique.

Enfin, le dernier chapitre portera sur la caractérisation du pouvoir de sectionnement de la technique que nous avons mise au point, en l'appliquant à différents types d'échantillons. Nous évaluerons également les niveaux d'intensité lumineuse nécessaires pour l'imagerie, en vérifiant leur compatibilité avec des études *in vivo*.

⁵ Ram Dixit et Richard Cyr, « Cell Damage and Reactive Oxygen Species Production Induced by Fluorescence Microscopy: Effect on Mitosis and Guidelines for Non-Invasive Fluorescence Microscopy », *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 36, n° 2 (octobre 2003): 280-90, <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01868.x>; Icha et al., « Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It ».

⁶ L. H. Schaefer, D. Schuster, et J. Schaffer, « Structured Illumination Microscopy: Artefact Analysis and Reduction Utilizing a Parameter Optimization Approach », *Journal of Microscopy* 216, n° Pt 2 (novembre 2004): 165-74, <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01411.x>.

I. Etat de l'art en microscopie de fluorescence

A. Principe de la fluorescence

1. Principe

L'utilisation de la fluorescence est l'un des outils majeurs dans l'étude du vivant. Ce phénomène a été observé pour la première fois en 1845 par Sir John F.W. Herschel lorsqu'il examina une solution de quinine sous la lumière du soleil. En 1853, G.G. Stokes donna le nom de "fluorescence" à ce phénomène, et c'est dans les années 1920-30 qu'A. Jabłoński est considéré comme le pionnier du développement de cette technique.

La fluorescence résulte de l'excitation d'une molécule par un photon d'une énergie suffisante (voir Figure I-1). L'émission de photons qui en découle est de l'ordre de la nanoseconde après l'excitation. Il est important de noter que la longueur d'onde d'émission est généralement plus grande que la longueur d'onde d'excitation. Cette différence s'explique par une perte d'énergie sous forme de chaleur lorsque les électrons passent par des états vibrationnels entraînant une dissipation d'énergie. On appelle cette différence de longueur d'onde le "déplacement de Stokes" (Stokes, 1852) (voir Figure I-2a).

Afin de séparer les spectres d'absorption et d'émission, on utilise un miroir dichroïque. Bien que celui-ci puisse avoir un taux de réjection considérable (de l'ordre de $1/1000000$), il n'est généralement pas suffisant et nécessite un filtre additionnel filtrant la bande spectrale associée à la fluorescence permettant une réjection additionnelle des photons d'excitation. Un filtre d'excitation est également souvent nécessaire pour filtrer le spectre d'excitation qui peut avoir des composantes dans le spectre d'émission. Pour pallier cela, on ajoute des filtres d'excitation et d'émission qui ont une meilleure densité optique, permettant ainsi de ne transmettre au détecteur que les longueurs d'onde d'émission sélectionnées (Figure I-2c). L'ensemble de ces trois éléments, c'est-à-dire les filtres d'excitation, les filtres d'émission et le miroir dichroïque, constitue le "bloc de filtres". Selon la catégorie de fluorochromes que l'on souhaite observer, on changera le bloc de filtres en conséquence.

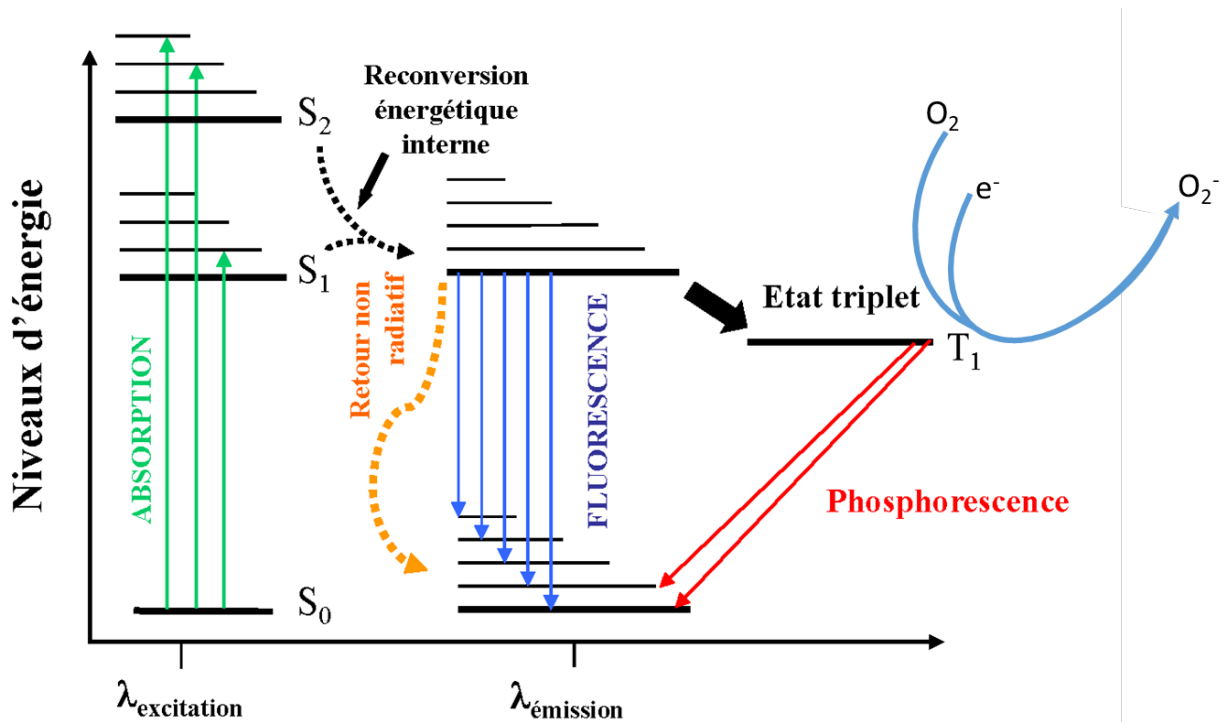


Figure I-1 Diagramme de Perrin-Jablonski. La fluorescence est un processus spontané d'émission de lumière intervenant lors du retour à l'état fondamental S_0 d'une molécule à partir d'un état excité singulet S_1 ($S_1 \rightarrow S_0$). Elle est caractérisée par l'émission très rapide d'un photon (10^{-10} à 10^{-7} s). L'émission de fluorescence est en compétition avec les processus non radiatifs et la phosphorescence. La fluorescence est à distinguer de la phosphorescence pour laquelle l'émission de lumière spontanée résulte du retour à l'état fondamental à partir d'un état excité triplet ($T_1 \rightarrow S_0$). Dans ce cas, l'émission est plus lente (10^{-6} à 1 s). Il est possible que le singulet S_1 soit converti en un état excité triplet de longue durée qui est capable de transférer des électrons à l'oxygène, produisant une série de DRO Dérivés Réactifs de l'Oxygène (ROS en anglais, Reactive Oxygen Species) via le superoxyde (adapté de ⁷).

⁷ Fatma Vatansever et al., « Antimicrobial Strategies Centered around Reactive Oxygen Species – Bactericidal Antibiotics, Photodynamic Therapy, and Beyond », *FEMS Microbiology Reviews* 37, n° 6 (novembre 2013): 955-89, <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026>.

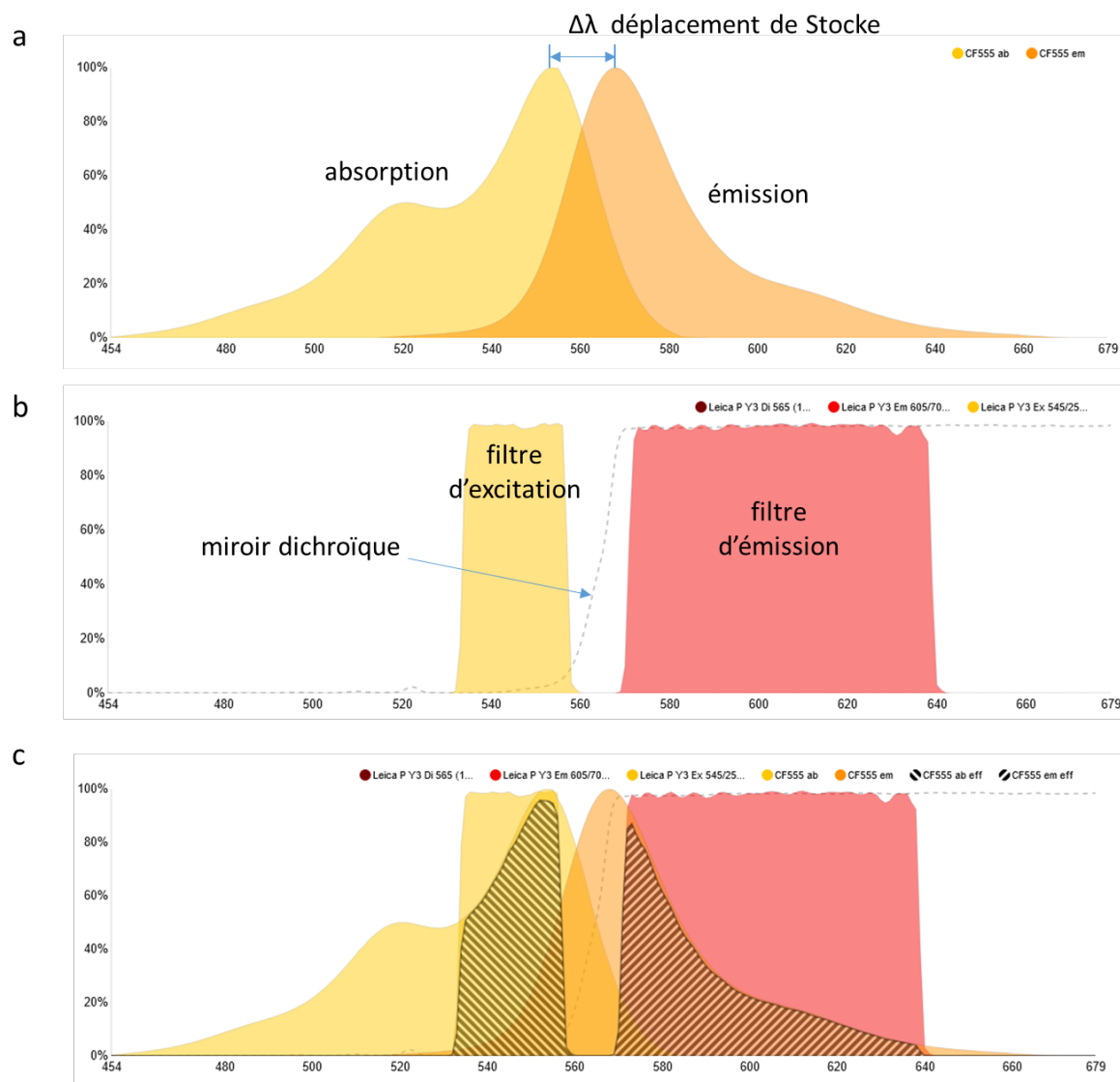


Figure I-2 (a) Spectre d'émission et d'excitation d'un fluorochrome CF[®]555. La longueur d'onde d'émission après excitation est plus grande que la longueur d'onde d'absorption. Cette différence entre les maxima des spectres d'absorption et d'émission est qualifiée de déplacement de Stokes et s'explique par le fait que le retour à l'état fondamental S_0 d'une molécule s'effectue depuis l'état excité de plus basse énergie. L'absorption d'un photon est en effet généralement suivie d'un processus de relaxation vibrationnelle (Figure I-1) très rapide qui entraîne une perte d'énergie avant l'émission d'un photon. (b) Il est ainsi possible de séparer les spectres d'absorption et d'émission par un miroir dichroïque. Ce dernier, qui peut avoir une bonne transmission, a généralement une mauvaise densité optique, ce qui peut laisser passer une partie des longueurs d'onde d'excitation au détecteur. C'est pour cela que l'on ajoute des filtres d'excitation et d'émission, avec une meilleure densité optique, pour ne transmettre au détecteur que les longueurs d'onde d'émission sélectionnées (c) partie hachurée rouge (créé avec ⁸).

⁸ Talley J. Lambert, « FPbase: A Community-Editable Fluorescent Protein Database », *Nature Methods* 16, n° 4 (avril 2019): 277-78, <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>.

Les solutions les plus utilisées pour marquer une protéine d'intérêt avec un fluorochrome sont celles utilisant la transfection d'un plasmide codant pour une protéine chimère composée de la protéine d'intérêt et d'une protéine fluorescente rapportrice comme par exemple la GFP (Green Fluorescent Protein), issue d'une méduse (*Aequorea victoria*), découverte en 1962⁹, qui est à l'origine du prix Nobel de chimie en 2008¹⁰.

Après une transfection d'un vecteur contenant la séquence de cette protéine chimère, la cellule va exprimer avec son matériel la protéine d'intérêt, avec accrochée, la protéine fluorescente rapportrice. Il est alors possible d'observer la localisation et de suivre le mouvement de cette protéine d'intérêt, à l'intérieur d'une cellule maintenue en vie, grâce à la fluorescence de la protéine rapportrice.

Les progrès en mutagenèse ont permis de modifier la GFP et la DsRed (*Discosoma* sp. Fluorescent protein) pour créer des gammes de longueurs d'onde de fluorescence qui s'étendent du bleu jusqu'au rouge lointain¹¹. La Figure I-3 montre à titre d'exemples les spectres d'excitation et d'émission de différentes variantes de la Red Fluorescente Protein (RFP) ainsi que les protéines purifiées en trans-illumination (c) et en fluorescence (d). Il est possible de transférer plusieurs chimères avec des protéines rapportrices qui ont des couleurs différentes et donc de suivre simultanément dans la même cellule plusieurs protéines d'intérêts.

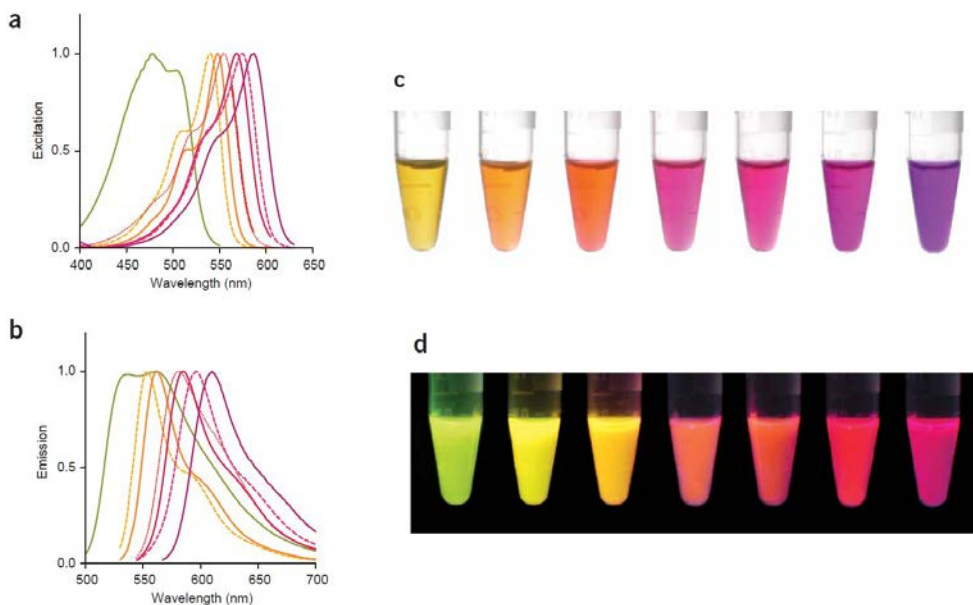


Figure I-3 (a et b) Spectres d'excitation et d'émission des différents variantes de la RFP (Red Fluorescente Protein). (c et d) protéines purifiées de gauche à droite : mHoneydew, mBanana, mOrange, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, montrées en transmission (c), et en fluorescence (d).¹²

⁹ O. Shimomura, F. H. Johnson, et Y. Saiga, « Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea* », *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (juin 1962): 223-39, <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.

¹⁰ Marie-Thérèse Nicolas et Marc Moreau, « Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien) : Osamu Shimomura », *médecine/sciences* 24, n° 11 (1 novembre 2008): 983-84, <https://doi.org/10.1051/medsci/20082411983>.

¹¹ Nathan C Shaner et al., « Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma* Sp. Red Fluorescent Protein », *Nature Biotechnology* 22, n° 12 (décembre 2004): 1567-72, <https://doi.org/10.1038/nbt1037>.

¹² Shaner et al.

La deuxième approche est l'utilisation d'anticorps spécifiques d'une protéine ou d'un épitope, où l'anticorps est directement couplé à un fluorochrome¹³.

Cependant cette approche nécessite la fixation des cellules ou des tissus.

Lors d'une excitation spontanée d'un fluorochrome organique, l'émission de fluorescence n'est pas polarisée à cause de la rotation des molécules. La transition dipolaire des fluorophores induit une polarisation de l'émission. Néanmoins, la plupart des fluorophores sont libres en rotation ce qui rend statistiquement leur émission non polarisée.

La cohérence temporelle de la fluorescence est très faible à cause de la largeur spectrale de typiquement quelques dizaines de nanomètres (par contre le caractère ponctuel de l'émetteur induit une cohérence spatiale importante).

2. Mouvements cellulaires et moléculaires

L'utilisation de la fluorescence offre des avantages significatifs dans l'observation du vivant, combinant résolution, spécificité, fonctionnalité et grandes fréquences d'acquisition. Cependant, il peut être difficile d'optimiser toutes ces dimensions simultanément sans sacrifier l'une d'entre elles.

Par exemple, pour étudier un mouvement cellulaire, on peut facilement acquérir des images toutes les minutes avec une temps d'acquisition de 100 ms, ce qui sera peu phototoxique pour la cellule. En revanche, l'observation d'un mouvement moléculaire peut nécessiter des acquisitions toutes les 20 ms pendant 30 s, ce qui multiplie l'irradiation subie par la cellule par 300.

Certaines techniques permettent d'améliorer la profondeur de champ ou la résolution en augmentant le nombre d'acquisitions, comme c'est le cas pour les techniques plein champ de déconvolution et de SIM. D'autres techniques à balayage augmentent simplement le temps nécessaire pour effectuer une acquisition unique, comme dans le cas de la microscopie confocale.

La technique que nous avons développée est plein champ mais permet de réaliser les différentes acquisitions pour le sectionnement axial de façon simultanée. Ceci permet d'accéder à des temps d'acquisition aux fréquences des caméras, atteignant environ 40 Hz. En parallélisant l'acquisition, notre approche permet de mieux concilier une acquisition rapide avec une moindre phototoxicité pour les échantillons, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'imagerie *in vivo*.

¹³ Ian D. Odell et Deborah Cook, « Immunofluorescence Techniques », *Journal of Investigative Dermatology* 133, n° 1 (janvier 2013): 1-4, <https://doi.org/10.1038/jid.2012.455>.

3. Phototoxicité des fluorophores

Lorsqu'on image des cellules vivantes exprimant des protéines fluorescentes, une partie des fluorochromes, à force d'être excitée, va passer dans un état triplé, un état noir T_1 (Figure I-1).

Cet état triplé, transitoire, est très sensible aux oxydants présents dans le milieu, et entraîne la destruction de la molécule et donc la fin de l'émission de fluorescence. C'est le phénomène de photoblanchiment.

Dès lors qu'on excite des fluorochromes, une réaction d'oxydo-réduction se produit et génère des radicaux libres correspondant à des dérivés réactifs de l'oxygène (DRO, ROS en anglais, Reactive Oxygen Species) comme par exemple le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'anion superoxyde O^{2-} .

En temps normal les cellules sont capables de se défendre contre les dommages causés par les DRO à l'aide d'enzymes de type superoxyde dismutase, catalase et glutathion peroxydase. Mais les fortes concentrations de DRO causées par l'excitation des fluorochromes ne sont pas compensables par les cellules et peuvent rapidement entraîner une mort cellulaire.¹⁴

Ainsi il est important de limiter la dose de radiation, de réduire au maximum le temps d'exposition d'un laser ou d'une lampe sur les cellules vivantes, contenant des fluorochromes, afin d'être le plus neutre possible.

B. Microscopie photonique

Ce chapitre décrit les différentes techniques de microscopie de fluorescence utilisées pour l'observation et l'imagerie d'objets à l'échelle microscopique. L'objectif est l'une des composantes les plus importantes de ce système, car il détermine le grossissement et la résolution de l'image. La résolution est la capacité à distinguer deux objets proches. Pour un microscope sans aberration, elle est limitée par la diffraction de la lumière qui forme une tache de diffraction appelée tache d'Airy ou réponse impulsionnelle du système (PSF - Point Spread Function) (Figure I-5).

Dans ce chapitre, nous étudierons en détail la profondeur de champ et ses implications en microscopie photonique. Nous examinerons également les différentes techniques qui permettent de réduire la profondeur de champ et d'améliorer la résolution et la qualité des images. Ces techniques peuvent être regroupées en deux catégories principales : celles qui confinent à l'émission et celles qui confinent à l'excitation. Chaque technique présente des avantages et des limites spécifiques.

¹⁴ Dixit et Cyr, « Cell Damage and Reactive Oxygen Species Production Induced by Fluorescence Microscopy »; Icha et al., « Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It ».

1. Techniques de microscopie photonique

Le microscope photonique est un système optique composé de plusieurs lentilles permettant de réaliser une image d'un objet observé.

La partie la plus importante de celle-ci est l'objectif car il va participer au grossissement global et à la résolution. La résolution permet de pouvoir distinguer deux objets proches. L'image d'un point source infiniment petit ne sera pas un point mais une tache de diffraction. Cette tache est appelée tache d'Airy ou réponse impulsionnelle du système (PSF Point Spread Function).

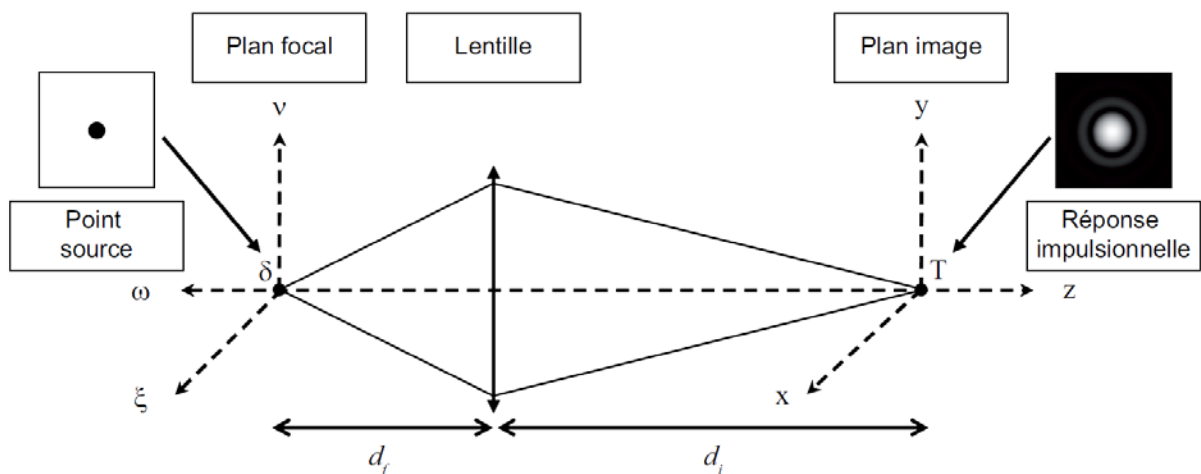


Figure I-4 Système optique simple constitué d'une lentille mince. La lentille transforme l'impulsion $\delta(\xi, \nu, \omega)$ située sur le plan focal, en une tache $T(x, y, z)$ sur le plan image. La tache ainsi formée représente la PSF de ce système. Les distances d_f et d_i sont respectivement la distance focale et la distance entre la lentille et le plan image¹⁵.

La Figure I-4 montre un système optique simple constitué d'une unique lentille mince convergente. Un point source, mathématiquement formulé par une impulsion de Dirac $\delta(\xi, \nu, \omega)$, est situé sur le plan focal de la lentille et produit une tache $T(x, y, z)$ sur le plan image. Cette réponse correspond à la PSF de ce système optique. Le rapport entre la distance d_f , distance focale de la lentille, et d_i , la distance entre la lentille et le plan image, définit le coefficient de grossissement transversal $M = d_i/d_f$ de la lentille. Du point de vue de l'optique géométrique, ce système peut être vu comme un grossissement et une projection de l'impulsion d'entrée vers l'image de sortie. L'optique géométrique ne suffit pas alors à expliquer la tache formée sur le plan image.

À l'aide des notations de la Figure I-4, la PSF h de ce système, définie en tout point de l'espace, s'écrit¹⁶

¹⁵ Elodie Dusch, « Modélisation de la réponse impulsionnelle pour la détection de particules en microscopie par fluorescence » (Université Paris Descartes, 2008).

¹⁶ Kenneth R. Castleman, *Digital Image Processing* (Prentice Hall, 1996).

$$h(x, y, z) = \iiint_{\mathbb{R}^3} h\left(\frac{x}{M} - \xi, \frac{y}{M} - v, \frac{z}{M^2} - \omega\right) \delta(\xi, v, \omega) d\xi dv d\omega$$

Équation I-1

On remarque que le grossissement axial (le long de l'axe optique z) est égal au carré du coefficient de grossissement transversal M . Le grandissement axial équivaut à la distance entre deux plans successifs dans l'espace objet divisée par la distance entre les deux plans correspondants dans l'espace image.

Dans un système optique linéaire et invariant par translation, la formation d'une image est définie par la PSF (Figure I-5), il est alors possible d'exprimer l'image comme la convolution entre l'objet étudié et la PSF. Un système est dit invariant par translation s'il transforme de façon identique deux points sources situés à deux endroits différents du plan focal.

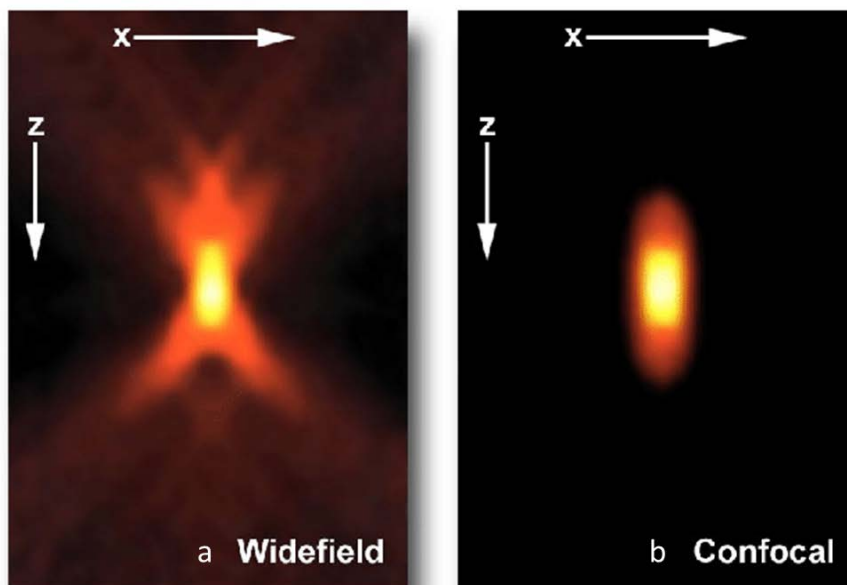


Figure I-5 PSF (a) image de la réponse impulsionnelle (PSF Point Spread Function) d'une bille fluorescente de 170 nm de diamètre observée avec un objectif 100x 1.4 ON par un microscope plein champ dans l'axe axial XZ et latéral XY où l'on observe la tâche d'Airy due à la diffraction de la lumière. (b) image de la PSF d'une bille fluorescence de 170 nm observée avec un objectif 63x 1.4 ON par un microscope confocal dans l'axe axial XZ et latéral XZ. La barre d'échelle blanche représente 200 nm. ¹⁷

¹⁷ S Astner et Martina Ulrich, « [Confocal laser scanning microscopy] », *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 61 (1 avril 2010): 421-28, <https://doi.org/10.1007/s00105-015-3632-y>.

Les équations suivantes représentent le rayon du lobe principale de la PSF limité par la diffraction dans la direction latérale r_{xy} et axiale r_z pour un microscope optique, plein champ (Wide-Field WF)¹⁸.

$$r_{xy\ WF} = \frac{\lambda_{em}}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda_{em}}{2\ ON} = \frac{560}{2 * 1.40} \simeq 200\ nm$$

$$r_{z\ WF} = \frac{1,77 * n * \lambda_{em}}{ON^2} = \frac{1,77 * 1,5 * 560}{1,40^2} \simeq 758\ nm$$

Équations I-2

Où λ_{em} la longueur d'onde d'émission, n l'indice de réfraction et ON l'ouverture numérique de l'objectif. Cette dernière vérifie :

$$ON = n \sin \alpha$$

Équation I-3

Où α est le demi-angle maximal de convergence.

L'ouverture numérique est la caractéristique principale de l'objectif dans la définition de la PSF. Pour les objectifs possédant une ouverture numérique inférieure à 0,8 (l'ON peut varier de 0,1 à 1,5), une approximation paraxiale peut alors être utilisée pour modéliser la PSF.

Pour notre système expérimental nous avons utilisé un objectif 60x à immersion à huile avec $ON=1.40$. Le filtre d'émission utilisé est une bande passante autour de 560 nm, de largeur 25 nm (BP 560/25). Pour simplifier les calculs nous prendrons $\lambda_{em}=560$ nm.

L'Équation I-2 est liée à la résolution axiale du système. D'après le critère de Rayleigh deux émetteurs de même intensité ne sont plus distinguables lorsque le maximum de la PSF de l'un correspond à la position du minimum de l'autre ce qui correspond à r_x pour la résolution latérale et r_z pour la résolution axiale. On constate que cette dernière est environ trois fois moins résolue que la résolution latérale en microscopie plein champ.

Cette limite de résolution, due à la diffraction de la lumière, empêche de distinguer deux objets ayant une distance inférieure à cette résolution.

Avec un objectif d'une forte ouverture numérique $ON= 1.40$, nous obtenons une résolution latérale d'environ 200 nm pour un microscope plein champ, ce qui est largement suffisant pour observer des cellules d'une dizaine de micromètre, mais insuffisant pour l'observation et la localisation de protéines ou de molécules de quelques nanomètres.

Quant aux techniques de microscopie confocale à scanner à point ou par disque rotatif (Spinning disk ¹⁹), l'Équation I-4 ²⁰ montre la limite de résolution latérale $r_{xy\ conf}$ et axiale $r_{z\ conf}$

¹⁸ B. Amos, G. McConnell, et T. Wilson, « 2.2 Confocal Microscopy », in *Comprehensive Biophysics* (Elsevier, 2012), 3-23, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00203-4>.

¹⁹ M. D. Egger et M. Petrăn, « New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells », *Science (New York, N.Y.)* 157, n° 3786 (21 juillet 1967): 305-7, <https://doi.org/10.1126/science.157.3786.305>; Paul Nipkow, « Elektrisches Teleskop Patent schrift n° 30105 » (Kaiserliches Patentamt, 1885).

²⁰ Amos, McConnell, et Wilson, « 2.2 Confocal Microscopy ».

d'un microscope confocal avec scanner à point (conf), dépendant de $\lambda_{ex} = 532\text{nm}$ la longueur d'onde d'excitation du laser, ON l'ouverture numérique de l'objectif. Pour notre système nous avons utilisé un objectif 60x à immersion à huile de 1.49 d'ouverture numérique ON. Nous avons pris la même source et le même objectif pour permettre une comparaison, elles permettent seulement d'améliorer la résolution latérale d'une dizaine de nanomètres et d'améliorer par un facteur deux la résolution axiale.

$$r_{xy\ conf} = \frac{\lambda_{ex}}{2n \sin \alpha} = \frac{\lambda_{ex}}{2\ ON} = \frac{532}{2 * 1.40} \simeq 190\ \text{nm}$$

$$r_{z\ conf} = \frac{0,88 * \lambda_{ex}}{n - \sqrt{n^2 - ON^2}} = \frac{0,88 * 532}{1,5 - \sqrt{1,5^2 - 1,40^2}} \simeq 538\ \text{nm}$$

Équations I-4

Nous venons de découvrir le fonctionnement de la microscopie photonique, mettant en évidence l'importance cruciale de l'objectif pour la résolution. Cependant, la résolution est limitée par la diffraction de la lumière, ce qui empêche de distinguer deux objets ayant une distance inférieure à cette résolution. La résolution latérale et axiale dépendent de facteurs tels que la longueur d'onde d'émission, et l'ouverture numérique de l'objectif. Nous allons maintenant nous concentrer sur la profondeur de champ et sa définition.

2. Profondeur de champ

Si on se place d'un point de vue de l'optique géométrique, l'image d'un point à travers une lentille est un point présent uniquement dans le plan image conjugué du plan objet. Si on se trouve sur des plans différents de ce plan image conjugué, les faisceaux lumineux provenant de l'objet ne convergent pas et l'image de l'objet sera considérée comme floue.

Ainsi on peut considérer la profondeur de champ comme étant la profondeur axiale de l'espace de part et d'autre du plan contenant l'objet dans lequel l'objet peut être déplacé sans que la perte de netteté soit détectable dans l'image, tout en conservant les positions du plan image et objectif. Cette distance va dépendre principalement de l'ouverture numérique de l'objectif. Plus l'ouverture numérique sera grande et plus la profondeur de champ sera petite.

Il faut aussi prendre en compte l'aspect ondulatoire de la lumière. En effet cet aspect limite la focalisation d'un point plus petit que la résolution de l'objectif et génère une tache de diffraction dépendante de la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} , et de l'ouverture numérique de l'objectif ON. La profondeur de champ d_z ²¹ déterminée comme la somme de la composante à onde $d\lambda_{ex}$ et la composante géométrique d_{geom} . Avec $n \simeq 1.5$ l'indice de réfraction du milieu entre l'objectif et l'échantillon, $NA = 1.40$ ouverture numérique de l'objectif.

Ainsi, si on prend comme exemple un objectif 100x d'une ouverture numérique de 1.40 et une longueur d'onde de 532 nm (cf Équation I-3, Équation I-2), cela nous permettra d'atteindre une profondeur de champ $d_z \simeq 543$ nm.

De plus on peut remarquer qu'un objectif avec une grande ouverture numérique permet une profondeur de champ proche de la longueur d'onde utilisée.

²¹ Rudolf Oldenbourg et Michael Shribak, « Microscopes », 2010, 28.1-28.62.

En microscopie de fluorescence, le fait que le signal capté vienne de l'émission très faible des fluorochromes, nécessite d'avoir des objectifs avec une grande ouverture numérique pour pouvoir capter le plus possible de photons, ce qui entraîne une faible profondeur de champ.

On pourrait en déduire que cette faible profondeur de champ pourrait être un avantage pour mieux discriminer les objets de petite taille. Cependant tous les objets se trouvant sur l'axe optique sont également excités et émettent eux aussi un signal.

Ce signal venant des plans hors plan focal (hors de la profondeur de champ) va être additionné au signal venant du plan focal (de la profondeur de champ).

Cela provoque une superposition entre les signaux du plan focal et des plans hors plan focal, réduisant de ce fait le contraste par la baisse du rapport signal à bruit.

Il existe différentes techniques de microscopie photonique qui permettent de réduire la profondeur de champ et ainsi améliorer la résolution et la qualité des images. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories principales : celles qui confinent à l'émission et celles qui confinent à l'excitation.

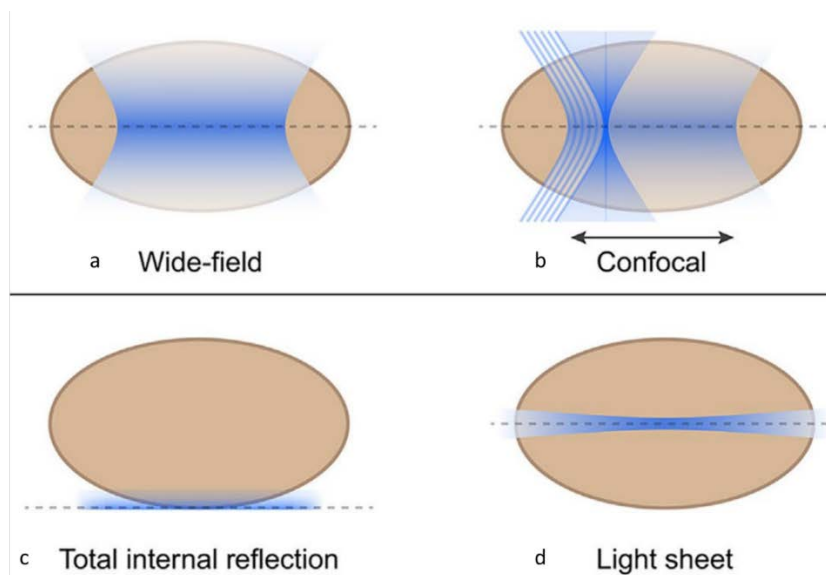


Figure I-6 (a) Comparaison de la microscopie plein champ (Wide-field) où la profondeur de champ n'est pas limitée, à la microscopie confocale (b) qui confine l'émission. Pour la microscopie TIRF (Total internal Reflection Fluorescence²²) (c) et SPIM (Selective/Single Plane Illumination Microscopy²³) (d) c'est l'excitation qui est confinée.²⁴

La première catégorie (Figure I-6 a et b) comprend par exemple la microscopie confocale, le SAF (Supercritical Angle Fluorescent)²⁵ et la microscopie utilisant des masques tournants

²² D. Axelrod, « Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence », *The Journal of Cell Biology* 89, n° 1 (avril 1981): 141-45, <https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141>.

²³ A. H. Voie, D. H. Burns, et F. A. Spelman, « Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning: Three-Dimensional Imaging of Macroscopic Biological Specimens », *Journal of Microscopy* 170, n° 3 (1993): 229-36, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x>.

²⁴ Icha et al., « Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It ».

²⁵ Thomas Barroca et al., « Full-Field Supercritical Angle Fluorescence Microscopy for Live Cell Imaging », *Optics Letters* 36, n° 16 (15 août 2011): 3051-53, <https://doi.org/10.1364/OL.36.003051>.

« spinning disk ». Ces techniques utilisent des méthodes optiques pour limiter la profondeur de champ de l'émission lumineuse provenant de l'échantillon.

La seconde catégorie (*Figure 1-6 c et d*) comprend le TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence), le SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy) et le HiLo (High-frequency Low-frequency). Ces techniques confinent la lumière d'excitation à une fine couche permettant de ne pas exciter les marqueurs fluorescents qui ne sont dans le plan focal.

Dans ce chapitre, nous explorerons ces différentes techniques de microscopie photonique en détail, en examinant les principes fondamentaux de chacune avec leurs avantages et limites respectives.

a) Les microscopies limitant la profondeur de champ à l'émission

(1) La microscopie confocale

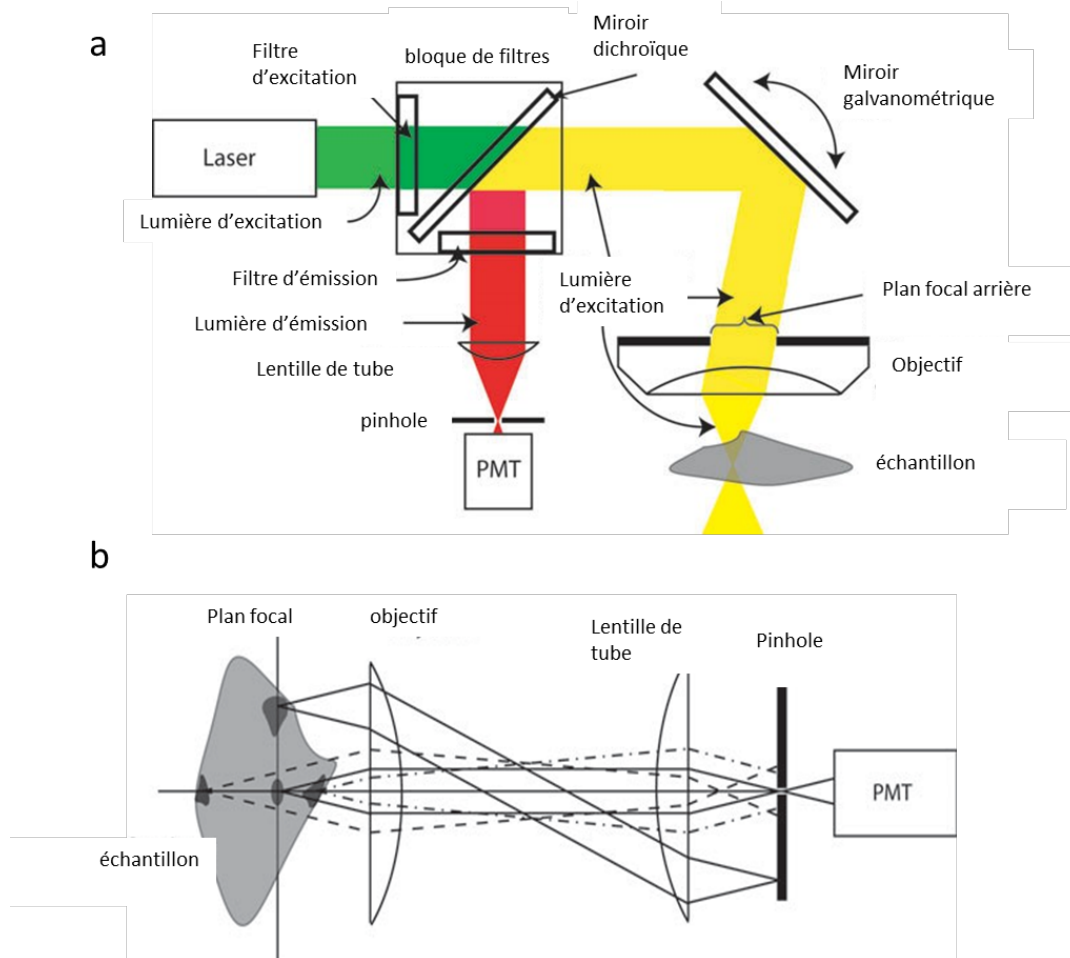


Figure I-7 Principe de la microscopie confocale²⁶. (a) Schéma du microscope confocal. La lumière d'excitation est dirigée par le miroir de balayage et focalisée sur l'échantillon. L'émission fluorescente est séparée de l'excitation par le miroir dichroïque et le filtre d'émission. La lumière émise à partir de l'emplacement du spot de balayage passe par le pinhole devant le détecteur. (b) Trajectoire de la lumière fluorescente, l'excitation et le balayage n'étant pas représentés. Le point de balayage se trouve au centre du plan de mise au point. La lumière émise à partir du plan de mise au point (lignes pleines) est focalisée dans le plan de l'image où se trouve l'ouverture du pinhole. La lumière qui n'est pas émise à partir de l'emplacement du spot de balayage se concentre sur les parties opaques de l'ouverture du pinhole et n'atteint donc pas le détecteur PMT (photomultiplier tube). La lumière hors foyer émise à partir de points plus profonds (ligne en pointillés) ou moins profonds (ligne en tirets) que le plan de mise au point se concentre respectivement devant ou derrière le plan d'ouverture, et donc seule une petite partie de cette lumière passe à travers l'ouverture du pinhole.

²⁶ José-Angel Conchello et Jeff W Lichtman, « Optical Sectioning Microscopy », *Nature Methods* 2, n° 12 (décembre 2005): 920-31, <https://doi.org/10.1038/nmeth815>.

Pour aborder les techniques permettant de limiter le signal à l'émission, nous commencerons par mettre en avant la microscopie confocale (Minsky, 1957, Wilson and Sheppard, 1984) qui est une technique d'imagerie optique utilisant un diaphragme de filtrage (sténopé, pinhole en anglais) en amont du capteur (Figure I-7). Ce pinhole est conjugué optiquement avec le plan de mise au point de l'objectif afin de ne sélectionner spatialement que la fluorescence provenant de ce plan. Cette propriété confère à la microscopie confocale une capacité de sectionnement optique, où seule une très faible portion des photons provenant des plans hors mise au point sera transmise par le pinhole. La taille du trou détermine l'épaisseur de la section imagée.

Cependant, l'utilisation d'un pinhole entraîne une faible vitesse d'acquisition, car l'excitation et l'acquisition des images se font point par point par balayage de l'échantillon ou du faisceau d'excitation laser dans les trois dimensions de l'espace. Ainsi, pour une image 512×512 pixels, un microscope confocal a une cadence d'acquisition limitée par le balayage à environ 1 à 2 images par seconde. Pour augmenter la vitesse de balayage, il est possible de remplacer les miroirs galvanométriques par des éléments non mécaniques tels que des modules acousto-optiques²⁷. Cependant, une limite importante de cette technique est la nécessité d'utiliser une illumination laser intense pour récolter suffisamment de photons de fluorescence, car chaque zone de focalisation est illuminée très peu de temps, typiquement quelques microsecondes. Cette intensité peut entraîner du photoblanchiment et de la phototoxicité, mais une parallélisation de plusieurs faisceaux d'excitation peut permettre d'augmenter la dynamique d'acquisition tout en conservant la capacité de sectionnement optique indispensable à l'imagerie d'échantillons épais. En somme, la microscopie confocale est une technique d'imagerie optique d'une faible vitesse d'acquisition mais d'une capacité de sectionnement optique unique, offrant la possibilité d'obtenir des images haute résolution en 3D d'échantillons épais.

²⁷ Vivek Bansal, Saumil Patel, et Peter Saggau, « High-Speed Addressable Confocal Microscopy for Functional Imaging of Cellular Activity », *Journal of Biomedical Optics* 11, n° 3 (2006): 34003, <https://doi.org/10.1117/1.2209562>.

(2) Microscopie spinning disk

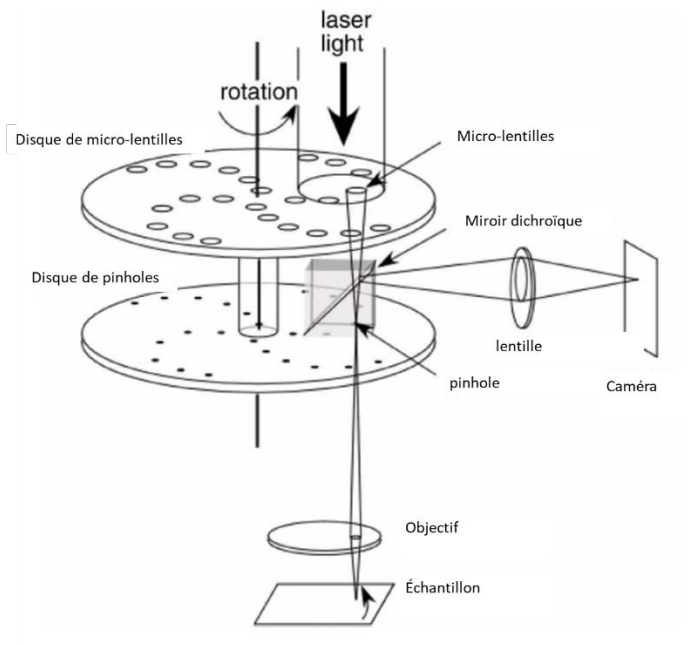


Figure I-8 Schéma optique du « spinning disk » Yokogawa²⁸. La méthode du disque de Nipkow utilise un disque en rotation avec plusieurs pinholes. Le problème de l'efficacité de l'irradiation est nettement amélioré par l'introduction d'un autre disque avec des microlentilles. Cette méthode a permis un balayage aussi rapide que 1000 images/seconde. Comme l'axe lumineux ne se déplace jamais pendant le balayage, les signaux fluorescents produisent une image réelle, qui peut être visualisée directement à l'œil nu ou capturée par une caméra.

La microscopie spinning disk permet de réaliser des images résolues spatialement à grande vitesse en parallélisant l'excitation. Le cœur de ce type de microscope est le disque de Nipkow, inventé par Paul Nipkow²⁹, puis mis en œuvre dans le premier microscope multiconfocal de type "spinning disk" par David Egger et Mojmír Petrán³⁰. Ce disque est composé de milliers de trous disposés en spirale, espacés de manière régulière les uns des autres. La version la plus récente du microscope multiconfocal "spinning disk" utilise une paire de disques (Figure I-8). Le premier disque est constitué de milliers de micro-lentilles disposées selon la spirale d'Archimède, permettant de focaliser le faisceau laser d'excitation sur un second disque composé de pinhole en regard des micro-lentilles du premier disque. Ces trous de filtrage sont conjugués optiquement avec le plan de l'échantillon. À un instant donné, seule une fraction des trous est

²⁸ Akihiko Nakano, « Spinning-Disk Confocal Microscopy. A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic. », *Cell Structure and Function* 27, n° 5 (2002): 349-55, <https://doi.org/10.1247/csf.27.349>.

²⁹ Nipkow, « Elektrisches Teleskop Patent schrift n° 30105 ».

³⁰ Egger et Petrán, « New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells ».

illuminée, l'illumination de l'ensemble de l'échantillon étant assurée par la rotation des disques. Les différents trous parcourent alors des arcs concentriques pour balayer l'échantillon. La fluorescence émise par l'échantillon est filtrée par les mêmes trous du disque de Nipkow que ceux traversés par le faisceau d'excitation. Cette approche permet de bloquer la lumière provenant des plans hors mise au point pour réaliser le sectionnement optique, tout en offrant une grande vitesse d'acquisition. Néanmoins, cette méthode peut dégrader la qualité du sectionnement optique, en particulier pour les échantillons épais et aberrants optiquement, en raison d'un phénomène appelé "pinhole crosstalk"³¹. En outre, la microscopie spinning disk consiste à illuminer l'échantillon sur toute sa profondeur avant de ne conserver, par filtrage spatial, que les photons provenant de la section d'intérêt. Cette méthode peut entraîner des effets de photoblanchiment et de phototoxicité sur les échantillons biologiques, en fonction de la puissance d'excitation utilisée.

³¹ Egger et Petrăn.

(3) La microscopie SAF

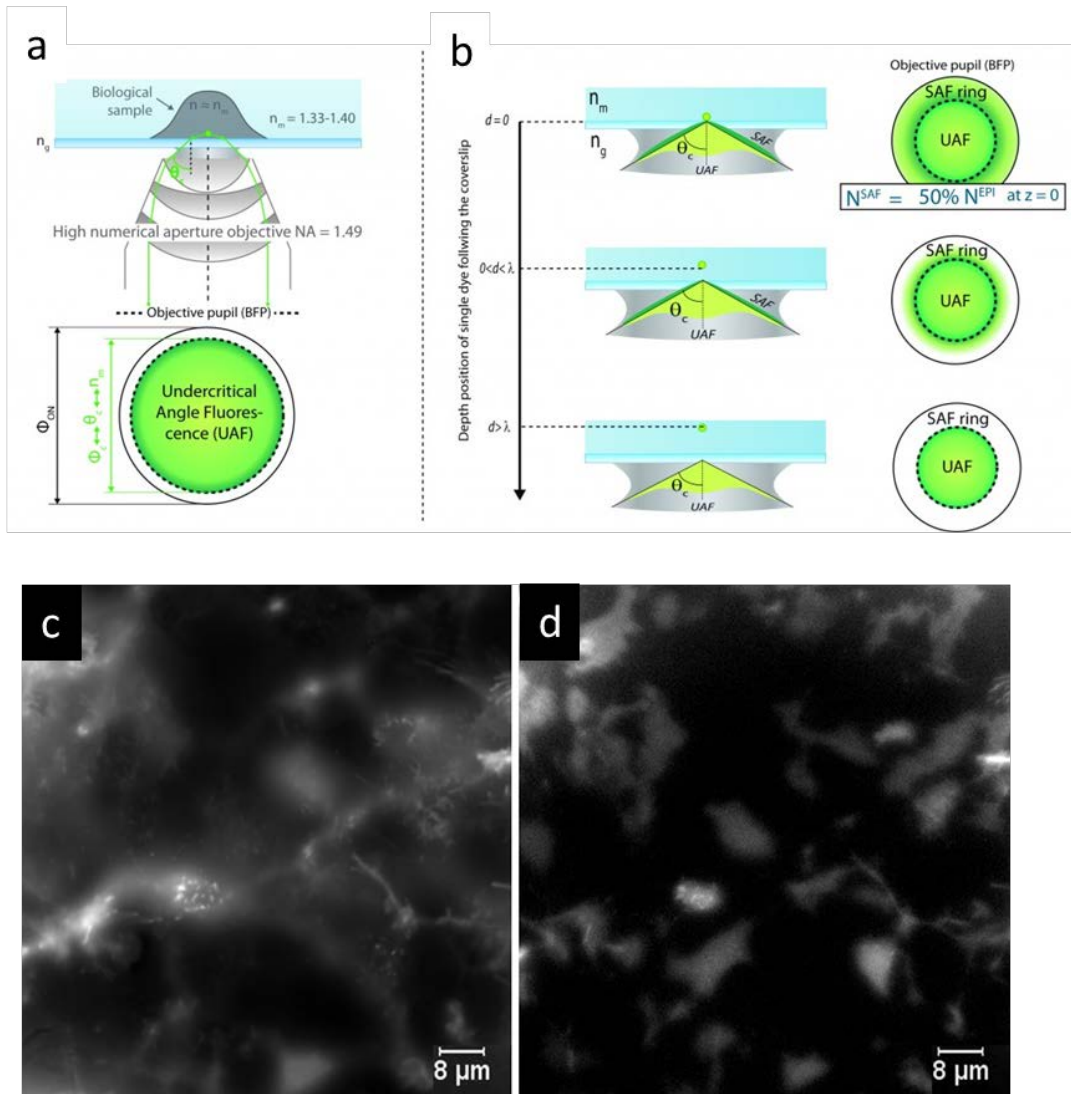


Figure I-9 (a) La technique de microscopie photonique SAF³² (Supercritical Angle Fluorescence) est une méthode complémentaire aux techniques de TIRF pour réduire la profondeur de champ. (b) Contrairement au TIRF, le SAF sélectionne la lumière à l'émission, ce qui permet de limiter la profondeur de champ. Cette technique est particulièrement utile pour l'imagerie en fluorescence de structures proches de la surface d'un échantillon, en permettant de visualiser uniquement les molécules fluorescentes se trouvant dans une couche très mince au-dessus de la surface. (c) cellules HEK en UAF + SAF et (d) cellule HEK en F²-SAF³³. En résumé, le SAF est une technique de microscopie photonique qui permet de limiter la profondeur de champ en sélectionnant la lumière à l'émission, complétant ainsi les méthodes de TIRF pour l'imagerie de structures proches de la surface d'un échantillon.

³² N. Bourg et al., « Direct Optical Nanoscopy with Axially Localized Detection », *Nature Photonics* 9, n° 9 (septembre 2015): 587-93, <https://doi.org/10.1038/nphoton.2015.132>.

³³ Barroca et al., « Full-Field Supercritical Angle Fluorescence Microscopy for Live Cell Imaging ».

La microscopie SAF (Supercritical Angle Fluorescence) plein champ ³⁴ est une technique basée sur une approche complémentaire aux techniques de TIRF³⁵, la sélectivité spatiale étant issue non pas d'un confinement à l'excitation mais par une sélectivité à la collection de l'émission de fluorescence de l'échantillon. Ceci présente de nombreux avantages notamment : de baisser significativement le bruit de fond dû à la diffusion intrinsèque de la lumière dans les milieux biologiques, de s'affranchir des difficultés d'éclairage, et enfin de permettre d'acquérir simultanément et parallèlement une image d'épi-fluorescence standard. Les directions d'émission des fluorophores dépendent de leur distance à la surface de la lamelle de verre (Figure I-9). Les fluorophores sont assimilables à des nano-antennes possédant des composantes électromagnétiques évanescentes lorsque leur environnement immédiat est homogène. Par contre, lorsqu'une interface est présente à moins de quelques dizaines de nanomètres, une partie de ces composantes devient propagative. Ce signal est alors émis dans le verre dans des directions au-delà de l'angle critique. Ainsi, alors que l'émission sous-critique est identique quel que soit la distance fluorophore/verre, seuls les fluorophores situés au voisinage immédiat de l'interface possèdent une telle émission supercritique.

Cette lumière parfois désignée sous le nom de " lumière interdite " peut représenter jusqu'à 50% de l'émission vers la lamelle de l'émetteur fluorescent. Cette émission supercritique décroît très rapidement avec la distance à la surface et permet d'obtenir une localisation axiale nanométrique absolue des fluorophores.

Les techniques d'imagerie optique sont utiles pour l'observation des échantillons biologiques en 3D. La microscopie confocale permet d'obtenir des images haute résolution en 3D d'échantillons épais grâce à sa capacité de sectionnement optique unique. Cependant, elle a une faible vitesse d'acquisition en raison du balayage point par point par le faisceau laser. La microscopie spinning disk, quant à elle, permet d'obtenir des images à grande vitesse en parallélisant l'excitation grâce à un disque de Nipkow. Cette méthode peut dégrader la qualité du sectionnement optique pour les échantillons épais et aberrants optiquement. Elle peut également entraîner des effets de photoblanchiment et de phototoxicité sur les échantillons biologiques. En somme, ces techniques offrent des avantages et des inconvénients complémentaires qui permettent de répondre aux besoins spécifiques de l'utilisateur.

³⁴ Barroca et al.

³⁵ Axelrod, « Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence ».

b) Les microscopies limitant la profondeur de champ à l'excitation

Le sectionnement peut être obtenu non par une sélectivité de la lumière émise mais par un éclairage spécifique

(1) Microscopie TIRF (Total internal reflection fluorescence)

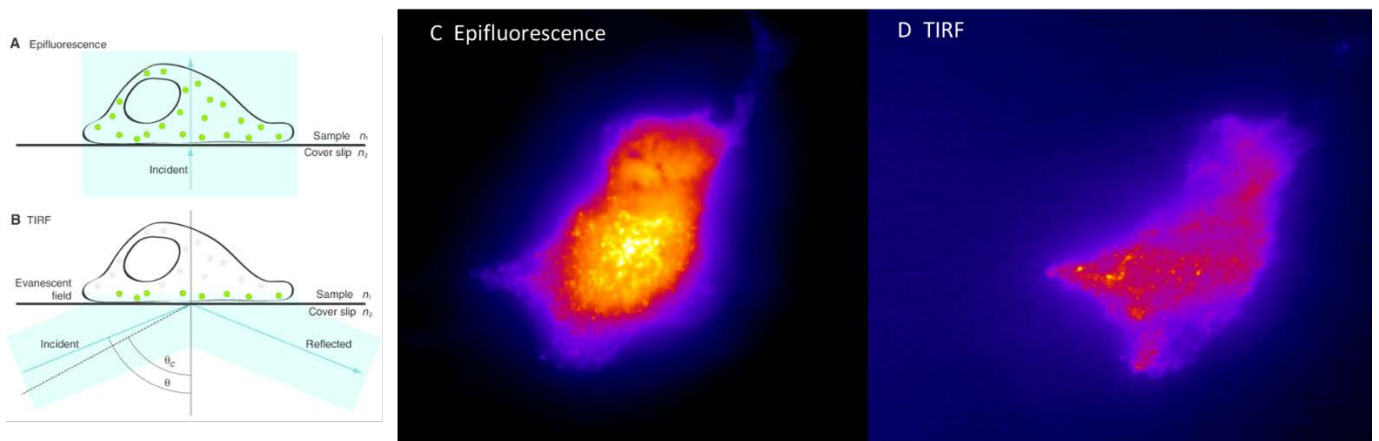


Figure I-10 (A) Schéma illustrant l'interface entre la lame de couverture et l'échantillon. Le faisceau d'excitation traverse directement l'interface lame de couverture-échantillon. (C) Photo en épifluorescence d'un fibroblaste avec un marquage de la clathrine. Tous les fluorophores de l'échantillon sont excités. (B) TIRF Le faisceau d'excitation entre depuis la gauche avec un angle d'incidence ϑ , qui est supérieur à l'angle critique ϑ_c (indiqué par la ligne en pointillé). Les angles sont mesurés par rapport à la normale. Le faisceau d'excitation est réfléchi par l'interface lame de couverture-échantillon et un champ évanescent est généré de l'autre côté de l'interface, dans l'échantillon. Seuls les fluorophores dans le champ évanescent sont excités, comme indiqué par la couleur verte. L'indice de réfraction de l'échantillon (n_1) doit être inférieur à l'indice de réfraction de la lame de couverture (n_2) pour obtenir l'image TIRF³⁶. (D) Photo du même fibroblaste en TIRF où seule la clathrine proche de la membrane plasmique en contact avec la lamelle est visible.

On peut citer également la microscopie TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence)³⁷, technique de microscopie de fluorescence qui permet l'imagerie de structures ou de processus situés à la surface d'un échantillon (Figure I-10) comme la membrane plasmique et la dynamique

³⁶ Alexa Mattheyses, Sanford Simon, et Joshua Rappoport, « Imaging with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for the Cell Biologist », *Journal of cell science* 123 (1 novembre 2010): 3621-28, <https://doi.org/10.1242/jcs.056218>.

³⁷ Axelrod, « Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence ».

membranaire (endocytose et exocytose). Cette technique, équivalente au SAF, utilise un phénomène optique appelé réflexion interne totale pour exciter uniquement les molécules fluorescentes situées près de la surface de l'échantillon contre la lamelle.

Lorsque la lumière se propage à travers un milieu optique, comme une cellule, elle subit une réfraction à l'interface entre deux milieux ayant des indices de réfraction différents. Si la lumière est incidente à un angle suffisamment grand, elle peut être totalement réfléchi à l'interface entre les deux milieux, produisant ainsi une onde évanescente qui s'étend uniquement dans le milieu le plus dense. Cette onde évanescente peut être utilisée pour exciter les molécules fluorescentes situées près de la surface de la lamelle, tandis que les molécules fluorescentes plus profondes ne sont pas excitées.

La profondeur de champ en TIRF est limitée au niveau de l'excitation, car la lumière pénètre seulement jusqu'à une profondeur d'environ 100 nm dans l'échantillon. Cela permet d'obtenir une image hautement résolue des structures situées au contact de la lamelle, tels que les récepteurs membranaires et les microvillosités.

En résumé, la microscopie TIRF est une technique de microscopie de fluorescence avancée qui utilise la réflexion interne totale pour exciter uniquement les molécules fluorescentes situées près de la surface de la lamelle. La limitation de la profondeur de champ se fait à l'excitation, permettant une imagerie haute résolution des structures situées à la surface de la lamelle. Cette technique est particulièrement utile pour étudier les processus de signalisation cellulaire et les interactions moléculaires à la surface des cellules.

Ainsi la microscopie TIRF est très adaptée pour l'étude *in vivo* mais étant limitée au champ proche elle permet seulement l'observation des phénomènes présents à la membrane plasmique basale, comme par exemple l'endocytose et l'exocytose.

(2) Microscopie SPIM

D'autres techniques existent comme les techniques de SPIM (Selective Plane Illumination Microscopy)³⁸.

La microscopie SPIM est une technique de microscopie de fluorescence 3D qui permet l'imagerie de structures biologiques en utilisant une illumination sélective de plans d'intérêt dans un échantillon (Figure I-11).

La SPIM utilise deux objectifs perpendiculaires. Un est utilisé pour l'illumination et l'autre sert à la détection de fluorescence. Concernant l'illumination, un faisceau laser traverse une lentille cylindrique et est focalisé dans l'échantillon pour illuminer un plan fin. La fluorescence émise par l'échantillon est détectée par l'objectif de détection, situé perpendiculairement à l'objectif d'illumination.

³⁸ Voie, Burns, et Spelman, « Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning ».

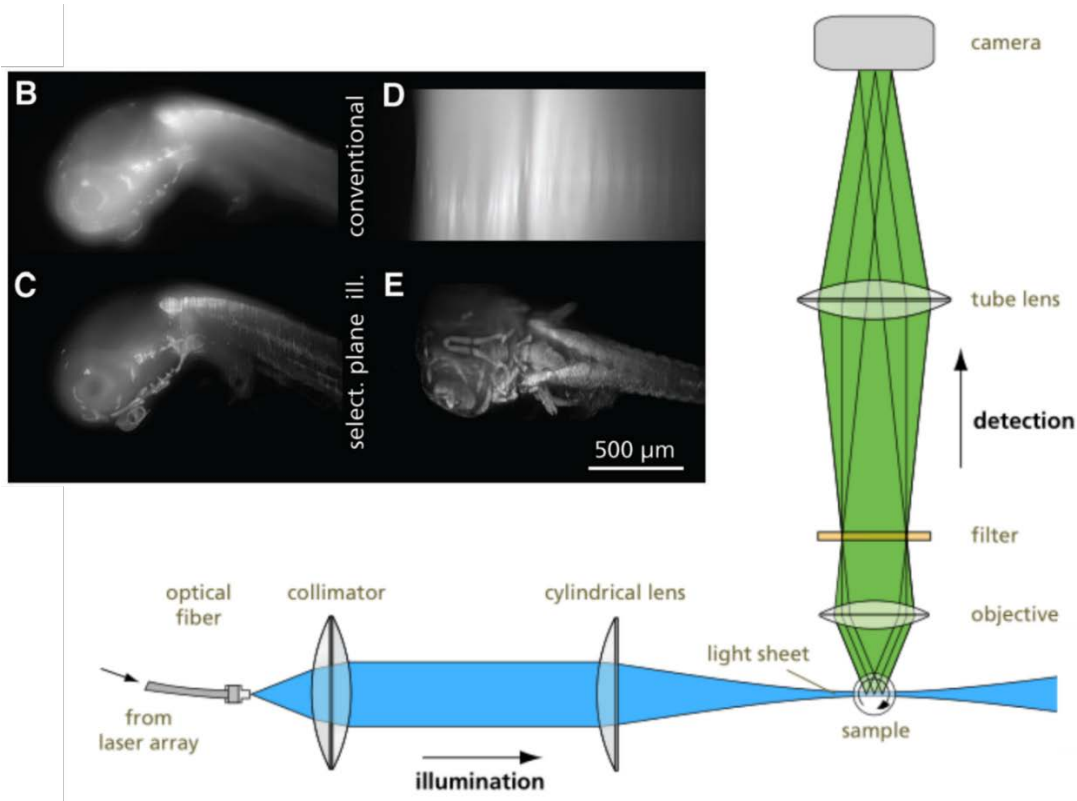


Figure I-11 Schéma optique d'un microscope à feuille de lumière SPIM³⁹. Composé d'un bras d'excitation et d'un bras de détection perpendiculaires. Pour former « la feuille de lumière », une lentille cylindrique convergente est utilisée. Cette dernière focalise le faisceau selon un axe et, grâce à une distance focale adaptée, forme une feuille de lumière de l'ordre de la dizaine de micromètres d'épaisseur. (B à E) embryon de médaka imagé de manière uniforme sans la lentille cylindrique (B-D) et avec la lentille cylindrique (C et E)

Cette technique permet de minimiser les effets de photoblanchiment et de phototoxicité, car seul le plan d'intérêt est illuminé, ce qui réduit la quantité de lumière nécessaire pour l'imagerie. De plus, en effectuant une acquisition d'images de différents plans d'intérêt, il est possible de reconstruire une image 3D de l'échantillon.

La microscopie SPIM est particulièrement utile pour l'imagerie de gros échantillons biologiques tels que les organismes modèles, les tissus, les organes et les embryons. Elle permet également l'imagerie de cellules vivantes et l'étude de processus biologiques en temps réel⁴⁰.

Dans ce chapitre nous avons présenté la microscopie photonique et quelques configurations classiques utilisées dans ce domaine. L'objectif joue un rôle crucial dans la résolution. La

³⁹ Jan Huiskens et al., « Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy », *Science* 305, n° 5686 (13 août 2004): 1007-9, <https://doi.org/10.1126/science.1100035>.

⁴⁰ Huiskens et al.

résolution limitée par la diffraction de la lumière, détermine la capacité à distinguer deux objets proches.

La profondeur de champ est également abordée dans ce chapitre. Elle représente la zone de netteté dans l'espace de part et d'autre du plan objet, où l'objet peut être déplacé sans perte de netteté détectable dans l'image. La profondeur de champ dépend principalement de l'ouverture numérique de l'objectif. Une plus grande ouverture numérique réduit la profondeur de champ.

Différentes techniques de microscopie photonique sont présentées, chacune ayant ses propres avantages et inconvénients. Certaines techniques limitent la profondeur de champ à l'émission lumineuse, comme la microscopie confocale, la microscopie spinning disk et la microscopie SAF. D'autres techniques limitent la profondeur de champ à l'excitation lumineuse, telles que la microscopie TIRF, la microscopie SPIM et le HiLo⁴¹.

On peut d'ores et déjà remarquer que toute tentative de réduire la profondeur de champ nécessite de sacrifier d'autres dimensions comme la fréquence d'acquisition ou les puissances d'irradiation des échantillons.

Maintenant nous allons décrire plus en détail la microscopie par illumination structurée faisant partie des techniques les moins phototoxiques améliorant le sectionnement optique.

C. Principe de la microscopie d'illumination structurée SIM

Afin d'expliquer le concept de la microscopie à illumination structurée, nous débuterons en abordant l'optique de Fourier.

1. Les fréquences spatiales

Chaque image peut être décomposée en une somme de fréquences spatiales possédant des amplitudes complexes obtenues par transformation de Fourier. Ces composantes fréquentielles de l'image, s'entremêlent pour former une représentation visuelle cohérente. Les images sont constituées à la fois de fréquences spatiales élevées et basses. Conceptuellement, les fréquences spatiales élevées correspondent à des variations rapides de l'intensité dans l'image, tels que des contours nets ou des détails fins. En revanche, les fréquences spatiales basses caractérisent les variations plus lentes de l'intensité au sein de l'image. Afin de reconstituer une image optique de qualité supérieure d'un plan spécifique de l'échantillon, il est essentiel d'accéder simultanément aux informations des fréquences spatiales élevées et basses. Cette notion est clairement illustrée dans la Figure I-12. L'analyse fréquentielle d'une image est obtenue par le biais d'une transformation de Fourier. La transformée de Fourier inverse permet ensuite de restituer fidèlement l'image d'origine. Lorsqu'un filtre passe-bas est appliqué dans le domaine fréquentiel, les contours disparaissent (Figure I-12 a) tandis qu'un filtre passe-haut met au contraire en évidence ces contours (Figure I-12 g).

⁴¹ Daryl Lim, Kengyeh K. Chu, et Jerome Mertz, « Wide-Field Fluorescence Sectioning with Hybrid Speckle and Uniform-Illumination Microscopy », *Optics Letters* 33, n° 16 (15 août 2008): 1819-21, <https://doi.org/10.1364/OL.33.001819>.

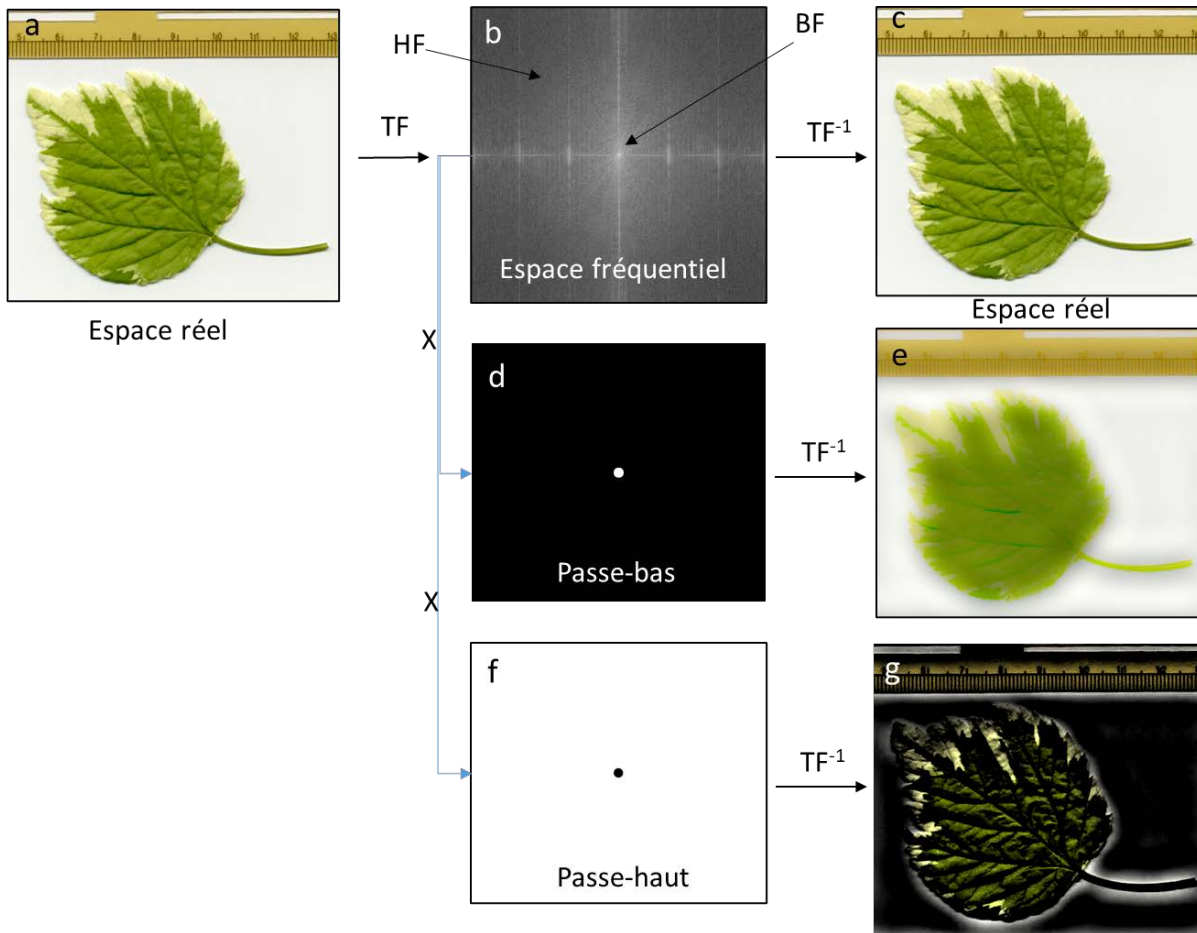


Figure I-12 Illustration de l'application de filtres fréquentiels passe-bas et passe-haut sur une image. (a) Image originelle dans le domaine spatial. (b) Image montrée en (a) dans le domaine fréquentiel. Pour information, la composante de fréquence nulle se trouve au centre du diagramme. (c) Image montrée en (b) dans le domaine spatial. (d) Filtre fréquentiel passe-bas. (e) Image obtenue, dans le domaine spatial, par multiplication du filtre passe-bas et de l'image montrée en (b). (f) Filtre fréquentiel passe-haut. (g) Image obtenue, dans le domaine spatial, par multiplication du filtre passe-haut et de l'image montrée en (b). BF : Basses Fréquences spatiales. HF : autres Fréquences spatiales. TF : Transformée de Fourier, TF⁻¹ : Transformée de Fourier inverse.

Le principe fondamental de la microscopie à illumination structurée repose sur la transmission différenciée des différentes fréquences spatiales lors de la dégradation de la mise au point dans un système optique. Une analogie pertinente peut être faite avec la photographie. Lorsqu'un photographe capture une image de haute qualité, celle-ci est nette (Figure I-13 a). En revanche, si la mise au point est défectueuse, la photographie résultante sera floue, dépourvue

de détails et de contours précis des objets (Figure I-13 b). Ainsi, un défaut de mise au point affecte plus significativement les hautes fréquences spatiales que les basses fréquences spatiales.

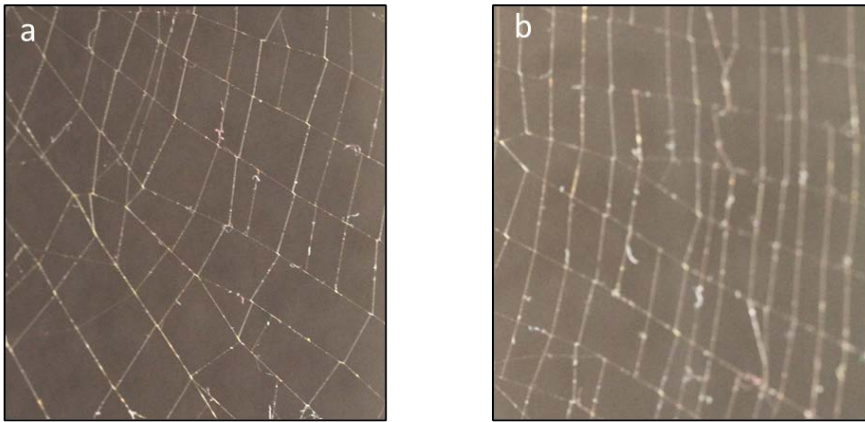


Figure I-13 Illustration du défaut de mise au point sur une image. (a) Image nette. (a) Image présentant un défaut de mise au point.

La Figure I-14 illustre l'évolution du profil d'intensité d'une grille à fréquence variable pour différentes positions du plan de mise au point, où la grille est située dans le plan de référence $z = 0$. Les basses et hautes fréquences spatiales se trouvent respectivement à gauche et à droite de l'image de référence prise dans le plan de focalisation. Il est important de noter que, dans ce contexte, la distinction entre basses et hautes fréquences spatiales est abordée de manière qualitative, sans référence à une valeur spécifique. Tout d'abord, on peut observer que l'intensité des composantes de hautes fréquences spatiales diminue rapidement avec la dégradation de la mise au point, tandis que la transmission des composantes de basses fréquences spatiales est moins affectée malgré le défaut de mise au point. Ainsi, lors de l'imagerie d'un plan spécifique à l'intérieur d'un échantillon épais, les composantes de basses fréquences spatiales provenant des plans hors mise au point contribueront au signal bidimensionnel recueilli. Ce phénomène entraîne l'absence de séparation optique, qui constitue la principale limite des microscopes conventionnels à champ large. Dans l'image résultante, les basses fréquences spatiales du plan conjugué se superposent aux basses fréquences spatiales des plans non conjugués, sans possibilité de les distinguer.

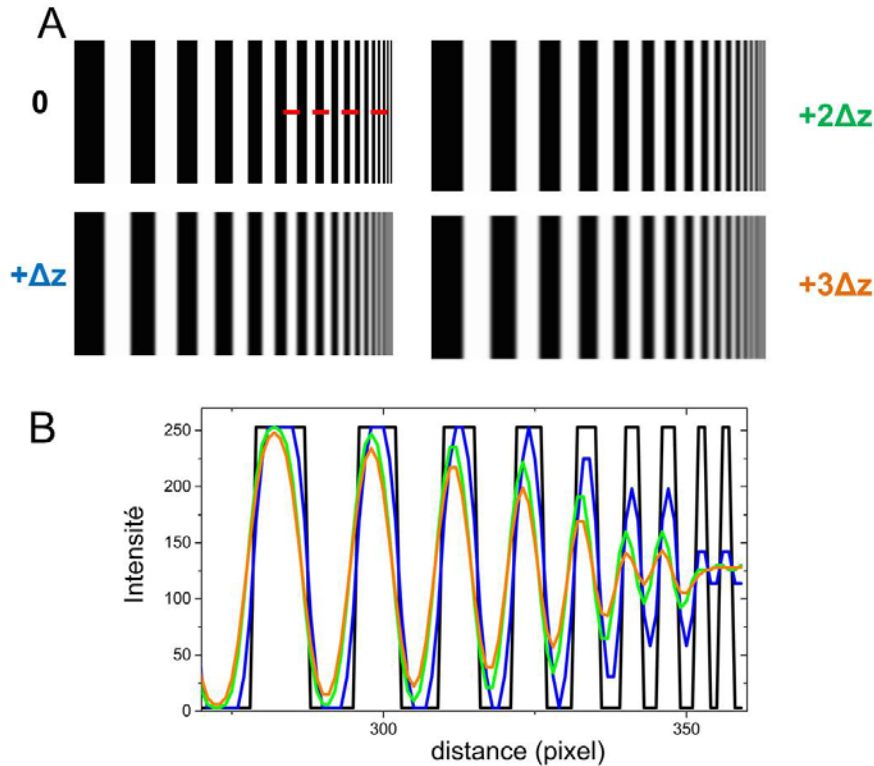


Figure I-14 Évolution du profil d'intensité d'une mire de fréquence variable avec la défocalisation. (A) Images du réseau pour différentes valeurs de défocalisation : 0 qui correspond au plan de mise au point, $+\Delta z$, $+2\Delta z$ et $+3\Delta z$. (B) Profils d'intensité pour les quatre valeurs de défocalisation. Le code couleur est celui présenté en (A). Les profils sont tracés suivant la ligne pointillée représentée sur l'image (A) sans défocalisation ⁴².

2. Modèle de formation d'image 2D

Un système d'imagerie peut être caractérisé par sa fonction d'étalement de point (FEP), c'est à dire, l'image qu'il donne d'un point source⁴³. On suppose dans ce manuscrit que la FEP est invariante dans le champ.

Considérons un objet 2D étendu, dont les points émettent un rayonnement incohérent. Dans ce cas, l'image de cet objet est donnée par la superposition des images de chacun de ces points. Ainsi, en notant $o(x, y)$ la répartition d'intensité rayonnée par l'objet, la répartition d'intensité de son image $i(x', y')$ au plan focal image de l'instrument imageur est donnée par :

$$\begin{aligned}
 i(x', y') &= \iint_{x, y} h(x' - x, y' - y) o(x, y) dx dy \\
 &= (h * o)(x', y')
 \end{aligned}$$

Équation I-5

⁴² Mélanie Pedrazzani, « Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle in vivo des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster* » (These de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), 2015), <https://www.theses.fr/2015SACL226>.

⁴³ Joseph W. Goodman, *Introduction to Fourier Optics* (McGraw-Hill, 1996).

en notant $*$ l'opérateur de convolution et h la FEP de l'instrument imageur. Par la suite, les termes $o(x, y)$ et $i(x', y')$ seront appelés abusivement objet et image respectivement.

Dans le domaine de Fourier, cette relation s'écrit simplement comme le produit entre la transformée de Fourier 2D de l'objet \tilde{o} , appelée spectre objet, et la transformée de Fourier 2D de la FEP \tilde{h} , appelée fonction de transfert optique (FTO) :

$$\tilde{i}(\vec{f}) = \tilde{h}(\vec{f})\tilde{o}(\vec{f})$$

Équation I-6

où le symbole \sim désigne la transformée de Fourier 2D de son argument et $\vec{f} = (f_x, f_y)$ sont les coordonnées dans l'espace des fréquences spatiales. Ainsi, la formation de l'image i d'un objet o peut être vue comme un filtrage fréquentiel du spectre objet, où chacune de ses composantes $\tilde{o} = (f_x, f_y)$ est atténuée par la fonction de transfert $\tilde{h} = (f_x, f_y)$. Le module de la FTO est appelé fonction de transfert de modulation (FTM). Dans le cas d'un système optique parfait, la FEP est une tâche d'Airy et la FTO est un filtre passe-bas de fréquence de coupure⁴⁴ :

$$f_c = \frac{2NA}{\lambda_{ex}}$$

Équation I-7

où λ_{ex} la longueur d'onde d'excitation et $NA = n \sin \alpha$ est l'ouverture numérique objet (n étant l'indice du milieu d'observation et α le demi-angle d'ouverture).

Les fréquences spatiales de l'objet supérieures à f_c ne sont pas transmises par le système optique, limitant ainsi la résolution des images, comme l'illustre la Figure I-15. L'inverse de la fréquence de coupure optique f_c correspond à la résolution latérale r_{xy} en limite de diffraction.

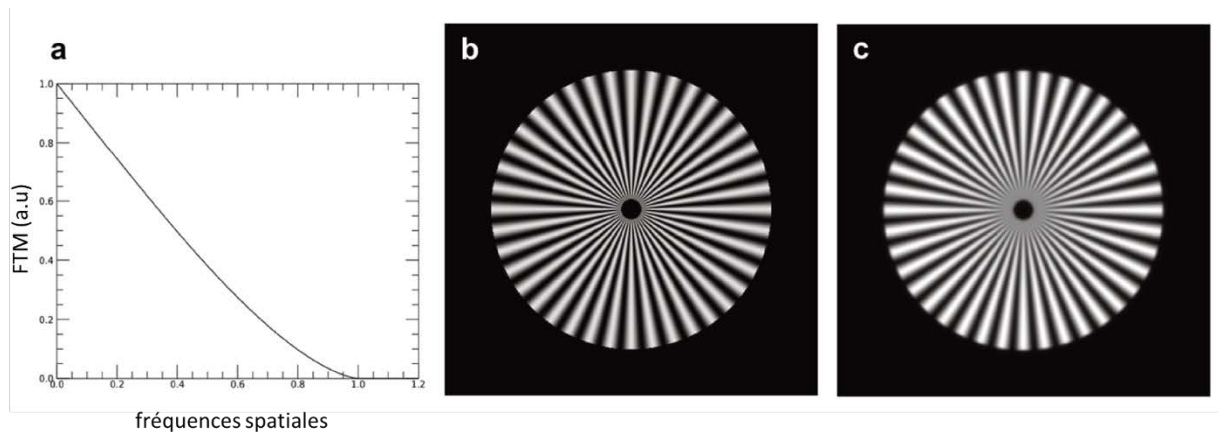


Figure I-15 (a) Fonction de Transfert de modulation (FTM) d'un système optique parfait avec une pupille circulaire, en fonction de la fréquence spatiale radiale normalisée par f_c , (b) Objet observé (c) Image de l'objet. Les structures centrales de la mire, correspondant à des fréquences spatiales de l'objet supérieures à la fréquence de coupure optique f_c , ne sont pas résolues dans l'images.⁴⁵

⁴⁴ Goodman.

⁴⁵ Yann Lai-Tim, « Imagerie haute résolution de la rétine humaine par illumination structurée assistée par optique adaptative » (PSL, 2020).

L'image acquise i par la caméra est une version échantillonnée et bruitée de l'image continue i :

$$i(k, l) = [h * o]_{III} (k, l) + n(k, l)$$

Équation I-8

(k, l) désigne les indices des pixels de la caméra et $[\]_{III}$ représente l'opérateur d'échantillonnage spatial de la caméra, c'est-à-dire la multiplication par un peigne de Dirac de pas p , p étant le pas d'échantillonnage de la caméra. Nous considérons dans l'ensemble du manuscrit que le critère d'échantillonnage de Shannon-Nyquist est respecté, c'est-à-dire que la fréquence d'échantillonnage du capteur $f_e = 1 / p$ est au moins deux fois supérieure à la fréquence de coupure optique f_c . Par conséquent, la discrétisation de l'image continue i se fait sans perte d'information. Le bruit de détection n est un mélange de bruit de détecteur (lié aux caractéristiques de la caméra) et de bruit de photon (lié à la nature quantique de la lumière).

L'opérateur d'échantillonnage peut s'appliquer également à la FEP h et à l'objet o . Le modèle de formation d'image (Équation I-8) peut alors être approximé par une convolution discrète (dont l'opérateur est notée $*$) entre la version échantillonnée h de la FEP et la version échantillonnée o de l'objet :

$$i = h * o + n$$

Équation I-9

3. Notion de FTO 3D et sectionnement optique

Les notions de FEP et de FTO peuvent s'étendre au cas d'une image 3D formée à partir d'un objet 3D. L'expression scalaire de la fonction de transfert optique 3D dans le cas d'un système optique parfait avec une ouverture circulaire a été établie par Frieden⁴⁶ dans le cas de l'approximation paraxiale. Sheppard⁴⁷ a ensuite étendu les travaux de Frieden en dehors de l'approximation paraxiale, pour des ouvertures à symétrie radiale.

La Figure I-16 représente le support de la FTO 3D, le domaine fréquentiel sur lequel la FTO est non nulle. La FTO 3D présente une fréquence de coupure latérale $f_c = \frac{D}{\lambda_{ex} f_{eq}}$ qui est la même que dans le cas 2D. Dans la direction axiale, l'extension maximale du support définit la fréquence de coupure axiale $f_{c,z}$, c'est-à-dire la fréquence spatiale axiale maximale transmise par le système optique. La fréquence de coupure axiale vaut :

⁴⁶ B. Roy Frieden, « Optical Transfer of the Three-Dimensional Object*+ », *Journal of the Optical Society of America* 57, n° 1 (1 janvier 1967): 56, <https://doi.org/10.1364/JOSA.57.000056>.

⁴⁷ Colin Sheppard et al., « Three-dimensional transfer functions for high-aperture systems », *Journal of The Optical Society of America A-optics Image Science and Vision - J OPT SOC AM A-OPT IMAGE SCI* 11 (1 février 1994), <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.000593>.

$$f_{c,z} = \frac{NA^2}{2\lambda_{ex}}$$

Équation I-10

Ce qui donne, dans l'approximation paraxiale :

$$f_{c,z} = \frac{D^2}{8\lambda_{ex}f_{eq}^2}$$

Équation I-11

Il est important de noter l'existence d'un cône manquant de fréquences spatiales centré sur l'axe des fréquences spatiales purement axiales f_z . Cela implique en particulier qu'aucune fréquence spatiale axiale pure n'est transmise par un système optique conventionnel. Par conséquent, les structures à très basses fréquences latérales, comme par exemple des plans fluorescents perpendiculaires à l'axe optique en microscopie, ne peuvent pas être résolues axialement. Autrement dit, un système optique conventionnel n'est pas capable d'isoler axialement les contributions provenant d'un plan de l'objet. Certaines techniques d'imagerie comme l'imagerie confocale ou la SIM permettent de rejeter les contributions des couches de l'objet défocalisées de manière optique ou numérique, de manière à isoler la tranche focalisée de l'objet. Cette capacité à rejeter les photons provenant de couches défocalisées de l'objet est appelée sectionnement optique, et revient à remplir le cône manquant du support de la FTO 3D.

Nous verrons dans la section suivante, comment la SIM permet de réaliser du sectionnement optique et d'améliorer la résolution au-delà de la limite de diffraction.

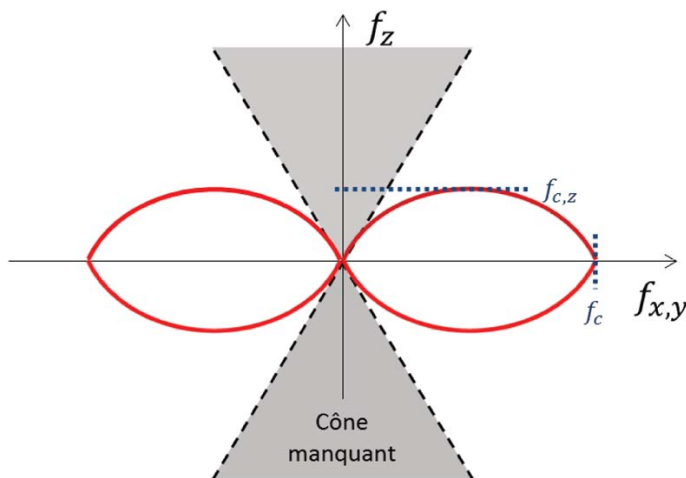


Figure I-16 Support de la fonction de transfert optique 3D délimité à l'intérieur de l'enveloppe rouge) d'un système optique parfait avec une pupille circulaire. Les fréquences de coupure latérale f_c et axiale $f_{c,z}$ sont reliées à la limite de diffraction. Le cône manquant correspondant aux fréquences proches de l'axe f_z (coordonnée fréquentielle axiale) qui ne sont pas transmises⁴⁸

⁴⁸ Lai-Tim, « Imagerie haute résolution de la rétine humaine par illumination structurée assistée par optique adaptative ».

4. Principe de la microscopie par illumination structurée (SIM)

Le SIM est une technique d'imagerie couramment utilisée en microscopie plein champ. Elle consiste à éclairer l'échantillon à l'aide de motifs d'illumination périodique généralement sinusoïdaux de manière à moduler spatialement la réponse de l'objet à l'illumination. La modulation induite par l'illumination structurée présente un double intérêt :

D'une part, la composante modulée des images acquises provient essentiellement des couches de l'objet qui sont proches du plan focal, car le contraste de la modulation dans les images décroît avec la défocalisation. Cela permet d'extraire, à partir de la composante modulée, une coupe optique du contenu focalisé de l'objet, et donc de réaliser du sectionnement optique.

D'autre part, la modulation replie des composantes fréquentielles de l'objet normalement inaccessibles, à l'intérieur du support de la FTO par effet de Moiré (Figure I-17). La séparation des différentes composantes de l'image, modulées et non modulées, permet de reconstruire une image super-résolue.

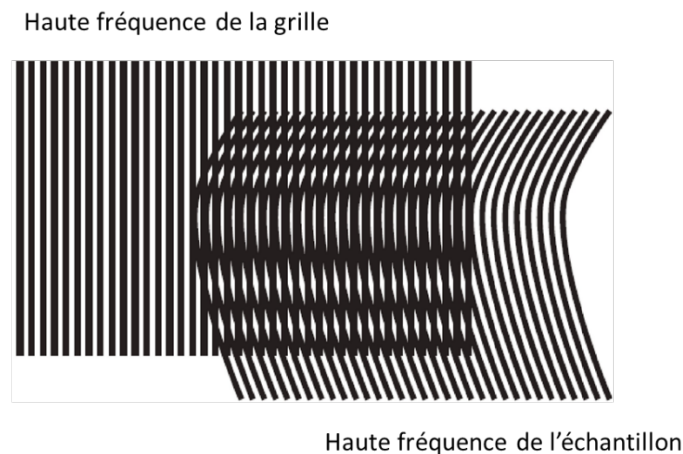


Figure I-17 Effet de Moiré. La superposition de deux structures périodiques haute fréquence génère un motif plus basse fréquence (composé ici de lignes horizontales), provenant du repliement de leurs fréquences.

On distingue ainsi deux catégories de méthodes SIM : les méthodes pour le sectionnement optique (OS-SIM), et celles pour la super-résolution⁴⁹ (SR-SIM). Ces dernières permettent également dans certains cas de faire du sectionnement optique.

Avant d'aborder plus en détails ces deux branches de la SIM, je présente d'abord le modèle de formation d'images SIM 2D employé en microscopie.

⁴⁹ M. G. L. Gustafsson, « Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy », *Journal of Microscopy* 198, n° 2 (1 mai 2000): 82-87, <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>.

a) *Modèle usuel de formation d'images SIM 2D*

Considérons un motif d'illumination sinusoïdal $m(x, y)$ projeté sur un objet 2D $o(x, y)$.

On peut écrire le motif sous la forme :

$$m(x, y) = 1 + \alpha \cos(2\pi \vec{f}_m \cdot \vec{r} + \varphi)$$

Équation I-12

Où $\vec{r} = (x, y)$ désigne les coordonnées spatiales transverses dans l'espace objet, et α , $\vec{f}_m = (f_{m,x}, f_{m,y})$ et φ sont respectivement le contraste, la fréquence et la phase de la modulation.

On suppose que l'objet réagit de manière linéaire à l'illumination. Alors l'image SIM observée par un système optique de FEP h est donnée par le produit de convolution de l'objet modulé par l'illumination structurée et la FEP h :

$$i_{SIM} = h * (m \times o)$$

Équation I-13

L'Équation I-11 s'écrit dans l'espace de Fourier comme le produit de la FTO \tilde{h} et de la convolution du spectre du motif \tilde{m} avec le spectre objet \tilde{o} . En remarquant que :

$$\tilde{m}(\vec{f}) = \delta(\vec{f}) + \frac{\alpha}{2} \delta(\vec{f} + \vec{f}_m) e^{-i\varphi} + \frac{\alpha}{2} \delta(\vec{f} - \vec{f}_m) e^{+i\varphi}$$

Équation I-14

Avec δ la distribution de Dirac, on déduit l'expression du spectre de l'image SIM :

$$\begin{aligned} \tilde{i}_{SIM}(\vec{f}) &= (\tilde{h} \times (\tilde{m} * \tilde{o}))(\vec{f}) \\ &= \tilde{h}(\vec{f}) [\tilde{o}(\vec{f}) + \frac{\alpha}{2} \tilde{o}(\vec{f} + \vec{f}_m) e^{-i\varphi} + \frac{\alpha}{2} \tilde{o}(\vec{f} - \vec{f}_m) e^{+i\varphi}] \\ &= \tilde{D}_o(\vec{f}) + \tilde{D}_{-1}(\vec{f}) + \tilde{D}_{+1}(\vec{f}) \end{aligned}$$

Équation I-15

On distingue 3 composantes dans le spectre de l'image SIM : la composante non modulée $\tilde{D}_o(\vec{f}) = \tilde{h}(\vec{f}) \tilde{o}(\vec{f})$ correspondant au spectre d'une image plein champ conventionnelle deux composantes modulées $\tilde{D}_{-1}(\vec{f})$ et $\tilde{D}_{+1}(\vec{f})$ qui comme nous allons le voir, permettent d'obtenir du sectionnement optique et/ou de la super-résolution.

Dans ce manuscrit, nous définirons souvent la valeur de la fréquence de modulation \vec{f}_m en termes de fréquences spatiales normalisées $\vec{v} = (v_x, v_y)$ définie par $\vec{v} = \vec{f} / f_c$ avec f_c la fréquence de coupure optique du système d'imagerie. Nous noterons f_m la norme de la fréquence de modulation.

b) *Le SIM pour le sectionnement optique*

Pour comprendre l'origine du sectionnement optique permise par la SIM, il faut observer comment l'image SIM d'un objet 2D évolue avec la défocalisation de l'objet. On entend ici par défocalisation, la distance axiale qui sépare l'objet observé et le plan focal objet conjugué de la caméra d'imagerie. Dans ce manuscrit, nous quantifions la défocalisation à l'aide de la coordonnée axiale réduite u qui est liée à la coordonnée axiale z par :

$$u = 8 \frac{\pi}{\lambda_{ex}} z n \sin(\beta/2)^2$$

Équation I-16

Avec $n \sin\beta$ l'ouverture numérique.

Dans l'approximation paraxiale, il est possible de relier simplement la défocalisation exprimée en coordonnées axiales réduites u au coefficient de défocalisation a_4 (valeur RMS associée à la défocalisation) sur la base des polynômes de Zernike. En effet, on peut alors montrer que $u = 4\sqrt{3}a_4$ en remarquant que, dans l'approximation paraxiale :

$$u = \frac{\pi D^2}{2\lambda_{ex} n f_{eq}^2}$$

Équation I-17

(car $\sin(\beta/2)^2 = \frac{D^2}{16n^2 f_{eq}^2}$) et :

$$z = \frac{8\sqrt{3}\lambda_{ex} n f_{eq}^2}{\pi D^2} a_4$$

Équation I-18

avec D le diamètre de la pupille du système optique dans l'espace objet et f_{eq} la focale objet équivalente dans l'air.

La Figure I-18 affiche les coupes du spectre image pour différentes valeurs de défocalisation dans le cas d'un objet 2D illuminé par un motif sinusoïdal de contraste $\alpha = 1$ et de fréquence de modulation $\vec{v}_m = (0.5, 0)$. Lorsque l'objet est dans le plan conjugué ($u = 0$), on retrouve dans le spectre image, la composante non modulée centrée à la fréquence nulle (pic central) et les deux composantes modulées centrées en $\pm\vec{v}_m$. Comme la fonction de transfert de modulation (FTM) du système optique atténue de plus en plus les moyennes et hautes fréquences spatiales de l'objet observé quand la défocalisation u augmente, l'amplitude des composantes modulées décroît avec la défocalisation. Ainsi, dans une image SIM, les composantes modulées proviennent essentiellement de structures dans le plan conjugué et c'est cette propriété qui est exploitée par les méthodes SIM pour reconstruire une image avec du sectionnement optique.

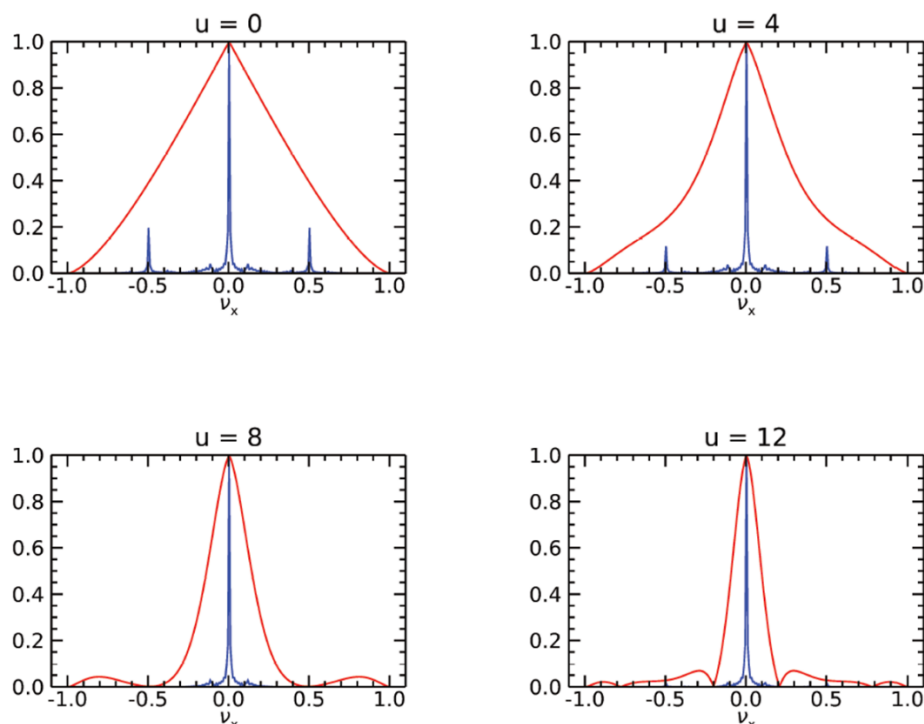


Figure I-18 Coupe normalisée du spectre de l'image SIM dans la direction de la modulation (en bleu) obtenue à travers un système optique parfait, dont la FTM est représentée en rouge.

Comme les composantes modulées et non modulées sont mélangées dans le spectre image, plusieurs images sont nécessaires pour extraire l'information modulée. La méthode traditionnellement utilisée a été proposée par Neil et al⁵⁰. Elle consiste à acquérir trois images SIM en faisant varier la phase φ de la modulation, ce qui revient à décaler latéralement la position du motif d'illumination. Ainsi, trois phases ($\varphi_1 = 0$, $\varphi_2 = 2\pi/3$ et $\varphi_3 = 4\pi/3$) sont utilisées et une coupe optique de l'objet est obtenue en combinant les trois images résultantes. Il faut noter que $(I_1 + I_2 + I_3)/3$ redonne l'image de l'objet avec une illumination homogène (superposition linéaire)

$$I_{section} = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_3)^2}$$

Équation I-19

La Figure I-19 illustre le sectionnement optique obtenu par cette méthode. L'épaisseur de coupe optique et donc la finesse du sectionnement dépendent de la décroissance de la fréquence de modulation avec la défocalisation u . Pour minimiser l'épaisseur de coupe, il faut choisir la fréquence de modulation optimale pour le sectionnement optique $\|\vec{v}_m\| = 0.5$.

En outre, la nature du motif d'illumination influe également sur l'épaisseur de coupe. En effet, dans notre raisonnement sur la décroissance de l'amplitude de modulation (Figure I-18), nous avons supposé que le contraste du motif d'illumination projeté sur l'objet était constant

⁵⁰ M. a. A. Neil, R. Juškaitis, et T. Wilson, « Method of Obtaining Optical Sectioning by Using Structured Light in a Conventional Microscope », *Optics Letters* 22, n° 24 (15 décembre 1997): 1905-7, <https://doi.org/10.1364/OL.22.001905>.

avec la défocalisation. Cela est vrai pour un motif généré en faisant interférer deux ondes avec une lumière cohérente par exemple. Dans le cas d'un motif projeté de manière incohérente, obtenu en imageant un masque d'illumination sinusoïdal sur l'échantillon par exemple, le contraste du motif projeté α est atténué lors de la projection par la FTO du système optique. Ainsi, le contraste α décroît avec la défocalisation. Grâce à l'atténuation à l'aller (lors de la projection du motif) et au retour (lors de la formation de l'image) du contraste de modulation, le sectionnement optique devient meilleur en utilisant une projection incohérente de motifs d'illumination⁵¹ pour différentes valeurs de défocalisation u . L'axe des abscisses est donné en fréquence spatiale normalisé $\nu = f/f_c$ avec f_c la fréquence de coupure optique. L'amplitude des composantes modulées, centrées à la fréquence de modulation $\nu_m = \pm 0.5$, varie suivant la valeur de la FTM à ν_m ⁵².

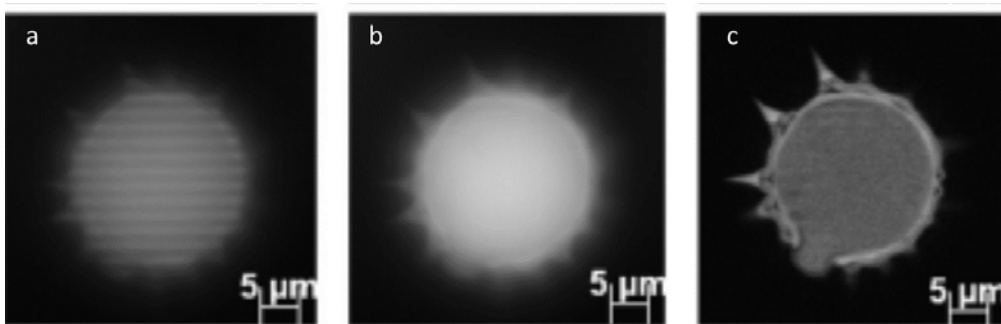


Figure I-19 Exemple de reconstruction SIM sur un grain de pollen (a) Image SIM brute, (b) Image plein champ conventionnelle, (c) Coupe optique reconstruite SIM⁵³

c) SIM pour la super-résolution SR-SIM

La super-résolution permise par le SIM provient des composantes modulées \tilde{D}_{-1} et \tilde{D}_{+1} (Équation I-15) qui replient les hautes fréquences de l'objet à l'intérieur du support de la FTO, comme illustré à la Figure I-20.

⁵¹ T. Wilson, « Optical Sectioning in Fluorescence Microscopy », *Journal of Microscopy* 242, n° 2 (1 mai 2011): 111-16, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03457.x>.

⁵² Lai-Tim, « Imagerie haute résolution de la rétine humaine par illumination structurée assistée par optique adaptative ».

⁵³ Dejan Karadaglić et Tony Wilson, « Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy », *Micron* 39, n° 7 (1 octobre 2008): 808-18, <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.01.017>.

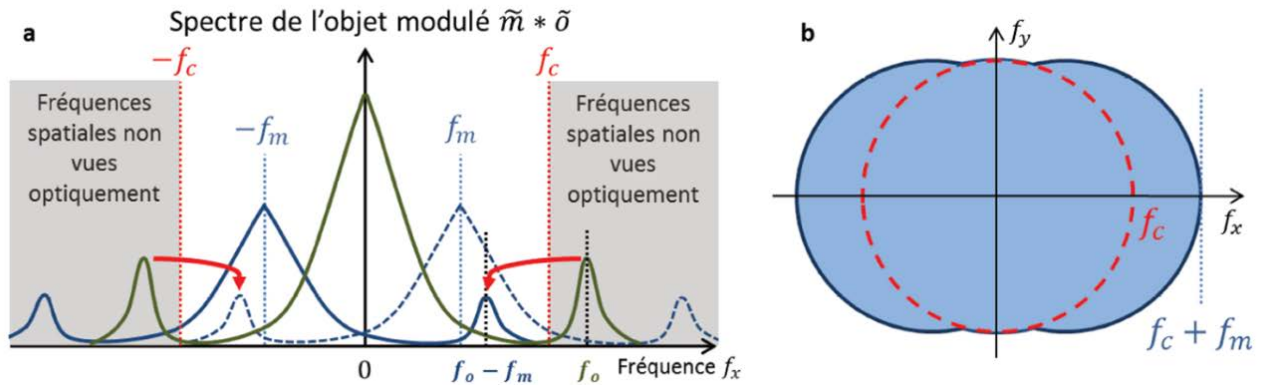


Figure I-20 Principe de la SR-SIM. (a) Visualisation du spectre de l'objet modulé (b) Agrandissement du support fréquentiel par le SIM⁵⁴.

D'après l'Équation I-15, le spectre de l'objet modulé (avant l'atténuation par la FTO \tilde{h}) est la somme du spectre objet original \tilde{o} (courbe verte) et de deux répliques modulées du spectre objet centrées à $\pm \vec{f}_m$ (courbes bleues). Les composantes modulées replient des hautes fréquences de l'objet (indiquées par les flèches rouges) qui sont initialement en dehors du support fréquentiel optique à l'intérieur de celui-ci. Ainsi, en extrayant les trois composantes du spectre objet puis en les recombinaut, il est possible de reconstruire une image super-résolue dont le support fréquentiel est agrandi par rapport au support fréquentiel en limite de diffraction (Figure I-20 b). La fréquence de coupure SIM vaut $f_c + f_m$ dans la direction de la modulation. En général, 3 orientations du motif d'illumination sont utilisées pour obtenir un gain en résolution isotrope. Si le motif d'illumination est projeté à travers le même système optique que celui d'imagerie, la fréquence maximale des motifs que l'on peut projeter sur l'échantillon est f_c . Dans ce cas, le SIM permet donc d'augmenter la résolution au mieux d'un facteur 2.

Cependant, cette technique présente des artefacts de reconstruction. Par exemple, il peut arriver que des franges persistent sur l'image reconstruite, cela est dû soit à un photoblanchiment "structuré" de l'échantillon dans le plan de mise au point, soit à une mauvaise complémentarité des trois motifs d'illumination⁵⁵. L'image finale est reconstruite à partir de la capture consécutive de trois images du même plan. Afin d'augmenter la dynamique d'acquisition des images et de se rapprocher des cadences requises pour l'imagerie fonctionnelle *in vivo*, une autre technique d'illumination structurée a été développée par l'équipe de J. Mertz⁵⁶. Cette technique, appelée HiLo, nécessite la capture de seulement deux images avec deux types d'illumination différente : une illumination uniforme (similaire à celle utilisée dans les microscopes conventionnels plein champ) et une illumination structurée. Contrairement à la microscopie à illumination structurée précédemment présentée, la technique HiLo se place directement dans le plan de Fourier pour la reconstruction de la section, en se basant sur l'analyse du contenu fréquentiel des images plutôt que sur la soustraction d'images complémentaires dans l'espace réel.

⁵⁴ Lai-Tim, « Imagerie haute résolution de la rétine humaine par illumination structurée assistée par optique adaptative ».

⁵⁵ Schaefer, Schuster, et Schaffer, « Structured Illumination Microscopy ».

⁵⁶ Lim, Chu, et Mertz, « Wide-Field Fluorescence Sectioning with Hybrid Speckle and Uniform-Illumination Microscopy »; Silvia Santos et al., « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle », *Journal of Biomedical Optics* 14, n° 3 (juin 2009): 030502, <https://doi.org/10.1117/1.3130266>.

5. Microscopie HiLo et algorithme de reconstruction des images

Le principe de base de la microscopie HiLo repose sur l'acquisition de deux images du même plan en utilisant deux illuminations différentes. L'une des images est capturée avec une illumination uniforme. Comme expliqué dans la Figure I-21, cette image contient à la fois les informations du plan conjugué et des contributions provenant de plans hors plan conjugué, principalement des composantes basses fréquences spatiales. Afin de rejeter ces composantes défocalisées, un filtre passe-haut est appliqué à l'image obtenue avec l'illumination uniforme, permettant ainsi de ne conserver que les hautes fréquences spatiales qui proviennent exclusivement du plan focal (image "Hi", voir Figure I-21).

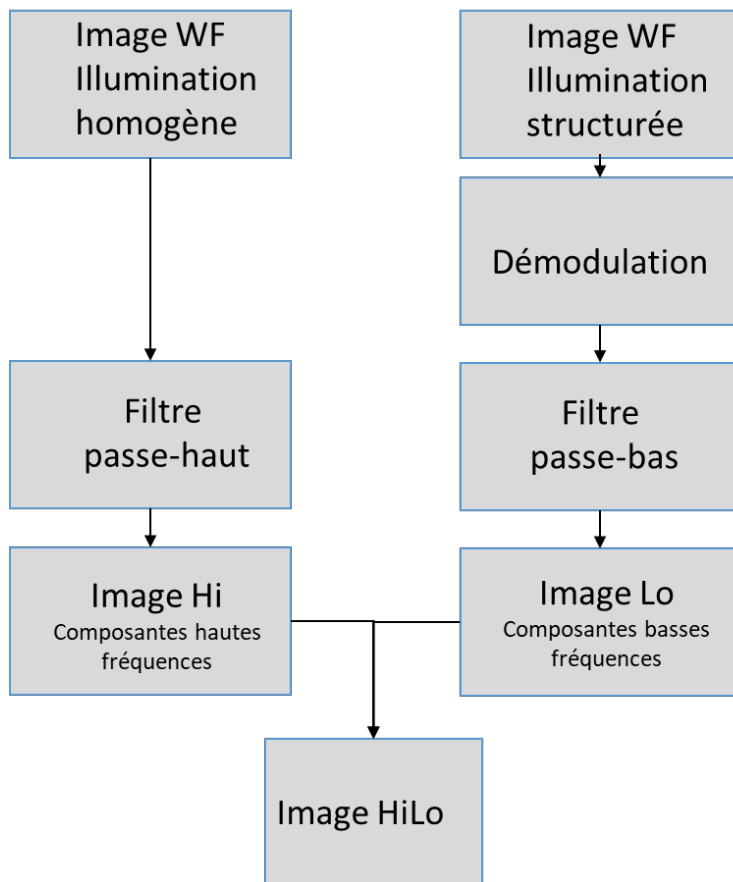


Figure I-21 Schéma du principe de sectionnement de la microscopie HiLo⁵⁷

Cependant, pour obtenir une reconstruction complète de la coupe optique, il est nécessaire de récupérer les informations relatives aux composantes basses fréquences spatiales du plan focal. Pour cela, une seconde image du même plan de l'échantillon est acquise, cette fois-ci en

⁵⁷ Santos et al., « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle ».

utilisant une illumination structurée. Différents types de structuration peuvent être utilisés, tels que la granulosité (speckle) créée par l'excitation cohérente du laser ⁵⁸, ou un motif de lignes ⁵⁹, qui est celui choisi pour notre étude. La structuration est conçue de manière à ce que son contraste diminue rapidement avec la défocalisation. Ainsi, cette structuration de l'illumination agit comme une porteuse optique, où seuls les plans très proches du plan focal présentent une modulation significative. Une démodulation, associée à un filtrage passe-bas, permet alors d'accéder aux composantes basses fréquences spatiales du plan focal (image "Lo", voir Figure I-21).

La combinaison de ces deux images permet de reconstruire l'image HiLo (voir Figure I-22), qui est une coupe optique contenant à la fois les hautes et les basses fréquences spatiales du plan focal, dans la limite de la bande passante spectrale de notre système optique. Ainsi, la microscopie HiLo permet d'obtenir des informations plus détaillées sur l'échantillon en rejetant les contributions défocalisées et en récupérant les composantes basses fréquences spatiales manquantes.

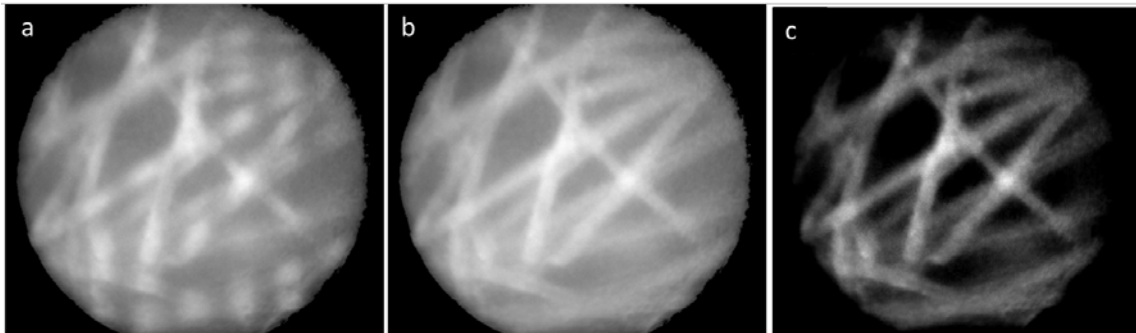


Figure I-22 (a) Image brute de fibres de papier à lentilles marquées par fluorescence avec une grille et (b) une illumination uniforme. Réalisé à l'aide de l'endoscope HiLo. (c) Après traitement image HiLo finale.⁶⁰

6. Conclusion

En conclusion, la microscopie à illumination structurée est une technique qui permet de différencier les fréquences spatiales basses en fonction de leur origine spatiale dans l'échantillon. Elle repose sur le principe de transmission différenciée des différentes fréquences spatiales lors de la dégradation de la mise au point dans un système optique. Cette technique utilise un motif d'illumination structurée qui présente une structure spatiale nette uniquement au niveau du plan focalisé, permettant ainsi de réaliser une section optique tout en préservant la rapidité de l'imagerie.

⁵⁸ Lim, Chu, et Mertz, « Wide-Field Fluorescence Sectioning with Hybrid Speckle and Uniform-Illumination Microscopy ».

⁵⁹ Santos et al., « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle ».

⁶⁰ Santos et al.

La méthode la plus simple de microscopie à illumination structurée consiste à capturer trois images successives avec des motifs d'illumination présentant des franges décalées d'un tiers de période entre chaque image. En soustrayant les images deux à deux, il est possible de reconstruire une coupe optique en mettant en évidence les composantes de fréquences spatiales élevées du plan focalisé.

Cependant, cette technique présente des artefacts de reconstruction, telles des franges persistantes ou une mauvaise complémentarité des motifs d'illumination. Pour pallier ces problèmes, une autre technique d'illumination structurée appelée HiLo a été développée. Elle nécessite la capture de seulement deux images avec deux types d'illuminations différentes : une illumination uniforme et une illumination structurée. En appliquant un filtre passe-haut à l'image obtenue avec l'illumination uniforme, on peut rejeter les composantes basses fréquences spatiales provenant des plans hors de focalisation. En utilisant l'image acquise avec l'illumination structurée, on peut récupérer les informations relatives aux composantes basses fréquences spatiales du plan focal. La combinaison de ces deux images permet de reconstruire une coupe optique contenant à la fois les hautes et les basses fréquences spatiales du plan focal.

En résumé, la microscopie à illumination structurée, qu'elle soit réalisée avec la méthode traditionnelle ou la technique HiLo, permet d'obtenir des informations détaillées sur l'échantillon en distinguant les composantes de fréquences spatiales provenant du plan focalisé et des plans hors de focalisation. Cela permet d'améliorer la résolution et la qualité des images obtenues, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives pour l'imagerie optique en biologie et en sciences des matériaux.

Bibliographie

- Abbe. « The Relation of Aperture and Power in the Microscope (Continued).* ». *Journal of the Royal Microscopical Society* 2, n° 4 (1882): 460-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>.
- Amos, B., G. McConnell, et T. Wilson. « 2.2 Confocal Microscopy ». In *Comprehensive Biophysics*, 3-23. Elsevier, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00203-4>.
- Astner, S, et Martina Ulrich. « [Confocal laser scanning microscopy] ». *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 61 (1 avril 2010): 421-28. <https://doi.org/10.1007/s00105-015-3632-y>.
- Axelrod, D. « Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence ». *The Journal of Cell Biology* 89, n° 1 (avril 1981): 141-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141>.
- Bansal, Vivek, Saumil Patel, et Peter Saggau. « High-Speed Addressable Confocal Microscopy for Functional Imaging of Cellular Activity ». *Journal of Biomedical Optics* 11, n° 3 (2006): 34003. <https://doi.org/10.1117/1.2209562>.
- Barroca, Thomas, Karla Balaa, Julie Delahaye, Sandrine Lévêque-Fort, et Emmanuel Fort. « Full-Field Supercritical Angle Fluorescence Microscopy for Live Cell Imaging ». *Optics Letters* 36, n° 16 (15 août 2011): 3051-53. <https://doi.org/10.1364/OL.36.003051>.
- Beaurepaire, E, A C Boccara, M Lebec, L Blanchot, et H Saint-Jalmes. « Full-Field Optical Coherence Microscopy ». *Optics Letters*, 1998.
- Bourg, N., C. Mayet, G. Dupuis, T. Barroca, P. Bon, S. Lécart, E. Fort, et S. Lévêque-Fort. « Direct Optical Nanoscopy with Axially Localized Detection ». *Nature Photonics* 9, n° 9 (septembre 2015): 587-93. <https://doi.org/10.1038/nphoton.2015.132>.
- Capoulade, Jérémie, Malte Wachsmuth, Lars Hufnagel, et Michael Knop. « Quantitative Fluorescence Imaging of Protein Diffusion and Interaction in Living Cells ». *Nature Biotechnology* 29, n° 9 (septembre 2011): 835-39. <https://doi.org/10.1038/nbt.1928>.
- Castleman, Kenneth R. *Digital Image Processing*. Prentice Hall, 1996.
- Conchello, José-Angel, et Jeff W Lichtman. « Optical Sectioning Microscopy ». *Nature Methods* 2, n° 12 (décembre 2005): 920-31. <https://doi.org/10.1038/nmeth815>.
- Dixit, Ram, et Richard Cyr. « Cell Damage and Reactive Oxygen Species Production Induced by Fluorescence Microscopy: Effect on Mitosis and Guidelines for Non-Invasive Fluorescence Microscopy ». *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 36, n° 2 (octobre 2003): 280-90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2003.01868.x>.
- Dusch, Elodie. « Modélisation de la réponse impulsionnelle pour la détection de particules en microscopie par fluorescence ». Université Paris Descartes, 2008.
- Egger, M. D., et M. Petrǎn. « New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 157, n° 3786 (21 juillet 1967): 305-7. <https://doi.org/10.1126/science.157.3786.305>.
- Frieden, B. Roy. « Optical Transfer of the Three-Dimensional Object*† ». *Journal of the Optical Society of America* 57, n° 1 (1 janvier 1967): 56. <https://doi.org/10.1364/JOSA.57.000056>.
- Fu, Zhiqiang, Jialong Chen, Gan Liu, Gan Liu, Shih-Chi Chen, et Shih-Chi Chen. « Single-Shot Optical Sectioning Microscopy Based on Structured Illumination ». *Optics Letters* 47, n° 4 (15 février 2022): 814-17. <https://doi.org/10.1364/OL.451267>.
- Gleyzes, P., F. Guernet, et A. C. Boccara. « Picometric Profilometry. II. Multidetector Approach and Multiplexed Lock-in Detection ». *Journal of Optics* 26, n° 6 (novembre 1995): 251. <https://doi.org/10.1088/0150-536X/26/6/003>.
- Goodman, Joseph W. *Introduction to Fourier Optics*. McGraw-Hill, 1996.
- Guiet, Romain. « doFWHM.ljm ». GitHub Gist, 2019. <https://gist.github.com/romainGuiet/42395587d1193536b7a0858f72db4aca>.

- Gustafsson, M. G. L. « Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy ». *Journal of Microscopy* 198, n° 2 (1 mai 2000): 82-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>.
- Hinds Instruments. « PEM Technical Overview », 2019.
- Huisken, Jan, Jim Swoger, Filippo Del Bene, Joachim Wittbrodt, et Ernst H. K. Stelzer. « Optical Sectioning Deep Inside Live Embryos by Selective Plane Illumination Microscopy ». *Science* 305, n° 5686 (13 août 2004): 1007-9. <https://doi.org/10.1126/science.1100035>.
- Icha, Jaroslav, Michael Weber, Jennifer C. Waters, et Caren Norden. « Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 39, n° 8 (août 2017). <https://doi.org/10.1002/bies.201700003>.
- Karadaglić, Dejan, et Tony Wilson. « Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy ». *Micron* 39, n° 7 (1 octobre 2008): 808-18. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.01.017>.
- Lai-Tim, Yann. « Imagerie haute résolution de la rétine humaine par illumination structurée assistée par optique adaptative ». PSL, 2020.
- Lambert, Talley J. « FPbase: A Community-Editable Fluorescent Protein Database ». *Nature Methods* 16, n° 4 (avril 2019): 277-78. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0352-8>.
- Lim, Daryl, Kengyeh K. Chu, et Jerome Mertz. « Wide-Field Fluorescence Sectioning with Hybrid Speckle and Uniform-Illumination Microscopy ». *Optics Letters* 33, n° 16 (15 août 2008): 1819-21. <https://doi.org/10.1364/OL.33.001819>.
- Manders, E. M. M., F. J. Verbeek, et J. A. Aten. « Measurement of Co-Localization of Objects in Dual-Colour Confocal Images ». *Journal of Microscopy* 169, n° 3 (mars 1993): 375-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>.
- Mattheyses, Alexa, Sanford Simon, et Joshua Rappoport. « Imaging with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for the Cell Biologist ». *Journal of cell science* 123 (1 novembre 2010): 3621-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.056218>.
- Nakano, Akihiko. « Spinning-Disk Confocal Microscopy. A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic. » *Cell Structure and Function* 27, n° 5 (2002): 349-55. <https://doi.org/10.1247/csf.27.349>.
- Neil, M. a. A., R. Juškaitis, et T. Wilson. « Method of Obtaining Optical Sectioning by Using Structured Light in a Conventional Microscope ». *Optics Letters* 22, n° 24 (15 décembre 1997): 1905-7. <https://doi.org/10.1364/OL.22.001905>.
- Nicolas, Marie-Thérèse, et Marc Moreau. « Prix Nobel de Chimie 2008 (Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Y. Tsien) : Osamu Shimomura ». *médecine/sciences* 24, n° 11 (1 novembre 2008): 983-84. <https://doi.org/10.1051/medsci/20082411983>.
- Nipkow, Paul. « Elektrisches Teleskop Patent schrift n° 30105 ». Kaiserliches Patentamt, 1885.
- Odell, Ian D., et Deborah Cook. « Immunofluorescence Techniques ». *Journal of Investigative Dermatology* 133, n° 1 (janvier 2013): 1-4. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.455>.
- Oldenbourg, Rudolf, et Michael Shribak. « Microscopes », 28.1-28.62, 2010.
- Pacheco, Gefeson. « Variable optical attenuator using double acousto-optic modulator », 2006.
- Pedrazzani, Mélanie. « Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle in vivo des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster* ». These de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), 2015. <https://www.theses.fr/2015SACL226>.
- « Phoenix 5.0MP Polarsens Polarization Camera, Sony's IMX264MZR and IMX264MYR CMOS | LUCID Vision Labs ». Consulté le 21 septembre 2022. <https://thinklucid.com/product/phoenix-5-0-mp-polarization-model-imx264mzrmyr/>.
- Santos, Silvia, Kengyeh K. Chu, Daryl Lim, Nenad Bozinovic, Tim N. Ford, Claire Hourtoule, Aaron C. Bartoo, Satish K. Singh, et Jerome Mertz. « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle ». *Journal of Biomedical Optics* 14, n° 3 (juin 2009): 030502. <https://doi.org/10.1117/1.3130266>.

- Schaefer, L. H., D. Schuster, et J. Schaffer. « Structured Illumination Microscopy: Artefact Analysis and Reduction Utilizing a Parameter Optimization Approach ». *Journal of Microscopy* 216, n° Pt 2 (novembre 2004): 165-74. <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01411.x>.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, et Kevin W. Eliceiri. « NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis ». *Nature Methods* 9, n° 7 (juillet 2012): 671-75. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Shaner, Nathan C, Robert E Campbell, Paul A Steinbach, Ben N G Giepmans, Amy E Palmer, et Roger Y Tsien. « Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma* Sp. Red Fluorescent Protein ». *Nature Biotechnology* 22, n° 12 (décembre 2004): 1567-72. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>.
- Shannon, C.E. « Communication in the Presence of Noise ». *Proceedings of the IRE* 37, n° 1 (janvier 1949): 10-21. <https://doi.org/10.1109/JRPROC.1949.232969>.
- Sheppard, Colin, Min Gu, Yoshimasa Kawata, et S. Kawata. « Three-dimensional transfer functions for high-aperture systems ». *Journal of The Optical Society of America A-optics Image Science and Vision - J OPT SOC AM A-OPT IMAGE SCI* 11 (1 février 1994). <https://doi.org/10.1364/JOSAA.11.000593>.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et Y. Saiga. « Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea* ». *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (juin 1962): 223-39. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.
- Thevenaz, P., U.E. Ruttimann, et M. Unser. « A pyramid approach to subpixel registration based on intensity ». *IEEE Transactions on Image Processing* 7, n° 1 (janvier 1998): 27-41. <https://doi.org/10.1109/83.650848>.
- Tizro, Parastou, Cecilia Choi, et Negar Khanlou. « Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1897 (2019): 417-24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_33.
- Vatansever, Fatma, Wanessa C.M.A. De Melo, Pinar Avci, Daniela Vecchio, Magesh Sadasivam, Asheesh Gupta, Rakkiyappan Chandran, et al. « Antimicrobial Strategies Centered around Reactive Oxygen Species – Bactericidal Antibiotics, Photodynamic Therapy, and Beyond ». *FEMS Microbiology Reviews* 37, n° 6 (novembre 2013): 955-89. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12026>.
- Voie, A. H., D. H. Burns, et F. A. Spelman. « Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning: Three-Dimensional Imaging of Macroscopic Biological Specimens ». *Journal of Microscopy* 170, n° 3 (1993): 229-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x>.
- Wilson, T. « Optical Sectioning in Fluorescence Microscopy ». *Journal of Microscopy* 242, n° 2 (1 mai 2011): 111-16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2010.03457.x>.
- Wilson, Tony, et Colin Sheppard. *Theory and practice of scanning optical microscopy*. London ; Orlando: Academic Press, 1984.

Illumination structurée : partie excitation

II. Illumination structurée : partie excitation

Comme nous avons pu le voir dans le chapitre précédant nous allons développer une technique d'illumination structurée sur la base de la technique HiLo⁶¹. Notre objectif est d'améliorer la fréquence d'acquisition tout en préservant les avantages du sectionnement optique et du gain en résolution. Dans cette optique, nous commencerons par décrire la partie d'excitation de notre montage, qui met en œuvre un interféromètre de Mach-Zehnder intégrant un modulateur de phase sous la forme d'une cellule de Pockels. Ces composants nous permettront de générer un motif structuré, tel qu'un réseau, qui sera utilisé pour moduler le signal de fluorescence. Ainsi, nous pourrions contrôler la phase du réseau engendré par l'interféromètre en utilisant différentes tensions appliquées à la cellule de Pockels.

Dans le chapitre II, nous explorerons l'idée centrale de notre travail, qui consiste à synchroniser la cellule de Pockels avec un modulateur photoélastique (PEM) placé devant la caméra. C'est ce modulateur photoélastique qui permettra de démoduler le signal en répartissant les différentes phases du réseau dans différents canaux de la caméra.

En combinant ces deux éléments clés, à savoir la modulation de phase avec la cellule de Pockels et la démodulation par le modulateur photoélastique, nous serons en mesure d'optimiser notre technique d'illumination structurée. Cette approche synchronisée nous permettra d'acquérir des images à une fréquence plus élevée tout en préservant la capacité de sectionnement optique et en améliorant la résolution.

Au cours de ce chapitre, nous aborderons en détail les principes et le fonctionnement de cette approche synchronisée, ainsi que ses avantages et ses applications potentielles. Nous discuterons également des considérations expérimentales et des résultats obtenus lors de la mise en œuvre de cette technique d'illumination structurée améliorée.

Ce chapitre présente en détail cette illumination structurée basée sur la méthode de type HiLo, en intégrant un interféromètre de Mach-Zehnder avec une cellule de Pockels pour la modulation de phase, et en synchronisant cette dernière avec un modulateur photoélastique pour la démodulation du signal. Grâce à cette combinaison, nous pourrions optimiser la fréquence d'acquisition tout en conservant les avantages du sectionnement optique et en améliorant la résolution, ouvrant ainsi de nouvelles perspectives dans le domaine de l'imagerie optique avancée.

⁶¹ Santos et al.

A. Principe

Dans un premier temps nous nous sommes orientés sur la création du réseau pour essayer d'améliorer le sectionnement optique tout en essayant de limiter le temps d'exposition lors de l'acquisition.

En effet, il a été démontré que le sectionnement était plus efficace si on augmentait le nombre de phases et d'angles pris ⁶², mais ceci est au détriment du temps d'acquisition et de la phototoxicité.

Les paramètres les plus importants à prendre en compte pour la création du réseau sont la fréquence du réseau et le nombre de phases.

Si la fréquence du réseau est supérieure à la résolution de l'objectif, le motif du réseau ne sera pas transmis à l'échantillon (Figure I-14). Inversement si la fréquence du réseau est trop basse, le sectionnement axial ne sera pas optimal (i.e. le plus fin).

Pour projeter une grille sur l'échantillon plusieurs solutions existent, en général associées à des cohérences du faisceau d'illumination différentes. Dans le premier cas, le faisceau peut être incohérent et les interférences confinées au plan conjugué.

La plus courante est celle qui consiste à positionner une grille physique entre la source lumineuse et l'objectif⁶³. La fréquence spatiale $\tilde{\nu}$ du réseau sur l'échantillon pourra alors être défini par $\tilde{\nu} = \beta\lambda\nu/NA$, où β est le grossissement, λ la longueur d'onde d'excitation, ν la fréquence spatiale initiale du réseau et NA l'ouverture numérique de l'objectif ⁶⁴.

Il est nécessaire de déplacer mécaniquement la grille pour obtenir plusieurs phases. Il y aura autant d'images que de phases nécessaires pour la démodulation.

Il faut au minimum 3 phases avec un déphasage de $\frac{2\pi}{3}$, ce qui donne : $\varphi_1 = 0$, $\varphi_2 = 2\pi/3$, $\varphi_3 = 4\pi/3$, avec I_1 , I_2 et I_3 les images correspondantes à chaque phase.

Ainsi pour obtenir uniquement le signal d'intérêt I_f modulé par la grille, il est possible de faire une simple opération (Équation II-1 introduite dans la partie I.C.4) :

$$I_f = \frac{\sqrt{2}}{3} \sqrt{(I_1 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2 + (I_2 - I_3)^2}$$

Équation II-1

Une alternative à l'utilisation d'un réseau physique, est la création d'interférences au niveau de l'échantillon entre deux faisceaux laser, par le biais d'un interféromètre.

Cela permet d'être indépendant d'un déplacement mécanique de grille pour obtenir chaque phase (Figure II-1 et Figure II-8).

⁶² Gustafsson, « Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy ».

⁶³ Karadaglić et Wilson, « Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy ».

⁶⁴ Neil, Juškaitis, et Wilson, « Method of Obtaining Optical Sectioning by Using Structured Light in a Conventional Microscope ».

B. Interféromètre de Mach-Zehnder

1. Source laser et fréquence de contrôle

Nous avons décidé d'utiliser un interféromètre de Mach-Zehnder pour générer les interférences. Celui-ci créera le réseau d'illumination structurée (Figure II-1).

Son montage simple nécessite l'utilisation d'un laser et de deux cubes séparateurs 50/50.

En séparant le faisceau laser en deux bras, on crée des interférences lorsqu'on réunit à nouveau les deux faisceaux avec un certain angle. Les deux miroirs M3 et M4 peuvent être positionnés sur des platines translation permettant d'ajuster l'écartement entre les deux faisceaux et ainsi jouer sur l'angle d'incidence dans l'objectif, ce qui modifie la fréquence des interférences au niveau de l'objet d'intérêt.

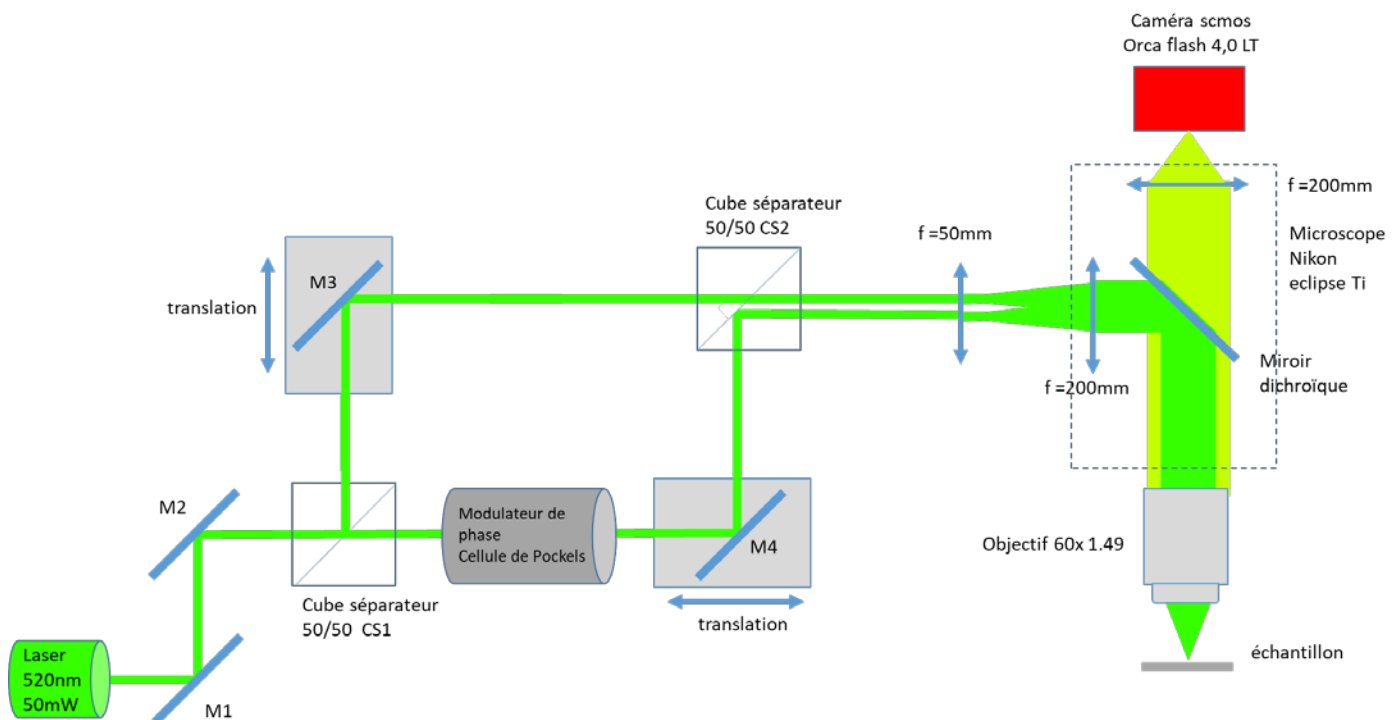


Figure II-1 Premier montage d'un interféromètre de Mach-Zehnder pour la partie « excitation » avec l'injection dans un microscope commercial Nikon eclipse Ti. Un faisceau laser cohérent est divisé en deux par un cube séparateur 50/50 (CS1). Sur chacun des bras, nous avons positionné deux miroirs (M3 et M4) sur des platines de translation, ce qui permet de gérer l'écartement entre les deux faisceaux des bras. Après le passage par le deuxième cube 50/50 (CS2) pour recombiner les deux faisceaux, nous pouvons ainsi régler la fréquence du réseau d'interférence. En positionnant un modulateur de phase (cellule de Pockels) sur l'un des bras, nous pouvons retarder l'un des faisceaux et ainsi moduler la phase du réseau d'interférence.

Ainsi le contrôle de l'intensité du laser permet une action directe sur la création du réseau.

Dans un premier temps, nous avons utilisé un laser Oxxius 532L-50-COL-PP, laser solide pompé par diode de 50mW, mais nous avons vite été confrontés au problème de synchronisation avec la partie émission qui sera abordée dans le prochain chapitre où nous verrons que la démodulation se fait avec un modulateur photoélastique PEM, résonnant à 50kHz dont la fréquence ne peut pas être changée. C'est donc ce dernier qui imposera la fréquence pour la synchronisation.

Nous avons opté de ce fait pour l'utilisation d'un laser diode LBX-520-70-CSB-PPA OXXIUS pouvant être modulé jusqu'à 150 MHz. Ainsi nous avons réussi à synchroniser l'émission du laser avec le PEM (Photo-Elastic Modulator).

Cependant le passage d'un laser solide pompé par diode à un laser diode a provoqué un raccourcissement de la longueur de cohérence du faisceau laser.

Nous sommes alors passés d'une centaine de mètres pour le laser 532 nm où il était très facile de créer des interférences à 0.5 mm de longueur de cohérence pour le laser 520 nm.

Il est devenu très difficile de générer les interférences et nous avons dû rajouter une ligne à retard sur l'un des bras pour permettre l'ajustement précis d'un des bras.

Cette courte longueur de cohérence nous imposait régulièrement d'ajuster la ligne à retard. Cela devenait trop complexe en cas de modification de l'écartement des deux faisceaux avec la translation des miroirs M3 et M4.

Malgré les ajustements avec la ligne à retard, nous avons observé une instabilité dans les interférences qui, au final, venait de la mise sous tension du laser diode 520 nm (Figure II-2).

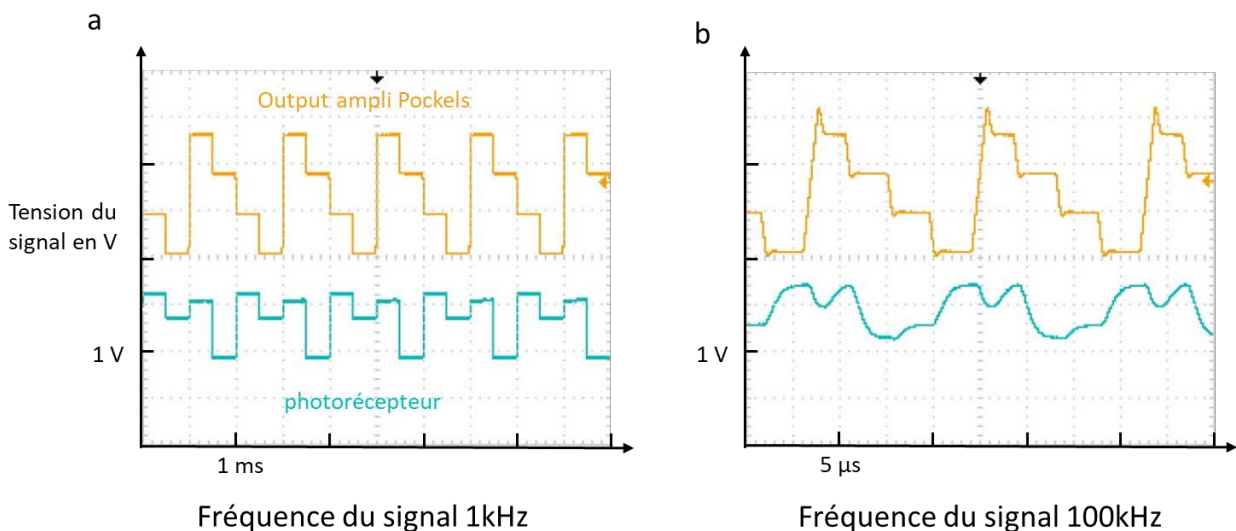


Figure II-2 Réponse du laser diode LBX-520 : nous avons mesuré à l'aide d'un photorécepteur (CH2 bleu) la modulation au bord du faisceau laser, après la création des interférences, en fonction du signal TTL (CH1 orange) envoyé à la cellule de Pockels. On peut observer une baisse des interférences à 100kHz (b) due probablement à l'instabilité de la longueur de cohérence lors de la variation du courant diode supérieure à 20kHz. (a) Si

on baisse la fréquence à 1kHz on observe une réponse équivalente au signal envoyé à la cellule de Pockels.

Lors de la synchronisation, l'allumage et l'extinction du laser avec une fréquence supérieure à 20 kHz rendent celui-incohérent pour la création des interférences.

En effet, la longueur de cohérence change quand on module le laser car la longueur d'onde varie légèrement en fonction du courant diode. Ceci se traduit par un brouillage spectral cassant la longueur de cohérence provoquant au final l'absence d'interférence.

Ainsi, comme notre laser solide pompé par diode ne peut être synchronisé à hautes fréquences, et que les lasers diodes peuvent être synchronisés avec des hautes fréquences mais ne sont pas stables en longueur d'onde, nous avons décidé de réaliser la modulation à l'aide d'un filtre acousto-optique AOTF (Acousto Optique Tunable Filter) : un AOTFnC-400.650-TN de chez AA OPTO-Electrique (Figure II-3 Figure II-4 Figure II-5).

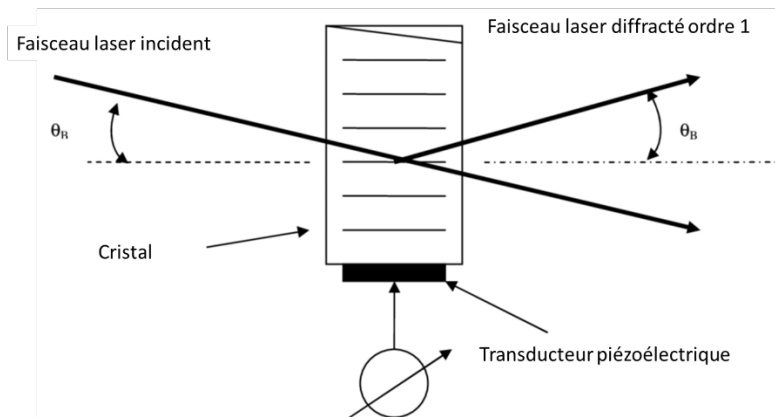


Figure II-3 Schéma d'un filtre acousto-optique à transduction optique acoustique (AOTF)⁶⁵. Le dispositif est composé d'un cristal biréfringent traversé par un faisceau laser. Lorsqu'une onde acoustique induit par le transducteur piézoélectrique est appliquée sur le cristal, une interaction acousto-optique se produit, modulant la phase et l'amplitude du faisceau lumineux. Cette modulation permet de sélectionner une longueur d'onde spécifique dans le spectre lumineux incident, agissant ainsi comme un filtre optique sélectif. La fréquence de l'onde acoustique appliquée détermine la longueur d'onde de sortie du faisceau lumineux.

L'AOTF est un dispositif optique qui utilise l'effet acousto-optique pour filtrer la lumière en fonction de sa fréquence. L'effet acousto-optique se produit lorsque des ondes acoustiques traversent un matériau cristallin transparent, induisant des variations locales de l'indice de réfraction. Ces variations interfèrent avec la propagation de la lumière, permettant ainsi de contrôler les propriétés optiques du matériau.

Pour régler l'AOTF (Figure II-4), un générateur de fréquence RF est utilisé afin de trouver la fréquence qui diffractera de manière optimale le faisceau laser dans l'ordre 1. Dans le cas d'un

⁶⁵ Gefeson Pacheco, « Variable optical attenuator using double acousto-optic modulator », 2006.

laser de 532 nm, une fréquence de 101,680 MHz a été déterminée comme étant la plus appropriée.

L'AOTF permet de laisser le laser allumé en continu de manière à ce que sa stabilité soit maintenue. Nous avons utilisé un laser solide pompé par diode (Laser Cobolt Samba 532 de 150 mW) de plus forte puissance, tout en pouvant moduler à haute fréquence, environ 100 MHz, le passage ou non du faisceau laser.

Il est maintenant envisageable de synchroniser la création du réseau d'interférences par exemple avec la caméra ou un autre périphérique grâce à un signal TTL (Transistor-Transistor Logic) 0-5 Volt.

Après avoir synchronisé la présence ou l'absence des interférences à la fréquence du photoélastique, environ 50kHz, nous nous sommes focalisés sur le contrôle de la phase du réseau.

En effet il est possible de mettre une lame à retard sur un des bras de l'interféromètre. En retardant un des deux faisceaux, nous décalerons d'autant la phase des interférences. Là aussi nous allons utiliser un modulateur électro-optique, une cellule de Pockels, qui nous permettra de synchroniser la phase de la même manière que la présence ou l'absence des interférences.

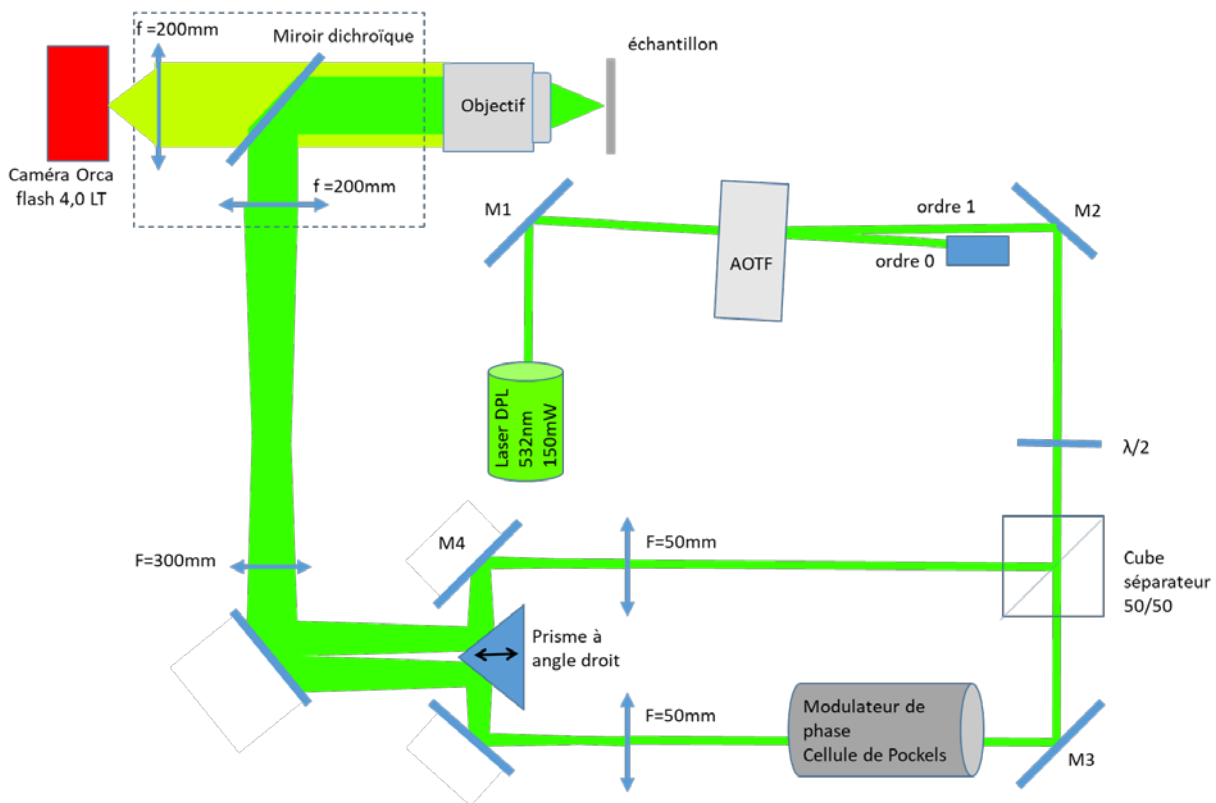


Figure II-4 Schéma de l'interféromètre de Mach-Zehnder pour la partie excitation avec l'introduction de l'AOTF, la cellule de Pockels et un prisme à angle droit.

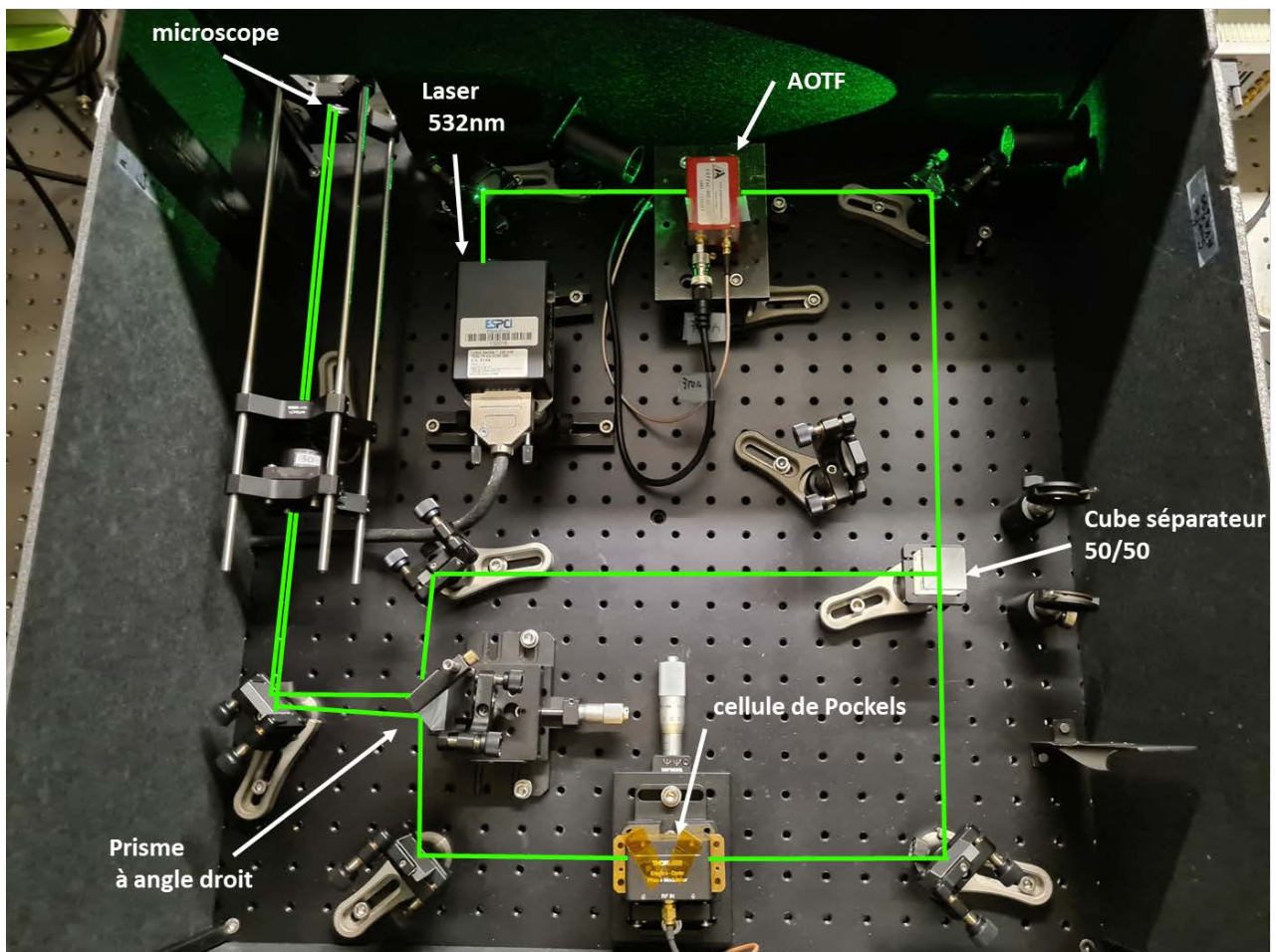


Figure II-5 Photo de la partie excitation comportant le laser solide pompé par diode, l'AOTF et la cellule de Pockels.

2. Modulateur de phase, cellule de Pockels

Après avoir créé les interférences avec l'interféromètre de Mach-Zehnder, il est maintenant nécessaire de pouvoir moduler le réseau. Cette modulation sera possible en plaçant une lame à retard, sous la forme d'un modulateur électro-optique, appelée également cellule de Pockels (Figure II-5 et Figure II-6). En appliquant un champ électrique, on pourra modifier l'indice de réfraction du cristal et de contrôler le déphasage du faisceau d'un des bras. Ce retard se manifestera par un changement de phase relatif entre les deux bras dans les interférences.

Ainsi, on peut avec l'aide un générateur de fonction synchroniser avec la période du modulateur photoélastique PEM différentes tensions à la cellule de Pockels correspondant aux différentes phases du réseau.

Par exemple, pour obtenir quatre phases, on enverra par le biais d'un générateur de fonction un signal TTL, composé de 4 tensions, ex : 0.5V, 2V, 3.5V, 5V.

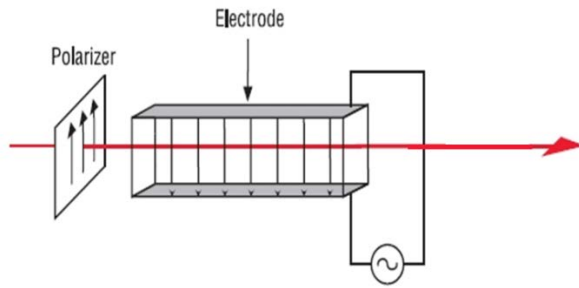


Figure II-6 Principe de fonctionnement d'une cellule de Pockels pour obtenir une lame biréfringente variable en temps : l'effet Pockels est l'apparition d'une biréfringence créée par un champ électrique statique ou variable. La biréfringence qui apparaît est proportionnelle au champ électrique. La cellule est polarisée verticalement de long d'un axe propre de polarisation de la lame.

3 Fréquence des interférences

Pour que la modulation du signal soit efficace sur les petits objets, il est nécessaire que le réseau projeté sur les échantillons ait une fréquence la plus élevée possible. Le sectionnement axial sera d'autant meilleur si la fréquence du réseau augmente (cf. partie A et Figure II-7).

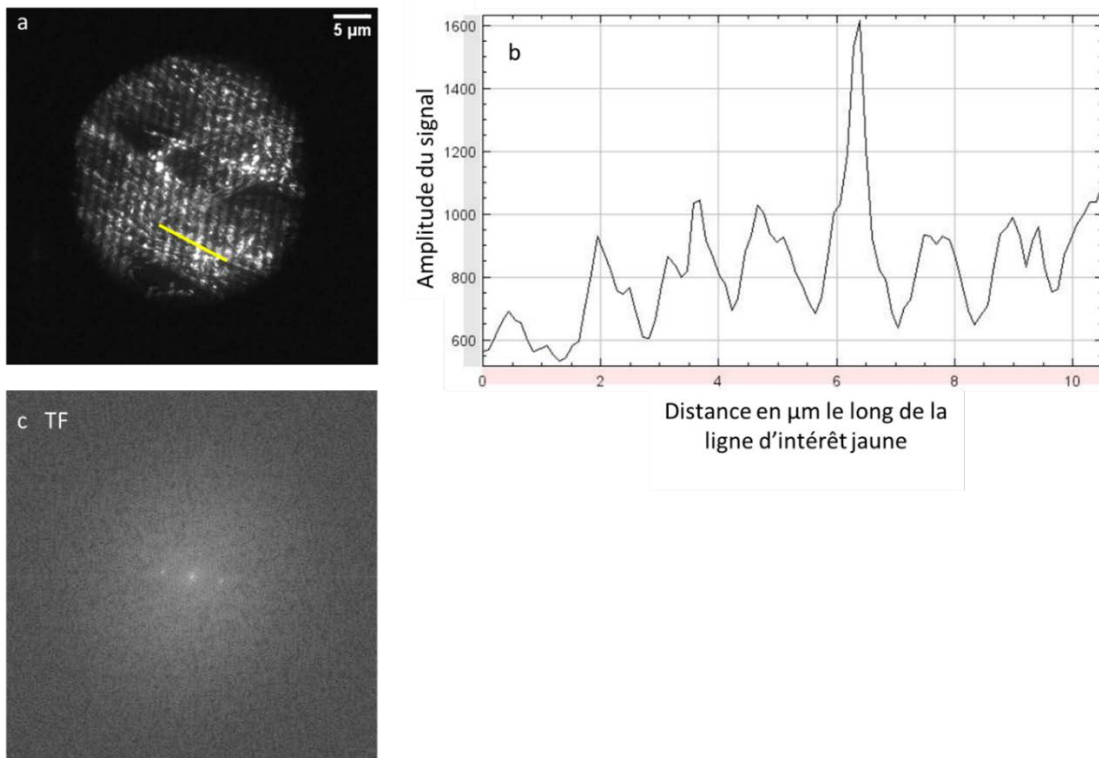


Figure II-7 (a) Illustration des interférences sur des mitochondries (marquées à l'Alexa555) de fibroblastes de Muntjacs, avec une période α expérimentale $\alpha_{exp}=1,1\mu m$ et une fréquence spatiale normalisée $\Lambda_{exp} = 0.32$. (b) Représentation en profil d'intensité le long de la ligne d'intérêt jaune sur (a). (c) On peut observer sur la transformée de Fourier TF de l'image (a), les deux points centro-symétriques qui représentent la fréquence des interférences.

Dans notre cas, nous avons utilisé un objectif aplanétique 60x à immersion à huile avec une ouverture numérique de 1.49 donnant une résolution latérale d'environ 184nm avec λ_{em} 560nm.

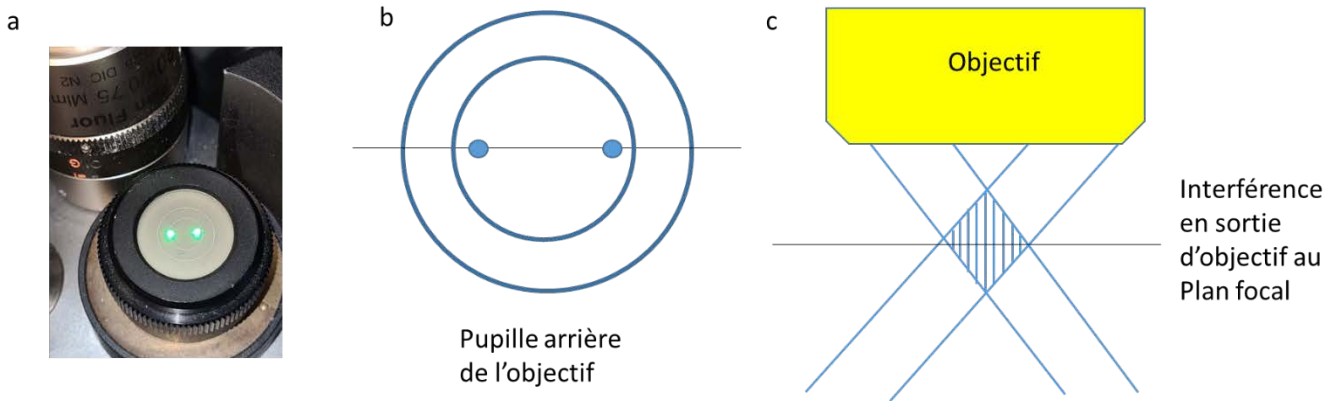


Figure II-8 (a et b) Positionnement des deux faisceaux dans la pupille arrière de l'objectif grâce à un diffuseur. (c) Interférence en sortie d'objectif au niveau du plan focal. La fréquence spatiale des interférences dépend de l'écartement des deux faisceaux au niveau de la pupille arrière de l'objectif.

$$\Lambda = \frac{\lambda_{ex}}{\alpha} \frac{1}{ON} \approx 1$$

$$\Lambda_{exp} = \frac{\lambda_{ex}}{\alpha_{exp}} \frac{1}{ON} = \frac{532}{430} * \frac{1}{1.49} = 0,83$$

Équation II-2 La fréquence spatiale normalisée Λ ⁶⁶ doit tendre vers 1 pour obtenir un système optimum, ce qui donne une période α minimale du réseau dans le plan objet de $\alpha=357$ nm avec une ouverture numérique de 1.49 et une source laser de longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex} = 532$ nm. Après optimisation du système nous avons pu obtenir une interfrange expérimentale $\alpha_{exp} = 430$ nm donnant une fréquence spatiale normalisée expérimentale de $\Lambda_{exp}=0,83$.

La fréquence du réseau va dépend de la distance entre les deux faisceaux dans la pupille arrière de l'objectif Figure II-8. Nous avons remplacé le deuxième cube séparateur par un prisme à angle droit

Figure II-4 ce qui nous permet d'ajuster au micromètre près l'angle d'incidence des deux faisceaux.

⁶⁶ Karadaglić et Wilson, « Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy ».

Ainsi nous avons pu obtenir une période expérimentale α_{ex} de 430nm (Figure II-9), au niveau de l'échantillon, supérieure à la période optimale préconisée dans l'Équation II-2 selon ⁶⁷ de $\alpha = 357\text{nm}$.

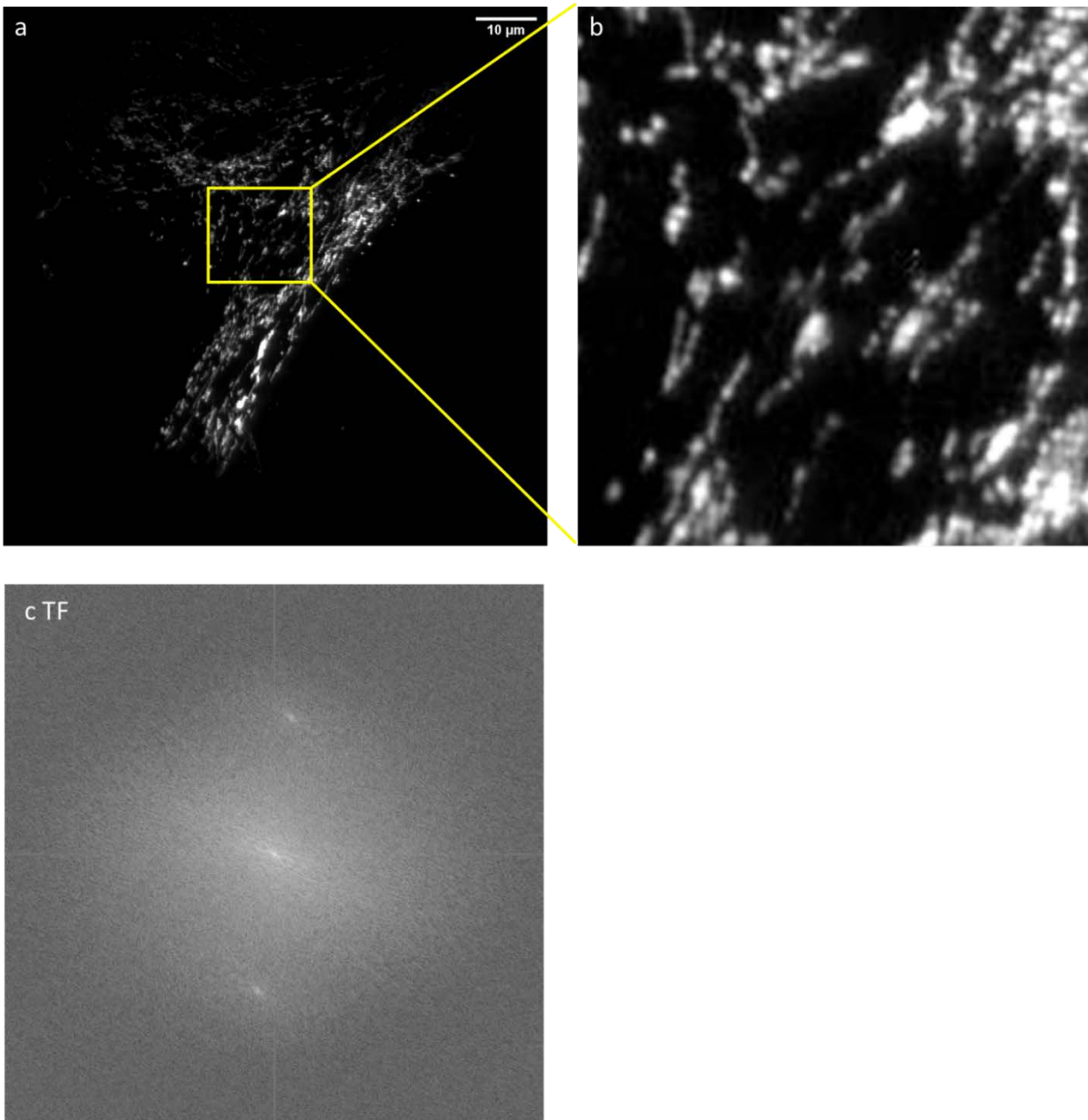


Figure II-9 (a) Illustration des interférences sur des mitochondries (marquées à l'Alexa555) de fibroblastes de Muntjacs, avec une période α expérimentale $\alpha_{exp}=430\text{ nm}$ et une fréquence spatiale normalisée $\Lambda_{exp} = 0.83$ obtenue avec l'ajustement du prisme à angle droit. Comme la fréquence des interférences se rapproche de la limite de transmission de l'objectif, il est difficile d'observer directement les interférences sur l'image. (b) Zoom de la zone d'intérêt en jaune.(c) Par contre on les observe facilement sur la transformée de Fourier TF de cette même image (objectif 63x, ON 1.49, laser 532 nm).

⁶⁷ Karadaglić et Wilson.

Ceci donne une normalisation de la fréquence spatiale expérimentale $\Lambda_{ex} = 0,83$ pouvant être comparée à un système commercial tel que le système OMX de Deltavision. En effet, dans ce système, on mesure une période α_{omx} de 400 nm avec un objectif 100x d'ouverture 1.4 et une excitation à 405 nm. Si on applique l'Équation II-2 on trouve $\Lambda_{omx} = 0,72$ (Figure II-10) donnant un sectionnement moins efficace que notre système expérimental.

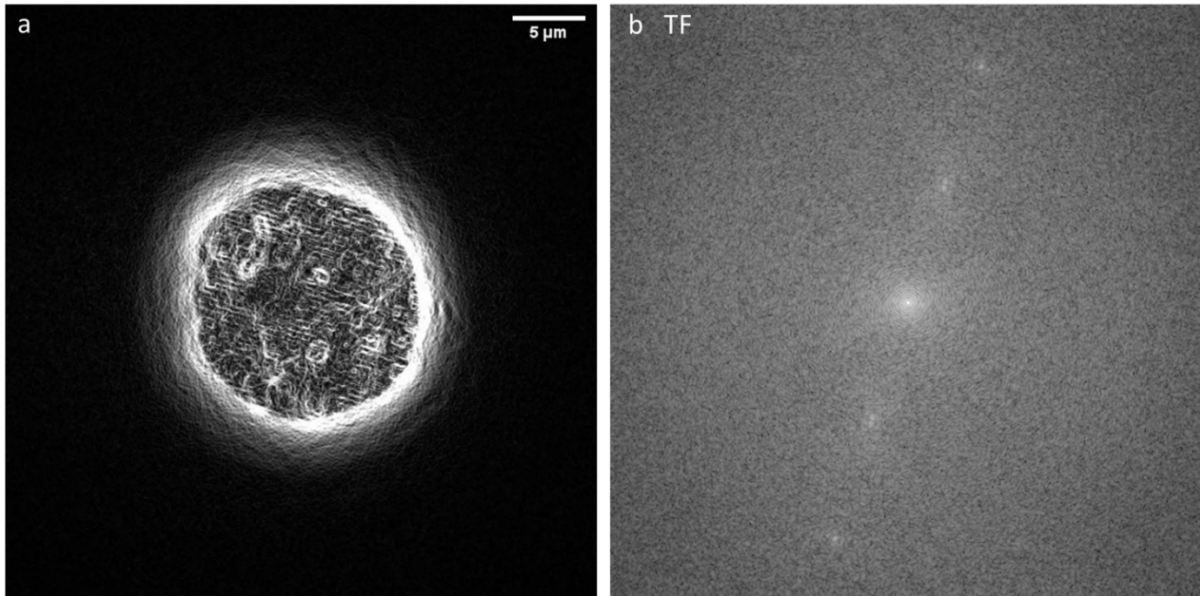


Figure II-10 (a) Illustration des interférences sur un noyau avec un marquage de l'ADN (DAPI) par un système Deltavision OMX, laser 405 nm, objectif 100x ON 1.4 période $\alpha_{omx}=400$ nm et une fréquence spatiale normalisée $\Lambda_{omx} = 0.72$ (Aurélien Dauphin Institut Curie).

Expérimentalement, il est difficile de diminuer la période des interférences en deçà de 430 nm. En effet, l'intensité de l'illumination ainsi que le contraste de franges diminuent. Il s'agit d'un double effet conjugué de troncature du faisceau incident dans le plan de la pupille et de la difficulté de maintenir la polarisation des faisceaux au niveau du plan objet. Plus on écarte les faisceaux l'un de l'autre, plus on s'approche de l'angle critique. Celui-ci se situe juste avant la réflexion totale du laser à l'intérieur de l'objectif pour faire de l'imagerie champ proche TIRF (voir Figure I-10).

Le diamètre du tube d'injection dans le microscope Nikon eclipse Ti impose également des contraintes pour l'écartement des deux faisceaux (Figure II-5).

Après avoir optimisé la fréquence du réseau, nous nous sommes concentrés sur l'homogénéisation du champ des interférences.

Pour cela, les deux bras doivent posséder des faisceaux polarisés perpendiculairement au plan d'incidence afin qu'ils puissent interférer dans les hautes fréquences quand les deux faisceaux s'écartent le plus.

Nous constatons à la sortie de l'AOTF une polarisation parallèle au plan d'interférence (Figure II-11). Ainsi l'utilisation d'une lame à retard $\lambda/2$ a été nécessaire pour tourner la

polarisation de façon verticale afin d'avoir des interférences homogènes sur toute la surface imagée.

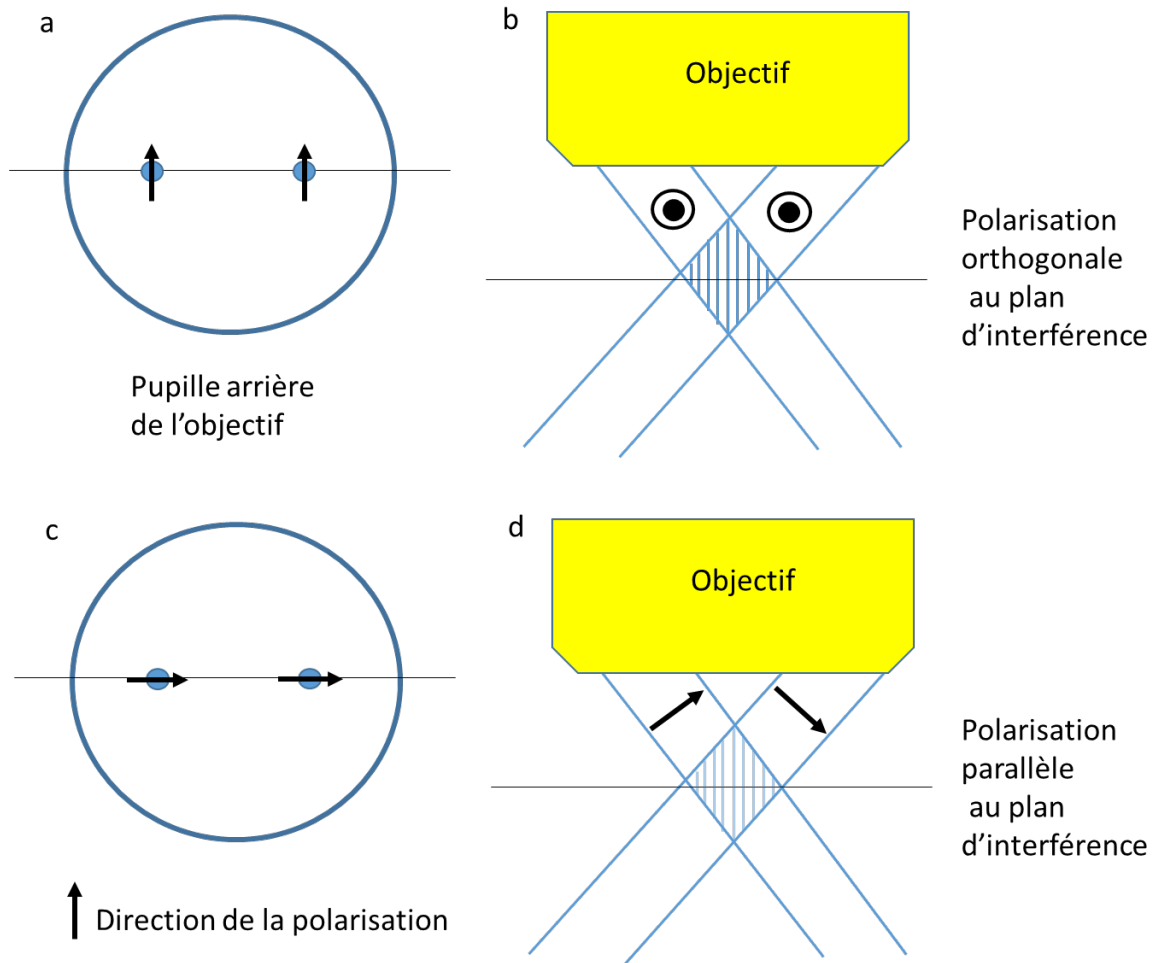


Figure II-11 Influence de la polarisation des faisceaux sur le contraste et l'homogénéité des interférences au niveau du plan focal. (a b) positionnement des deux faisceaux dans la pupille arrière de l'objectif avec une polarisation verticale. (c d) même position des deux faisceaux dans la pupille arrière de l'objectif avec une polarisation horizontale, ce qui entraîne un plus faible contraste des interférences et un champ d'illumination moins homogène.

C. Conclusion

Dans cette première partie, nous avons mis en évidence les avantages de l'utilisation d'un interféromètre couplé à un AOTF (Acousto-Optical Tunable Filter) pour la gestion de la création de réseaux dans l'échantillon à des fréquences élevées, supérieures à celles de la caméra, environ 50 kHz. L'utilisation d'un AOTF nous a permis d'exploiter un laser solide pompé par diode, qui ne peut pas être modulé à des fréquences élevées, mais qui présente l'avantage d'avoir une longueur de cohérence considérable, de plusieurs mètres. Cette caractéristique facilite la création d'interférences lors de l'ajustement du montage et du changement des angles d'incidence des deux faisceaux.

De plus, nous avons placé une cellule de Pockels sur l'un des bras de l'interféromètre afin de synchroniser la création du réseau par l'AOTF avec le changement de phase du réseau. Cette synchronisation garantit une précision temporelle optimale et permet d'obtenir des motifs d'interférence cohérents et bien définis.

Enfin, nous avons appliqué une polarisation, orthogonale au plan d'interférence, aux deux faisceaux pour assurer un contraste amélioré et une homogénéité au niveau des interférences dans le plan focal. La polarisation verticale permet de mieux distinguer les variations d'intensité et d'améliorer la qualité des images obtenues.

Dans la deuxième partie, nous aborderons la manière de séparer les différentes phases du réseau et de les répartir de manière optimale sur le minimum d'images acquises par la caméra. Notre objectif est de réduire l'irradiation de l'échantillon tout en améliorant le contraste du signal dans la profondeur de champ.

Illumination structurée : partie émission

III. Illumination structurée : partie émission

Dans le chapitre précédent, nous avons vu comment ajuster la fréquence des interférences pour les optimiser dans le contexte d'un sectionnement optique. Dans ce chapitre, nous allons aborder la modulation et la démodulation du signal dans le but d'améliorer les fréquences d'acquisition, avec pour objectif d'avoir une seule acquisition de la caméra afin de posséder l'ensemble des phases du réseau nécessaire au sectionnement optique par illumination structurée.

À cet effet, nous décrivons la synchronisation entre le modulateur de phase (la cellule de Pockels), l'AOTF et le démodulateur photoélastique PEM. Ce dernier va nous permettre de répartir les différentes phases projetées sur l'échantillon sur différents canaux de la caméra. Le PEM fera tourner la polarisation du signal d'émission de fluorescence sortant du microscope. Le signal sera divisé en deux avant de traverser le PEM, puis il sera de nouveau divisé en deux, toujours selon la polarisation, pour être au final réparti dans quatre canaux, I_1 , I_2 , I_3 et I_4 de la caméra.

Nous chercherons également à déterminer le nombre de phases du réseau nécessaires pour permettre le sectionnement optique. Enfin, nous aborderons la répartition des différentes phases sur les canaux de la caméra et examinerons la manière de reconstruire l'image résultante.

A. Démodulation du signal

Après avoir modulé le signal d'intérêt avec plusieurs phases, nous souhaitons récupérer ces phases en une seule image du détecteur, une caméra sCMOS (Scientific Complementary Metal-Oxide-Semiconductor) (Hamamatsu Orca Flash 4.0 LT), avec une fréquence d'acquisition entre 2 et 50Hz (Figure III-1).

Au lieu de répartir les quatre phases du réseau sur quatre pauses de la caméra, nous les avons réparties sur une seule pause en divisant le capteur de la caméra en quatre parties égales (Figure III-1 et Figure III-4 a). Pour la démodulation, nous nous sommes inspirés des travaux de Claude Bocarra⁶⁸ sur l'extraction d'une modulation haute fréquence d'un signal optique par un détecteur basse fréquence.

⁶⁸ P. Gleyzes, F. Guernet, et A. C. Boccara, « Picometric Profilometry. II. Multidetector Approach and Multiplexed Lock-in Detection », *Journal of Optics* 26, n° 6 (novembre 1995): 251, <https://doi.org/10.1088/0150-536X/26/6/003>;

Dans un premier temps on sépare le signal de fluorescence non polarisé sortant du microscope en deux (une partie polarisée verticale et l'autre horizontale) à l'aide d'un cube séparateur de polarisation (CSP1, Figure III-1).

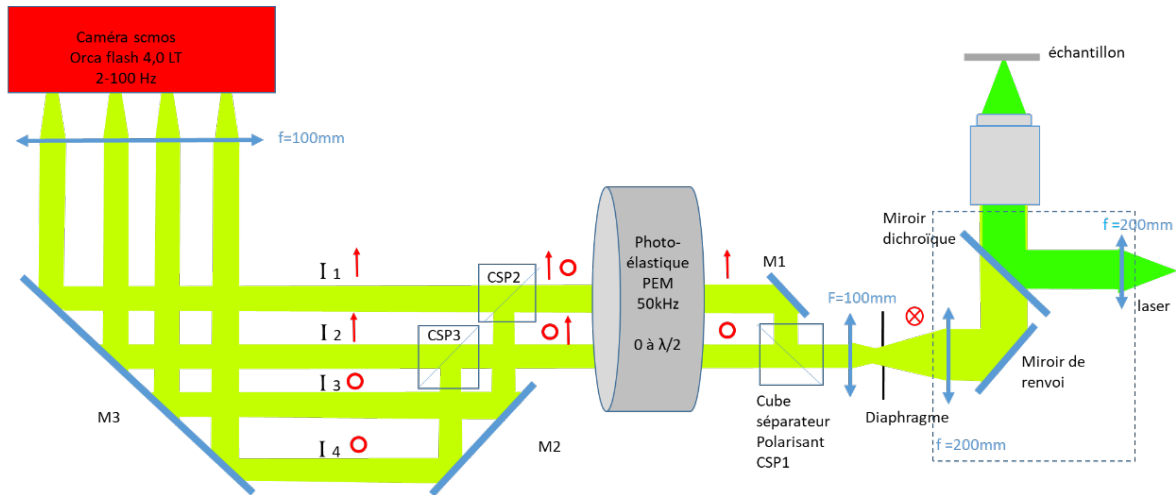


Figure III-1 Schéma de la partie émission en sortie du microscope. Le signal de fluorescence qui n'a pas de polarisation particulière est séparé en deux par un cube séparateur de polarisation CSP1. Ces deux canaux passent ensuite dans le modulateur de phase (PEM Photoelastic modulator) pour faire tourner la polarisation. Ils sont de nouveau séparés en quatre par deux cubes séparateurs de polarisation CSP2 et CSP3. Le signal est ainsi réparti de façon sinusoïdale dans les quatre canaux de la caméra.

On considère ici que l'émission de fluorescence n'a pas une polarisation particulière, et donc toutes les polarisations sont présentes en sortie du microscope, pour la partie émission. Ces deux faisceaux avec une polarisation différente traversent un modulateur photoélastique (PEM Figure III-1 et Figure III-2).

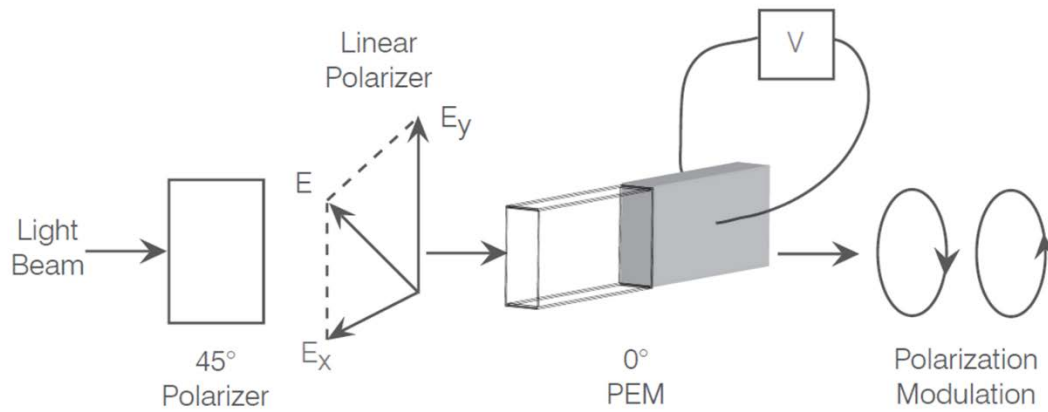


Figure III-2 Principe d'un modulateur Photoélastique PEM⁶⁹. En introduisant une onde mécanique via des piézoélectriques dans un cristal, l'indice de réfraction du cristal peut être modifié. Ce changement jouera le rôle de lame à retard en passant de 0 à $\lambda/2$.

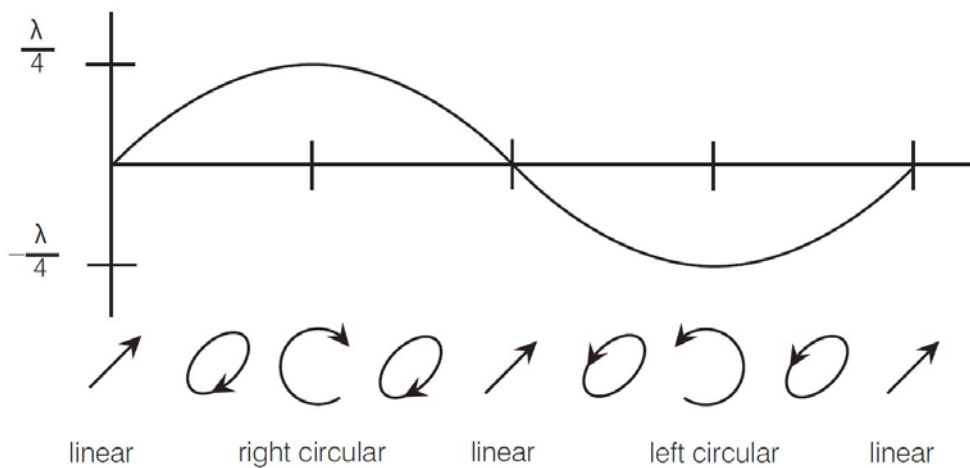
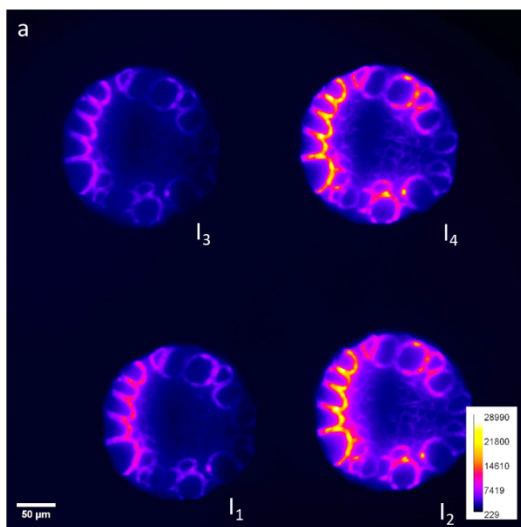


Figure III-3 Effet de la polarisation de circulaire droite à circulaire gauche du modulateur photoélastique PEM⁷⁰

Ce modulateur, à la fréquence de 50kHz, fait tourner la polarisation, comme une lame à retard qui passe de 0 à $\lambda/2$ en passant par $\lambda/4$ (Figure III-2 et Figure III-3).

⁶⁹ Hinds Instruments, « PEM Technical Overview », 2019.

⁷⁰ Hinds Instruments.



Cumul du signal réparti dans les quatre canaux de la caméra pendant 200ms

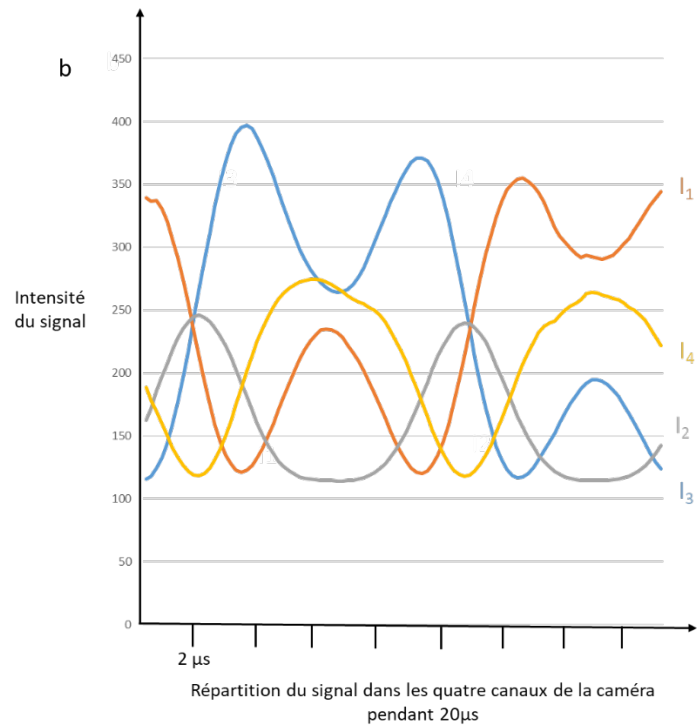


Figure III-4 (a) Coupe de rhizome de convallaria pour illustrer le signal intégré sur une période du PEM dans quatre canaux de la caméra pendant 200ms. (b) Répartition de l'intensité lumineuse dans chacun des canaux de la caméra pendant une période du PEM soit $20\mu s$.

La présence de deux autres cubes séparateurs de polarisation redistribue le signal vers quatre canaux. Ainsi pendant une période de $20\mu s$ du PEM, le signal est envoyé spécifiquement dans les quatre canaux de la caméra selon la modulation et la démodulation.

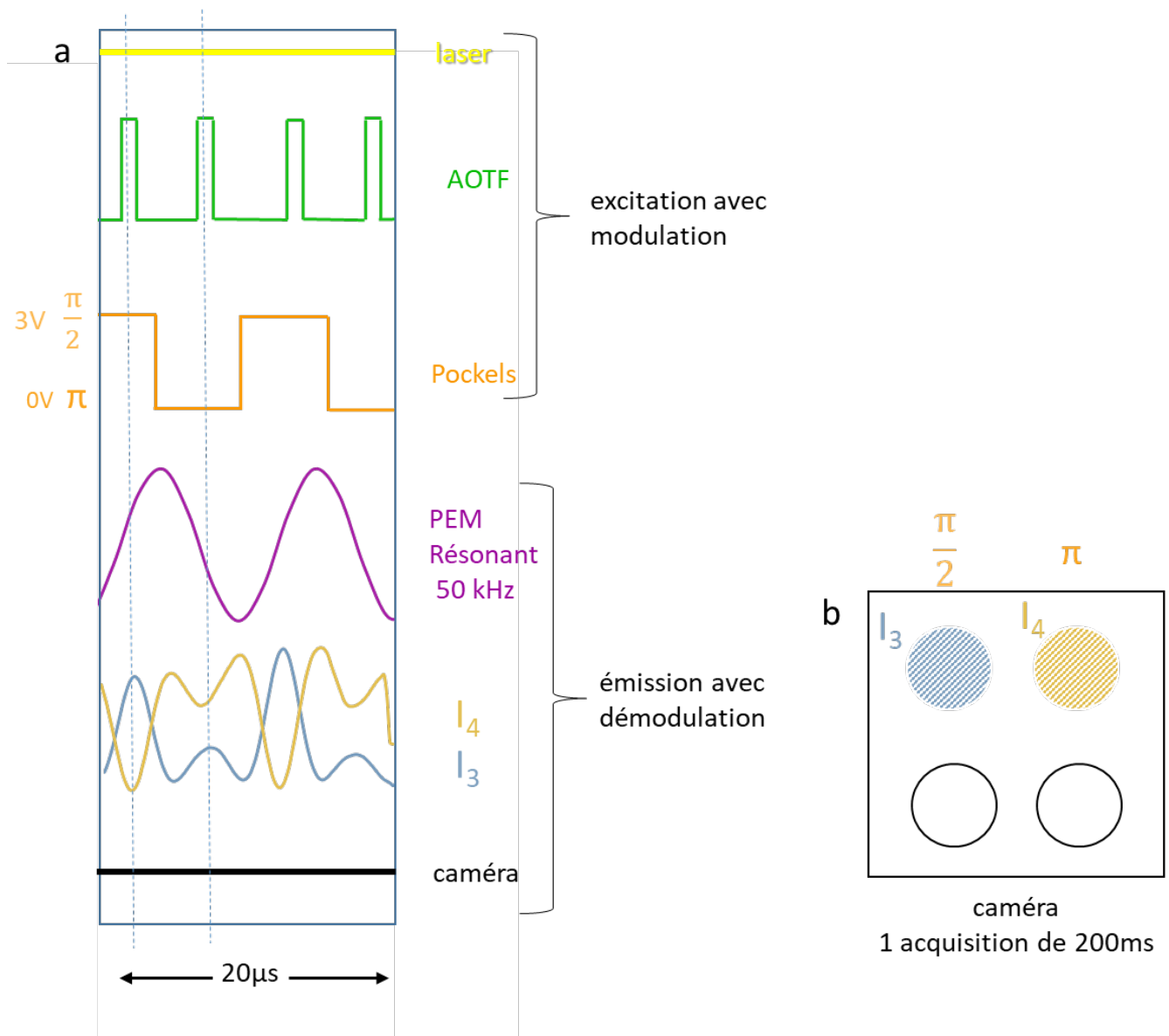


Figure III-5 Représentation de la modulation et démodulation du signal pour une période de $20\mu\text{s}$. (a) Le signal du laser est toujours allumé. C'est l'AOTF synchronisé avec la cellule de Pockels qui laisse passer un pulse laser de $0,5\mu\text{s}$ pour chaque changement de phase. Dans cet exemple nous avons pris deux phases pour le réseau d'interférence, π et $\frac{\pi}{2}$, qui sont créés en appliquant respectivement une tension de 0 et de 3 V à la cellule de Pockels. C'est le PEM dans la partie émission qui répartit le signal en faisant tourner la polarisation du signal d'émission de fluorescence. Comme le PEM est résonant c'est lui qui impose la fréquence de 50 kHz à l'AOTF et à la cellule de Pockels. (b) Même si la caméra a une fréquence d'acquisition beaucoup plus basse (5 Hz) le capteur verra le cumul de chaque phase $\frac{\pi}{2}$ et π dans les canaux spécifiques I_3 et I_4 .

Tout d'abord, nous avons constaté un déséquilibre entre les polarisations verticales et horizontales après le premier cube séparateur de polarisation CSP1 (Figure III-1 et Figure III-6), empêchant toute caractérisation de la réponse du PEM.

Après avoir testé plusieurs échantillons et une autre source blanche, on en a déduit que le problème pouvait venir du miroir dichroïque.

En changeant le miroir d'origine par un nouveau miroir de la société Semrock, les BrightLine® Super-résolution (Di03-R532-t1), nous avons constaté une égalité dans la répartition des deux polarisations ce qui a diminué le rapport de 55% à 10% entre les deux canaux (I1 et I2 Figure III-6).

Ces miroirs dichroïques mesurant 1mm d'épaisseur au lieu de 3 mm, limitent la déformation du front d'onde du signal d'émission, et surtout ils transmettent de la même façon toutes les polarisations.

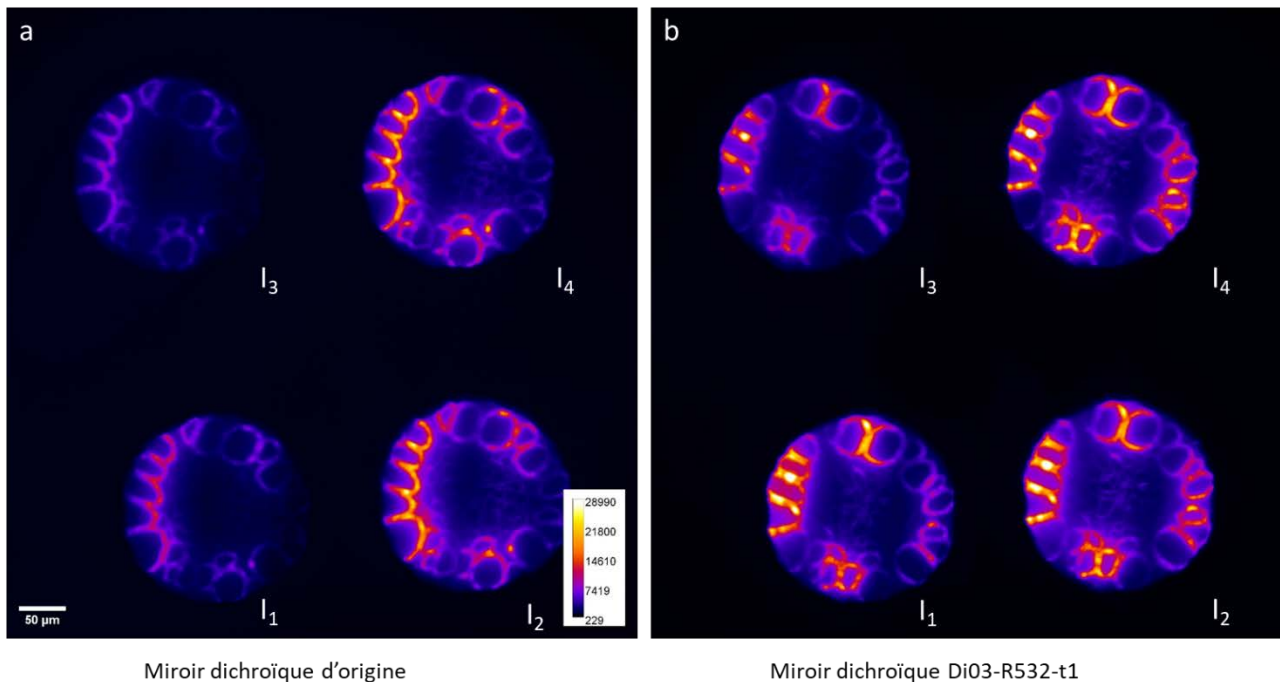


Figure III-6 Coupe de rhizome de convallaria qui illustre la différence de transmission, selon la polarisation du signal d'émission de la fluorescence, des miroirs dichroïques. (b) La nouvelle catégorie de miroirs dichroïques conçue pour la microscopie de super-résolution par la société Semrock permet d'atteindre l'équilibre entre les polarisations. (a) Les anciens miroirs dichroïques montrent un rapport de 55% de transmission entre la polarisation verticale et horizontale I₁ et I₂.

En synchronisant le modulateur photoélastique résonnant à la cellule de Pockels, il est possible de répartir chaque phase du réseau dans un des quatre canaux de la caméra tout en restant indépendant du temps de pause de la caméra qui a des fréquences d'acquisition plus basses d'environ 5 Hz dans notre cas.

Au final, pendant une pose de la caméra de 200 ms, chaque phase repassera 10000 fois environ sur son canal, sur le même modèle que la microscopie spinning disk (avec une rotation de 4000 tpm *tour par minute*) où chaque pixel est éclairé 13 fois lors d'une pause de 200ms de la caméra.

Cette accumulation pendant une acquisition est maintenant suffisante pour obtenir une dynamique du signal, environ 2500 niveaux sur une image 16bit comptant 65536 niveaux (Figure III-16).

1. Synchronisation entre la modulation (Pockels) et la démodulation (PEM)

Afin d'obtenir la synchronisation entre la modulation de la phase par la cellule de Pockels et la démodulation de l'électro-acoustique plusieurs solutions ont été envisagées.

La première a été d'utiliser le logiciel Matlab pour créer le profil du signal TTL envoyé par un générateur de fonction basse fréquence à la cellule de Pockels.

Cependant après plusieurs tentatives, les fonctions utilisées ne permettaient pas d'avoir un signal stable à ces hautes fréquences. Cette instabilité pouvait venir de la communication RS232 entre l'ordinateur et le générateur de fonction. Nous avons alors créé directement des fonctions sur le générateur de fonction Agilent 33220A. En parallèle, nous avons tenté de contrôler et de moduler la synchronisation par un Arduino. Cependant, nous n'avons pas trouvé de modèle générant des signaux supérieurs à 50 kHz.

Dans un premier temps nous avons caractérisé la modulation du PEM, en synchronisant l'AOTF pour laisser un pulse laser de 0,5 μ s avec une période de 20 μ s en fonction d'un délai sur le signal de sortie du PEM.

En mesurant le signal devant la caméra avec une photodiode, et en introduisant un retard au signal du PEM, on peut observer sur quel canal de la caméra le signal a été envoyé.

En faisant une gamme pour les délais de 0 à 20 μ s (période du PEM) avec une incrémentation de 0,25 μ s, nous pouvons observer comment le signal se répartit dans les quatre canaux en fonction de la période du PEM.

Pour obtenir ces mesures, nous avons dans un premier temps utilisé une photodiode (OE-200-Si de chez Femto) placée devant la caméra, canal par canal. En récupérant le signal de cette photodiode et du PEM, nous avons recalé le signal des quatre canaux avec celui du PEM et obtenu ainsi la Figure III-7. De ce fait, on peut observer l'évolution du signal lors d'une période du PEM.

Afin de simplifier les mesures, nous avons fait l'acquisition d'une image avec la caméra pour chaque délai et nous avons regardé le profil d'intensité de la pile d'images résultante pour chaque canal.

On observe sur la Figure III-8 la répartition du signal dans les quatre canaux. On constate qu'il n'y a aucune position dans la période du PEM où le faisceau est envoyé dans un seul canal.

Le signal est réparti dans au moins deux canaux.

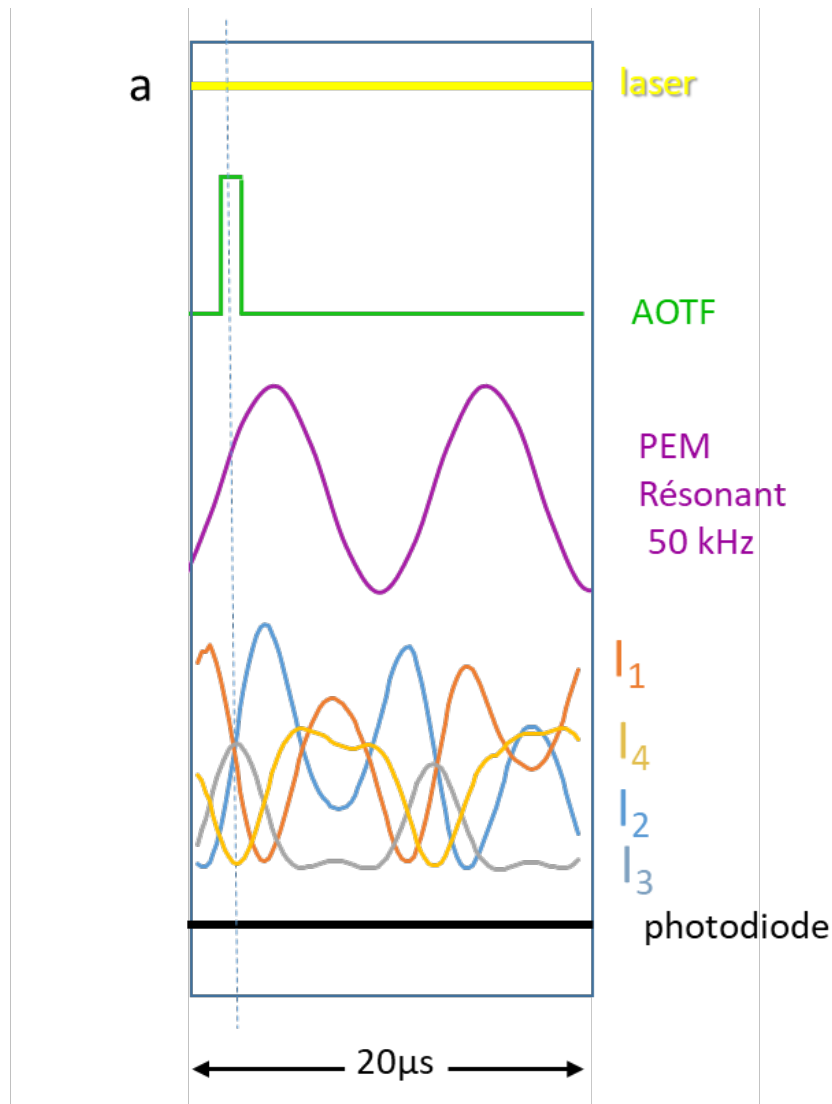


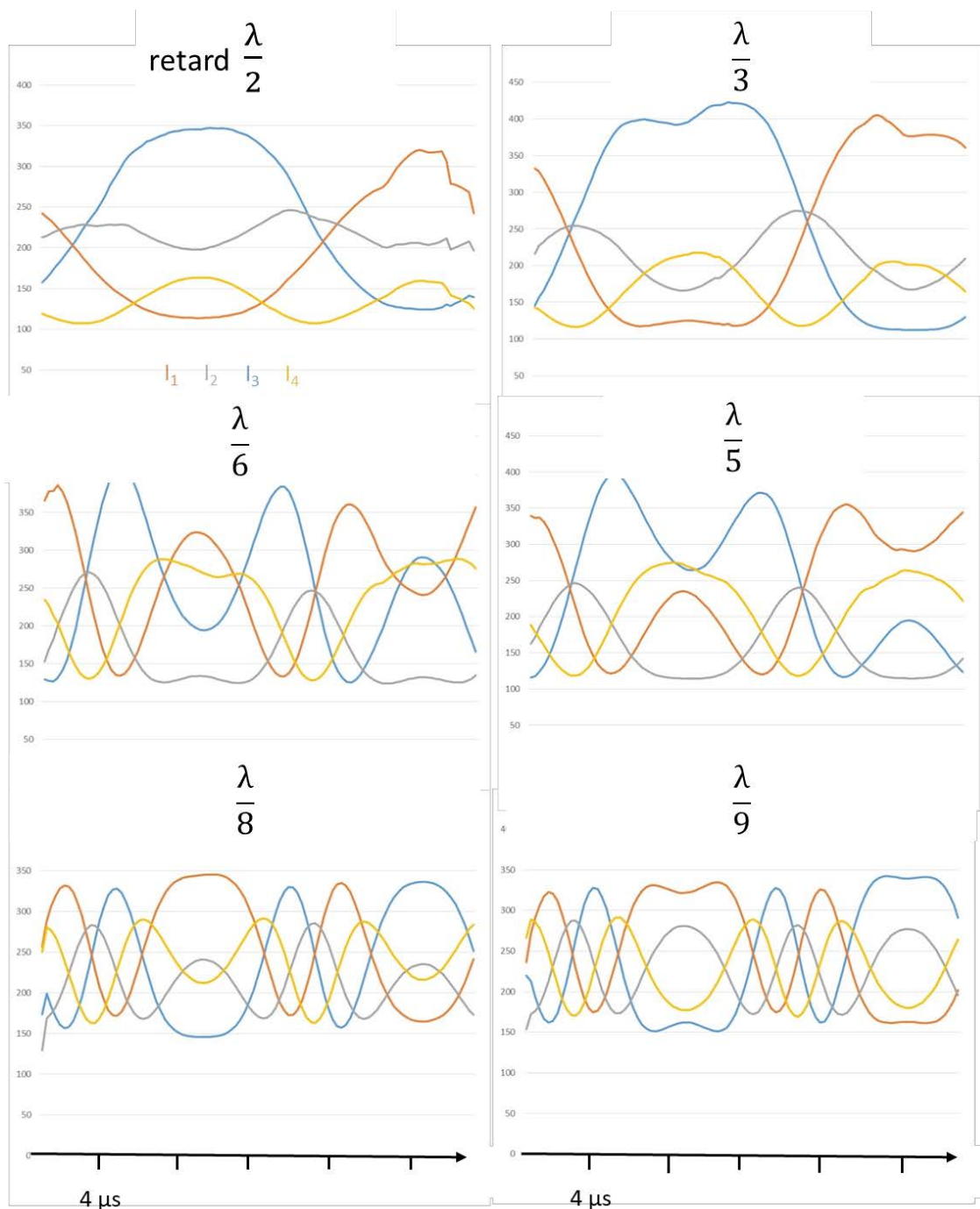
Figure III-7 Analyse du signal dans les quatre canaux I_1 , I_2 , I_3 et I_4 en utilisant une photodiode placée devant la caméra, en prenant comme référence le signal du photoélastique PEM avec une période de $20\mu\text{s}$ et un retard de $\lambda/6$.

Après avoir caractérisé la période du PEM pour un retard de $\lambda/6$, nous avons fait varier les retards au niveau du PEM dans l'objectif de trouver celui qui sépare les différentes phases dans les quatre canaux de la caméra.

2. Démodulation du signal par le modulateur Photoélastique PEM

Pour utiliser le modulateur photoélastique positionné à 45° , il a fallu trouver le retard adéquat pour séparer au mieux les différentes phases du réseau.

Ce retard est exprimé sous forme de fraction de λ .



Répartition du signal dans les quatre canaux de la caméra pendant 20μs en fonction du retard appliqué au PEM

Figure III-8 Répartition du signal dans les quatre canaux, I₁ marron, I₂ gris, I₃ bleu et I₄ jaune, en fonction du retard sur le signal du PEM. L'axe des abscisses représente les délais entre le pulse de 0,5 μs de l'AOTF et le signal de sortie de PEM. Le délai va de 0 μs à 24,25 μs qui représente la période du PEM, avec un incrément de 0,25 μs par image. L'axe des ordonnées représente l'intensité moyenne du signal par canal. Chaque histogramme représente un retard imposé au PEM, allant de 0 à π. Nous n'avons affiché que 6 retards représentant au mieux la variation de la modulation du PEM. On peut observer que seul le retard $\lambda/9$ répartit au mieux le signal dans les quatre canaux.

Pour ce faire nous avons synchronisé le laser avec le photoélastique et introduit un délai à un pulse de $0,5 \mu\text{s}$ avec un pas de $0,2 \mu\text{s}$. Ainsi, nous avons pu créer une série d'images où chaque image représente un délai différent entre le laser et la modulation photoélastique (Figure III-8).

On peut ainsi observer que le retard $\lambda/9$ donne le plus d'amplitude à tous les canaux.

3. Démodulation du signal par 4 phases du réseau

Après avoir caractérisé la modulation du PEM, nous avons essayé de synchroniser le PEM à l'AOTF et à la cellule de Pockels.

Pour commencer nous avons introduit un seul pulse laser de $0,5 \mu\text{s}$ via l'AOTF, synchronisé avec le PEM. On peut en déduire de la Figure III-9 que l'émission sera forcément répartie au minimum dans deux canaux mais on observe surtout que les interférences sont bien maintenues malgré les répétitions et le temps d'exposition de 200 ms de la caméra.

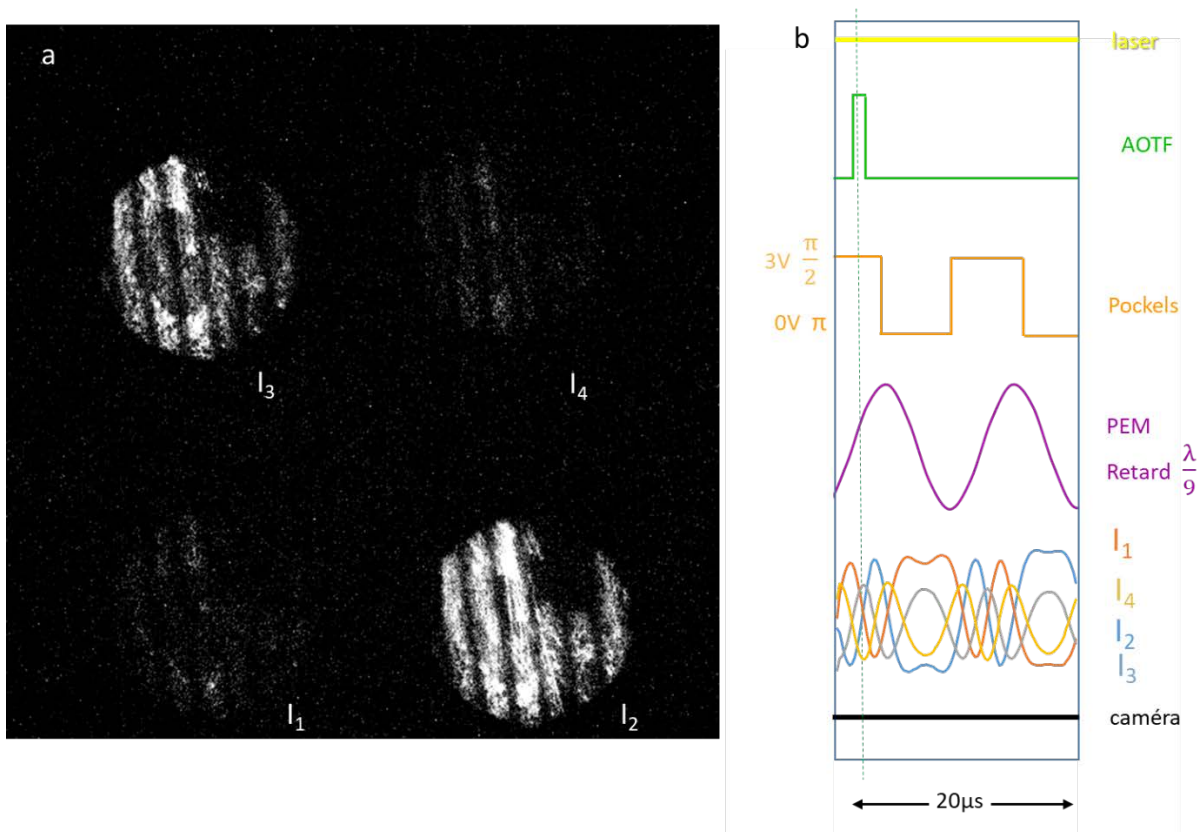


Figure III-9 Répartition d'un pulse laser de $0,5 \mu\text{s}$ avec un délai de $5 \mu\text{s}$ par rapport à la période du PEM lui-même retardé à $\lambda/9$, conditions optimisées de la Figure III-8. (a) Sur des mitochondries (Alexa555) de fibroblastes, le signal d'un seul pulse laser de $0,5 \mu\text{s}$ est principalement détecté dans deux canaux I_3 et I_2 . (b) Répartition du signal sur les quatre canaux avec en pointillé (vert) la position du pulse par rapport à une période du PEM. Synchronisation entre le signal TTL du PEM (violet), de l'amplificateur de la cellule de Pockels (marron) et du signal envoyé à l'AOTF (vert) pour créer un pulse de $0,5 \mu\text{s}$, environ $5 \mu\text{s}$ après le début de la période du PEM.

Dans un deuxième temps nous avons introduit deux pulses correspondant à deux tensions de la cellule de Pockels, représentées en Figure III-10.

Ces deux tensions, de 0 et de 3V, font des interférences avec deux phases complémentaires. Nous avons réussi à répartir ces deux phases dans deux canaux distincts I_1 et I_3 . Mais comme nous l'avons vu sur la Figure III-9 chaque phase est forcément répartie dans deux ou trois canaux.

Ainsi, on retrouve dans les canaux I_2 et I_4 les deux phases complémentaires qui annulent les interférences.

Après de nombreuses combinaisons, nous n'avons pas réussi à répartir trois ou quatre phases distinctes dans quatre canaux de la caméra avec le PEM.

Nous avons alors tenté de diminuer le temps du pulse mais en dessous de $0,5 \mu s$ l'excitation est trop faible pour que la caméra capte un signal, malgré l'addition de celui-ci pendant une pause de la caméra.

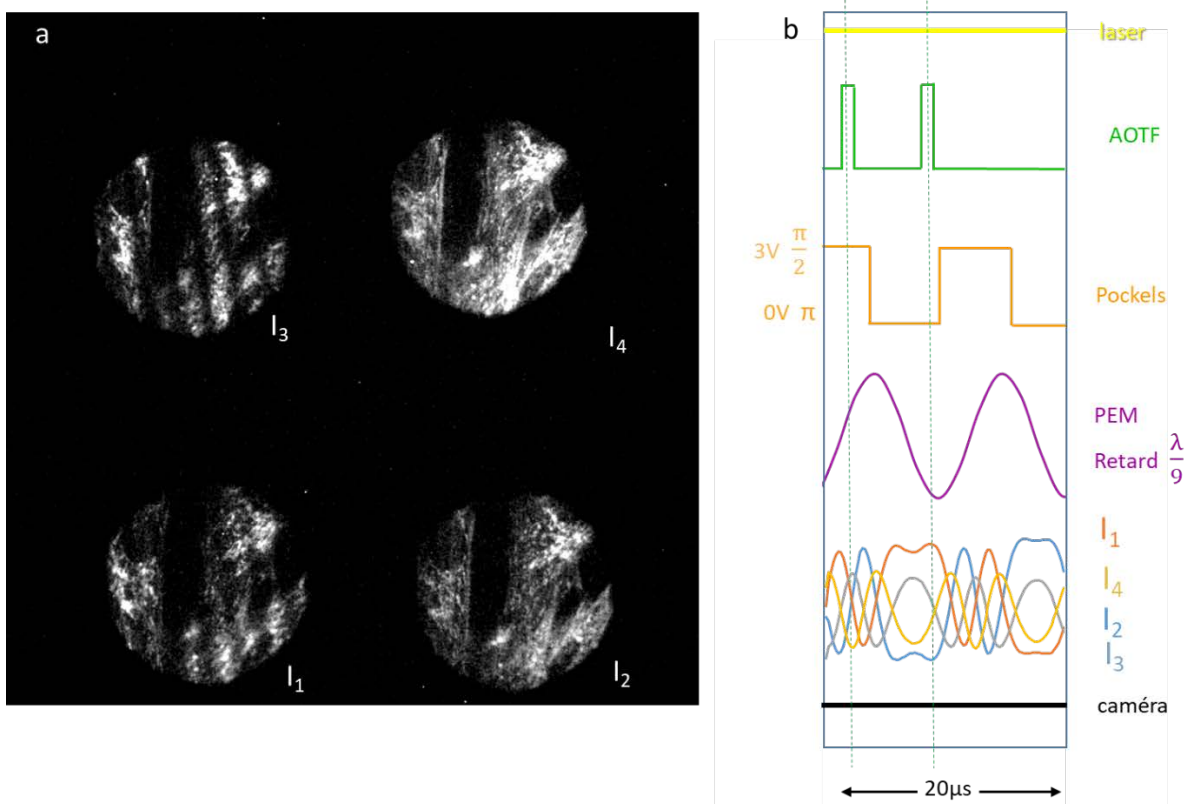


Figure III-10 Répartition de deux pulses laser de $0,5 \mu s$ correspondant à deux tensions 0 et 3V de la cellule de Pockels. Ces deux tensions de 0 et 3V génèrent deux interférences avec des phases complémentaires. (a) Sur des mitochondries (Alexa555) de fibroblastes, on observe que les deux phases se retrouvent respectivement seules dans I_3 et I_1 mais aussi sont présentes toutes les deux dans I_2 et I_4 . La complémentarité des deux phases ne permet plus l'observation des interférences dans I_2 et I_4 . (b) Répartition du signal sur les quatre canaux avec en pointillé (vert) la position des deux pulses par rapport à une période du PEM. (c) Synchronisation entre le signal TTL du PEM (bleu), de l'amplificateur de la cellule de Pockels (orange) et du signal envoyé à l'AOTF (marron) pour créer deux pulses de $0,5 \mu s$, environ $5 \mu s$ après le début de la période du PEM

Pour contourner le problème de la répartition de plus de deux phases sur la caméra, nous nous sommes orientés vers la solution HiLo développée par Jérôme Mertz ⁷¹ dans laquelle il montre que la combinaison d'une image en illumination homogène et d'une image contenant la paterne d'un réseau, permet de soustraire une partie du signal hors focus contenu dans l'image brute.

4. Modulation du signal par deux phases du réseau : LiveHiLo

Comme nous avons pu le voir, on ne peut pas répartir plus de deux phases sur les quatre canaux de la caméra.

De ce fait, nous nous sommes orientés vers la technique HiLo (High-frequency Low-frequency) développée par Jérôme Mertz ⁷², qui est d'utiliser deux seules images : Une image de l'échantillon avec une illumination homogène contenant le signal d'intérêt du plan de focalisation mais contenant aussi le signal des plans supérieurs et inférieurs qui forment le bruit de fond et en parallèle une image du même plan mais avec le motif d'un réseau.

Dans le montage de Jérôme Mertz, ce réseau créé par un modulateur spatial de lumière (SLM Spatial Light Modulator) va spécifiquement moduler le signal du plan de focalisation mais ne modifiera pas le bruit de fond des plans supérieurs et inférieurs. Les deux images sont acquises séquentiellement avec 250 ms de temps d'exposition. Pour terminer nous appliquons un traitement d'images afin d'extraire uniquement le signal du plan focal.

Dans notre montage, en utilisant deux pulses avec deux phases complémentaires, il est possible d'obtenir sur un même temps de pause, une image de l'échantillon avec ou sans motif d'interférences (Figure III-11). Nous appellerons cette méthode par la suite LiveHiLo pour Haute fréquence Basse fréquence en temps réel.

⁷¹ Santos et al., « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle ».

⁷² Santos et al.

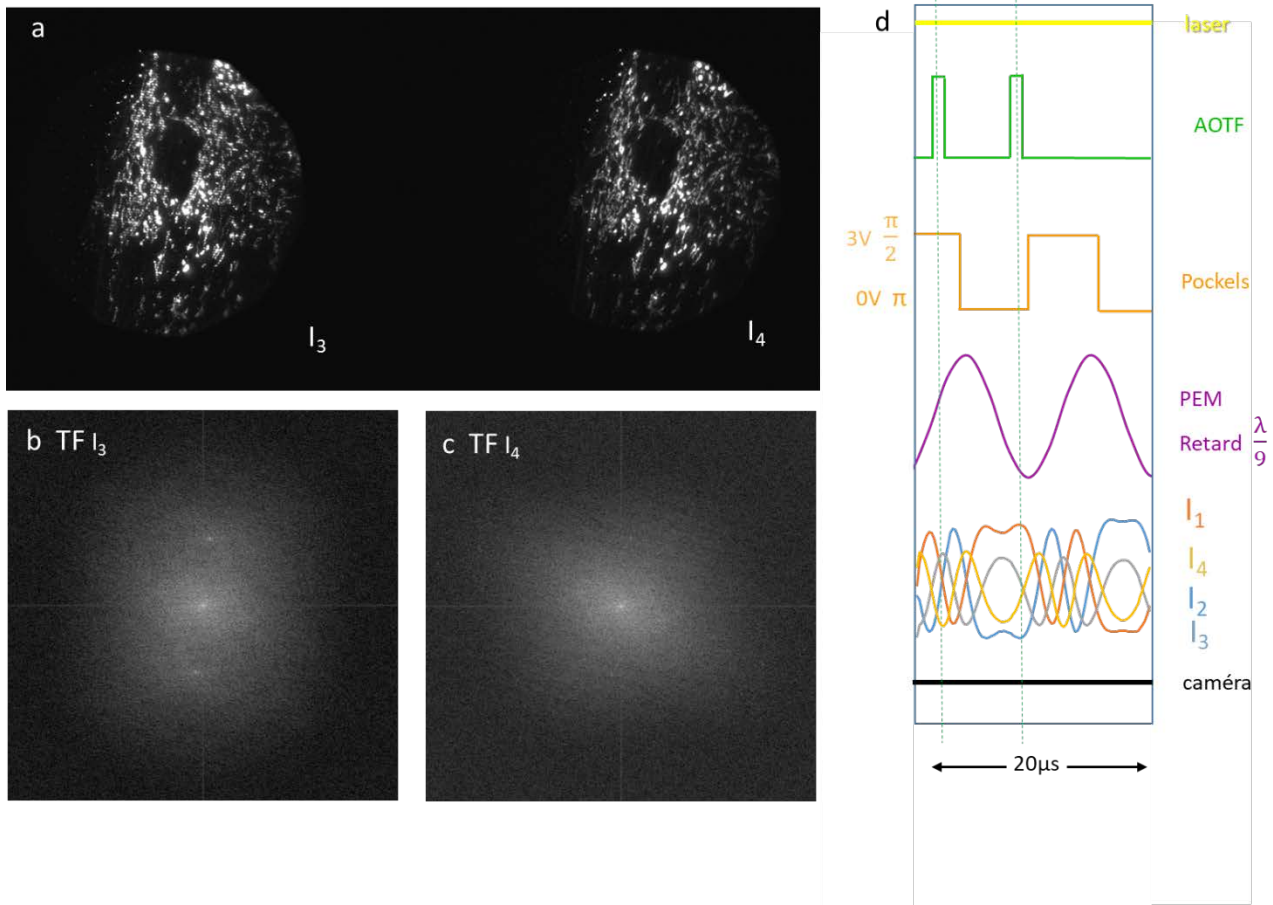


Figure III-11 (a) Image brute comportant les quatre canaux où l'on distingue en I_3 une illumination structurée et en I_4 une illumination homogène venant du cumul des deux phases complémentaires générées par deux pulses. (b et c) Transformées de Fourier TF, respectivement des canaux I_3 et I_4 . Seul la TF de I_3 laisse apparaître la fréquence des interférences. (d) Synchronisation entre le signal du photoélastique PEM (violet), le signal de l'amplificateur de la cellule de Pockels (orange) et le signal de l'AOTF (vert).

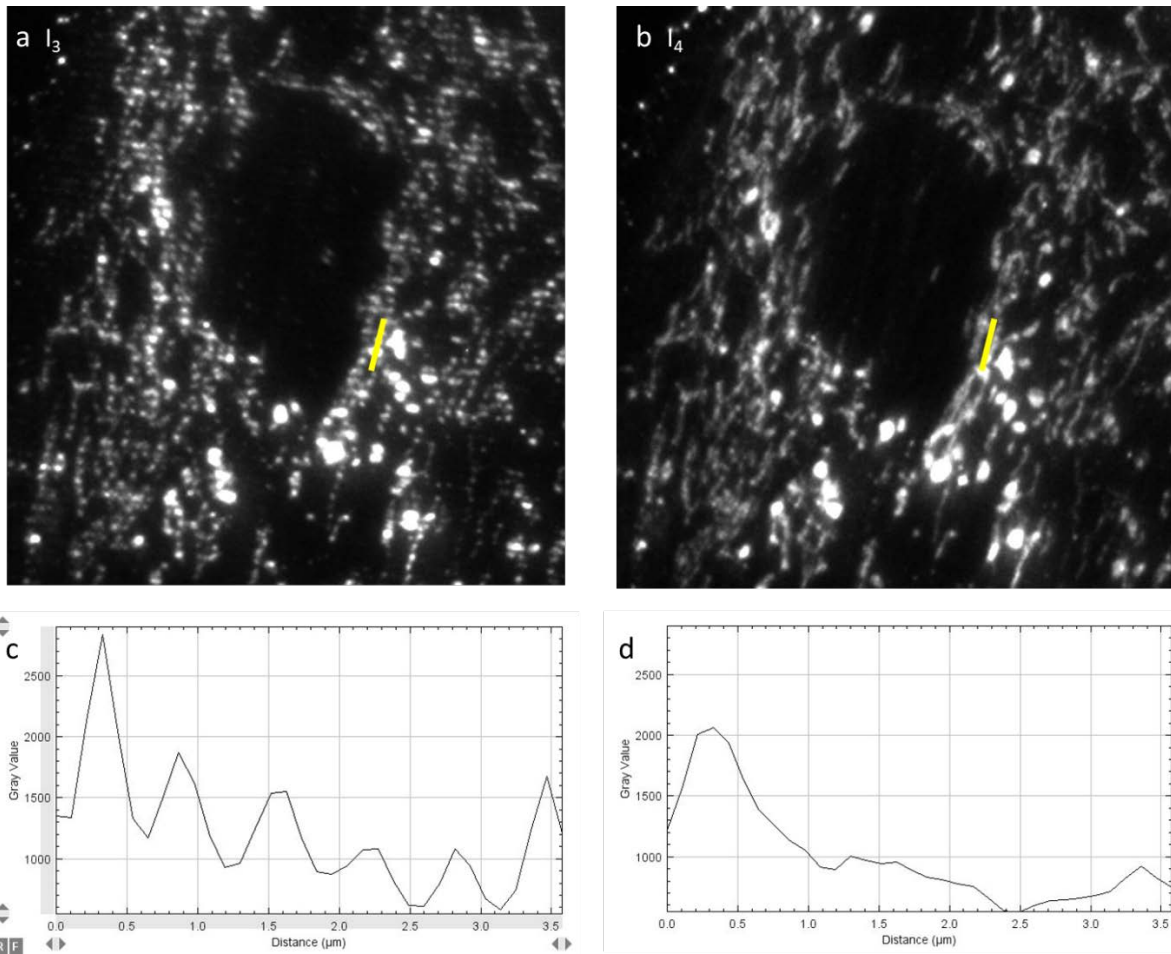


Figure III-12 (a) Illustration sur un zoom de I_3 Figure III-11 avec un profil d'intensité (c) réalisé le long du trait (jaune) où l'on observe les interférences avec une période α expérimentale α_{exp} de 628nm. (b) Illustration sur un zoom de I_4 Figure III-11 avec un profil d'intensité (d) réalisé le long du trait (jaune) au même endroit où l'on observe aucune interférence.

5. Compensation de la déformation des canaux de la caméra

En parallèle des synchronisations, nous avons optimisé l'injection des quatre canaux dans la dernière lentille L2 100 mm (Figure III-1), passant par un seul miroir M3.

Le passage des quatre faisceaux sur les bords de la dernière lentille entraînait une déformation trop importante (Figure III-13). Cela empêchait la reconstruction et la démodulation des images.

Nous avons donc remplacé ce dernier miroir M3 par quatre petits miroirs permettant ainsi de croiser les quatre faisceaux au niveau de la dernière lentille L2 (Figure III-14).

Les quatre faisceaux ne passant plus sur les bords de la lentille L2 cela permet d'observer (b Figure III-13) l'absence de déformation.

Si on calcule le coefficient de corrélation de Pearson r_p ⁷³ (Équation III-1) permettant de comparer des images deux à deux, avec R_i et V_i la valeur du même pixel dans le canal Rouge et Vert, et r et v les valeurs moyennes des pixels dans les deux canaux comparés, on passe d'une moyenne \bar{r}_p entre tous les canaux l_1, l_2, l_3 et l_4 de 0,826 (un seul miroir M3) à 0,974 (quatre miroirs), en sachant que r_p est compris entre -1 et 1 et si $r_p=1$ nous avons deux images identiques.

$$r_p = \frac{\sum_i (R_i - r) \times (V_i - v)}{\sqrt{\sum_i (R_i - r)^2 \times \sum_i (V_i - v)^2}}$$

Équation III-1

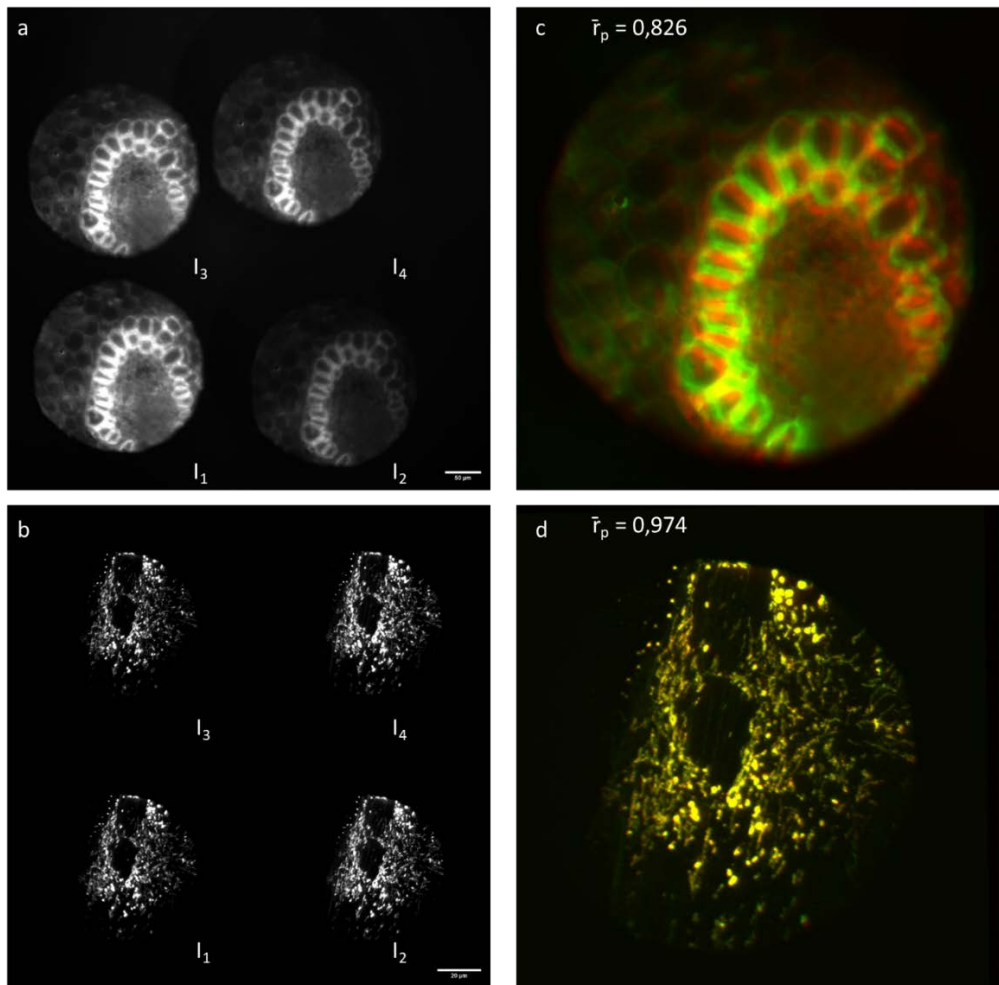


Figure III-13 (a) Image brute de la caméra des quatre canaux utilisant un seul miroir M3 (Figure III-1) avant la caméra. (c) Si on compare les quatre canaux deux à deux en calculant le coefficient de corrélation de Pearson, on obtient une moyenne $\bar{r}_p=0,826$ avec un écart type $\sigma=0,056$. (b) Image brute de la caméra des quatre faisceaux en réduisant le diamètre par le diaphragme de champ. Le dernier miroir a été remplacé par quatre miroirs (Figure III-14) permettant une meilleure injection dans la dernière lentille L2. (d) Comparaison des quatre canaux deux à deux en calculant un coefficient de corrélation. On a en moyenne $\bar{r}_p=0,974$ et $\sigma=0,004$. Cette valeur moyenne de $\bar{r}=0,974$ proche de 1 montre que les déformations sont très limitées.

⁷³ E. M. M. Manders, F. J. Verbeek, et J. A. Aten, « Measurement of Co-Localization of Objects in Dual-Colour Confocal Images », *Journal of Microscopy* 169, n° 3 (mars 1993): 375-82, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03313.x>.

L'utilisation d'une caméra sCMOS, grand capteur de 2048x2048 pixels représentant 13,3x13,3 mm², n'a pas permis de répartir les quatre faisceaux sans un léger chevauchement.

Nous avons dû pour cela rajouter un diaphragme de champ (Figure III-14 et Figure III-15) en sortie du microscope pour réduire le diamètre du faisceau principal d'émission.

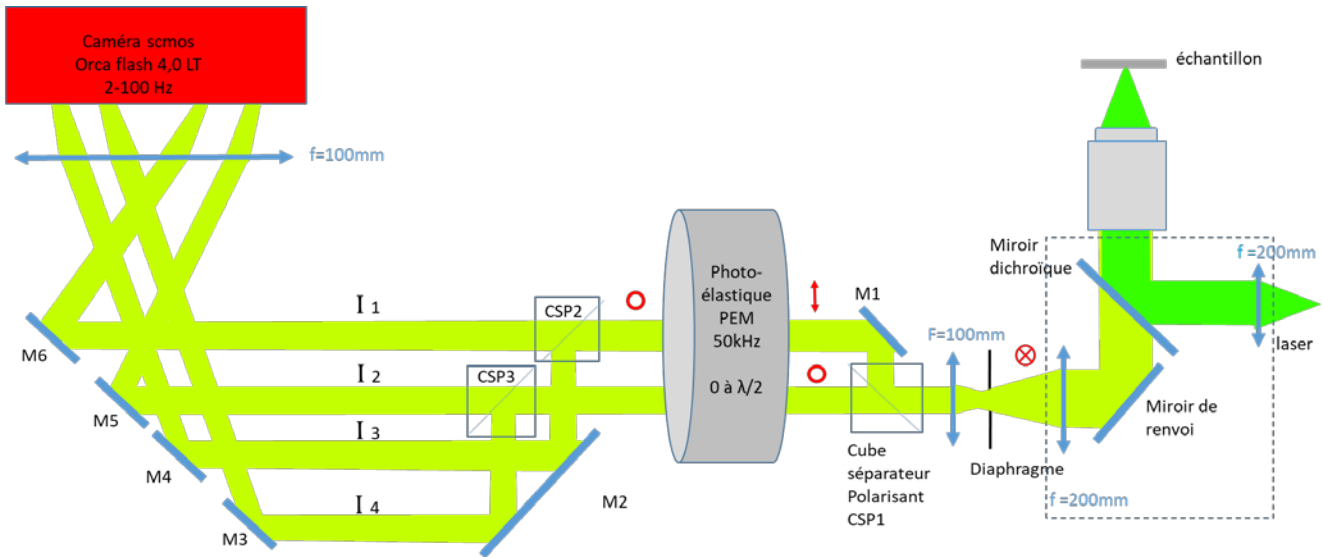


Figure III-14 Partie excitation avec le remplacement du dernier miroir par quatre miroirs indépendants. Cela permet de croiser les canaux au niveau de la dernière lentille L2 et par conséquent, de limiter la déformation due au passage sur les bords de cette même lentille.

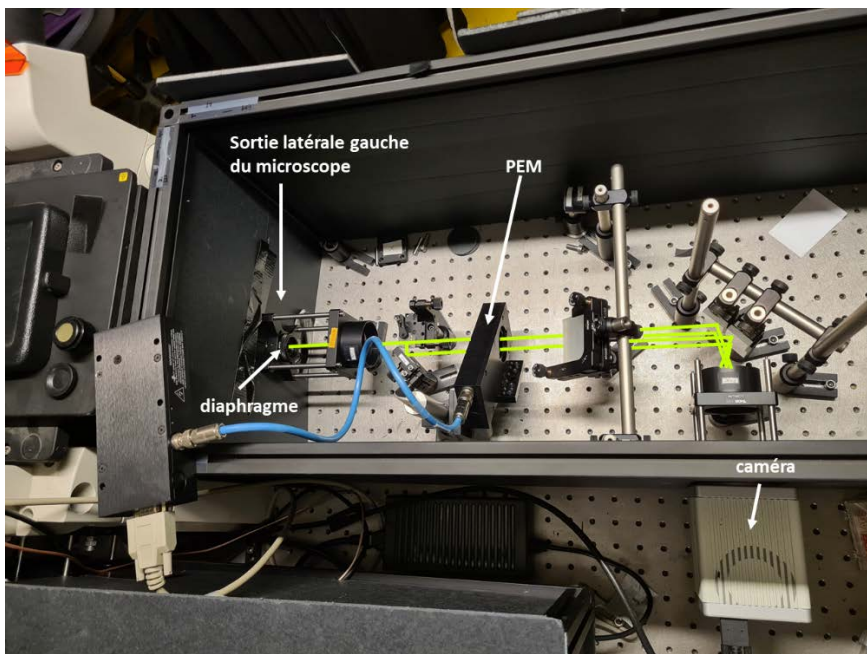


Figure III-15 Photo de la partie émission avec le modulateur photoélastique PEM orienté à 45°. L'ensemble est encagé afin de limiter la pollution lumineuse et seul le corps de la caméra reste à l'extérieur pour limiter les vibrations du ventilateur.

Nous avons diminué au maximum la déformation entre les différents canaux (Figure III-16), bien que toujours présente, du fait que les faisceaux n'utilisent pas le même trajet.

Il s'avère donc indispensable d'appliquer un champ de déformation afin de pouvoir ajuster et de faire coïncider les quatre images issues de chacun des canaux.

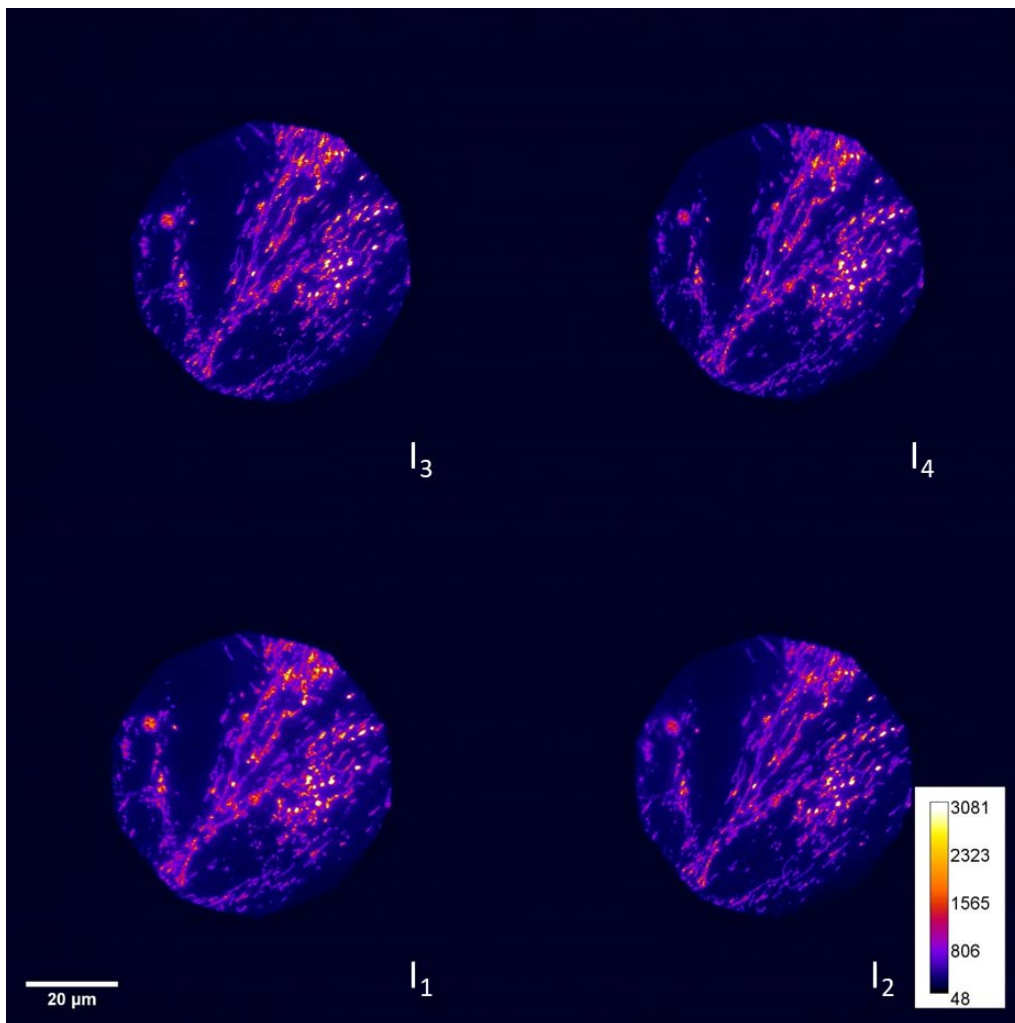


Figure III-16 Cellule Fibroblaste de Muntjacs (cervidés) avec marquage Alexa555 couplé à un anticorps anti complexe V (ATP synthase) présent sur la membrane des mitochondries. Image brute de la caméra avec les quatre canaux. Temps de pause de la caméra d'environ 200 ms, la dynamique du signal est d'environ 2000 sur 2^{16} . On peut observer les quatre canaux qui représentent 30% du capteur de la caméra Orca Flash 4.0 LT (2048x2048 pixels). Objectif 60x huile 1.49 ON

6. Traitement d'images, démodulation

L'image obtenue est composée de 4 parties représentant la même zone de l'échantillon avec une modulation différente. Ces modulations vont dépendre de la synchronisation entre la Pockels et le PEM. Il est ainsi possible d'obtenir l'image du même objet modulé par des interférences et non modulé avec une illumination homogène sur le même temps de pause de la caméra. Le traitement d'images a été entièrement fait sur ImageJ⁷⁴ (Figure III-17)(Annexe V.1).

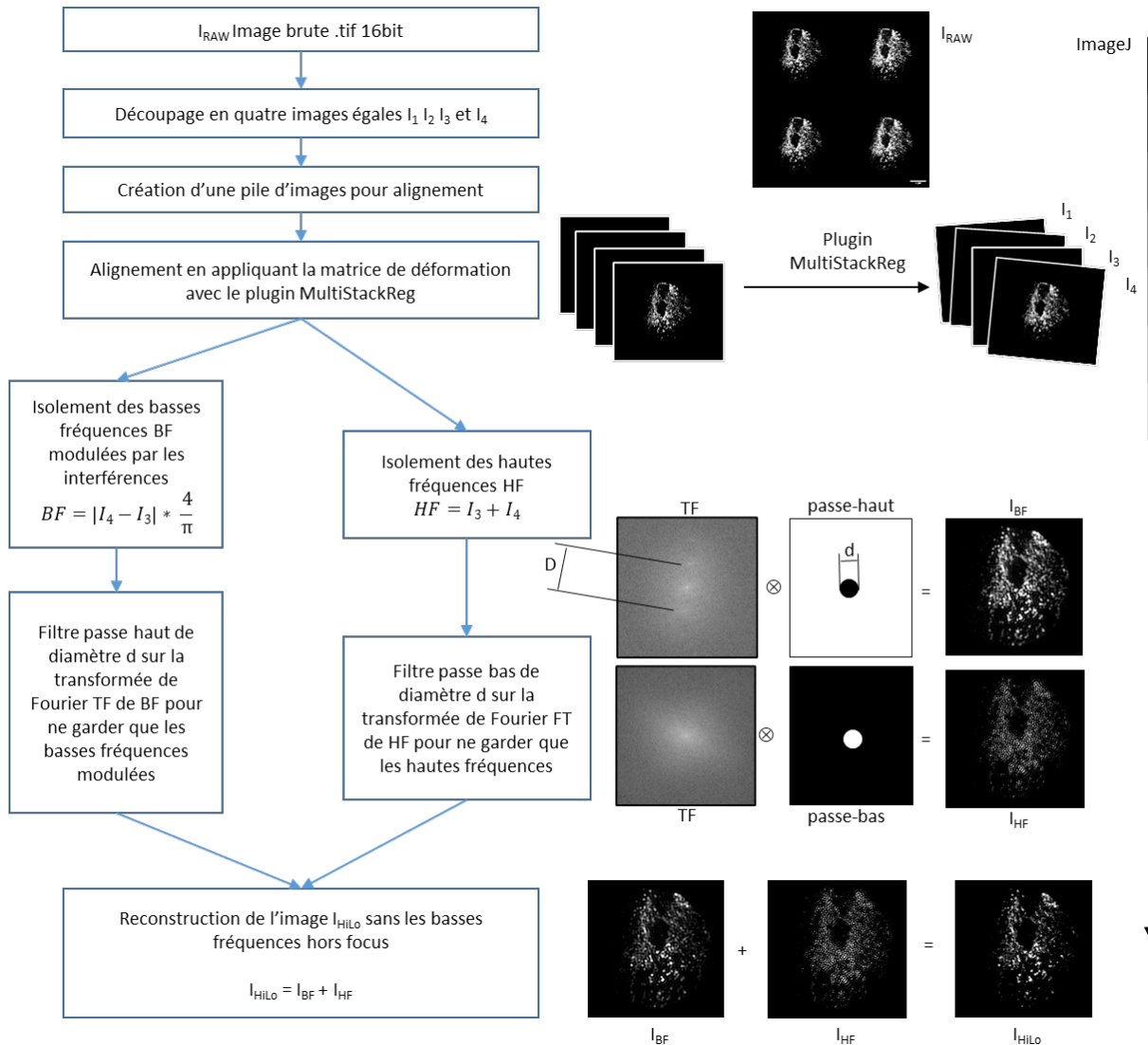


Figure III-17 Étapes du traitement d'images effectué avec ImageJ (Annexe V.1) permettant de soustraire les basses fréquences, hors focus non modulées. Après avoir découpé l'image brute I_{RAW} en quatre images I_1, I_2, I_3 et I_4 , on aligne en appliquant l'inverse d'une matrice de déformation avec le plugin MultiStackReg⁷⁵. Par la suite on isole les basses fréquences I_{BF} modulées par les interférences en soustrayant I_3 à I_4 et en appliquant un

⁷⁴ Caroline A. Schneider, Wayne S. Rasband, et Kevin W. Eliceiri, « NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis », *Nature Methods* 9, n° 7 (juillet 2012): 671-75, <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.

⁷⁵ P. Thevenaz, U.E. Ruttimann, et M. Unser, « A pyramid approach to subpixel registration based on intensity », *IEEE Transactions on Image Processing* 7, n° 1 (janvier 1998): 27-41, <https://doi.org/10.1109/83.650848>.

filtre passe haut sur la transformée de Fourier de diamètre d , où $d < D$, D étant la distance entre les deux pics de Dirac de la fréquence des interférences.

Dans un premier temps, on observe que l'image brute I_{RAW} est coupée en quatre parties représentant les quatre chemins. De plus les quatre sous images doivent être alignées à cause de la déformation. Pour cela nous avons utilisé le plugin MultiStackReg ⁷⁶.

Ce plugin permet de créer des matrices de déformation grâce à trois algorithmes. En effet ces algorithmes compensent soit une déformation par translation, soit par rotation, ou soit par transformation affine. Nous avons utilisé la fonction affine car elle permet de prendre en compte les trois déformations en même temps. L'utilisation du plugin nécessite de calibrer le système en créant une matrice de vecteur. Cette calibration doit être faite sans créer d'interférences afin d'obtenir le signal sans modulation sur les quatre sous-images. Ce système est assez stable mais il nécessite un recalibrage mensuel, recréant une matrice de vecteurs.

Après avoir aligné les quatre canaux, on isole les basses fréquences modulées I_{BF} en soustrayant $I_4 - I_3$, et en appliquant un masque passe-haut pour supprimer toutes les hautes fréquences dans l'espace de Fourier. En parallèle, on isole les hautes fréquences modulées I_{HF} en additionnant I_3 et I_4 et avec le même masque inversé passe-bas, ce qui supprime les basses fréquences.

Pour ce faire le diamètre $d=150$ pixels des filtres passe-haut et passe bas doit être inférieur à $D=350$ pixels, D étant la distance entre les deux pics de Dirac de la fréquence des interférences dans l'espace de Fourier. En additionnant l'image de la transformée inverse des basses fréquences I_{BF} et des hautes fréquences I_{HF} , on obtient ainsi une image résultat I_{HILo} ne comportant que les hautes fréquences et les basses fréquences modulées au plan focal soustraites des basses fréquences non modulées hors plan de focalisation. Ce traitement fait référence à l'article ⁷⁷.

On va pouvoir maintenant adapter le diamètre d du masque passe-haut et passe-bas de la transformée de Fourier. La transformée de Fourier nous permet également d'observer la présence du réseau même à des hautes fréquences.

⁷⁶ Thevenaz, Ruttimann, et Unser.

⁷⁷ Santos et al., « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle ».

B. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons détaillé la partie émission de notre système et expliqué la manière dont nous avons synchronisé la partie excitation et émission, pour moduler et démoduler le signal afin d'obtenir nos images LiveHiLo. (Figure III-18 Figure III-19)

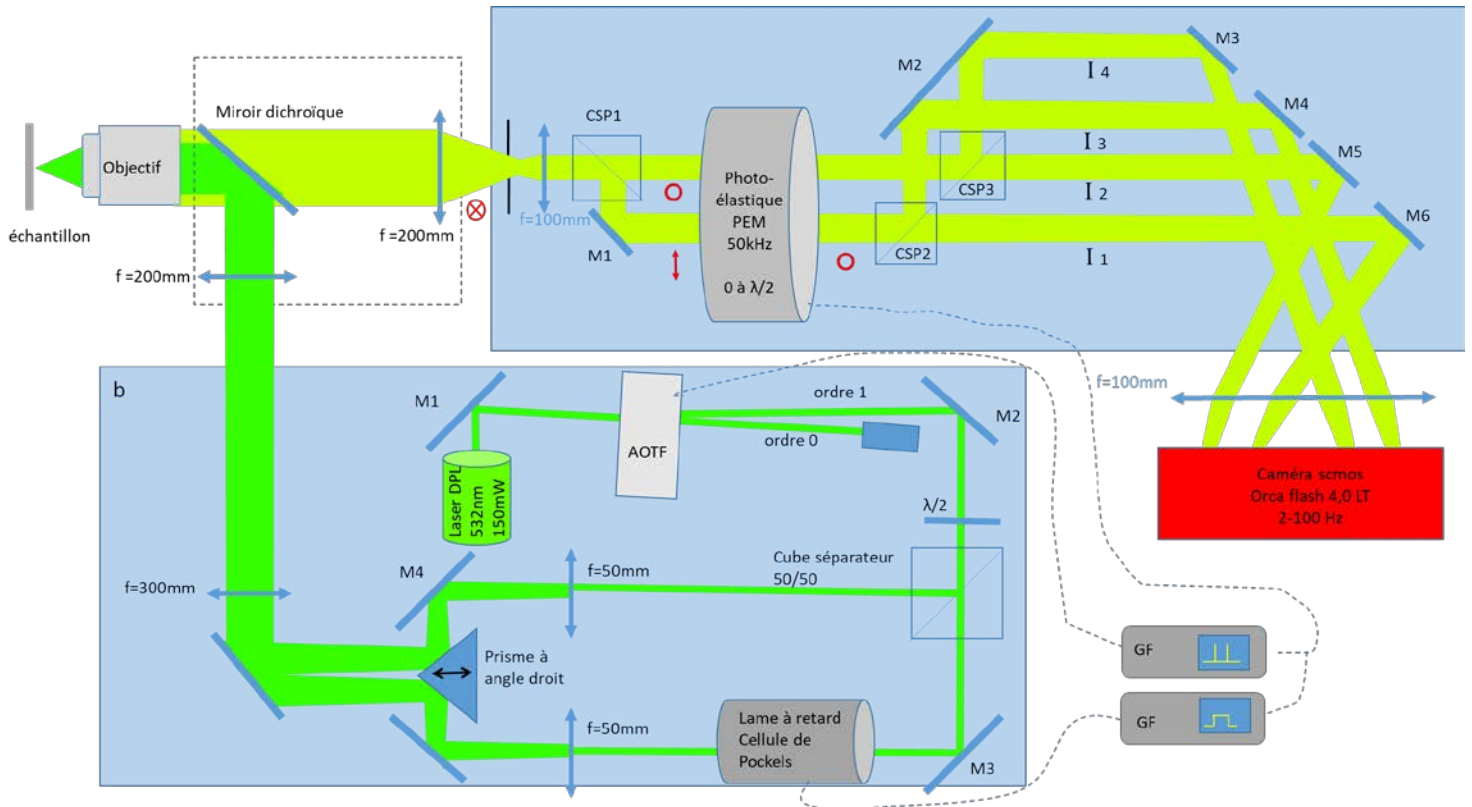


Figure III-18 Schéma du montage complet comprenant les parties d'excitation (a) et d'émission (b) qui sont isolées et engagées pour limiter la pollution lumineuse et les vibrations de l'extérieur, comme les ventilateurs. La synchronisation entre le PEM et la partie émission se fait avec deux générateurs de fonction GF. Chacun reçoit le signal du PEM pour synchroniser le signal envoyé soit à l'AOTF soit à la cellule de Pockels.

En partant du fait que le signal d'émission de fluorescence n'a pas de polarisation particulière, on peut répartir ce signal dans quatre canaux de la caméra, grâce à un modulateur photoélastique qui fait tourner la polarisation en sortie de microscope à une cadence élevée.

Nous avons réussi à synchroniser le modulateur photoélastique à l'AOTF et à la cellule de Pockels. Cependant la période du PEM de 20 μ s est encore trop courte pour répartir spécifiquement plus de deux phases des interférences, dans les quatre canaux de la caméra, sans perte de signal.

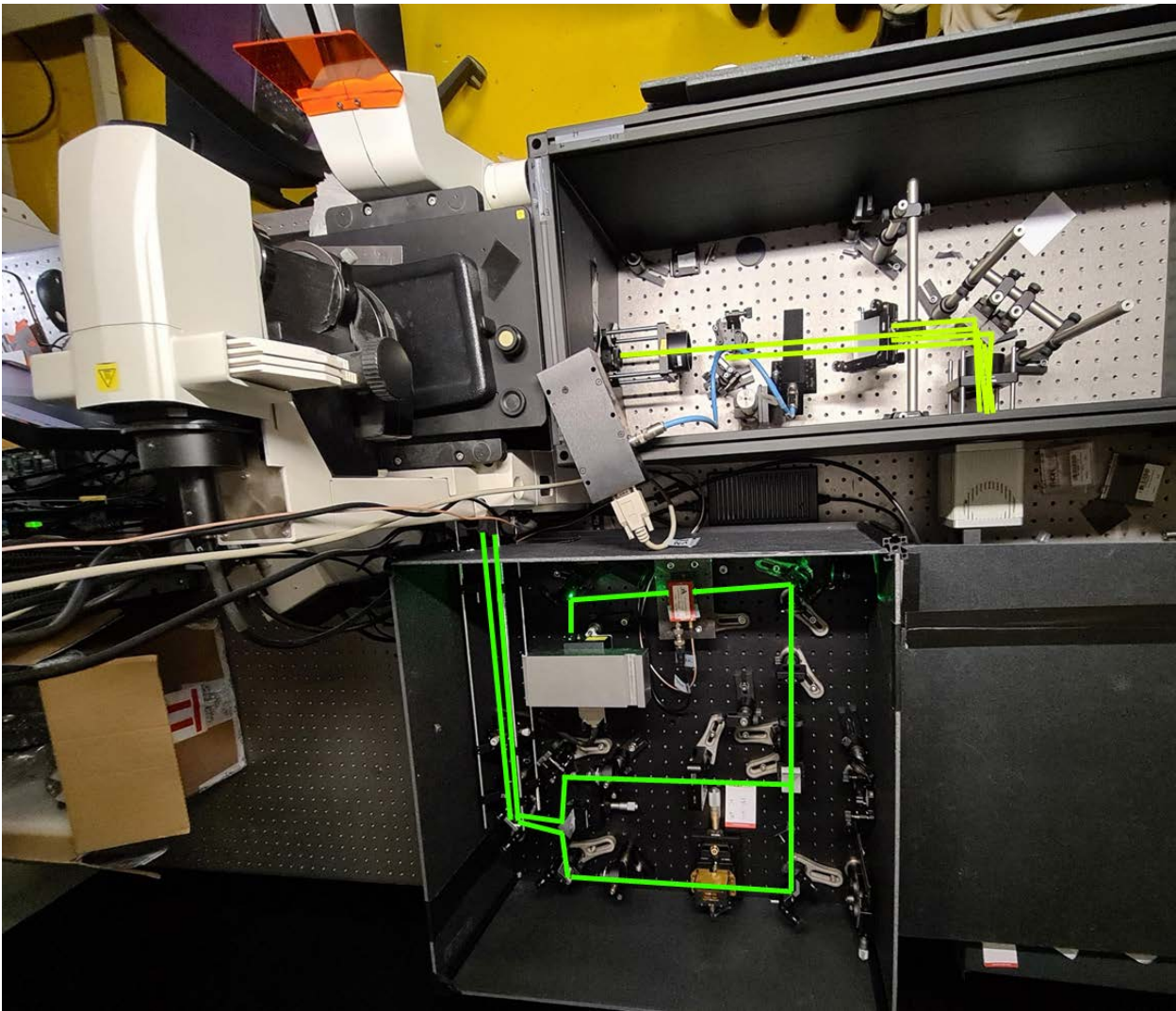


Figure III-19 Photo du montage complet comprenant les parties excitation et émission, isolées et engagées pour limiter la pollution lumineuse et les vibrations de l'extérieur, comme par exemple les ventilateurs.

Nous nous sommes alors orienté vers la technique HiLo ⁷⁸ nécessitant l'utilisation de deux seules images. Une image avec une illumination homogène et une deuxième image avec une illumination structurée.

Pour finir, nous avons essayé de limiter le plus possible la déformation entre les différents canaux de la caméra permettant ainsi d'obtenir un meilleur traitement d'images HiLo.

Le traitement d'images HiLo nous permet de retirer une partie de la fluorescence hors focus car cette dernière n'est pas modulée par le réseau.

De ce fait on peut isoler le signal d'intérêt présent uniquement dans la profondeur de champ du bruit provenant de la fluorescence hors champ.

⁷⁸ Santos et al.

Ce sectionnement grâce à l'acquisition simultanée LiveHiLo peut être réalisé sans allonger le temps d'exposition et sans ajouter de séquence, ni d'augmenter les puissances laser.

Ainsi nous restons sur les mêmes bases d'un microscope plein champ, tout en utilisant des puissances plus faibles, limitant l'irradiation des échantillons.

Résultats

Après avoir expliqué dans les chapitres précédents le principe et l'implémentation choisie pour la technique LiveHiLo, nous allons maintenant présenter les résultats des mesures obtenues.

Dans une première partie, nous présenterons les performances en termes de sectionnement du LiveHiLo en le comparant aux observations de microscopie en champ large classique. Nous utilisons d'abord des échantillons dont la structure et la géométrie sont connues afin de caractériser les performances du montage expérimental. Pour cela, nous utiliserons des billes fluorescentes de 5 microns de diamètre marquées en surface, adaptées pour mettre en évidence la capacité de sectionnement du montage expérimental. Puis, nous étudierons les performances sur des cellules (cellules épithéliales d'ostéosarcome humain et fibroblastes de Muntjacs) pour lesquelles les microtubules et les mitochondries ont respectivement été marqués.

Dans une deuxième partie nous présenterons les résultats de tomographie 3D avec un scan axial mettant pleinement en valeur la rapidité et la simplicité de cette technique de LiveHiLo avec une seule pause par position. L'observation de plusieurs types cellulaires permet de caractériser le profil axial des piles d'images et d'observer les performances en termes de sectionnement.

Enfin, nous comparerons les performances de LiveHiLo en fonction de l'éclairement par rapport aux techniques de plein champ classique et de spinning disk. Cet aspect est essentiel par rapport à la phototoxicité pour une observation de cellules vivantes.

IV. Caractérisation

A. Performances du LiveHiLo en termes de sectionnement

Dans cette partie, nous présenterons les résultats obtenus avec LiveHiLo comparé à la microscopie plein champ classique. Le sectionnement provient de la capacité du LiveHiLo de filtrer le signal de fluorescence provenant des plans hors focus. Nous utiliserons dans un premier temps des échantillons calibrés formés de billes de 5 microns fluorescentes en surface. Dans un deuxième temps nous présenterons des résultats sur des réseaux de microtubules et sur des mitochondries dans des cellules fixées.

1. Sectionnement de billes micrométriques

Les micro-billes marquées en surface présentent une géométrie bien adaptée pour l'observation et la caractérisation du sectionnement axial. En effet, dans le plan de focalisation le sectionnement prend la forme d'un cercle dont le diamètre permet de remonter directement à la position axiale avec une précision de quelque dizaine de nanomètres. Le niveau de fluorescence inscrit dans les cercles provient uniquement des émissions hors champ. Ce découplage spatial des émissions dans le plan de focalisation et hors plan permet de remonter précisément à l'origine du signal. La taille des micro billes est suffisamment grande pour

typiquement s'étendre sur plusieurs profondeurs de champ et pour permettre un sectionnement efficace.

L'échantillon est constitué de billes de 5 µm de diamètre en polystyrène. Leur indice de réfraction est $n=1.59$, elles sont recouvertes de streptavidine couplées à des anticorps CF568 biotinylés et montées entre lame et lamelle ($n=1.5$) avec du milieu de montage ProLong Gold $n=1.47$. Au centre de la bille et à l'extérieur, le signal ne peut venir que des plans hors focalisation. Par contre sur la périphérie de la bille le signal viendra du plan focalisation et des plans hors focalisation.

On peut observer sur la Figure IV-1 la différence de l'intensité du signal entre l'illumination homogène (Wide-Field WF en anglais) (I_{4WF}) et l'image reconstruite ($I_{LiveHiLo}$) le long des courbes de profils radiaux des billes avant et après soustraction par LiveHiLo. Le signal venant des plans hors focus observé principalement au centre et à l'extérieur de la bille, a été retiré permettant un meilleur contraste et de mieux discriminer le signal provenant du plan d'observation du bruit de fluorescence hors plan.

$$Ratio = \frac{I_{4WF} - I_{LiveHiLo}}{I_{4WF}}$$

Équation IV-1

La Figure IV-2 montre les mesures de la largeur à mi-hauteur⁷⁹ sur le bord d'une bille. On passe d'une valeur médiane de $FWHM_{WF}=1,44\mu m$ à une valeur médiane $FWHM_{LiveHiLo}=0,94\mu m$ permettant un gain de 35% en moyenne sur la largeur des anneaux des images LiveHiLo.

Nous avons effectué une série de mesures sur des échantillons biologiques.

Nous avons utilisé des échantillons formés de cellules épithéliales d'ostéosarcome humain U2OS avec marquage tubuline au CF568 (Figure IV-3), et fibroblastes de Muntjacs (cervidés) avec marquage à l'Alexa555 couplé à un anticorps anti complexe V (ATP synthase) présent sur la membrane des mitochondries (Figure IV-4).

Dans tous les cas on peut observer un gain en résolution dû à la soustraction des signaux hors focus.

⁷⁹ Romain Guiet, « doFWHM.ljm », GitHub Gist, 2019, <https://gist.github.com/romainGuiet/42395587d1193536b7a0858f72db4aca>.

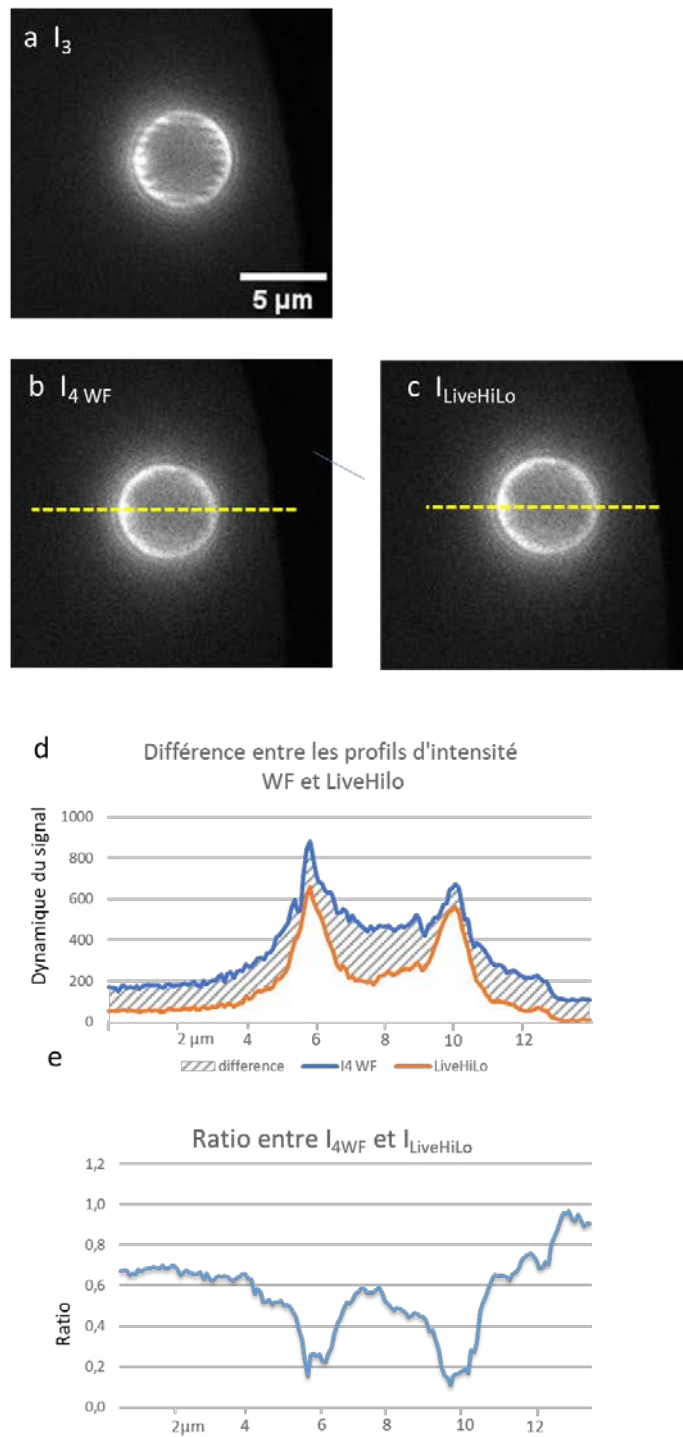
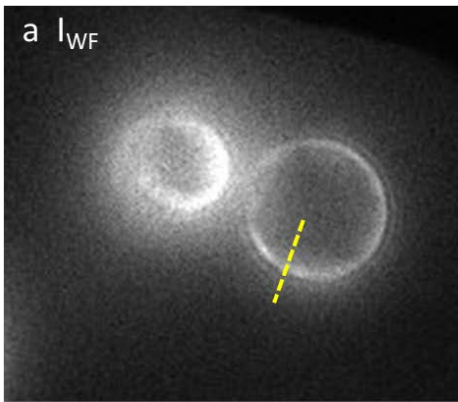
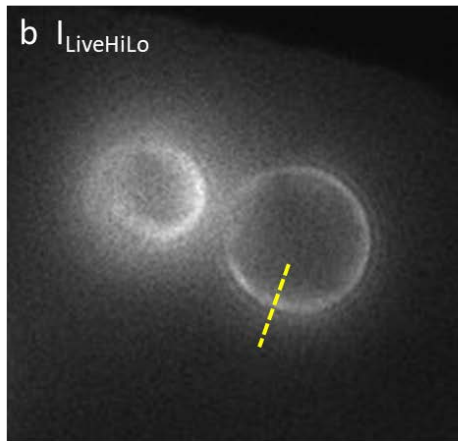


Figure IV-1 Section de billes de $5\ \mu\text{m}$ recouvertes avec un anticorps CF568. (a) billes avec une illumination structurée, (b) I_4 billes éclairées avec une illumination homogène. (c) signal après reconstruction. (d) En comparant l'intensité du signal le long du trait d'intérêt (jaune pointillé) entre $I_{4\text{ WF}}$ et I_{LiveHiLo} , le signal diminue faiblement sur l'anneau de la bille alors qu'il diminue fortement au centre de la bille et à l'extérieur. (e) Le ratio (Équation IV-1) entre $I_{4\text{ WF}}$ et I_{LiveHiLo} montre qu'au niveau de l'anneau, le signal, entièrement modulé par l'illumination structurée, tend vers 0 alors qu'au centre de la bille et à l'extérieur de la bille le ratio tend vers 1 car la majorité du signal n'a pas été modulée et a été retirée.



valeur médiane sur 10 mesures
 $FWHM_{WF} = 1,44 \mu\text{m}$



valeur médiane sur 10 mesures
 $FWHM_{LiveHiLo} = 0,941 \mu\text{m}$

épaisseur des anneaux des
 billes de $5\mu\text{m}$ FWHM (μm)

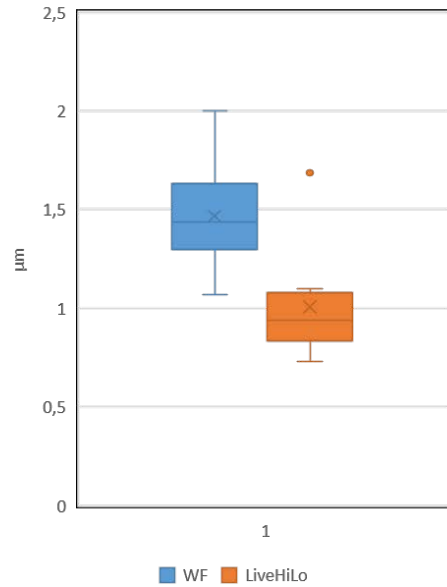


Figure IV-2 Mesure de la largeur à mi-hauteur des anneaux des billes CF568 de $5 \mu\text{m}$ de diamètre. Les mesures sont faites sur plusieurs billes avec des angles différents. On observe un gain de 35% en moyenne sur la largeur des anneaux des images LiveHiLo.

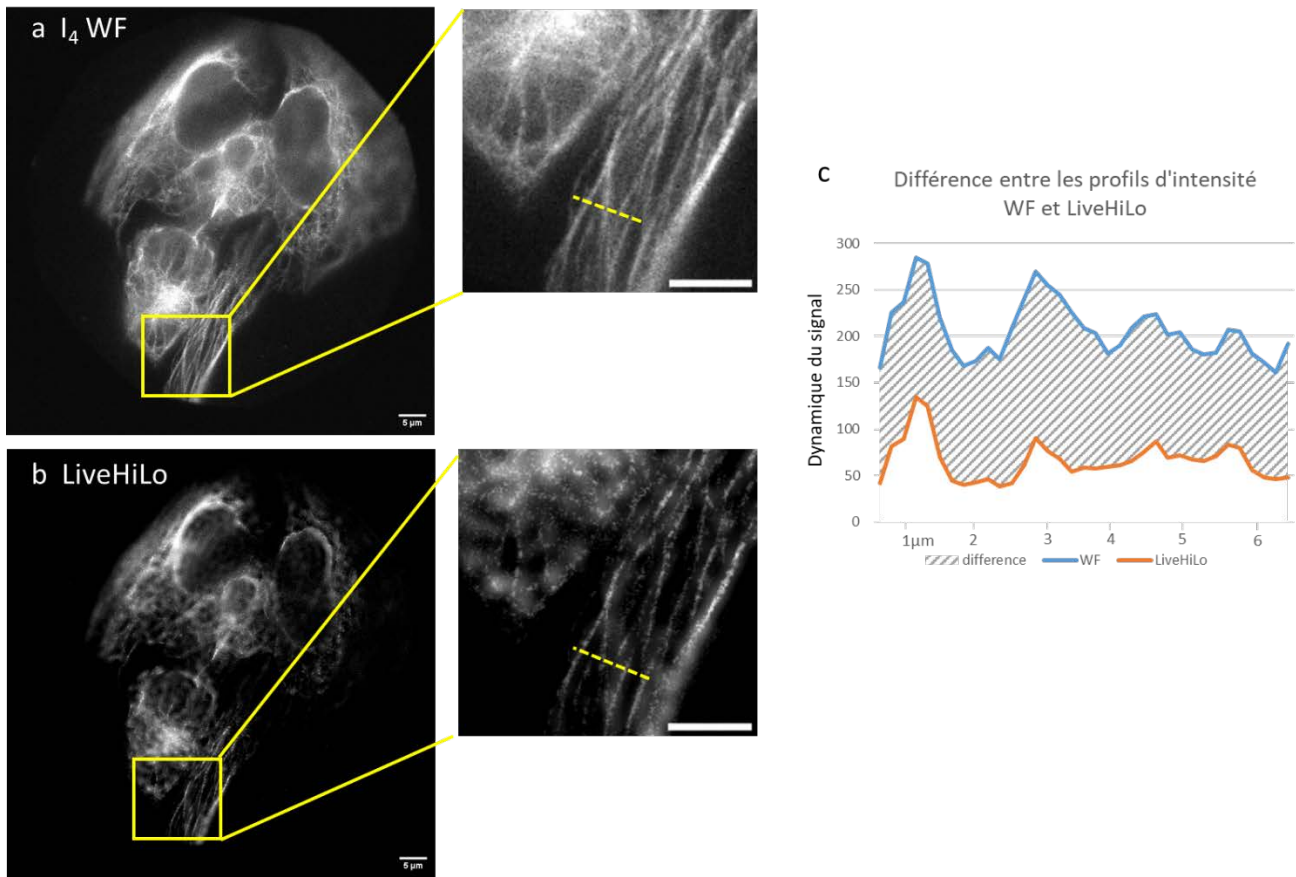


Figure IV-3 Comparaison de la dynamique du signal entre les images (a) Widefield et (b) LiveHiLo sur des microtubules de cellules épithéliales d'ostéosarcome humain U2OS avec marquage de la tubuline à la CF568. (c) Le profil d'intensité bleu représente la dynamique du signal le long du trait jaune en pointillé sur le zoom de l'image widefield. Le profil d'intensité rouge représente la même zone mais sur le zoom de l'image LiveHiLo. En hachuré gris, la différence de signal entre les deux techniques.

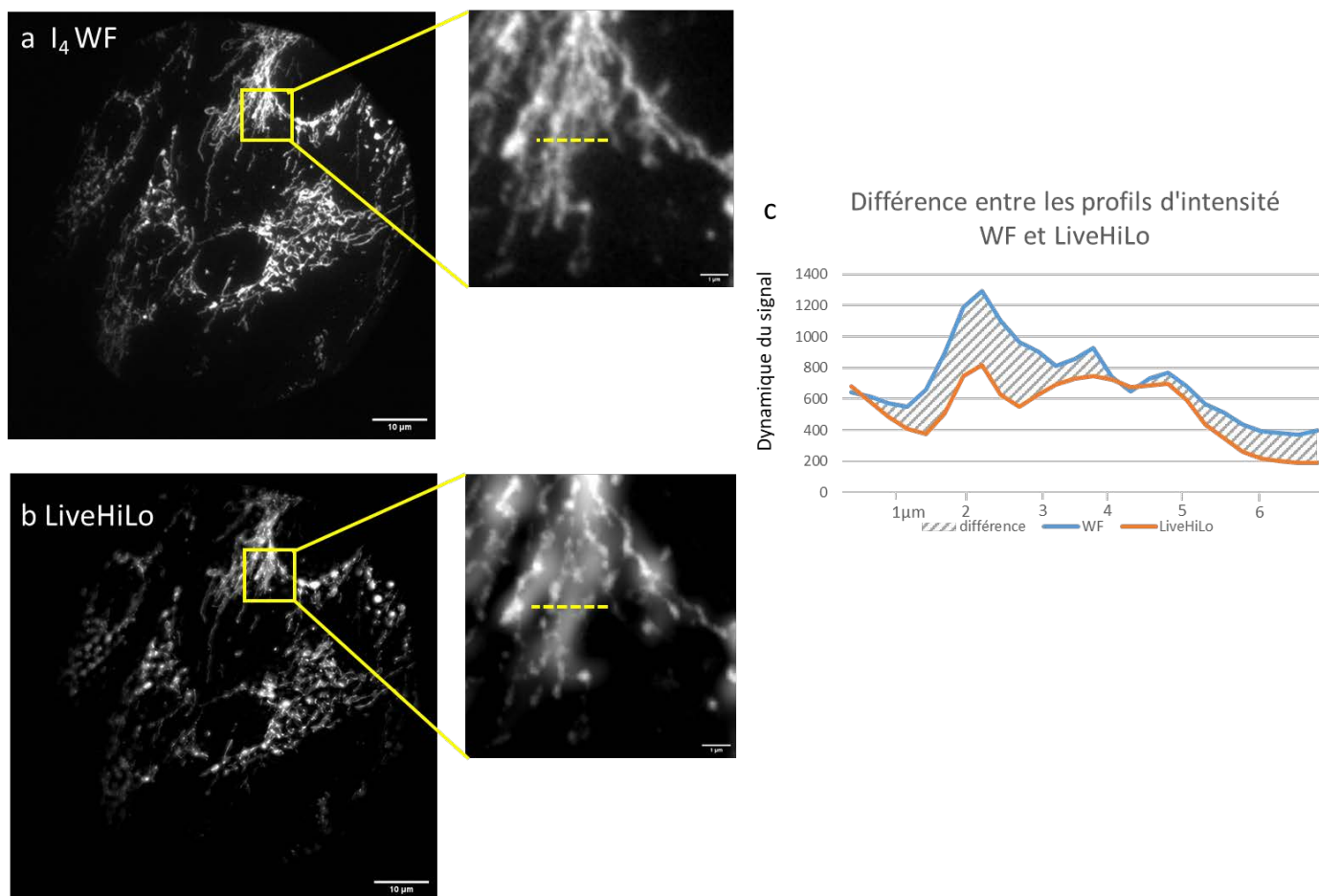


Figure IV-4 Comparaison de la dynamique du signal entre les images (a) Widefield et (b) LiveHiLo sur des mitochondries de fibroblastes de Muntjacs avec un marquage à l'Alexa555. (c) Le profil d'intensité bleu représente la dynamique du signal le long du trait jaune en pointillé sur le zoom de l'image widefield. Le profil d'intensité rouge représente la même zone mais sur le zoom de l'image LiveHiLo. En hachuré gris, la différence d'intensité entre les deux techniques.

2. Balayage axial, sectionnement d'un volume

L'un des avantages d'avoir toutes les informations dans une seule image, c'est de pouvoir synchroniser la fréquence d'acquisition de la caméra avec une bague piézoélectrique qui déplace l'objectif le long de l'axe optique. On parle alors d'acquisition en flux continu (Stream Z).

Il est maintenant possible de faire l'acquisition rapide du volume d'un objet sans faire de pause entre chaque déplacement en Z, et avec comme seul point limitant, le temps d'exposition de la caméra.

Excepté l'utilisation des techniques de microscopie plein champ, de feuille de lumière⁸⁰ et de microscopie spinning disk⁸¹, il est impossible de faire une acquisition en flux continu avec les techniques de microscopie confocale par scanner à point et microscopie SIM.

En effet le temps d'acquisition d'un plan est trop long, environ une seconde, pour qu'il y est un intérêt à synchroniser le déplacement en Z avec une bague piézoélectrique.

Après avoir synchronisé une bague piézoélectrique (E665XR de chez *PI*) avec la caméra via une carte convertisseur numérique-analogique (DAqBoard2000 de chez *Measurement Computing*) nous avons pu facilement faire l'acquisition d'une pile d'images en Z avec un pas de déplacement de 0,3 μm .

Le pas de déplacement doit être inférieur à la moitié de la résolution axiale de notre objectif ($r_{zWF} = 0,67 \mu\text{m}$ cf. Équation I-2) si on veut respecter le théorème de Nyquist-Shannon⁸² sur l'échantillonnage.

On peut ainsi observer en Figure IV-5, sur un échantillon plus épais que la profondeur de champ, que les interférences sont présentes sur tous les plans où se trouve l'échantillon. Sur une coupe orthogonale (e Figure IV-5) le long d'une ligne d'intérêt (a-d Figure IV-5) on observe aussi la présence des interférences uniquement au niveau de l'échantillon, représentant en moyenne 30 μm sur les 50 μm de l'acquisition en Z.

De la même façon, sur un échantillon plus petit que la profondeur de champ (Figure IV-6), on peut observer que les interférences sont présentes uniquement sur 2 ou 3 plans (Figure IV-6e). Sur la coupe orthogonale le long d'une ligne d'intérêt (Figure IV-6a-d) on observe aussi la présence des interférences uniquement au niveau de l'échantillon, représentant en moyenne 1 à 2 μm sur les 11 μm de l'acquisition en Z.

Plus l'objet aura une taille supérieure à la profondeur de champ, plus l'effet du traitement d'images sera efficace. En effet, plus les signaux hors focus non modulés seront retirés, meilleur sera le sectionnement optique.

⁸⁰ Voie, Burns, et Spelman, « Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning ».

⁸¹ Nakano, « Spinning-Disk Confocal Microscopy. A Cutting-Edge Tool for Imaging of Membrane Traffic. »

⁸² C.E. Shannon, « Communication in the Presence of Noise », *Proceedings of the IRE* 37, n° 1 (janvier 1949): 10-21, <https://doi.org/10.1109/JRPROC.1949.232969>.

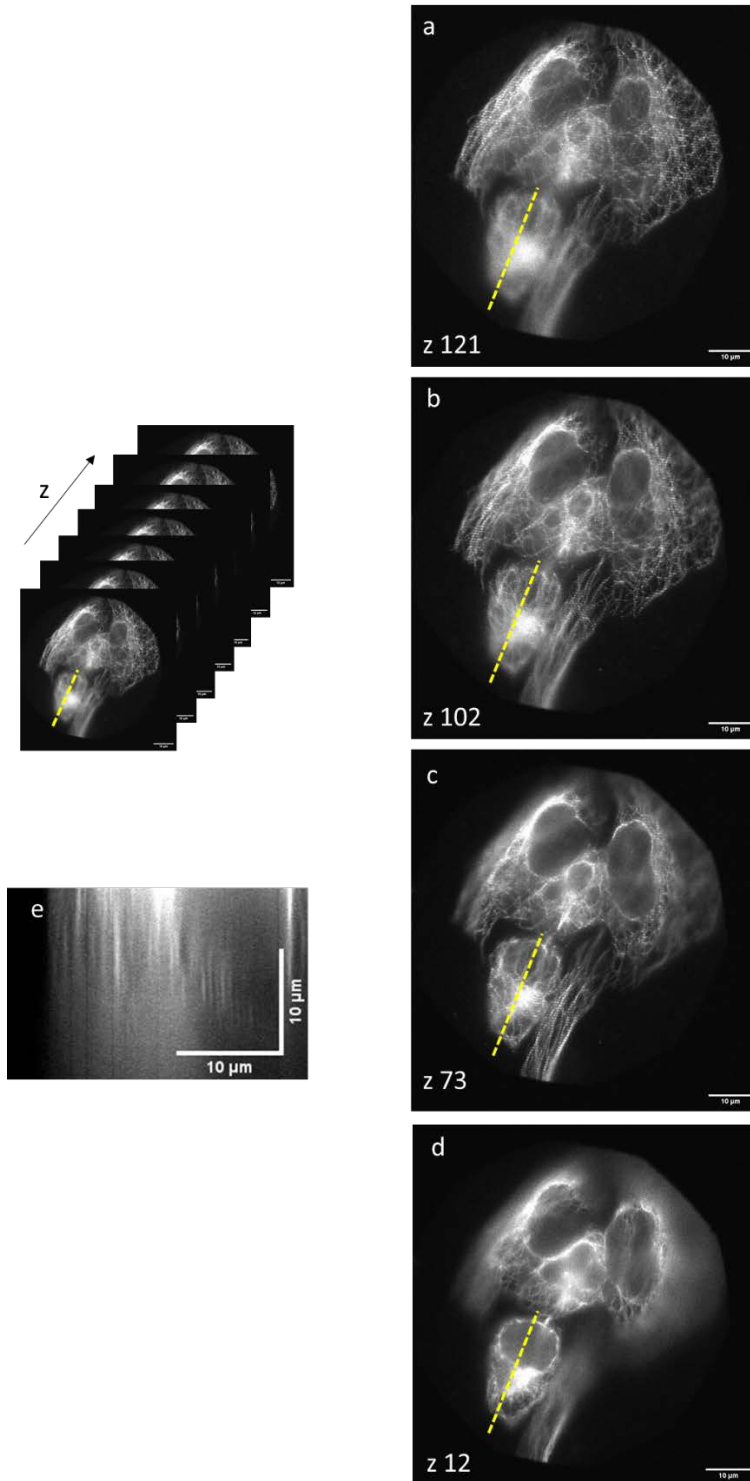


Figure IV-5 Cellules épithéliales d'ostéosarcome humain U2OS avec marquage de la tubuline au CF568. Acquisition d'une pile d'images en Z de 167 images prises tous les 0,3 μm sur un total de 50 μm. (a – d) Sur un échantillon plus épais que la profondeur de champ, on peut observer que les interférences sont présentes sur tous les plans où se trouve l'échantillon. (e) Coupe orthogonale le long de la ligne d'intérêt (jaune pointillé) où l'on observe aussi la présence des interférences uniquement au niveau de l'échantillon, représentant en moyenne 30 μm sur les 50 μm de l'acquisition en Z.

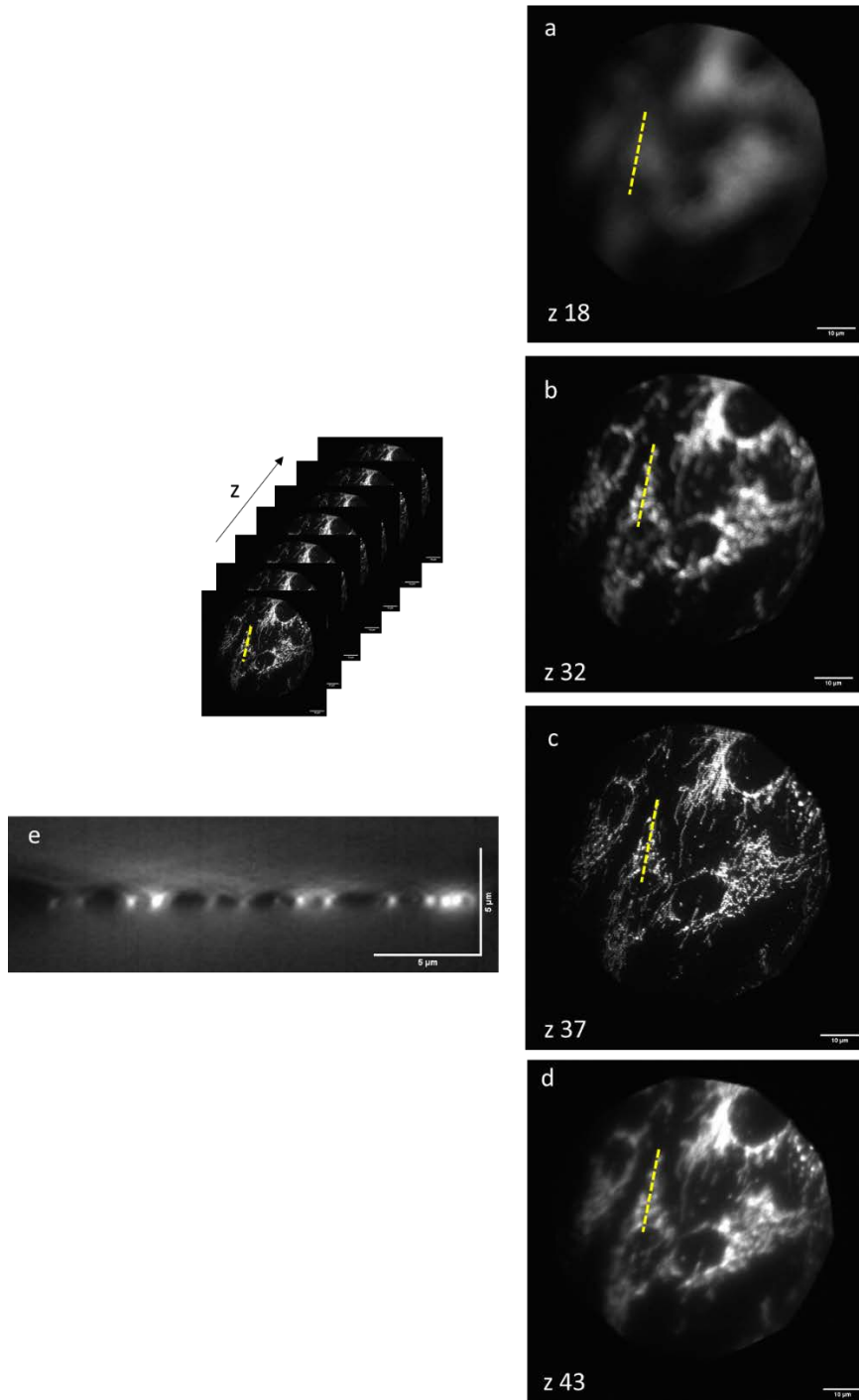


Figure IV-6 Fibroblastes de Muntjacs (cervidés) avec marquage à l’Alexa555 couplé à un anticorps anti complexe V (ATP synthase) présent sur la membrane des mitochondries. Acquisition d’une pile d’images en Z de 38 images prises tous les 0,3 μm sur un total de 11,4 μm. (a – d) Sur un échantillon plus petit que la profondeur de champ, on peut observer que les interférences sont présentes uniquement sur 2 ou 3 plans. (e) Coupe orthogonale le long de la ligne d’intérêt (jaune pointillé) où l’on observe aussi la présence des interférences uniquement au niveau de l’échantillon, représentant en moyenne 1 à 2 μm sur les 11 μm de l’acquisition en Z.

En se concentrant sur de petites structures comme des microtubules de cellules fibroblastes (Figure IV-7) et de cellules épithéliales d'ostéosarcome osseux humain U2OS (Figure IV-8), on observe qu'une grande partie du signal hors focus est soustrait sans retirer le signal d'intérêt présent au plan de focalisation.

Il est intéressant de comparer notre approche avec celle de la référence ⁸³. Dans celle-ci, en utilisant les bases de la technique HiLo, le capteur est coupé en deux et utilise un miroir galvanométrique permettant une acquisition unique comportant une image avec une illumination structurée et une image avec l'illumination homogène.

Comme notre système, l'unique limite est imposée par le temps de pause de la caméra, pour atteindre 200 Hz de fréquence d'acquisition pour une image HiLo.

⁸³ Zhiqiang Fu et al., « Single-Shot Optical Sectioning Microscopy Based on Structured Illumination », *Optics Letters* 47, n° 4 (15 février 2022): 814-17, <https://doi.org/10.1364/OL.451267>.

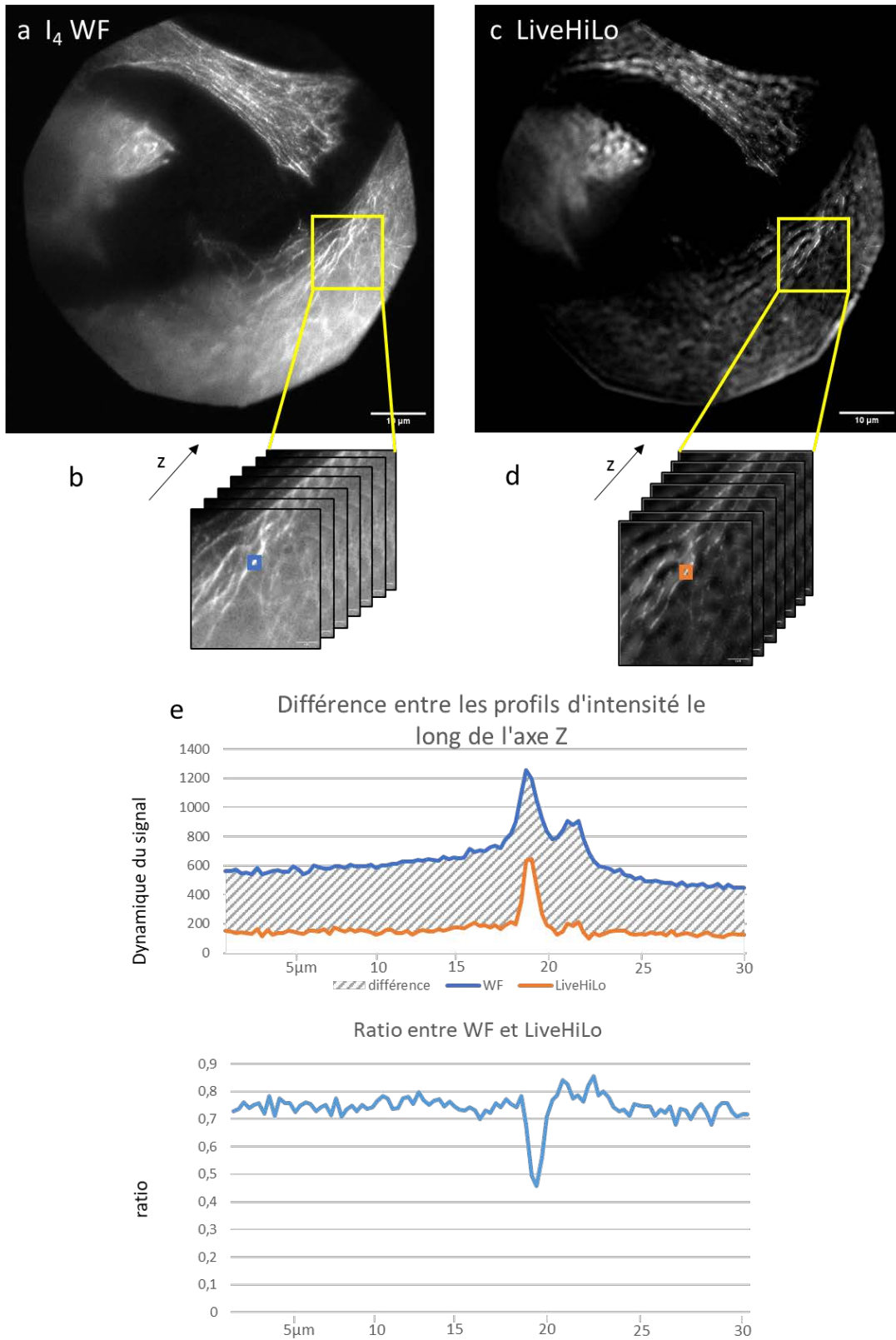


Figure IV-7 Fibroblaste avec un marquage de la tubuline à l'Alexa555. Acquisition d'une pile d'images en Z de 101 images prises tous les $0,3 \mu\text{m}$ sur un total de $30,3 \mu\text{m}$. (e) Analyse de l'intensité du signal selon l'axe Z entre une illumination homogène I_4 WF et la reconstruction d'image LiveHiLo. On observe qu'une grande partie du signal au-dessus et en dessous du plan focal est retirée sans modifier le signal d'intérêt.

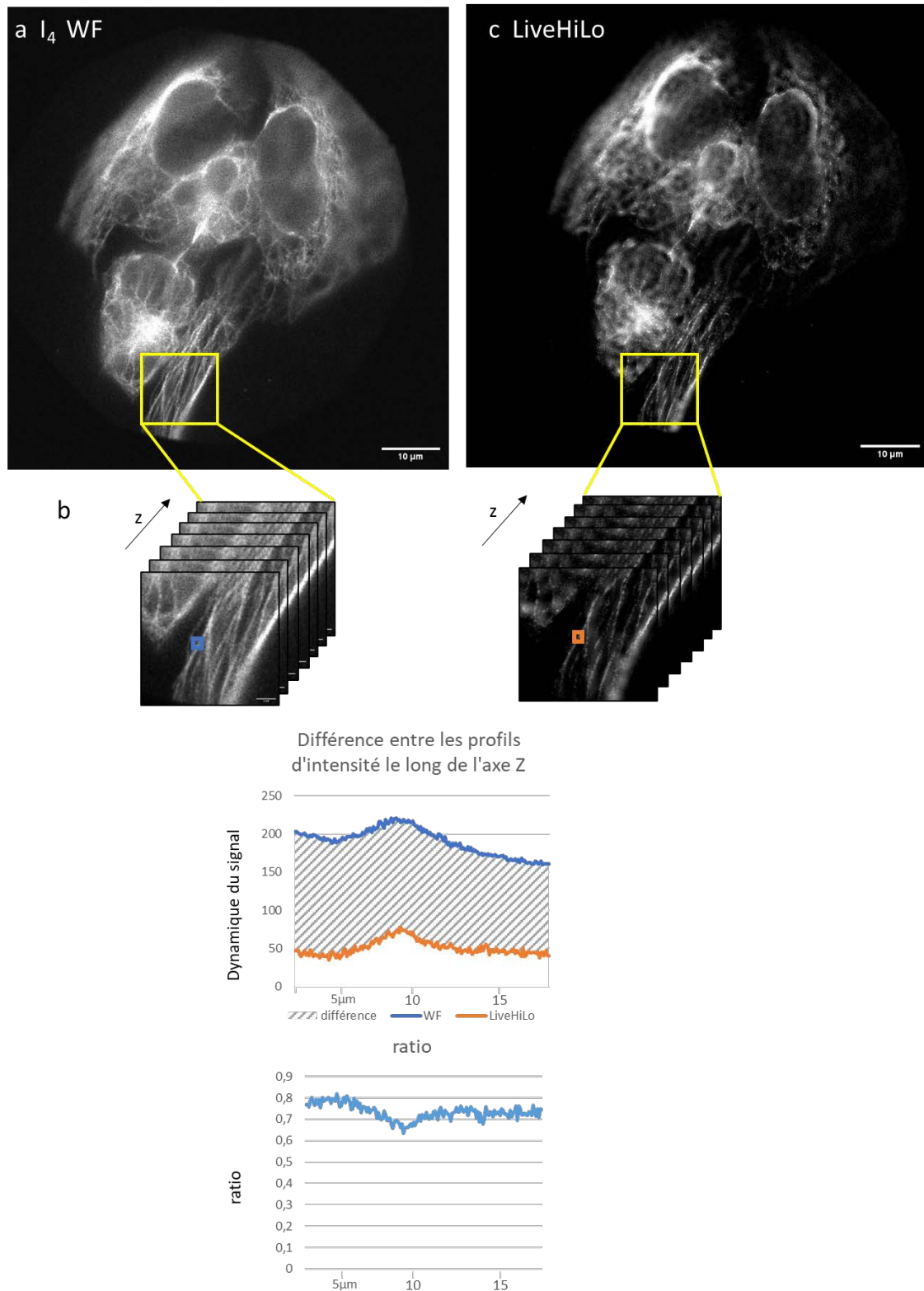


Figure IV-8 Cellule U2OS avec un marquage de la tubuline au CF568. Acquisition d'une pile d'images en Z de 101 images prises tous les 0,3 μm sur un total de 30,3 μm. (e) Analyse de l'intensité du signal selon l'axe Z entre une illumination homogène I₄ WF et la reconstruction d'image HiLo. On observe qu'une grande partie du signal au-dessus et en dessous du plan focal est retirée sans modifier le signal d'intérêt.

3. Éclairage de l'échantillon

Nous n'avons pas pu tester notre système sur des cellules vivantes à cause de l'absence de chambre thermostatée sur notre microscope. Nous avons donc comparé les puissances en sortie d'objectif sur notre système et sur les techniques de microscopie classique comme la microscopie plein champ et la microscopie spinning disk.

On observe sur Tableau 1 que les puissances mesurées sur notre système sont beaucoup plus faibles que celles mesurées sur les autres techniques classiques pour faire de l'imagerie *in vivo*. On peut expliquer ces faibles puissances principalement par les angles imposés aux deux faisceaux, ce qui provoque une excitation oblique.

Plus l'angle entre les faisceaux et l'axe optique est important pour avoir des fréquences spatiales d'illumination élevées, plus l'éclairage des échantillons diminue. A l'inverse dans les techniques classiques le faisceau doit être parfaitement collimaté avec l'axe optique.

	objectifs	Champs de vue	sources	Puissances en sortie d'objectif	Puissances moyennes par unité de surface
Microscope plein champ	100x 1.4	17 700 μm^2	Lampe Hg BP554/23 120W	18,8mW	1,06 $\mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$
Microscope spinning disk W1	60x 1.42	49 200 μm^2	Laser 561nm 100mW	3,7mW	0,07 $\mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$
<u>LiveHiLo</u>	60x 1.49	49 200 μm^2	Laser 532nm 150mW	<u>0,7mW</u>	<u>0,01 $\mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$</u>

Tableau 1 Comparaison des puissances d'excitation en sortie d'objectif entre la technique LiveHiLo et les techniques classiques de microscopie plein champ et microscopie spinning disk. On observe que notre technique met en jeu des puissances inférieures à celles des autres techniques. Une des principales explications est l'angle imposé aux deux faisceaux, générant une illumination oblique, ce qui dilue d'autant la quantité de photons envoyée sur l'échantillon.

Après avoir calculé la puissance par unité de surface en sortie d'objectif, nous avons imagé des billes fluorescentes, dans toutes les longueurs d'onde, de 10µm de diamètre (SPHERO Rainbow Fluorescent Particle Slide FPS-10057 de chez *Sperotech*). Ces billes restent stables dans le temps et sont assez résistantes au photoblanchiment (Figure IV-9).

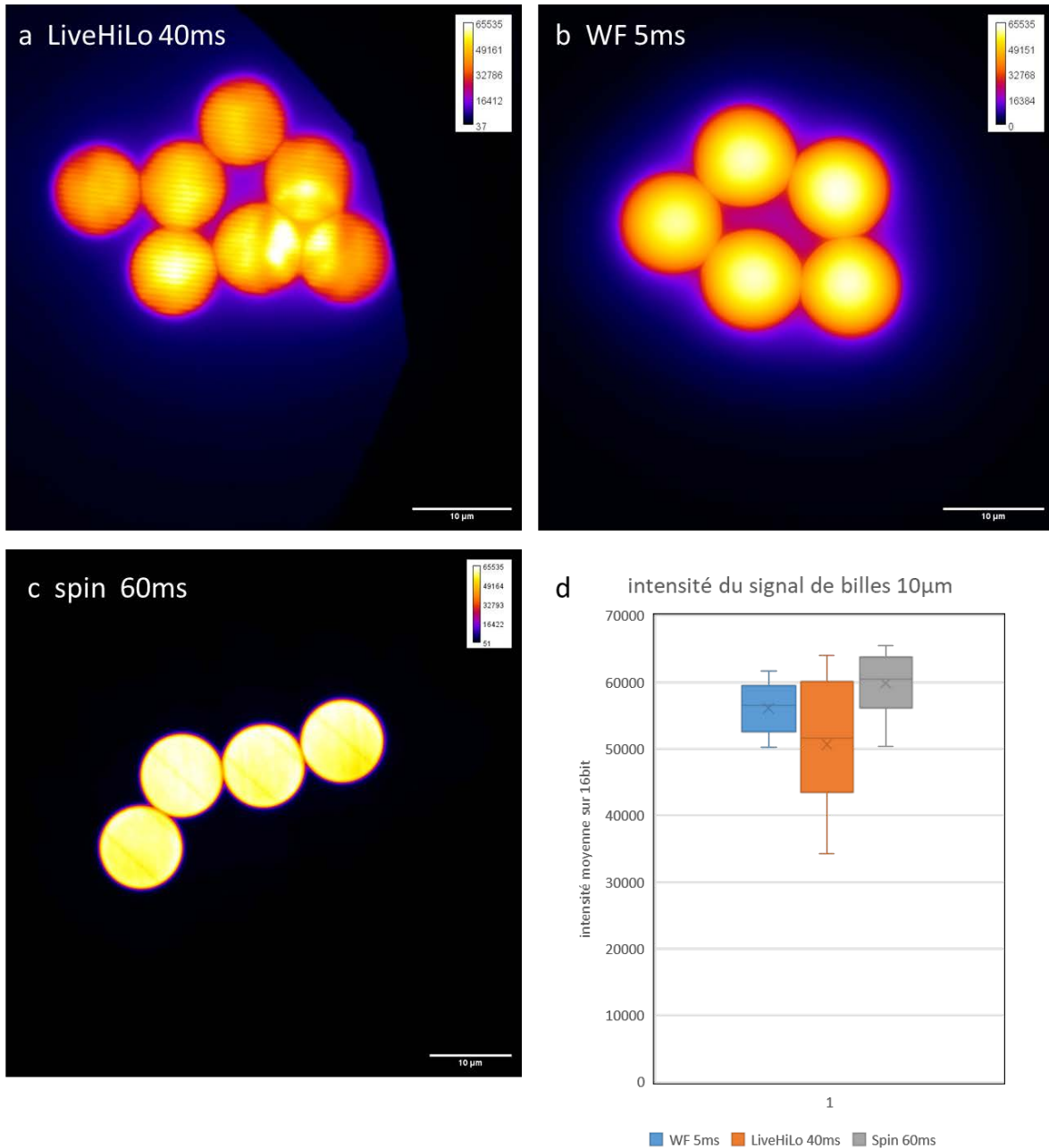


Figure IV-9 Comparaison des temps d'exposition entre notre technique LiveHiLo (a), la microscopie plein champ (WF)(b) et la microscopie spinning disk (spin)(c). Pour ce faire nous avons imposé aux billes fluorescentes un temps d'exposition afin d'obtenir une légère saturation du signal sur une dynamique de 16bit (65356 niveaux). (d) Représentation des mesures d'une vingtaine de billes (SPHERO Rainbow FPS) sur chaque technique en imposant 5 ms pour la microscopie plein champ (WF), 40ms pour la microscopie LiveHiLo et 60ms pour la microscopie spinning disk. Ainsi l'exposition est 8 fois supérieure en termes de temps pour la technique LiveHiLo que dans la microscopie plein champ et 1,5 fois inférieure qu'en microscopie spinning disk.

Afin de comparer l'irradiation et la sensibilité de chaque système, nous avons adopté des conditions d'excitation permettant d'obtenir la même saturation des billes sur tous les systèmes.

Pour ce faire nous avons utilisé 3 caméras identiques (ORCA Flash 4.0) avec la même matrice (2048x2048 pixels, binning 1), donc avec la même sensibilité, et nous avons modifié uniquement le temps d'exposition entre chaque système.

On observe (Figure IV-9) avec notre système LiveHiLo (40ms) que pour obtenir la même dynamique de signal pour les billes de 10 μm , le temps d'exposition est 8 fois supérieur qu'avec un microscope plein champ (5 ms). Par contre le temps d'exposition est 1,5 fois inférieur par rapport à la microscopie spinning disk (60 ms).

En rapportant cette différence aux mesures en sortie d'objectif (Tableau 2) où nous avons mesuré une puissance par unité de surface 100 fois moins importante sur notre système ($0,01 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$) que sur le microscope plein champ ($1,06 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$), nous démontrons que notre système nécessite un éclairage plus faible par rapport à un système de microscopie plein champ ou spinning disk classique pour obtenir la même dynamique de signal.

	objectifs	Puissances sortie d'objectif	Puissances moyennes par unité de surface	caméras	Temps d'exposition pour saturation des billes	Énergie moyenne pour saturation des billes
Microscope plein champ	100x 1.4	18,8mW	$1,06 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$	ORCA Flash 4.0 LT	5 ms	$5,3 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$
Microscope spinning disk W1	60x 1.42	3,7mW	$0,07 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$	ORCA Flash 4.0 V3	60 ms	$4,2 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$
<u>LiveHiLo</u>	60x 1.49	<u>0,7mW</u>	<u>$0,01 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$</u>	ORCA Flash 4.0 LT	<u>40 ms</u>	<u>$0,4 \mu\text{W} \cdot \mu\text{m}^{-2}$</u>

Tableau 2 Comparaison des puissances nécessaires à la saturation de billes de 10 μm de diamètre (SPHERO Rainbow FPS) entre la technique LiveHiLo et les techniques classiques de microscopie plein champ et microscopie spinning disk. On observe que notre technique nécessite un éclairage plus faible que pour les autres techniques.

Conclusion

V. Conclusion et perspectives

A. Perspectives

Un des points clés pour découpler la caméra des différentes modulations du signal, a été le découpage du capteur de la caméra en quatre parties.

Ce découpage nous a permis d'être totalement indépendant du temps de pause de la caméra par rapport à la modulation et à la démodulation du signal.

Par contre, le traitement simultané des 4 canaux sur la caméra a eu pour effet une légère déformation de chaque canal. La déformation a pu être compensée par la transformation affine dans le traitement d'images, mais il est impossible de compenser à 100% cette déformation. Dans tous les cas, cette déformation nous impose un recalibrage régulier de la matrice de compensation.

Un développement possible serait de réécrire le traitement d'images pour qu'il soit appliqué en direct lors de l'acquisition, par une carte GPU (Graphics Processing Unit) où l'on pourrait calculer une matrice de compensation pour chaque image. Cela permettrait d'être plus spécifique dans la déformation des objets.

Une autre solution pour pallier ce problème de déformation serait d'utiliser une seule caméra polarisée de type Phoenix de chez Lucid avec un capteur CMOS Sony IMX264MZR ("Phoenix 5.0MP Polarsens Polarization Camera). Sur le même principe que les cameras couleurs avec filtre de Bayer, les cameras polarisées disposent de polariseurs avec quatre orientations différentes (0° , 90° , 45° et 135°) sur quatre pixels contigus. Il est ainsi possible d'envoyer en même temps plusieurs canaux de polarisations différentes sur la même zone.

En une prise d'images avec une fréquence d'environ 22 images par seconde, le logiciel de la caméra permet de distinguer quatre images représentant chacune une polarisation différente.

Ce type de caméra simplifierait fortement la partie émission du montage expérimental (Figure V-1). Il n'y aurait plus besoin de séparer le faisceau en quatre et un seul faisceau suffirait, celui d'origine, pour traverser le PEM et aller sur la caméra. Ainsi il n'y aurait plus de découpage de l'image ni de déformation à compenser, seule une perte de la lumière mal polarisée.

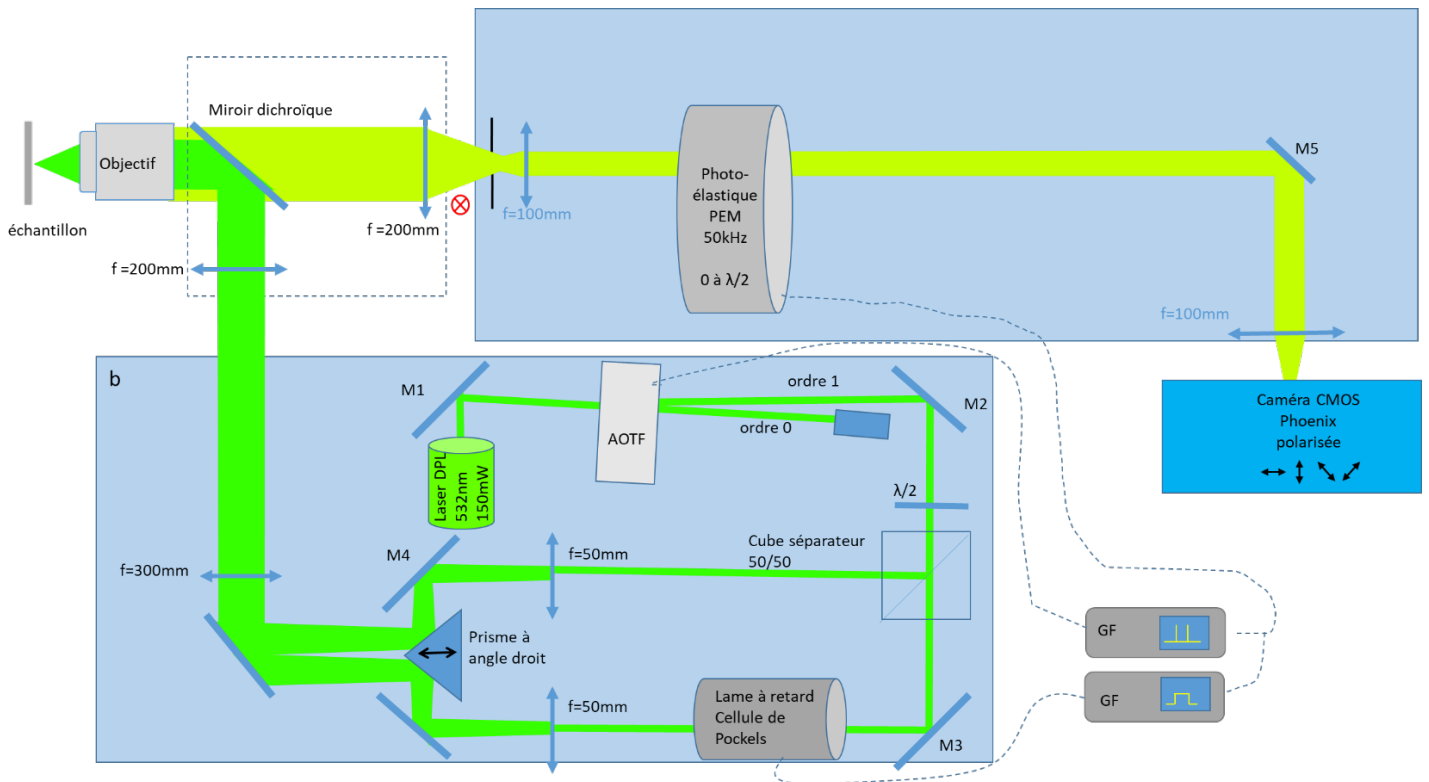


Figure V-1 Schéma du montage simplifié avec caméra polarisée. La synchronisation se ferait de la même façon entre l'AOTF et le PEM, car il ne serait plus nécessaire d'utiliser un diaphragme ni un cube séparateur de polarisation. La séparation se ferait directement sur la matrice du capteur.

En gardant la synchronisation entre le PEM et l'AOTF on laisserait passer le laser uniquement à chaque changement de polarisation tout en restant indépendant du temps de pause de la caméra en 5 et 22 Hz par rapport au 50 MHz du PEM.

Ainsi la réduction du faisceau en sortie du statif par un diaphragme (Figure V-1) ne serait plus nécessaire. L'ensemble du faisceau pourrait être exploité sur le capteur de la caméra.

Un autre développement possible consisterait à répartir au mieux les quatre phases sur les quatre canaux de la caméra et de diminuer le temps des impulsions laser au niveau de l'AOTF.

Nous avons pu voir que si l'on envoyait des impulsions avec un temps inférieur à $0,5 \mu\text{s}$, les temps de pause de la caméra devaient être augmentés avec le laser que nous utilisons pour pouvoir avoir un signal suffisant. Une des solutions pour pallier ce problème, serait d'utiliser un laser plus puissant, de sorte que l'augmentation de la puissance laser compenserait le raccourcissement des impulsions. Il est important de noter que l'utilisation d'un laser plus puissant avec des impulsions plus courtes ne serait pas plus phototoxique pour l'échantillon.

Une dernière perspective serait de faire l'acquisition de mouvements d'objets plus rapides, avec d'avantage de points en temps et de points en Z.

Il serait aussi envisageable de faire de la microscopie multi-couleur en injectant de façon collimatée d'autres lasers dans l'AOTF. C'est ce dernier qui servirait à sélectionner les différentes longueurs d'ondes, pour imager différents fluorochromes.

B. Conclusion

Le montage que nous avons réalisé nous amène à dire qu'il est possible d'optimiser les techniques d'illumination structurée au niveau des fréquences d'acquisition, en réunissant une ou plusieurs modulations du signal d'intérêt avec une image d'illumination homogène, sur un seul temps de pause de la caméra.

Jusqu'à maintenant, deux pauses de la caméra étaient nécessaires pour obtenir séparément les deux types d'illumination.

Notre système possède ainsi les mêmes temps d'acquisition qu'un système plein champ mais avec un éclairage de l'échantillon plus faible, dont le seul point limitant est la sensibilité de la caméra et son temps d'exposition.

Dans la première partie de mon travail, l'utilisation d'un interféromètre avec une cellule de Pockels pour la partie excitation nous a permis de moduler rapidement la phase des interférences qui sont envoyées dans l'échantillon.

Dans la deuxième partie, nous avons utilisé un photoélastique assurant la répartition des différentes modulations sur les canaux de la caméra. Cette modulation et démodulation se déroulant sur des temps très courts, aux environs de 20 μ s. Ces temps permettant d'être indépendant du temps de pause de la caméra qui lui est d'environ 10 à 200 ms.

Cela nous permet facilement d'envisager des acquisitions en flux continu dans le temps ou dans l'axe Z (Stream t ou Z), et ainsi de faire des acquisitions avec les fréquences les plus élevées pour la caméra, 40 Hz en plein capteur dans notre cas.

Ceci nous donne les mêmes avantages que la microscopie plein champ pour observer des mouvements moléculaires rapides.

Le seul fait d'avoir toutes les informations sur une seule image, rend envisageable un traitement à la volée avec une carte graphique GPU en ayant en direct l'image démodulée comme on peut obtenir en microscopie confocale mais plus lentement, 2 Hz en moyenne. Et ainsi, il serait aussi possible de calibrer directement la déformation à chaque acquisition.

Le fait de revenir aux temps d'acquisition d'un microscope plein champ, diminuera le taux d'éclairage d'autant. Nous avons pu mesurer moins de 1mW en sortie d'objectif, ce qui reste faible par rapport à un microscope plein champ classique où l'on trouve en moyenne, 10 à 20 mW.

Malgré l'impossibilité d'isoler quatre phases des interférences sur la caméra, nous avons montré que l'utilisation de notre technique LiveHiLo permet d'atteindre une meilleure profondeur de champ en éliminant une partie du signal hors focus, et d'atteindre une meilleure résolution latérale.

Bibliographie

- Abbe. « The Relation of Aperture and Power in the Microscope (Continued).* ». *Journal of the Royal Microscopical Society* 2, n° 4 (1882): 460-73. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1882.tb04805.x>.
- Amos, B., G. McConnell, et T. Wilson. « 2.2 Confocal Microscopy ». In *Comprehensive Biophysics*, 3-23. Elsevier, 2012. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374920-8.00203-4>.
- Astner, S, et Martina Ulrich. « [Confocal laser scanning microscopy] ». *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 61 (1 avril 2010): 421-28. <https://doi.org/10.1007/s00105-015-3632-y>.
- Axelrod, D. « Cell-Substrate Contacts Illuminated by Total Internal Reflection Fluorescence ». *The Journal of Cell Biology* 89, n° 1 (avril 1981): 141-45. <https://doi.org/10.1083/jcb.89.1.141>.
- Bansal, Vivek, Saamil Patel, et Peter Saggau. « High-Speed Addressable Confocal Microscopy for Functional Imaging of Cellular Activity ». *Journal of Biomedical Optics* 11, n° 3 (2006): 34003. <https://doi.org/10.1117/1.2209562>.
- Barroca, Thomas, Karla Balaa, Julie Delahaye, Sandrine Lévêque-Fort, et Emmanuel Fort. « Full-Field Supercritical Angle Fluorescence Microscopy for Live Cell Imaging ». *Optics Letters* 36, n° 16 (15 août 2011): 3051-53. <https://doi.org/10.1364/OL.36.003051>.
- Betzig, Eric, George H. Patterson, Rachid Sougrat, O. Wolf Lindwasser, Scott Olenych, Juan S. Bonifacino, Michael W. Davidson, Jennifer Lippincott-Schwartz, et Harald F. Hess. « Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution ». *Science (New York, N.Y.)* 313, n° 5793 (15 septembre 2006): 1642-45. <https://doi.org/10.1126/science.1127344>.
- Chen, Bi-Chang, Wesley R. Legant, Kai Wang, Lin Shao, Daniel E. Milkie, Michael W. Davidson, Chris Janetopoulos, et al. « Lattice Light Sheet Microscopy: Imaging Molecules to Embryos at High Spatiotemporal Resolution ». *Science (New York, N.Y.)* 346, n° 6208 (24 octobre 2014): 1257998. <https://doi.org/10.1126/science.1257998>.
- Dixit, Ram, et Richard Cyr. « Cell Damage and Reactive Oxygen Species Production Induced by Fluorescence Microscopy: Effect on Mitosis and Guidelines for Non-Invasive Fluorescence Microscopy ». *The Plant Journal* 36, n° 2 (2003): 280-90. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01868.x>.
- Egger, M. D., et M. Petřan. « New Reflected-Light Microscope for Viewing Unstained Brain and Ganglion Cells ». *Science (New York, N.Y.)* 157, n° 3786 (21 juillet 1967): 305-7. <https://doi.org/10.1126/science.157.3786.305>.
- Fu, Zhiqiang, Jialong Chen, Gan Liu, et Shih-Chi Chen. « Single-Shot Optical Sectioning Microscopy Based on Structured Illumination ». *Optics Letters* 47, n° 4 (15 février 2022): 814. <https://doi.org/10.1364/OL.451267>.
- Guiet, Romain. « DoFWHM.ljm ». GitHub Gist, 2019. <https://gist.github.com/romainGuiet/42395587d1193536b7a0858f72db4aca>.
- Gustafsson, M. G. L. « Surpassing the Lateral Resolution Limit by a Factor of Two Using Structured Illumination Microscopy ». *Journal of Microscopy* 198, n° 2 (1 mai 2000): 82-87. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.2000.00710.x>.
- Gustafsson, Mats G. L., Lin Shao, Peter M. Carlton, C. J. Rachel Wang, Inna N. Golubovskaya, W. Zacheus Cande, David A. Agard, et John W. Sedat. « Three-Dimensional Resolution Doubling

- in Wide-Field Fluorescence Microscopy by Structured Illumination ». *Biophysical Journal* 94, n° 12 (15 juin 2008): 4957-70. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.120345>.
- Hell, Stefan W., et Jan Wichmann. « Breaking the Diffraction Resolution Limit by Stimulated Emission: Stimulated-Emission-Depletion Fluorescence Microscopy ». *Optics Letters* 19, n° 11 (1 juin 1994): 780-82. <https://doi.org/10.1364/OL.19.000780>.
- Hess, Samuel T., Thanu P. K. Girirajan, et Michael D. Mason. « Ultra-High Resolution Imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy ». *Biophysical Journal* 91, n° 11 (1 décembre 2006): 4258-72. <https://doi.org/10.1529/biophysj.106.091116>.
- Icha, Jaroslav, Michael Weber, Jennifer C. Waters, et Caren Norden. « Phototoxicity in Live Fluorescence Microscopy, and How to Avoid It ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 39, n° 8 (août 2017). <https://doi.org/10.1002/bies.201700003>.
- Karadaglić, Dejan, et Tony Wilson. « Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy ». *Micron* 39, n° 7 (1 octobre 2008): 808-18. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.01.017>.
- Lim, Daryl, Kengyeh K. Chu, et Jerome Mertz. « Wide-Field Fluorescence Sectioning with Hybrid Speckle and Uniform-Illumination Microscopy ». *Optics Letters* 33, n° 16 (15 août 2008): 1819-21. <https://doi.org/10.1364/OL.33.001819>.
- Manley, Suliana, Jennifer M. Gillette, et Jennifer Lippincott-Schwartz. « Single-Particle Tracking Photoactivated Localization Microscopy for Mapping Single-Molecule Dynamics ». *Methods in enzymology* 475 (2010): 109-20. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)75005-9](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(10)75005-9).
- Mattheyses, Alexa, Sanford Simon, et Joshua Rappoport. « Imaging with Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy for the Cell Biologist ». *Journal of cell science* 123 (1 novembre 2010): 3621-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.056218>.
- Moerner, W. E., et L. Kador. « Optical detection and spectroscopy of single molecules in a solid ». *Physical Review Letters* 62, n° 21 (22 mai 1989): 2535-38. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.62.2535>.
- Neil, M. a. A., R. Juškaitis, et T. Wilson. « Method of Obtaining Optical Sectioning by Using Structured Light in a Conventional Microscope ». *Optics Letters* 22, n° 24 (15 décembre 1997): 1905-7. <https://doi.org/10.1364/OL.22.001905>.
- Nipkow, Paul. « Elektrisches Teleskop Patent schrift n° 30105 ». Kaiserliches Patentamt, 1885.
- Oldenbourg, Rudolf, et Michael Shribak. « Microscopes », 28.1-28.62, 2010.
- Pedrazzani, Mélanie. « Microscopie de fluorescence rapide et optique adaptative pour l'étude fonctionnelle tridimensionnelle in vivo des réseaux neuronaux impliqués dans la mémoire chez *Drosophila melanogaster* ». These de doctorat, Université Paris-Saclay (ComUE), 2015. <https://www.theses.fr/2015SACLS226>.
- « Phoenix 5.0MP Polarsens Polarization Camera, Sony's IMX264MZR and IMX264MYR CMOS | LUCID Vision Labs ». Consulté le 21 septembre 2022. <https://thinklucid.com/product/phoenix-5-0-mp-polarization-model-imx264mzrmyr/>.
- Rust, Michael J., Mark Bates, et Xiaowei Zhuang. « Sub-Diffraction-Limit Imaging by Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) ». *Nature Methods* 3, n° 10 (octobre 2006): 793-96. <https://doi.org/10.1038/nmeth929>.
- Santos, Silvia, Kengyeh K. Chu, Daryl Lim, Nenad Bozinovic, Tim N. Ford, Claire Hourtoule, Aaron C. Bartoo, Satish K. Singh, et Jerome Mertz. « Optically Sectioned Fluorescence Endomicroscopy with Hybrid-Illumination Imaging through a Flexible Fiber Bundle ». *Journal of Biomedical Optics* 14, n° 3 (juin 2009): 030502. <https://doi.org/10.1117/1.3130266>.

- Schaefer, L. H., D. Schuster, et J. Schaffer. « Structured Illumination Microscopy: Artefact Analysis and Reduction Utilizing a Parameter Optimization Approach ». *Journal of Microscopy* 216, n° Pt 2 (novembre 2004): 165-74. <https://doi.org/10.1111/j.0022-2720.2004.01411.x>.
- Schneider, Caroline A., Wayne S. Rasband, et Kevin W. Eliceiri. « NIH Image to ImageJ: 25 Years of Image Analysis ». *Nature Methods* 9, n° 7 (juillet 2012): 671-75. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- Shaner, Nathan C, Robert E Campbell, Paul A Steinbach, Ben N G Giepmans, Amy E Palmer, et Roger Y Tsien. « Improved Monomeric Red, Orange and Yellow Fluorescent Proteins Derived from *Discosoma Sp.* Red Fluorescent Protein ». *Nature Biotechnology* 22, n° 12 (décembre 2004): 1567-72. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>.
- Shannon, C.E. « Communication in the Presence of Noise ». *Proceedings of the IRE* 37, n° 1 (janvier 1949): 10-21. <https://doi.org/10.1109/JRPROC.1949.232969>.
- Shimomura, O., F. H. Johnson, et Y. Saiga. « Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea* ». *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (juin 1962): 223-39. <https://doi.org/10.1002/jcp.1030590302>.
- Ströhl, Florian, et Clemens F. Kaminski. « Frontiers in Structured Illumination Microscopy ». *Optica* 3, n° 6 (20 juin 2016): 667-77. <https://doi.org/10.1364/OPTICA.3.000667>.
- Thevenaz, P., U.E. Ruttimann, et M. Unser. « A pyramid approach to subpixel registration based on intensity ». *IEEE Transactions on Image Processing* 7, n° 1 (janvier 1998): 27-41. <https://doi.org/10.1109/83.650848>.
- Tizro, Parastou, Cecilia Choi, et Negar Khanlou. « Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy ». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1897 (2019): 417-24. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8935-5_33.
- Voie, A. H., D. H. Burns, et F. A. Spelman. « Orthogonal-Plane Fluorescence Optical Sectioning: Three-Dimensional Imaging of Macroscopic Biological Specimens ». *Journal of Microscopy* 170, n° 3 (1993): 229-36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.1993.tb03346.x>.
- Wang, Luwei, Bingling Chen, Wei Yan, Zhigang Yang, Xiao Peng, Danying Lin, Xiaoyu Weng, Tong Ye, et Junle Qu. « Resolution Improvement in STED Super-Resolution Microscopy at Low Power Using a Phasor Plot Approach ». *Nanoscale* 10, n° 34 (2018): 16252-60. <https://doi.org/10.1039/C8NR03584A>.
- Wilson, Tony, et Colin Sheppard. *Theory and practice of scanning optical microscopy*. London ; Orlando: Academic Press, 1984.

Annexes

Annexes

1. Traitement d'images

Détail de la macro sur le logiciel ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health USA
<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>

```
//16 octobre 2020
//Pierre Bourdoncle
//source : 1 image 16 bit
//Macro : aligner 4 parties de l'image pour les superposer et suppression des basses
fréquences hors focus
//version ImageJ : 1.53c
//plugin : StackReg et MultiStackReg

//diamètre du masque pour FFT de base D=2
D =150;
P=PI;

var min, max;
getMinAndMax(min, max);
width = getWidth;
height = getHeight;

x = width /2;
y = height /2;

//set scale bin1 camera 6.5 objectif 60x
run("Set Scale...", "distance=1 known=0.10833 unit=µm");

makeRectangle(0, 0, x, y);
run("Duplicate...", "title=l2.tif");
selectImage(1);
makeRectangle(x, 0, x, y);
run("Duplicate...", "title=l1.tif");
selectImage(1);
makeRectangle(0, y, x, y);
run("Duplicate...", "title=l3.tif");
selectImage(1);
makeRectangle(x, y, x, y);
run("Duplicate...", "title=l4.tif");
selectImage(1);
close();
run("Images to Stack", "name=Stack title=[] use");
```



```

selectWindow("Stack");
setSlice(4);
run("Delete Slice", "delete=channel");
setSlice(3);
run("Delete Slice", "delete=channel");

//stack avant alignement

run("MultiStackReg", "stack_1=Stack action_1=[Load Transformation File] file_1=[]
stack_2=None action_2=Ignore file_2=[] transformation=Affine");

run("Make Composite", "display=Composite");

setSlice(1);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.2");
setSlice(2);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.2");

//ROI pour supprimer les bords de l'alignement
width = getWidth;
height = getHeight;
a = width * 0.15;
b = height * 0.15;
w = width * 0.7;
h = height * 0.7;
makeRectangle(a, b, w, h);
run("Crop");

run("Split Channels");

selectImage(1);
rename("I1");
selectImage(2);
rename("I2");

//image modulée
imageCalculator("Subtract create", "I1","I2");
imageCalculator("Subtract create", "I2","I1");
imageCalculator("Add create", "Result of I1","Result of I2");
run("FFT");

```

```

width = getWidth;
height = getHeight;

x = width /2;
y = height /2;

run("Specify...", "width=D height=D x=x y=y oval centered");
run("Clear Outside");
run("Select None");
run("Inverse FFT");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
rename("BF = | I2 - I1 |");
run("Multiply...", "value=4");
run("Divide...", "value=P");
rename("BF = | I2 - I1 | x 4/PI ");

```

```

//image RAW pour les hautes fréquences
selectWindow("I2");
run("FFT");
run("Duplicate...", "title=FFT");
selectWindow("FFT of I2");

```

```

run("Specify...", "width=D height=D x=x y=y oval centered");
run("Clear", "slice");
run("Select None");
run("Inverse FFT");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
rename("HF = I1 + I2");

```

```

imageCalculator("Add create", "BF = | I2 - I1 | x 4/PI ", "HF = I1 + I2");
rename("result = BF + HF");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.1");
run("Fire");

```

```

selectWindow("I1");
close();
selectWindow("Result of I1");
close();
selectWindow("Result of I2");
close();
selectWindow("Result of Result of I1");
close();

```

```
selectWindow("FFT of Result of Result of I1");
close();
selectWindow("BF = | I2 - I1 | x 4/PI ");
close();
selectWindow("FFT of I2");
close();
selectWindow("FFT");
close();
selectWindow("HF = I1 + I2");
close();
```

```
selectWindow("I2");
rename("WF");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.0");
getMinAndMax(min, max);
run("Magenta");
selectWindow("result = BF + HF");
setMinAndMax(min, max);
run("Green");
```

```
run("Merge Channels...", "c1=WF c2=[result = BF + HF] create ignore");
```


Microscopie de fluorescence par illumination structurée à démodulation rapide

Résumé : Le sujet de ma thèse a été de développer une technique de microscopie la moins phototoxique possible, tout en améliorant le sectionnement optique, sur les bases de l'illumination structurée. En effet, la microscopie d'illumination structurée SIM (Structured Illumination Microscopy)⁸⁴ est une technique permettant de séparer le signal d'intérêt modulé, du bruit de fond non modulé provenant des plans hors focus. Pour cela il est nécessaire de projeter un motif, tel un réseau, sur l'échantillon. La présence du réseau va moduler uniquement le signal d'intérêt au plan focal. Pour démoduler le signal d'intérêt, il est nécessaire d'avoir un maximum de phases et d'angles différents de ce réseau. Cela entraîne la création d'un grand nombre d'images et l'augmentation de l'énergie lumineuse reçue par l'échantillon augmentant la phototoxicité. Ainsi, nous avons tenté de limiter au maximum le nombre d'images nécessaires à la démodulation du signal, en regroupant le minimum d'information sur un seul temps de pause de la caméra, ce qui a eu pour effet de rendre le système moins phototoxique pour les échantillons, tout en gagnant en contraste et en résolution.

Mots clefs : Microscopie, Fluorescence, Illumination structurée

Fast demodulation structured illumination fluorescence microscopy

Abstract : The subject of my thesis was to develop a microscopy technique that is as minimally phototoxic as possible while improving optical sectioning, based on structured illumination. Indeed, Structured Illumination Microscopy (SIM) is a technique that separates the modulated signal of interest from the unmodulated background noise originating from out-of-focus planes. To achieve this, it is necessary to project a pattern, such as a grid, onto the sample. The presence of the grid will only modulate the signal of interest at the focal plane. To demodulate the signal of interest, it is necessary to have a maximum number of phases and different angles of this grid. This leads to the creation of a large number of images and an increase in the light energy received by the sample, thereby increasing phototoxicity. Thus, we attempted to minimize the number of images required for signal demodulation by consolidating the minimum amount of information during a single camera exposure time. This had the effect of making the system less phototoxic for samples while gaining in contrast and resolution.

Keywords : Microscopy, Fluorescence, Structured illumination