HAL
open science

# Microscopie à illumination structurée et optique adaptative pour l'imagerie de fluorescence 3D dynamique

Pierre Vermeulen

## To cite this version:

Pierre Vermeulen. Microscopie à illumination structurée et optique adaptative pour l'imagerie de fluorescence 3D dynamique. Optique [physics.optics]. Université Paris-Diderot - Paris VII, 2012. Français. NNT : . pastel-00777094

**HAL Id: pastel-00777094**

**https://pastel.hal.science/pastel-00777094**

Submitted on 16 Jan 2013

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

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

**THÈSE DE DOCTORAT**

présentée par

**Pierre VERMEULEN**

pour l'obtention du grade de

**Docteur de l'UNIVERSITÉ PARIS DIDEROT (Paris 7)**

ÉCOLE DOCTORALE MATIÈRE CONDENSÉE ET INTERFACE

Spécialité : Physique - Optique

réalisée au Laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux

# Microscopie à illumination structurée et optique adaptative pour l'imagerie de fluorescence 3D dynamique

soutenue le 20 septembre 2012

devant le jury constitué de :

| | | |
|---|---|---|
| M. | **Thierry FUSCO** | Rapporteur |
| M. | **Jerome MERTZ** | Rapporteur |
| Mme. | **Sophie BRASSELET** | Examinatrice |
| M. | **Claude BOCCARA** | Examinateur |
| M. | **Jean SALAMERO** | Examinateur |
| M. | **Vincent LORIETTE** | Directeur de thèse |
| Mme. | **Alexandra FRAGOLA** | Co-directrice de thèse |

# Remerciements

BEAUCOUP de personnes ont permis que cette thèse se passe aussi bien, ces quelques lignes me permettront de les remercier comme il se doit, en espérant n'oublier personne et faire honneur à chacun.

Il me paraît important de commencer par remercier les membres de mon jury. Merci à JEROME MERTZ et THIERRY FUSCO d'avoir accepté la charge de rapporteur, pour les discussions que nous avons pu avoir et leur intérêt pour mon travail d'opticien. Merci également à SOPHIE BRASSELET, JEAN SALAMERO et CLAUDE BOCCARA d'avoir complété ce jury, avec des sensibilités différentes mais un réel intérêt, merci d'être venus à la soutenance et pour la discussion qui s'en est suivie.

Tout ceci n'aurait pas été possible sans mes directeurs de thèse et en particulier ma co-directrice, ALEXANDRA FRAGOLA. Un immense merci d'avoir accepté de m'encadrer depuis le stage de master jusqu'à aujourd'hui... Tes compétences dans tout les domaines, ta gentillesse et ta bonne humeur (malgré les courtes nuits et l'accumulation des tâches administratives) m'ont décidé à rester en thèse au labo et je ne le regrette pas. Si je n'ai appris qu'une infime fraction de ce que tu pouvais m'apprendre, je n'aurai pas perdu ces trois ans et demi. Et dans tout les cas, pour une info sur une manip ou si tu as le cafard (à Orsay ou à Singapour...), n'hésite pas à m'appeler, mon numéro ne changera pas. Merci aussi à VINCENT LORIETTE, qui m'a encadré de loin au début, puis de façon de plus en plus rapprochée, jusqu'à devenir mon directeur de thèse officiel pour la dernière partie. Je pouvais toujours compter sur toi pour combler mes lacunes en optique, en Matlab ou tout autre domaine, avec en cadeau à chaque fois, l'incontournable bouquin de celui-ci ou celui-là. Une fois que je les aurai lus, on pourra peut-être parler d'égal à égal, mais il faudra attendre encore une ou deux décennies. Tes remarques toujours sympathiques et ton petit coté Sheldon vont me manquer, ne change surtout pas... Je voudrais enfin remercier BENOÎT DUBERTRET qui dans son équipe m'a accueilli. Merci de m'avoir permis de faire ce qui m'intéressait et de profiter des moyens du laboratoire, même si je n'ai pas succombé au charme des dots ou des plaquettes et que j'ai préféré m'enterrer dans notre cave(rne d'Ali Baba...). Je concluerai cette partie en rappelant que nombreux sont ceux qui m'ont envié ma direction de thèse durant ces trois ans, et je les comprends tant vous avez été compétents, attentionnés et gentils.

Enchaînons avec les autres personnes qui m'ont aidé au cours de ces trois ans. Merci à :

- Eduardo Sepulveda et ses codes chiliens, qui ont tenu 3 ans, et pourront le faire encore longtemps, je crois.
- Eleonora Muro pour son aide pour les échantillons biologiques et les manips partagées dans notre salle au matériel débordant
- Thomas Pons qui a toujours réponse à tout (surtout aux questions de rendement quantique...), toujours disponible pour un coup de main ou dire une connerie, je ne sais pas où tu trouves le temps de faire tout ça.
- Mohamed Hanafi pour sa bonne humeur (impossible de s'ennuyer quand il est dans les parages) et pour m'avoir chaperonné depuis mon arrivée à PC, il y a 7 ans.
- François Orieux qui m'a permis de découvrir la profondeur de l'inférence bayésienne et les joies du Python même si ce ne fut qu'à l'arrache et sur le tas.
- Christian Stigloher et Hong Zhan de nous avoir appris à faire joujou avec des petits vers et de nous les avoir toujours fourni très gentiment, ce qui m'a permis de pouvoir présenter au moins un échantillon vivant...
- Sophie Bouccara alias Toto, ma petite soeur de thèse, pour ta bonne humeur, ta candeur et ton soutien indéfectible, mais un conseil : ne stresse pas pour les autres, des raisons de stresser pour toi tu en auras..... Prends bien soin de toi et surtout ne te laisse pas faire, appelle-moi s'ils t'embêtent, ces zouaves de chimistes inélégants.
- Gary Sitbon toujours prêt à nous faire découvrir de nouvelles bières pour oublier les manips qui ne marchent pas. Merci aussi d'avoir géré le skype, et désolé d'avoir été pénible lors de l'installation, mais ça valait le coup, on n'a pas eu l'air bête devant Sylvain Gigan.

Ces remerciements s'adressent également à tous les membres de l'équipe que j'ai pu côtoyer pendant mon passage ici, la bonne humeur constante qui règne au labo m'a beaucoup aidé, surtout lors des dures journées de mesure de rendement quantique. Merci à Nicolas Lequeux le professeur aux deux passions (la thèse et le béton...), Cécile Bouet l'infatigable sportive, Elsa Cassette avec qui je cohabite depuis le début, Clémentine Javaux avec son petit caractère et ses livraisons de cochon, Benoit Mahler alias Chouchou et ses idées géniales, Brice Nadal le discret, Emerson Giovanelli le charitable bavard, Sandrine Ithurria Lhuillier la maître de conférence tant attendue, Ivan Maksimovic l'opticien dans son monde, Mickaël Tessier, Sylvain Helas-Othenin et Arjen Dijksman les trois thésards de la salle du fond, Patrick Bassoul le jeune retraité, Botao Ji, Louis Biadala (arrête d'embêter Toto), Hadrien Heuclin, Emmanuel Lhuillier, Silvia Pedetti et Michel Nasilowski les nouveaux arrivants.

Je remercie tous les gens du laboratoire de Physique et d'Étude des Matériaux, en particulier Jérôme Lesueur le directeur, Sophie Demonchaux, Marie-Claude Thème et Josiane Racine pour leur aide et leur disponibilité pour tous

les impératifs et soucis d'administration et de gestion. Merci également à nos anciens voisins de l'Institut Langevin toujours disponibles pour un conseil, une petite discussion ou un peu de matériel optique. Merci à (entre autres parce qu'ils sont trop nombreux) Yannick Dewilde, Gilles Tessier, Jean-Paul Roger, Emmanuel Labbey, Sylvain Gigan, Emmanuel Fort, François Ramaz, Thomas Barroca, Samuel Grésillon... Merci également à Fabrice Harms, Franck Martins, Eugénie Dalimier, Anne Latrive et Charles Brossolet de LL-Tech pour leur gentillesse, leur conseils divers et variés mais toujours utiles, et en prime un petit article sur la tomographie par cohérence optique.

Merci également à tous les collègues de promo, de ma jeunesse, de PC et de master pour toutes les discussions partagées autour d'un verre sur nos malheurs d'étudiant ou de thésard. Bon courage à tous ceux qui n'ont pas encore soutenu, et pour tous bonne continuation. Merci également à mes colocs Pauline, Will et Lucie pour les soirées en bonne compagnie, les bons repas et les racontards. Merci également aux Faidherbards pour les toujours trop rares WE glande, les innombrables parties d'aventuriers du rollercoaster, Vasco de Cuba et les folkloriques variantes de colons.

Merci à ma famille qui m'a soutenu depuis le début et surtout pour l'aide pour le pot. Marielle tu as géré tout ça avec talent et art. Et merci à ma maman, à Jbeu, Toto et Pauline d'avoir accepté de relire des bouts de mon manuscrit même à la dernière minute, et enlever les coquilles et virgules de trop.

Et pour finir, je remercie les quelques personnes qui m'ont supporté (et subi) au jour le jour, même si cela a dû être une partie de plaisir, car il est de notoriété publique que je ne râle jamais... (N'étant pas doué pour les grandes déclarations, l'affection et la gratitude que j'ai pour vous ne transparaîtra pas suffisamment dans ces quelques mots.) Merci à Sabrina pour les (trop peu) nombreuses heures passées au Brewberry à refaire le monde, et merci aussi pour m'avoir peut-être trouvé un boulot sans difficultés... Merci à Mai, 7 ans de PC que tu m'accompagnes, dont 3 ans de prose ou de vers à se demander ce que l'on va faire aujourd'hui ou demain, de nos vies, en vain, et pour continuer la discussion j'aurai toujours une place et un peu de Martini pour toi à Bordeaux. Bon courage pour les quelques mois qu'il vous reste et atteindre ce statut de docteur tant convoité. Merci enfin à Pauline de m'avoir supporté et encouragé dans les moments les plus difficiles, d'avoir accepté que je puisse me défouler sur toi et de m'avoir recueilli quand je menaçais de devenir clodo. J'espère profiter encore longtemps de tes roucoulements pendant ta nouvelle vie d'interne débordée.

# Table des matières

**Remerciements** **iii**

**Introduction** **1**

**I Coupes optiques plein champ par illumination structurée** **5**

I.1 Profondeur de champ, coupe optique, état de l'art et illumination structurée . . . 6
I.1.1 Profondeur de champ . . . 6
I.1.2 Illumination du plan focal : microscopies TIRF et à feuille de lumière . . . 8
I.1.3 Illumination structurée . . . 9
I.2 Mise en œuvre et optimisation . . . 15
I.2.1 Description du montage . . . 15
I.2.2 Utilisation d'une grille oscillante . . . 16
I.3 Caractérisation des performances . . . 20
I.3.1 Epaisseur de coupe théorique . . . 20
I.3.2 Mesure de l'épaisseur de coupe . . . 24
I.4 Limitations . . . 26
I.4.1 Augmentation de cadence . . . 26
I.4.2 Perte d'efficacité par les aberrations optiques . . . 27
I.4.3 Comparaison à un filtrage passe-haut . . . 29
I.5 Coupe optique à partir d'une seule image : HiLo bicouleur . . . 29
I.5.1 Passage à une seule image . . . 30
I.5.2 Applications et limitations . . . 36
I.6 Applications à divers échantillons biologiques . . . 36
I.6.1 Cellules HeLa . . . 36
I.6.2 Disque imaginal de drosophile . . . 40
I.6.3 *Caenorhabditis elegans* . . . 41
I.7 Conclusions et perspectives . . . 44

**II Illumination structurée : Super-résolution à haute cadence et coupe optique** **49**

II.1 Augmentation de résolution en microscopie optique . . . 50
II.1.1 Limite de résolution . . . 50
II.1.2 Super-résolution par super-localisation . . . 53

II.1.3 Super-résolution . . . . . 59
II.2 Montage et reconstruction des images . . . . . 70
II.2.1 Description du montage . . . . . 70
II.2.2 Reconstruction bayésienne des images super-résolues . . . . . 72
II.2.3 Coupe optique et super-résolution . . . . . 76
II.2.4 Efficacité de la reconstruction bayésienne . . . . . 78
II.3 Reconstruction d'images super-résolues . . . . . 85
II.3.1 Billes fluorescentes . . . . . 85
II.3.2 Disques imaginaux de drosophile . . . . . 87
II.4 Imagerie de super résolution à haute cadence . . . . . 90
II.4.1 Réduction du nombre d'images requis . . . . . 90
II.4.2 Reconstruction à quatre images . . . . . 91
II.4.3 Utilisation d'une fenêtre glissante . . . . . 92
II.4.4 Observation d'un échantillon test . . . . . 92
II.5 Limitations et perspectives . . . . . 95
II.5.1 Sensibilité au rapport signal sur bruit et débruitage . . . . . 95
II.5.2 Optimisation de l'algorithme de reconstruction . . . . . 95
II.5.3 Colocalisation sur échantillons vivants . . . . . 96
II.6 Conclusion . . . . . 97

**III Optique adaptative pour la microscopie de fluorescence plein champ 103**
III.1 Dégradation des capacités d'imagerie par les aberrations optiques . . 104
III.1.1 Aberrations optiques . . . . . 104
III.1.2 Optique adaptative . . . . . 106
III.2 Description du système . . . . . 110
III.2.1 Conception de l'expérience . . . . . 110
III.2.2 Montage . . . . . 110
III.2.3 Étoiles artificielles . . . . . 113
III.2.4 Protocole d'acquisition des images . . . . . 115
III.3 Correction et mesure des aberrations sur échantillon test . . . . . 117
III.4 Caractérisation de l'efficacité de correction . . . . . 119
III.4.1 Étendue de la zone corrigée . . . . . 120
III.4.2 Influence du nombre de modes corrigés . . . . . 123
III.5 Augmentation de l'étendue de la zone corrigée . . . . . 124
III.5.1 Adaptation de l'instrument à la correction multiétoile . . . . . 124
III.5.2 Reconstruction d'images corrigées composites . . . . . 128
III.6 Application à un échantillon biologique . . . . . 129
III.7 Perpectives . . . . . 131
III.7.1 Caractérisation et observation d'échantillons vivants . . . . . 131
III.7.2 Optique adaptative multiconjuguée . . . . . 132
III.7.3 Cartographie des aberrations et tomographie . . . . . 132
III.8 Conclusion . . . . . 134

**IV Mesure de rendement quantique par effet de lentille thermique 139**
IV.1 Rendement quantique de fluorescence . . . . . 140
IV.1.1 Définition . . . . . 140
IV.1.2 Méthodes de mesure et limitations . . . . . 141
IV.1.3 Mesure de rendement quantique de quantum dots infrarouges 148
IV.2 Détection homodyne de lentille thermique . . . . . 148
IV.2.1 Principe de la mesure . . . . . 148
IV.2.2 Montage expérimental . . . . . 149
IV.2.3 Protocole de mesure . . . . . 152
IV.3 Rendement quantique de fluorophores organiques et inorganiques . . 154
IV.3.1 Rendement quantique de composés de référence . . . . . 154
IV.3.2 Rendement quantique de quantum dots visibles et IR . . . . . 156
IV.4 Limitations et perspectives . . . . . 158
IV.4.1 Faible précision des mesures . . . . . 158
IV.4.2 Perspectives . . . . . 160
IV.5 Conclusion . . . . . 162

**Conclusion 167**

**Annexe A : Calculs d'illumination structurée 171**
A.1 Remarques préliminaires . . . . . 171
A.2 Cas de l'éclairage statique . . . . . 171
A.3 Cas de l'éclairage dynamique . . . . . 172
A.4 Cas de l'éclairage dynamique réduit . . . . . 176
A.5 Réglage de $\psi$ . . . . . 178
A.6 Réglage de $X$ . . . . . 179
A.7 Combinaisons d'images . . . . . 180

**Annexe B : Synthèse des étoiles artificielles 181**
B.1 Étoiles guides émettant à 620 nm . . . . . 181
B.2 Étoiles guides émettant à 800 nm . . . . . 181

# Introduction

La microscopie optique est un outil incontournable pour la compréhension de nombreux phénomènes biologiques, car elle permet d'obtenir des informations à différentes échelles d'espace (suivi de molécules uniques, processus cellulaires, développement embryonnaire, organisation des tissus, comportement de petits animaux...) et de temps (de la milliseconde à plusieurs jours). Ce succès est également lié à la facilité d'accès et d'utilisation des différents outils disponibles ainsi que la possibilité d'observer des échantillons vivants dans des conditions leur permettant de se développer normalement.

Ceci est d'autant plus vrai avec le développement des sondes fluorescentes qui permettent d'observer les différents constituants d'un échantillon avec un excellent contraste et une grande sensibilité, allant jusqu'à la molécule unique. Grâce à l'utilisation de marqueurs spécifiques de protéines ou de structures cellulaires, il est possible de suivre le devenir de molécules ou de cellules individuelles dans un échantillon vivant. L'éventail de sondes disponibles (fluorophores organiques, protéines fluorescentes, quantum dots...) permet de réaliser des combinaisons très nombreuses, et de suivre potentiellement tous les constituants cellulaires [1]. Enfin l'observation en parallèle de plusieurs marquages en utilisant des fluorophores de différentes couleurs apporte une information sur la colocalisation des différents constituants. Les interactions directes entre ceux-ci peuvent être obtenues grâce à l'étude du transfert de fluorescence (FRET) entre deux fluorophores [1]. Appliqué à l'étude d'échantillons vivants, il est possible d'obtenir des informations sur des interactions dynamiques avec une résolution spatiale de 200 nm et temporelle de 10-100 ms, ce qu'aucune autre technique ne permet [1, 2].

Ceci explique pourquoi les microscopes à épifluorescence plein champ et confocaux sont devenus des standards dans les laboratoires de biologie. Il reste cependant différentes limitations physiques et techniques qui restreignent les phénomènes observables. Le développement de nouveaux outils pour dépasser ces limites permettra d'élargir les possibilités offertes pour l'étude des échantillons biologiques.

Par exemple, il est important d'améliorer les sondes fluorescentes disponibles pour augmenter leur brillance (absorption et rendement quantique de fluorescence), leur résistance au photoblanchiment, leur stabilité en milieu cellulaire et leur innocuité. Les sondes actuellement disponibles ne présentent pas toutes ces caractéristiques simultanément, ce qui impose un compromis lors du choix du marquage des échantillons en fonction de l'application visée [1].

L'observation d'échantillons épais pose également d'importants problèmes en microscopie conventionnelle [2]. Ces échantillons étant généralement des milieux peu homogènes, ils génèrent des aberrations optiques qui dégradent les performances initiales des microscopes. Associé à la présence de lumière parasite provenant des plans hors mise au point qui peuvent fortement dégrader le rapport signal sur bruit des images, il est parfois difficile d'observer des échantillons épais tels que des embryons ou de petits organismes. L'utilisation du microscope confocal permet de s'affranchir efficacement et simplement de cette lumière hors focus, grâce à une illumination à balayage et l'emploi d'un trou confocal devant le détecteur pour sélectionner les photons provenant du point focal. Mais ce gain est généralement obtenu au détriment de la cadence d'acquisition [2] et impose des puissances d'excitation plus importantes qu'en microscopie plein champ, l'efficacité de collection des photons de fluorescence étant plus faible en microscopie confocale de plusieurs ordres de grandeurs [3]. Ces aspects peuvent ainsi limiter son utilisation pour des échantillons fragiles ou très dynamiques.

Enfin une des grandes restrictions de la microscopie optique conventionnelle est la limite de résolution imposée par la diffraction, qui empêche l'observation de structures plus petites que la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Cette limite de 200 à 300 nm interdit l'observation de nombreuses structures cellulaires qui ont des tailles comprises entre quelques nanomètres et quelques centaines de nanomètres. L'utilisation de la microscopie électronique permet d'atteindre une résolution de l'ordre du nanomètre, en utilisant, à la place des photons, des électrons dont la longueur d'onde est $10^5$ fois plus petite. Mais elle est incompatible avec l'utilisation d'échantillons vivants. De plus, la préparation nécessaire à leur observation est bien plus complexe et peut générer des artefacts. Ajouté au coût et à l'impossibilité d'observer différents marquages sur un même échantillon, on comprend bien pourquoi cette technique n'a pas supplanté l'imagerie optique en biologie [2].

Ces dernières années, de nombreuses techniques ont ainsi été développées pour surmonter les problèmes évoqués ci-dessus. Par exemple, la microscopie à feuille de lumière (SPIM) en illuminant uniquement le plan de mise au point permet de fortement réduire l'effet de la lumière hors focus et de diminuer la puissance d'excitation à laquelle est soumis l'échantillon. Cela a permis d'observer des embryons de drosophiles ou de poissons zèbres pendant plusieurs étapes de leur développement et ainsi de suivre les mécanismes à l'œuvre lors de leur croissance [4, 5]. Les techniques de super-résolution (PALM, SIM, STED...) ont, quant à elles, permis de surpasser la limite de diffraction, permettant d'atteindre une résolution de 100 à 10 nm [2, 6]. Elles ouvrent ainsi de nombreuses perspectives pour étudier des phénomènes jusqu'à présent inaccessibles en microscopie optique.

Toutefois, ces performances nouvelles sont obtenues au prix de compromis parfois importants. Par exemple, le temps d'acquisition de certaines techniques est fortement augmenté, limitant l'observation d'échantillons vivants et dynamiques. Les marquages ou l'acquisition des images peuvent également être plus complexes et peu compatibles avec une utilisation à grande échelle [2]. Il est donc essentiel de continuer à perfectionner ces techniques afin d'améliorer leurs performances et

élargir leurs champs d'application. Les principaux critères à considérer lors du développement d'une nouvelle technique de microscopie optique sont résumés sur la figure 1 [2].

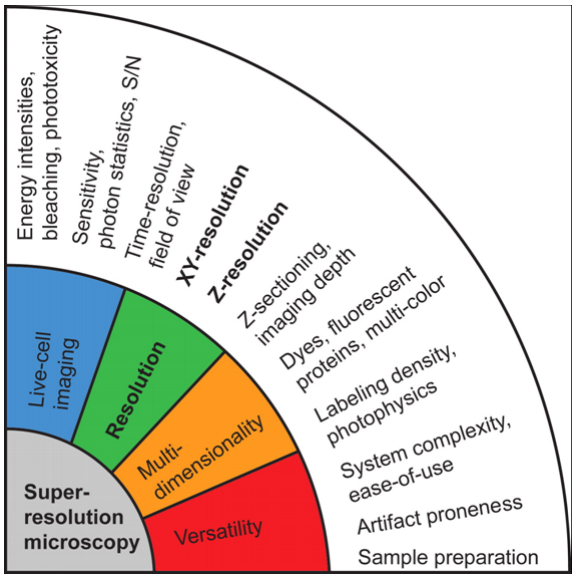


FIGURE 1 – Challenges et compromis pour la microscopie de super-résolution (extrait de [2]).

Au cours de ma thèse, j'ai travaillé sur différents outils pour la microscopie optique plein champ, permettant d'augmenter les performances des systèmes d'imagerie actuels. Un des objectifs principaux étant le développement de techniques imposant le minimum de restrictions sur les échantillons, nous nous sommes assez naturellement tournés vers la microscopie à illumination structurée en microscopie plein champ.

Le premier chapitre est consacré à l'étude de deux techniques d'illumination structurée permettant d'obtenir un gain en résolution axiale en limitant la perte de résolution temporelle due à l'acquisition de plusieurs images brutes pour obtenir une image de coupe optique. Ces deux techniques ont été caractérisées et appliquées à l'observation d'échantillons biologiques pour visualiser le gain qu'elles pouvaient apporter.

Dans le deuxième chapitre, nous décrirons une seconde méthode d'illumination structurée permettant un gain en résolution latérale et notamment le développement d'un nouvel algorithme de reconstruction des images grâce à une approche bayésienne. Les avantages et limitations de cet outil seront décrits, notamment la possibilité de réduire le nombre d'images nécessaires à cette reconstruction, permettant d'envisager une augmentation de cadence.

Le troisième chapitre concerne le développement d'un système d'optique adaptative pour la microscopie plein champ, inspiré des techniques développées en astronomie. L'ajout d'étoiles artificielles dans l'échantillon permet de mesurer et de corriger les aberrations du système et de l'échantillon. L'utilisation d'étoiles spectralement

indépendantes de l'échantillon permet de préserver celui-ci lors de la correction et de n'utiliser sa fluorescence que lors de la phase d'imagerie.

Enfin dans le dernier chapitre, nous décrirons la réalisation d'un instrument de mesure de rendement quantique par effet de lentille thermique permettant de s'affranchir de l'utilisation d'une référence fluorescente lors de la mesure. Ceci pourrait permettre une meilleure caractérisation des fluorophores infrarouges pour lesquels peu de références fluorescentes existent.

# Bibliographie

[1] B. N. G. Giepmans, S. R. Adams, M. H. Ellisman, and R. Y. Tsien. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5771) :217–24, 2006.

[2] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 190(2), 2010.

[3] J. M. Murray, P. L. Appleton, J. R. Swedlow, and J. C. Waters. Evaluating performance in three-dimensional fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 228(Pt 3), 2007.

[4] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, 2004.

[5] P. J. Keller, A. D. Schmidt, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer. Reconstruction of zebrafish early light sheet microscopy. *Science*, 322(November), 2008.

[6] C. G. Galbraith and J. A. Galbraith. Super-resolution microscopy at a glance. *Journal of cell science*, 124(Pt 10), 2011.

# I

# Microscopie 3D de fluorescence : coupes optiques plein champ par illumination structurée. Application à des échantillons épais fixés et vivants

Ce premier chapitre est consacré à l'étude de deux techniques de coupe optique plein champ par illumination structurée. Les principes de ces techniques sont exposés ainsi que leurs principales limitations, puis les modifications apportées en vue d'augmenter la cadence d'acquisition sont développées. Enfin des échantillons biologiques permettent de visualiser l'efficacité de ces techniques.

# I.1 Profondeur de champ, coupe optique, état de l'art et illumination structurée

## I.1.1 Profondeur de champ

### Interprétation géométrique

Dans le cadre de l'optique géométrique, un système optique réalise l'image d'un point objet source uniquement dans le plan image conjugué du plan objet. Si le système est stigmatique, cette image est également un point. En revanche, dans des plans différents du plan conjugué de l'objet, les faisceux lumineux issus de l'objet ne convergent pas, et l'image du point objet est une tache dont le diamètre dépend de l'angle des faisceaux marginaux et de la distance au plan image. Si la taille de cette tache est plus grande que la taille des éléments du détecteur (pixels en général), l'image de l'objet sera considérée comme floue.

Pour un système optique réglé dans une configuration donnée, la profondeur de champ correspond à la distance entre le premier et le dernier plan de l'espace objet qui apparaîtront nets sur le détecteur. La figure I.1 illustre la position de ces plans et la profondeur de champ. Celle-ci dépend entre autres de la taille des pixels et de l'ouverture du système. En effet, plus les angles des rayons collectés seront importants, plus le diamètre des images d'objets défocalisés sera important, et donc plus petite sera la profondeur de champ.

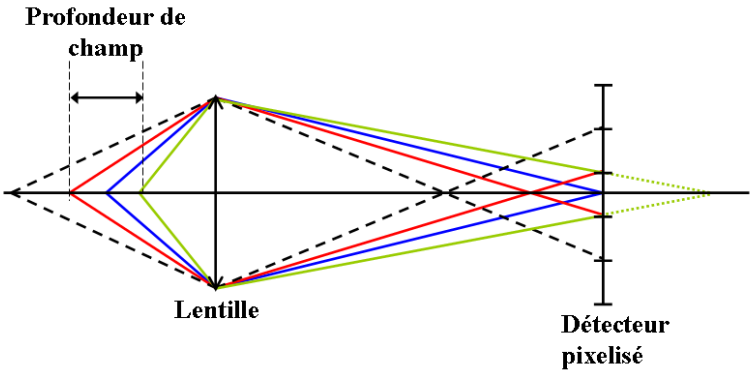


Figure I.1 – Illustration de la profondeur de champ d'un point de vue géométrique.

### Interprétation ondulatoire

Le caractère ondulatoire de la lumière empêche de focaliser l'image d'un point objet infiniment petit au delà de la limite de diffraction, ce qui aboutit à une tache d'une taille de l'ordre de $\lambda/2$. Ainsi en microscopie classique, l'image d'un point source est une tache en général plus grande qu'un pixel. Mais l'extension axiale de cette tache focale est également limitée par la diffraction. La profondeur de champ est alors définie à partir des variations d'intensité suivant l'axe optique. La taille typique de cette tache fournit une mesure de la profondeur de champ $d$ [1] :

$$d = \frac{\lambda n}{ON^2}$$

avec $\lambda$ la longueur d'onde de la lumière considérée, $n$ l'indice optique du milieu d'immersion entre l'objectif et l'échantillon et $ON$ l'ouverture numérique ($ON = n\sin(\alpha)$, $\alpha$ le demi angle de collection de la lumière).

En microscopie de fluorescence, une bonne collection des photons étant primordiale, on utilise des objectifs à forte ouverture numérique ($\alpha \sim 65°$), ce qui réduit fortement la profondeur de champ. Ceci permet de n'observer nettement qu'une couche très fine de l'échantillon, inférieure au micromètre pour des objectifs à fort grandissement. Mais l'observation d'échantillons épais pose problème, car en microscopie plein champ l'intégralité du volume de l'échantillon est illuminée. Le signal d'intérêt provenant du plan de mise au point est donc mêlé à la fluorescence provenant des plans en dehors de la profondeur de champ, ce qui réduit le contraste, le rapport signal sur bruit et limite la dynamique utile du détecteur.

Des solutions ont été développées depuis longtemps pour éviter ce problème. Le microscope confocal permet d'isoler la lumière provenant du plan de mise au point à l'aide d'un trou placé dans un plan conjugué du plan focal objet. Toutefois cette technique nécessite un balayage de l'échantillon pour obtenir une image complète de l'objet. Afin de garder une cadence d'acquisition des images élevée, il est nécessaire d'intégrer le signal sur un temps très court pour chaque point, et donc d'éclairer fortement l'échantillon, ce qui peut le dégrader. L'utilisation d'un disque de Nipkow permet d'accélérer l'acquisition des images grâce à un balayage de plusieurs trous en parallèle. Les microscopes confocaux ou à disque rotatif atteignent actuellement des cadences typiques de l'ordre de 5 et 30 images par seconde respectivement (pour des images 512x512). Toutefois, l'acquisition séquentielle du signal provenant de différentes zones de l'échantillon peut-être sensible au mouvement de celui-ci et induire des erreurs ou défauts dans l'image finale. De plus, l'efficacité de collection de ce type de microscope est faible comparée au microscope conventionnel plein champ (notamment à cause de la faible efficacité quantique des photomultiplicateurs utilisés et des photons de fluorescence perdus au passage du trou [2]), ce qui peut être limitant pour des objets fragiles et photosensibles.

Au lieu de bloquer la lumière émise en dehors du point focal, les microscopies non-linéaires évitent la génération de signal en dehors de ce point. Ces techniques (fluorescence à deux ou trois photons, imagerie de second ou troisième harmonique)

nécessitent l'absorption de plusieurs photons simultanément, ce qui n'a lieu que dans le volume focal du faisceau d'excitation, évitant la génération de lumière parasite. Elles nécessitent cependant des marquages spécifiques et des intensités d'excitation importantes. De même que précédemment, le balayage du faisceau excitateur limite la cadence d'acquisition à des valeurs similaires au microscope confocal.

Il reste donc intéressant d'implémenter des techniques de coupe optique pour la microscopie plein champ, où l'acquisition du signal se fait en parallèle sur tous les pixels de la caméra. De même que pour les techniques à balayage, il est possible d'isoler la zone de l'échantillon où a lieu la génération du signal d'intérêt (microscopie TIRF ou à feuille de lumière) ou de sélectionner la lumière provenant du plan de mise au point (illumination structurée).

### I.1.2 Illumination du plan focal : microscopies TIRF et à feuille de lumière

#### Microscopie de fluorescence par reflexion totale interne TIRF

La microscopie TIRF ou microscopie de Fluorescence par Réflexion Totale Interne tire profit de la génération d'ondes évanescentes à la réflexion totale d'un faisceau excitateur au niveau d'un dioptre. Ces ondes sont atténuées en quelques centaines de nanomètres après le dioptre, mais peuvent exciter des fluorophores présents dans cette couche. Ils vont convertir ces ondes évanescentes en fluorescence et donc en ondes propagatives. On peut alors détecter cette lumière sur la caméra. La fluorescence détectée provient uniquement des 200 premiers nanomètres de l'échantillon observé, ce qui permet une imagerie avec un très bon contraste, comme le montre la figure I.2 [3, 4].

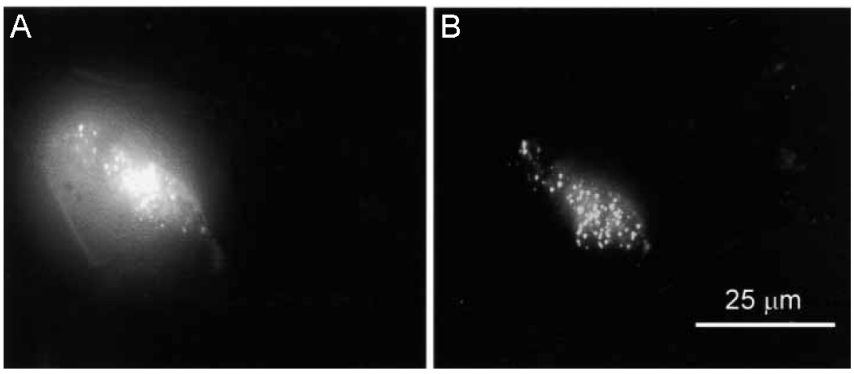


FIGURE I.2 – Cellules produisant des granules contenant de la GFP : A en épifluorescence et B en microscopie TIRF (extrait de [4]).

Cette technique est très utilisée pour l'observation des phénomènes biologiques ayant lieu au niveau de la membrane plasmique des cellules, car la fluorescence de la fine membrane cellulaire n'est pas parasitée par la fluorescence du milieu intracellulaire. Cette technique n'est toutefois pas adaptée pour l'observation de phénomènes intracellulaires. De plus, cette technique suppose une interaction entre

l'objet étudié et le support, ce qui peut pertuber le comportement de l'échantillon lui-même.

#### Feuille de lumière

Pour illuminer sélectivement un plan d'intérêt dans un échantillon épais en microscopie plein champ, une solution consiste à l'illuminer par le côté. On parle de microscopie à feuille de lumière, car une lentille cylindrique permet d'obtenir un faisceau d'illumination en forme de feuille (le plus fin possible axialement et le plus large possible latéralement par rapport à l'objectif de collection) (Figure I.3). L'utilisation d'éléments optiques placés à 90° de l'axe de détection pour l'illumination rend cependant difficile l'utilisation d'objectifs de grandissement important, car ils ont généralement une courte distance de travail. Cette technique est pour l'instant principalement utilisée pour l'observation d'organismes multicellulaires (racines, petits animaux, amas cellulaires) [5, 6]. Le développement récent de nouveaux objectifs à fort grandissement avec une distance de travail importante (plusieurs millimètres) permettra d'appliquer cette technique à de nouveaux types d'échantillons.

Les deux techniques précédentes sont très efficaces, mais ne sont pas toujours applicables à tous types d'échantillons, en particulier l'observation de phénomènes intra-cellulaires. La microscopie à illumination structurée basée sur une sélection de la lumière provenant du plan de mise au point permet la réalisation de coupes optiques pour de nombreux échantillons et quelque soit l'objectif utilisé.

### I.1.3 Illumination structurée

La réalisation de coupes optiques par illumination structurée repose sur le fait que toutes les fréquences spatiales présentes dans l'objet ne sont pas atténuées de la même façon à la traversée de l'objectif d'un microscope optique. Autrement dit, la profondeur de champ dépend de la fréquence spatiale considérée.

#### Le microscope optique : un filtre passe-bas optique

La fonction de transfert d'un microscope optique caractérise la façon dont les différentes fréquences spatiales de l'échantillon sont transmises par le système optique jusqu'au détecteur. Nous nous intéressons ici à la microscopie de fluorescence, nous allons donc nous restreindre à l'étude de la fonction de transfert incohérente.

L'image d'un point source infiniment petit par un microscope ne sera pas un point infiniment petit, mais une tache d'un certain diamètre du fait de la diffraction par la pupille du microscope. Cette tache, appelée tache d'Airy ou réponse impulsionnelle du système (que nous abrégerons en PSF pour Point Spread Function), a l'allure suivante si on la ramène dans le plan focal objet d'un microscope plein champ classique (à pupille circulaire) [7] :

$$I(r) = I_0 \left| \frac{J_1(kONr)}{kONr} \right|^2 , \tag{I.1}$$

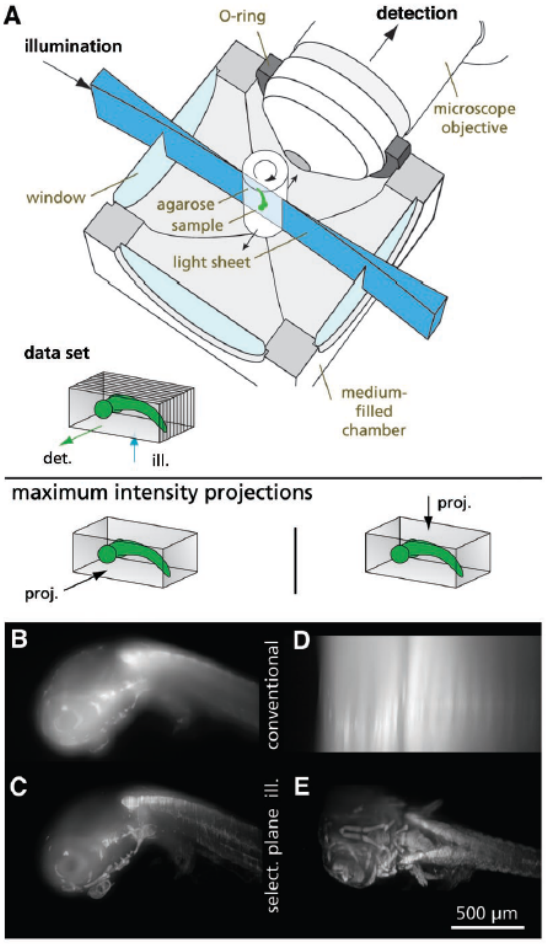


FIGURE I.3 – Schéma d'un montage d'illumination à feuille de lumière et comparaison de reconstructions 3D d'un embryon de poisson (Medaka) en microscopie à feuille de lumière (C et E) et plein champ classique (B et D) (extrait de Huisken et al. [5]).

avec $r$ la distance au centre de la figure de diffraction, $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ le nombre d'onde, $ON$ l'ouverture numérique et $J_1$ la fonction de Bessel de premier ordre.

La figure I.4 A représente un profil de cette tache d'Airy pour un objectif 100× à huile typique ($ON = 1,4$). Le filtrage des fréquences spatiales est à l'origine de cette largeur finie de 184 nm à mi-hauteur. Les rebonds que l'on peut observer sont dus au fait que la bande passante spatiale du système est limitée à une fréquence de coupure de $\frac{2ON}{\lambda}$.

La tache d'Airy est la réponse impulsionnelle du système. On en déduit la fonction de transfert optique (abrégé en OTF pour Optical Transfer Function) en prenant sa transformée de Fourier. La figure I.4 B illustre cette fonction de transfert avec $\nu$ la fréquence réduite $\nu = \nu_{\text{réel}}\frac{ON}{\lambda}$ définie dans le plan objet. Le support de la fonction de transfert est $\nu \in [-2; 2]$, cela signifie que des fréquences spatiales réduites supérieures à 2 ne seront pas transmises. On retrouve bien la fréquence de coupure

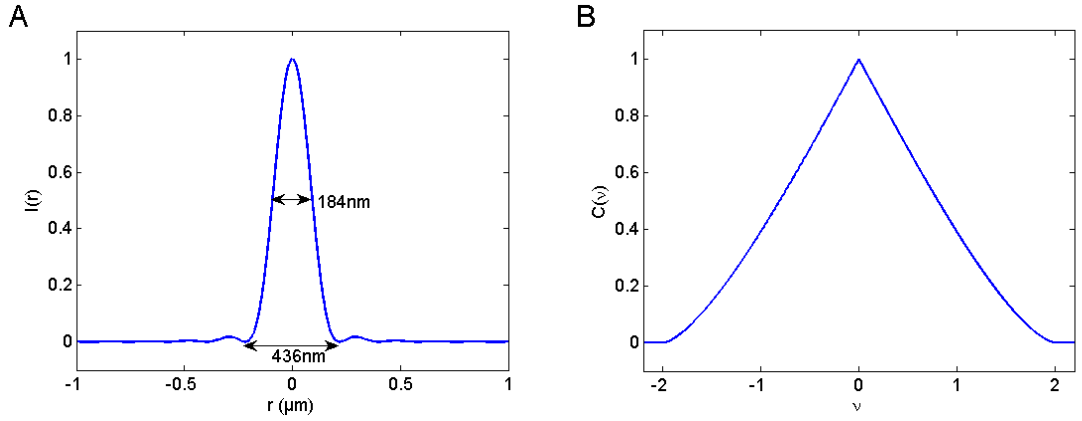


FIGURE I.4 – A : Tache d'Airy simulée avec $\lambda = 500\,\text{nm}$ et $ON = 1,4$, B : Fonction de transfert optique correspondante dans le plan focal en coordonnées réduites.

d'un microscope optique, $\frac{2ON}{\lambda}$.

Cette figure montre le filtrage passe-bas opéré par un microscope optique dans le plan de mise au point : quand la fréquence spatiale augmente, la transmission du signal diminue. Mais ce filtrage a également lieu axialement. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'image d'un point en dehors du plan de mise au point est une tache d'une certaine largeur. La défocalisation entraîne la disparition des hautes fréquences spatiales de l'image, comme le montrent les courbes de la figure I.5 obtenues en calculant la fonction de transfert pour différentes valeurs de défocalisation $z$, à partir des fonctions suivantes qui sont des approximations de l'OTF [8, 9] :

$$C(\nu, u) = 2f(\nu)\frac{J_1(u\nu(1-\nu/2)}{u\nu(1-\nu/2)}, \tag{I.2}$$

$$\text{avec : } f(\nu) = 1 - 0,69\nu + 0,0076\nu^2 + 0,043\nu^3, \tag{I.3}$$

$$\text{et : } u = \frac{8\pi n}{\lambda}\sin\left(\frac{\alpha}{2}\right)^2 z \text{ la coordonnée axiale réduite.} \tag{I.4}$$

Sur cette figure, on peut voir que les hautes fréquences spatiales sont très vite atténuées avec la défocalisation, alors que les basses fréquences spatiales se maintiennent plus longtemps, le cas extrême étant la fréquence nulle qui n'est jamais atténuée. L'observation d'une mire radiale permet de bien visualiser cet effet (figure I.6). Une mire radiale est constituée de basses fréquences spatiales à l'extérieur, et de fréquences de plus en plus élevées lorsqu'on se rapproche du centre de la mire. Sur la première image où la mire est au point, les basses fréquences spatiales sont nettes, et quand on se rapproche de la fréquence de coupure du microscope, les franges deviennent de plus en plus floues, jusqu'à perdre la modulation au centre de l'image. En défocalisant l'image, le centre de l'image devient très vite flou, alors que les basses fréquences restent visibles même à forte défocalisation.

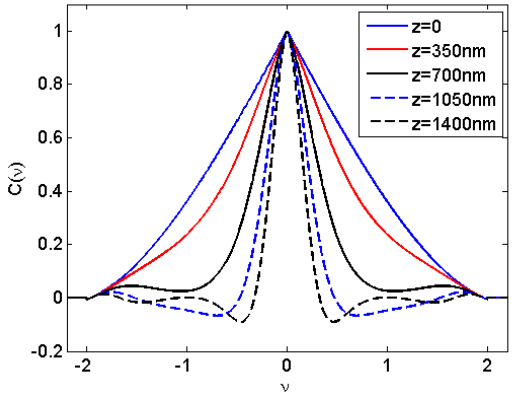


FIGURE I.5 – Fonction de transfert optique en coordonnées latérales réduites pour différentes valeurs de défocalisation z (calculée avec pour un objectif 100× à huile, $ON = 1,4$).

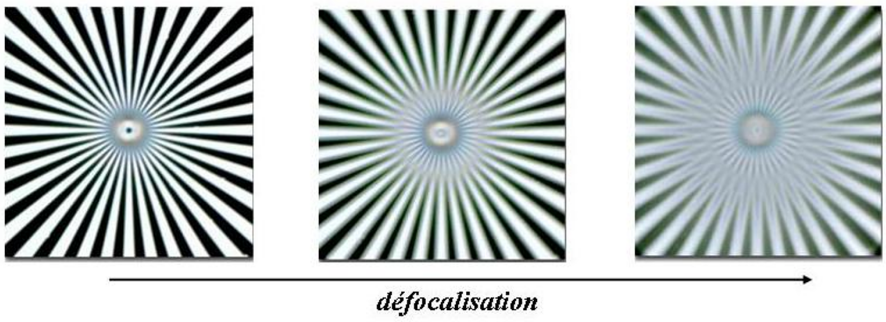


FIGURE I.6 – Mire radiale observée au microscope pour différentes valeurs de défocalisation.

Nous allons maintenant voir comment ce filtrage passe-bas axial peut nous permettre d'extraire l'information du plan focal objet, à partir d'images obtenues en illumination structurée.

### Principe

Le principe de l'illumination structurée est de moduler l'éclairage dans le plan de mise au point en projetant une grille sur l'échantillon par exemple. Cette grille ayant une certaine fréquence spatiale, elle ne sera nette que sur une certaine épaisseur qui est la profondeur de champ à la fréquence correspondante [10]. Les images acquises seront donc composées de deux parties : la lumière issue du plan de mise au point modulée par la grille d'illumination d'une part, la lumière provenant des plans hors mise au point non modulée d'autre part.

Cela permet de discriminer l'information venant du plan de mise au point. Il faut maintenant extraire cette information.

### Grille mobile

Les images acquises par la caméra peuvent s'exprimer sous la forme :

$$I(x,y) = I_{of}(x,y) + I_{if}(x,y)\left(\frac{1+cos(2\pi f_0 x + \phi_0)}{2}\right), \tag{I.5}$$

avec $I(x,y)$ l'image acquise par la caméra en fonction du pixel $(x,y)$, $I_{of}(x,y)$, la partie de l'image provenant des plans hors mise au point, $I_{if}(x,y)$ l'image du plan de mise au point, $f_0$ la fréquence de la grille imagée et $\phi_0$ la phase de la grille (on considère dans un premier temps un motif purement sinusoïdal par simplicité. Dans la suite, nous verrons l'effet que peuvent avoir les harmoniques de la fréquence fondamentale). La composante qui nous intéresse est $I_{if}$. Pour l'extraire, on peut acquérir plusieurs images en décalant la grille d'un tiers de période (déphasage du motif de $\frac{2\pi}{3}$) à chaque fois. Les images acquises $I_0$ à $I_2$, ne vont différer que par la phase de la grille. En utilisant les formules de reconstruction suivante :

$$R = \left|I_0 + I_1 e^{\frac{2i\pi}{3}} + I_2 e^{\frac{4i\pi}{3}}\right| = \frac{3}{4} I_{if} \tag{I.6}$$

$$R = \sqrt{\frac{(I_1 - I_0)^2 + (I_2 - I_1)^2 + (I_0 - I_2)^2}{2}} = \frac{3}{4} I_{if}, \tag{I.7}$$

on supprime la composante non modulée et on ne garde que la partie $I_{if}$ sans modulation. La figure I.7 illustre bien le gain obtenu par cette méthode.

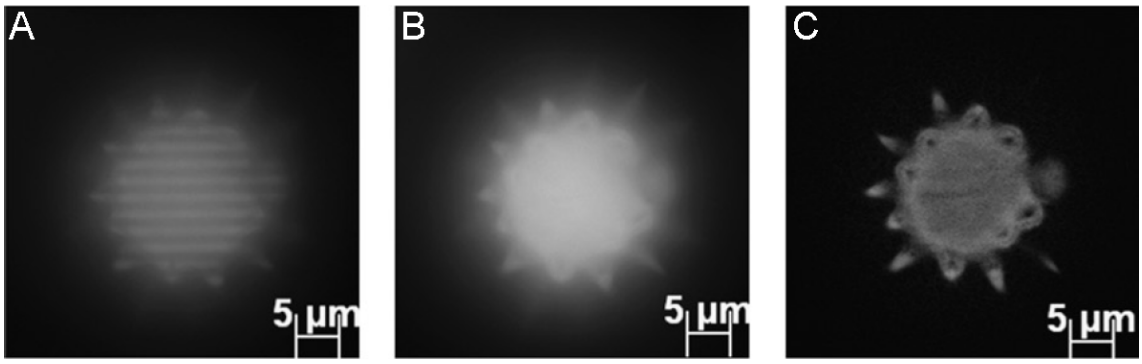


FIGURE I.7 – Exemple de coupe optique avec grille décalée d'un tiers de période par image. A : image structurée, B : image plein champ, C : coupe optique résultant de la reconstruction I.6 (Extrait de [9]).

Comme on le verra par la suite, cette technique est très facile à mettre en œuvre mais elle nécessite l'utilisation de trois images consécutives [9–11]. Pour augmenter la cadence d'acquisition, il est intéressant d'acquérir ces différentes images simultanément. Cela est possible en utilisant trois couleurs ou trois états de polarisation superposés et en isolant chaque image à la détection (caméra couleur ou trois caméras avec les filtres de polarisation adéquats) [12, 13]. Toutefois ces techniques sont difficilement applicables à la microscopie de fluorescence, car d'une part l'utilisation

de trois fluorophores spectralement distincts est très lourde au niveau de la procédure de marquage, et d'autre part l'émission de fluorescence n'est généralement pas polarisée (même partiellement).

Il est également possible de n'utiliser que deux images pour obtenir un résultat similaire au prix d'un traitement d'image plus complexe.

### Microscopie HiLo

La technique que nous venons de présenter permet d'obtenir une coupe optique à partir de trois images acquises consécutivement. Cette discrimination axiale se fait donc au détriment de la cadence d'acquisition. La réduction du nombre d'images nécessaires à la reconstruction d'une coupe optique permettrait donc d'augmenter la cadence d'imagerie.

La technique HiLo développée par Jerome Mertz permet d'obtenir des coupes optiques en n'utilisant que 2 images [14, 15]. Le but est d'extraire l'information basse fréquence d'une image modulée, comme les images précédentes. En effet, la grille n'étant au point que sur la profondeur de champ, les basses fréquences du plan de mise au point seront modulées, et on pourra donc les isoler des basses fréquences non modulées. L'information haute fréquence est récupérée d'une image plein champ classique, car on sait que ces hautes fréquences ne proviennent que du plan de mise au point. Ainsi toute l'information spectrale est accessible, il ne reste plus qu'à recombiner les deux informations pour obtenir l'image de coupe optique. La principale difficulté de cette technique reste la reconstruction des images, notamment de s'assurer de la complémentarité des deux parties de spectres provenant d'images différentes.

La figure I.8 montre un exemple de réalisation de cette technique HiLo sur un échantillon de papier optique fluorescent, extrait de Santos et al. [15].

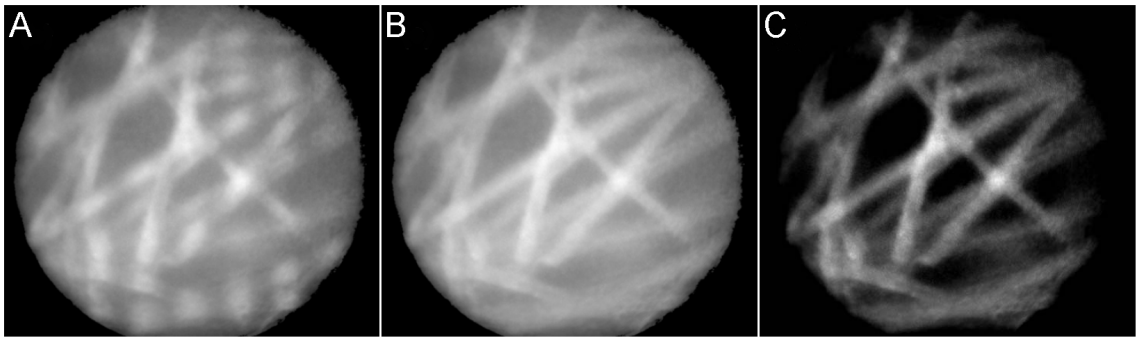


FIGURE I.8 – Réalisation de coupes optiques HiLo, à partir de deux images, l'une avec une grille (A) et l'autre en illumination classique (B). C : image reconstruite avec coupe optique. Champ de 240 $\mu$m (Extrait de [15]).

L'image modulée peut également être obtenue en illuminant l'échantillon avec un laser dont on ne casse pas la cohérence spatiale. On éclaire alors l'échantillon avec du speckle (terme que l'on préfèrera à tavelures), un réseau de taches (de la taille

d'une tache d'Airy) avec un contraste de 1. Une mesure des variations du signal sur des groupes de pixels permet d'isoler la composante basse fréquence du plan de mise au point. De plus en modifiant la taille de ces groupes de pixels, il est possible de faire varier a posteriori l'épaisseur de la coupe optique réalisée.

## I.2 Mise en œuvre et optimisation

Dans la suite, nous allons étudier deux méthodes d'illumination structurée permettant d'accélérer la cadence d'acquisition d'images de coupe optique. Nous allons tout d'abord détailler le montage utilisé et le fonctionnement du système.

### I.2.1 Description du montage

#### Montage

Le montage utilisé est relativement simple (Figure I.9). Il se base sur un microscope plein champ inversé commercial (Olympus IX71). On ajoute une grille physique (mire de Ronchi ou grille sinusoïdale) à l'emplacement du diaphragme de champ, qui est conjuguée avec l'échantillon (plan objet de l'objectif) et la caméra (plan image du microscope). La grille physique se retrouve donc imagée dans le plan de mise au point. Elle est fixée sur un support permettant de régler sa position (axialement, transversalement et angulairement) et de la déplacer au cours de l'acquisition des images grâce à un moteur piézoélectrique.

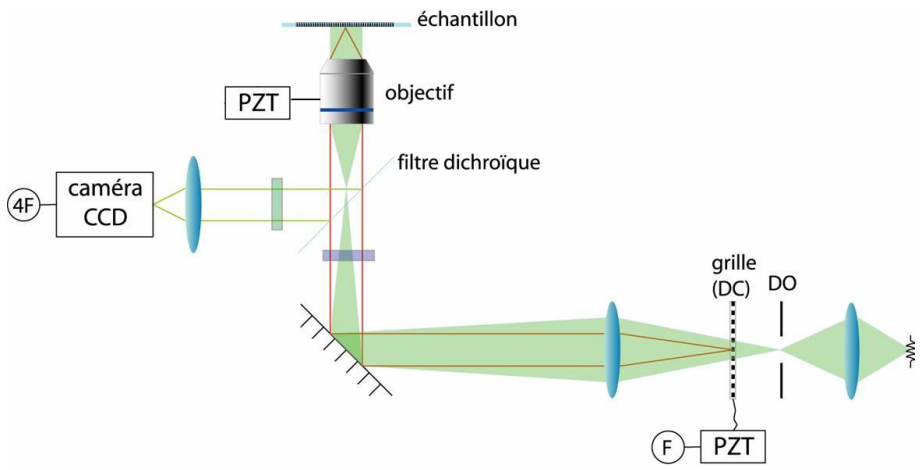


FIGURE I.9 – Schéma du microscope à illumination structurée utilisé (DO : diaphragme d'ouverture, DC : diaphragme de champ, PZT : support piézoélectrique).

Nous avons choisi d'utiliser une grille physique pour notre montage et non de projeter des franges d'interférences par simplicité de mise en œuvre ; en effet, l'ajout d'une grille au niveau du diaphragme de champ est très facile sur un microscope plein champ conventionnel et peut-être utilisé avec une lampe blanche à spectre

large. De plus ce choix permet de réduire la présence d'artefacts de reconstruction [9].

Ce montage nous permet de réaliser une coupe optique de l'échantillon. Si nous voulons récupérer une information 3D, il faut ensuite déplacer l'objectif par rapport à l'échantillon. Pour cela, l'objectif est monté sur un support piézoélectrique, permettant de déplacer le plan de mise au point et ainsi d'imager différents plans d'un même échantillon. La combinaison de ces images permet de réaliser une reconstruction 3D de l'objet d'intérêt.

Enfin, un programme informatique « maison » permet de gérer et synchroniser les différentes étapes nécessaires : acquisition des images, déplacement de la grille, déplacement de l'objectif. Avant de commencer l'acquisition des images, il faut régler quelques paramètres, tels que la phase initiale ou l'amplitude de la modulation de la grille. Un protocole rapide, détaillé par la suite, nous permet de les régler simplement.

#### Grille fixe pendant l'acquisition

La méthode la plus simple consiste à acquérir trois ou quatre images avec une grille immobile lors de l'exposition de chaque image. Un décalage de la grille d'un tiers ou d'un quart de période entre les images permet d'utiliser les combinaisons simples suivantes $R_3$ et $R_4$ (respectivement I.8 et I.9) pour obtenir les images de coupe optique [9–11] comme le montre la figure I.7 :

$$R_3 = \sqrt{\frac{(I_1 - I_0)^2 + (I_2 - I_1)^2 + (I_0 - I_1)^2}{2}} = \frac{3}{4} I_{if} \tag{I.8}$$

$$R_4 = \sqrt{(I_0 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2} = I_{if} \tag{I.9}$$

Cette technique a fait ses preuves et est utilisée par les microscopes à illumination structurée commerciaux (Apotome de Zeiss ou Optigrid d'Olympus par exemple). Toutefois, la cadence d'acquisition des images est limitée, car avant d'acquérir une image, il est nécessaire d'attendre la stabilisation de la grille (de l'ordre de quelques millisecondes).

Pour accélérer la cadence d'acquisition associée à cette technique d'illumination structurée, il faut s'affranchir de la stabilisation de la grille. Cela est possible en déplaçant la grille de manière continue.

### I.2.2 Utilisation d'une grille oscillante

#### Principe

Nous avons choisi de déplacer la grille physique de manière sinusoïdale. Une fois la modulation débutée, il n'est plus nécessaire d'attendre sa stabilisation, il faut simplement synchroniser l'exposition de la caméra et le déplacement de la grille en tenant compte de l'éventuel déphasage induit par le système. On a donc maintenant une grille se déplaçant continûment. Les calculs présentés dans l'annexe A montrent que l'on peut toujours exprimer les images acquises comme la somme d'images de

fond non modulées et d'images au point modulées sinusoïdalement. On peut en extraire deux combinaisons d'images $\Sigma_c$ et $\Sigma_s$ dont les modulations sont respectivement cosinusoïdale et sinusoïdale. La combinaison $R$ de ces images pondérées par le poids de chaque modulation $\Gamma_c$ et $\Gamma_s$ permet d'obtenir une image de coupe optique.

$$\Sigma_c = I_0 - I_1 + I_2 - I_3 \tag{I.10}$$

$$\Sigma_s = I_0 - I_1 - I_2 + I_3 \tag{I.11}$$

$$R = \sqrt{\left(\frac{\Sigma_c}{\Gamma_c}\right)^2 + \left(\frac{\Sigma_s}{\Gamma_s}\right)^2} = \frac{2T}{\pi} I_{if}, \tag{I.12}$$

où $T$ est la période de déplacement de la grille. Les valeurs de $\Gamma_c$ et $\Gamma_s$ dépendent fortement des paramètres de modulation de la grille (amplitude de déplacement et phase ou position initiale de la grille). Le schéma I.10 illustre la synchronisation de l'acquisition des images avec le déplacement de la grille. On peut repérer l'amplitude de déplacement et la phase initiale lors de l'acquisition de la première image.

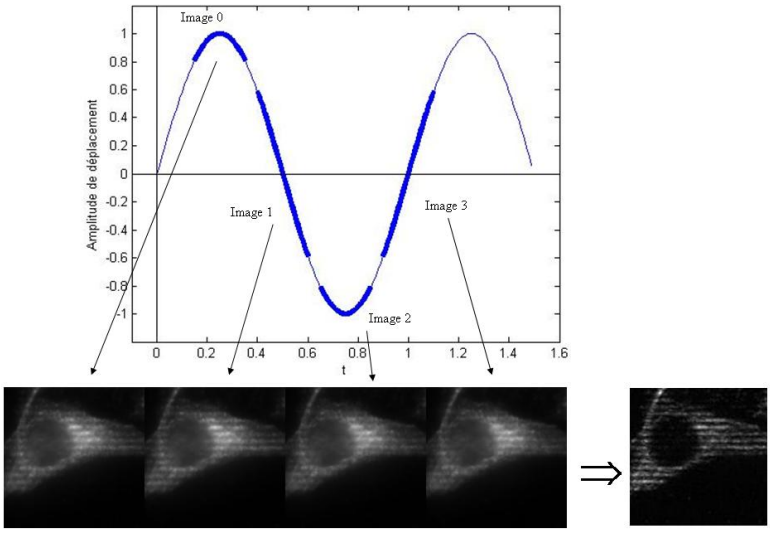


FIGURE I.10 – Schéma de l'acquisition des images. Les traits bleus épais indiquent les périodes d'exposition de la caméra, les images de cellules Hela avec la tubuline marquée illustrent l'effet de coupe optique obtenu ainsi que la présence d'artefacts.

On ne connait pas les valeurs de ces termes $\Gamma$; on choisit donc la phase et l'amplitude de déplacement de manière à les égaliser, ce qui permet de reconstruire les images plus simplement avec la formule $R$ suivante :

$$R = \sqrt{(\Sigma_c)^2 + (\Sigma_s)^2} = \frac{2T\Gamma}{\pi} I_{if}, \tag{I.13}$$

Si ces deux paramètres sont mal choisis, les images reconstruites feront apparaître des artefacts de reconstruction, comme le montre la figure I.10. La majorité de

ces artefacts peuvent être aisément supprimés en corrigeant les décalages entre les paramètres attendus et obtenus [16]. Nous avons dans un premier temps cherché à optimiser le réglage des paramètres pour faire disparaître ces artefacts et résidus de grille.

### Optimisation du système

**Phase et amplitude optimale.** Un travail de simulation a permis de mieux comprendre l'origine de ces artefacts et de déterminer les paramètres dominants. Les images acquises ont été modélisées pour différentes tailles de grille et différents paramètres de modulation. Nous avons pu en déduire les conclusions suivantes.

Le réglage de la phase initiale peut se faire très facilement en annulant l'image $I_1 - I_3$, cela correspond à une phase bien précise qui ne dépend que du temps d'intégration et de la période de modulation de la grille. Un réglage automatique et fiable de ce paramètre a donc été mis en place. Le schéma I.10 montre bien à quoi correspond cette égalité ; le déplacement de la grille est le même pour les deux images $I_1$ et $I_3$ au sens de déplacement près. De plus, l'égalité de la deuxième et de la dernière image rend inutile l'acquisition de cette dernière. Il est donc possible de reconstruire des coupes optiques avec seulement trois images, ce qui permet d'envisager une augmentation de cadence.

Le réglage de l'amplitude optimale de déplacement est plus difficile. Une fois la phase initiale fixée, ce paramètre va principalement jouer sur les valeurs de $\Gamma_c$ et $\Gamma_s$. Nous allons donc optimiser le déplacement de la grille en essayant d'égaler le poids de la modulation à la fréquence de grille dans les combinaisons $\Sigma_c$ et $\Sigma_s$. En effet, les combinaisons $\Sigma$ peuvent s'exprimer ainsi :

$$\Sigma_c = \frac{2T}{\pi}\Gamma_c I_{if} cos(2\pi f_0 + \phi_0) \tag{I.14}$$

$$\Sigma_s = \frac{2T}{\pi}\Gamma_s I_{if} sin(2\pi f_0 + \phi_0). \tag{I.15}$$

Si les deux termes $\Gamma$ sont identiques, la reconstruction des images en utilisant la formule I.13 évitera l'apparition d'une modulation résiduelle à $2f_0$. On minimise ainsi l'apparition de résidus et d'artefacts de grille. Ce réglage a également été mis en place.

Pour finir, nous avons constaté que ce réglage de l'amplitude n'est pas critique puisqu'un mauvais réglage peut être compensé avec un facteur correctif lors de la reconstruction.

**Réduction des résidus de grille a posteriori.** Le réglage de l'amplitude de déplacement de la grille n'étant pas nécessairement optimal, en particulier à cause de dérives thermiques du système, une correction a posteriori des images s'avère indispensable. En effet la modulation dans les combinaisons $\Sigma_c$ et $\Sigma_s$ reste différente. Un facteur correctif calculé à partir de ces valeurs peut être inséré dans la formule

de reconstruction, pour devenir :

$$R = \sqrt{\Sigma_c^2 + r^2 \Sigma_s^2}, \tag{I.16}$$

où $r$ est le rapport des amplitudes de modulation dans les deux combinaisons $\Sigma$. La figure I.11 montre l'effet drastique de ce facteur sur la reconstruction des images et la réduction des artefacts de reconstruction même lorsque le système est initialement déréglé. On voit clairement sur l'image B d'importants résidus de grille, ce que confirme la transformée de Fourier E. Lorsqu'on optimise la reconstruction, on voit que la plupart des résidus ont disparu, autant dans l'image C que dans la transformée de Fourier F.

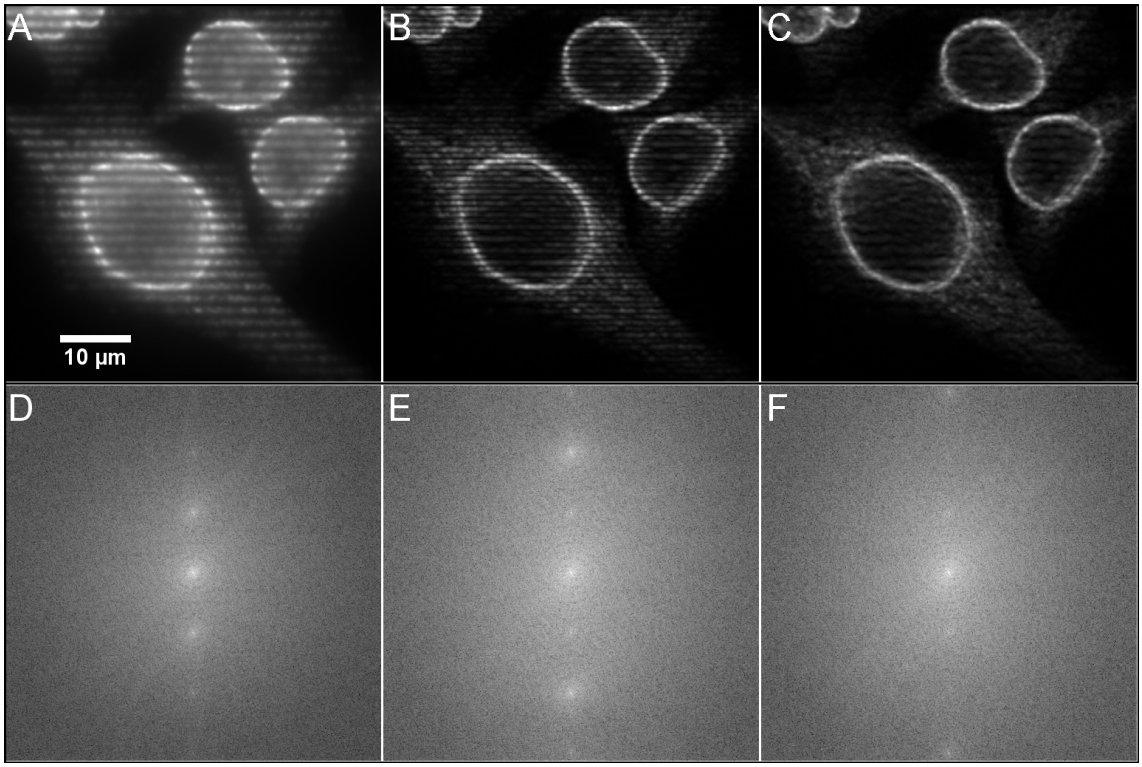


FIGURE I.11 – Optimisation de la reconstruction des images. Cellules Hela dont la lamine a été marquée par des quantum dots. A : image modulée, B : image reconstruite sans optimisation ($r = 1$), C : image reconstruite optimisée ($r = 0{,}41$). D-F : transformées de Fourier des images supérieures.

Il est cependant très difficile de supprimer totalement les résidus de grille. Cela est probablement dû à l'amplification des fréquences spatiales de l'échantillon proches de la fréquence de grille [9]. Un post-traitement plus complexe (minimisation des résidus à $f$ et $2f$ [17] ou déconvolution par exemple) serait nécessaire pour faire disparaître totalement ces artefacts.

**Influence de la grille physique.** La grille physique que nous utilisons est généralement une mire de Ronchi de rapport cyclique différent de 50 %. Le spectre de cette

grille contient donc des harmoniques paires et impaires de la fréquence fondamentale. La recombinaison de ces images par la technique présentée précédemment peut générer des résidus de grille à la fréquence fondamentale et à ses différentes harmoniques. Ces résidus ne pourront être efficacement minimisés par un facteur correctif et s'il sont trop importants, il sera nécessaire d'augmenter le nombre d'images à acquérir pour les supprimer efficacement [17].

En pratique, ces harmoniques ont des fréquences importantes et sont donc suffisamment atténuées pour générer peu d'artefacts sur les images reconstruites. Dans le cas contraire, il est possible d'utiliser une grille parfaitement sinusoïdale.

# I.3 Caractérisation des performances

Nous avons ensuite caractérisé précisément l'effet de coupe obtenu grâce à cette technique pour le comparer à la valeur théorique, ainsi qu'aux autres techniques de coupe optique.

## I.3.1 Epaisseur de coupe théorique

Nous allons tout d'abord déterminer l'expression de l'épaisseur de coupe théorique pour un échantillon fluorescent, puis pour un échantillon réfléchissant.

### Cas d'un échantillon fluorescent

L'épaisseur de coupe théorique peut-être déterminée grâce à une fonction de transfert axial équivalente du microscope. Le processus de reconstruction n'étant pas linéaire, il n'y a pas à proprement parler de fonction de transfert du système. Toutefois, on peut estimer l'efficacité de notre technique en utilisant une approche similaire. Les calculs présentés sont fortement inspirés de Karadaglić et Wilson [9] et Chasles et al. [18], à partir d'une expression de la fonction de transfert axiale d'un microscope déterminée par Stokseth [8].

On se place dans le cas particulier d'un échantillon constitué d'un film fluorescent uniforme très fin. Le signal détecté en fonction de la fréquence réduite dans le plan $\nu'$ et de la défocalisation réduite $u$ peut s'écrire :

$$T(u,\nu') = \left| 2\frac{J_1\left(u\nu'\left(1-\frac{\nu'}{2}\right)\right)}{u\nu'\left(1-\frac{\nu'}{2}\right)} \right| \tag{I.17}$$

$$\text{avec } \nu' = \nu\frac{\lambda}{ON} \tag{I.18}$$

$$\text{et } u = 4kn\sin^2\left(\frac{\alpha}{2}\right)z, \tag{I.19}$$

avec $\nu$ la fréquence spatiale dans le plan objet, $\nu'$ la fréquence spatiale réduite, $\lambda$ la longueur d'onde, $ON = n\sin(\alpha)$ l'ouverture numérique de l'objectif utilisé, $k$

le vecteur d'onde, $n$ l'indice du milieu d'immersion et $\alpha$ l'angle de collection de la lumière par l'objectif. La coordonnée réduite $u$ peut s'écrire de plusieurs façons et l'expression retenue est issue d'approximations au premier ordre de la formule exacte donnée par Stokseth [8]. Cette courbe $T$ peut être vue comme une fonction de transfert axiale d'un microscope en coordonnées réduites.

Si on trace cette courbe $T$ en fonction de la défocalisation réduite $u$ pour différentes valeurs de fréquence réduite, on obtient les courbes I.12. On observe que la fréquence nulle n'est jamais atténuée (courbe bleue), alors que les autres fréquences le sont d'autant plus qu'elles sont élevées, mais inférieures à 1. En effet, le terme $\nu'(1-\frac{\nu'}{2})$ étant symétrique par rapport à 1, la largeur à mi hauteur augmente à nouveau pour des fréquences spatiales comprises entre 1 et 2. Ainsi pour $\nu' = 1,5$, la courbe a la même allure que pour $\nu' = 0,5$. La différence principale, qui n'est pas visible sur cette courbe, est le contraste de la grille qui sera plus faible pour des fréquences de grille élevées (cf figure I.4 B). On voit donc que l'épaisseur de coupe sera minimale pour des fréquences de grille réduites proche de 1.

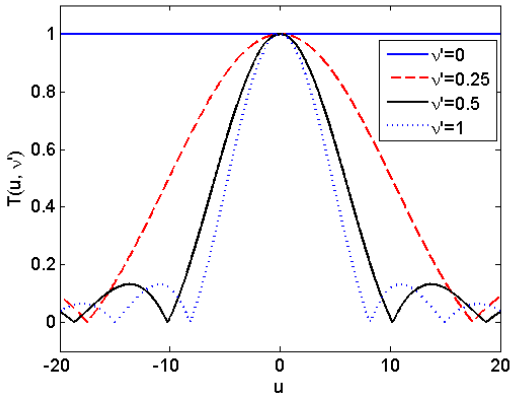


FIGURE I.12 – Fonction de transfert axiale normalisée, en fonction de la défocalisation pour diffférentes fréquences spatiales, en coordonnées réduites.

Si on observe un film fluorescent fin, on projette une image de la grille sur cet échantillon ; l'émission de fluorescence induite et codée par cette modulation est elle-même imagée par l'objectif sur la caméra. La fonction de transfert équivalente du système est donc $|T(u,\nu'_{exc})T(u,\nu'_{em})|$, où la fréquence de grille réduite est exprimée à partir des longueurs d'onde soit d'excitation soit d'émission. Si ces longueurs d'onde sont proches (ce qui est souvent le cas en pratique), l'expression précédente est très proche de $T(u,\nu'_0)^2$, avec $\lambda_0 = \dfrac{\lambda_{exc}+\lambda_{em}}{2}$ (pour $\lambda_{ex} = 550\,\text{nm}$, $\lambda_{ex} = 650\,\text{nm}$ et donc $\lambda_0 = 600\,\text{nm}$, la différence de largeur à mi hauteur est inférieure à 0,2%) . À partir de cette expression, on peut calculer l'épaisseur de coupe théorique de notre

système. On peut réécrire cette fonction de transfert équivalente sous la forme :

$$I(u,\nu') = \left| 2\frac{J_1\left(u\nu'\left(1-\frac{\nu'}{2}\right)\right)}{u\nu'\left(1-\frac{\nu'}{2}\right)} \right|^2 = \left| 2\frac{J_1(x)}{x} \right|^2, \tag{I.20}$$

$$\text{avec : } x = u\nu'\left(1-\frac{\nu'}{2}\right) \tag{I.21}$$

Comme le montre la figure I.13 A, on atteint la valeur 0,5 pour $x \approx \pm 1{,}62$, et donc la largeur à mi hauteur pour une fréquence fixée est donnée par $\Delta x(u,\nu') \approx 3,23$.

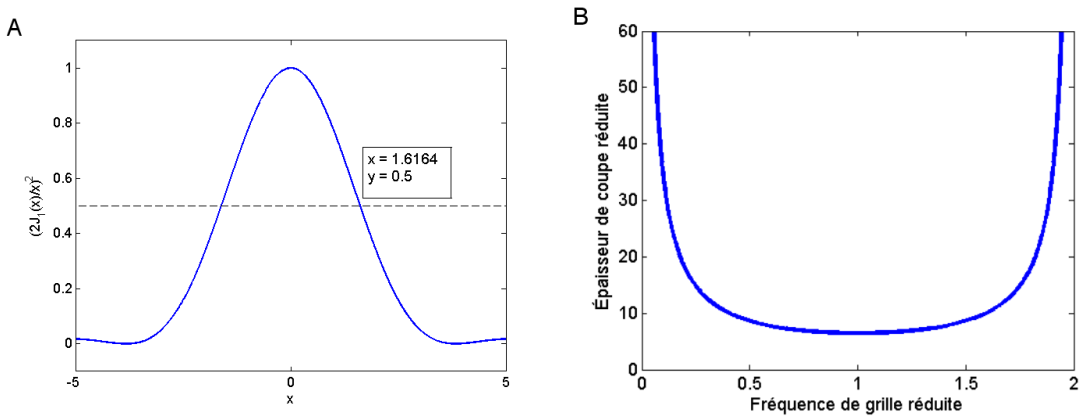


FIGURE I.13 – A : $(J_1(x)/x)^2$, B : Epaisseur de coupe réduite en fonction de la fréquence réduite de la grille.

L'épaisseur de coupe réduite est donc donnée par la formule précédente pour la fréquence de grille $\nu' = \nu'_g$, d'où :

$$\Delta u \approx 2\frac{1,62}{\nu'_g\left(1-\frac{\nu'_g}{2}\right)} \tag{I.22}$$

$$\text{et } \Delta z = \frac{1}{4kn\sin^2\frac{\alpha}{2}}\Delta u \tag{I.23}$$

La figure I.13 représente l'épaisseur de coupe réduite en fonction de la fréquence de grille. On voit bien qu'elle est minimale lorsque la fréquence réduite de la grille vaut 1, c'est à dire la moitié de la fréquence de coupure du microscope, et qu'elle varie peu sur une gamme de fréquence réduite assez importante (augmentation inférieure à 50% de l'épaisseur de coupe minimale pour des fréquences réduites comprises entre 0,45 et 1,55).

La fréquence de la grille dans l'échantillon est donnée par $\nu_g = \dfrac{G}{2p}$, où $G$ est le grandissement de l'objectif et $p$ la période de la grille (Dans les statifs de microscope utilisés, il y a un grandissement de $\frac{G}{2}$ entre le diaphragme de champ et le plan focal objet). L'épaisseur de coupe déterminée à partir des équations I.22 et I.23, peut donc s'exprimer ainsi :

$$\Delta z \approx \frac{3,23p}{2\pi \tan \dfrac{\alpha}{2} G\Big(1 - \dfrac{G\lambda_0}{4ONp}\Big)} \tag{I.24}$$

Le tableau I.1 présente les valeurs théoriques calculées à partir de la formule précédente pour différents objectifs et périodes de grille.

| Objectif (ON) \ grille (tr/mm) | 16 | 20 | 24 | 40 |
|---|---|---|---|---|
| 100× huile (1,4) | 0,58 | 0,49 | 0,43 | 0,34 |
| 60× eau (1,2) | 0,97 | 0,80 | 0,69 | 0,49 |
| 40× (0,6) | 2,67 | 2,41 | 2,12 | 1,61 |
| 20× eau (0,7) | 6,07 | 4,95 | 4,20 | 2,72 |
| 10× (0,3) | 22,8 | 18,6 | 15,9 | 10,5 |
| 5× (0,15) | 92,7 | 75,8 | 64,6 | 42,6 |

TABLE I.1 – Épaisseurs de coupe théoriques en µm (en fluorescence avec $\lambda_0 = 600\,\text{nm}$).

La mesure de faibles épaisseurs de coupe nécessite d'avoir comme échantillon un plan fluorescent plus fin que les épaisseurs de coupe attendues, avec un niveau de signal suffisant. Ceci est très difficile à réaliser et à contrôler surtout pour des objectifs à fort grandissement et ouverture numérique. Nous avons donc également étudié le cas d'un miroir métallique qui est beaucoup plus facile à mettre en œuvre en pratique.

### Cas d'un miroir métallique

Dans le cas d'un miroir, on n'a pas d'absorption du champ électromagnétique incident puis réémission, mais il y a une réflexion directe de celui-ci. La grille d'illumination n'est donc pas directement imagée sur le miroir, mais le champ électromagnétique est réfléchi pour être finalement imagé sur la caméra. Cela signifie que la fonction de transfert du système n'est plus mise au carré. En revanche, suivant la position du miroir par rapport à l'objectif, on a un terme de défocalisation qui est compté deux fois. La fonction de transfert à considérer devient donc : $T(2u, \nu')$.

Si on trace comme précédemment la courbe $\left|2\dfrac{J_1(2x)}{2x}\right|$, on trouve que cette fonction vaut 0,5 pour $x \approx \pm 1,11$, et donc la largeur à mi-hauteur correspond à

$\Delta x(u, \nu') \approx 2,2$. La formule donnant l'épaisseur de coupe devient donc :

$$\Delta z \approx \frac{2,2p}{2\pi \tan \frac{\alpha}{2} G\left(1 - \frac{G\lambda}{4ONp}\right)} \tag{I.25}$$

| Objectif (ON) \ grille (tr/mm) | 16 | 20 | 24 | 40 |
|---|---|---|---|---|
| 100× huile (1,4) | 0,40 | 0,34 | 0,30 | 0,23 |
| 60× eau (1,2) | 0,66 | 0,55 | 0,47 | 0,33 |
| 40× (0,6) | 1,97 | 1,65 | 1,45 | 1,10 |
| 20× eau (0,7) | 4,16 | 3,39 | 2,88 | 1,87 |
| 10× (0,3) | 15,6 | 12,8 | 10,9 | 7,18 |
| 5× (0,15) | 63,5 | 51,9 | 44,3 | 29,2 |

TABLE I.2 – Épaisseurs de coupe théoriques en µm (en utilisant un miroir avec $\lambda = 600\,\text{nm}$).

Les épaisseurs de coupe présentées dans le tableau I.2 sont plus petites que celles calculées en fluorescence. Nous allons à présent comparer ces valeurs à des mesures réalisées grâce à notre montage.

### I.3.2 Mesure de l'épaisseur de coupe

Nous avons mesuré les épaisseurs de coupe avec notre montage, pour différents objectifs et différentes périodes de grille. L'échantillon utilisé était un miroir, pour ne pas être influencé par l'épaisseur de l'échantillon lui-même. Pour des objectifs conçus pour être utilisés avec une lamelle de verre, le miroir était placé en contact avec celle-ci grâce à un film d'eau. Des coupes optiques ont été réalisées pour différentes positions axiales de l'objectif autour du plan de mise au point, grâce au support piézoélectrique.

La figure I.14 A montre un exemple du signal obtenu en fonction de la défocalisation pour l'objectif 60× à eau ($ON = 1,2$) et une grille physique de période 16 traits/mm, soit $4{,}8 \cdot 10^5\,\text{m}^{-1}$ dans l'échantillon. L'épaisseur de coupe obtenue est de 2,05 $\mu$m, déterminée à partir d'un ajustement gaussien du lobe principal (Nous avons choisi un ajustement gaussien plus simple à mettre en œuvre et amplement suffisant pour la mesure de la largeur à mi-hauteur).

L'ensemble des mesures effectuées est résumé sur la figure I.14 B, où l'on peut directement les comparer aux épaisseurs de coupe attendues. Les résultats pour les différents objectifs et fréquences de grille sont rassemblés dans le tableau I.3. L'épaisseur de coupe de notre système montre les capacités de notre montage.

On observe sur la courbe I.14 B que les mesures donnent des épaisseurs de coupe supérieures à ce que l'on attend, d'un facteur compris entre 1 et 3, assez variable.

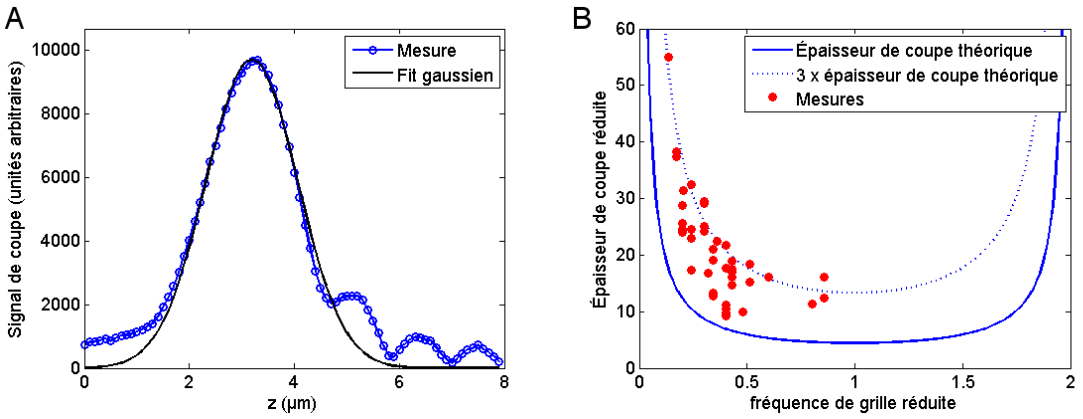


FIGURE I.14 – A : Épaisseur de coupe mesurée et ajustement gaussien, pour un miroir observé au 60× à eau, avec une grille de 16tr/mm, B : Épaisseur de coupe réduite en fonction de la fréquence de grille réduite, mesures et courbe théorique.

| Objectif (ON) \ grille (tr/mm) | 16 | 20 | 24 | 40 |
|---|---|---|---|---|
| 100× huile (1,4) | 1,02 | 0,85 | 0,862 | 0,738 |
| 60× water (1,2) | 2,05 | 1,55 | 1,41 | 1,01 |
| 40× (0,6) | 4,00 | 4,24 | 2,35 | 2,71 |
| 20× water (0,7) | 13,19 | 8,95 | 7,54 | 3,12 |
| 10× (0,3) | | 26,61 | 25,43 | 10,20 |
| 5× (0,15) | | 102,4 | 84,8 | 42,4 |

TABLE I.3 – Épaisseurs de coupe mesurées en µm (en utilisant un miroir).

L'origine principale de ces différences est probablement l'aberration sphérique induite par une mauvaise correction de l'épaisseur de la lamelle. Des variations communes de ±15% de l'épaisseur de la lamelle peuvent ainsi augmenter l'épaisseur de coupe mesurée d'un facteur 1,7 [19]. Cet effet ayant lieu à l'excitation et à la détection, il est d'autant plus important. Les mesures effectuées montrent que pour des objectifs d'ouvertures numériques plus grandes, les résultats sont plus éloignés de ce que prévoit la théorie. A l'inverse, les mesures réalisées avec des objectifs ne nécessitant pas de lamelle présentent une meilleure adéquation avec les calculs présentés dans le tableau I.2. La deuxième cause de dégradation des performances est probablement l'utilisation d'un diaphragme d'ouverture non ouvert à 100%. Ceci est dû à la géométrie particulière du système d'illumination : le diaphragme de champ est placé dans une position qui vignette l'image du diaphragme d'ouverture dans le plan focal arrière de l'objectif. Le diaphragme de champ modifie donc l'ouverture numérique du système d'illumination, or notre support de grille agit comme un diaphragme de champ légèrement fermé et produit donc une réduction de l'ouverture numérique effective du côté illumination.

Pour comparaison, un microscope confocal a une résolution axiale théorique donnée par [20] :

$$r_{confocal} = \frac{\lambda n}{2NA^2}. \tag{I.26}$$

Avec un objectif 100× à huile ouvert à 1,4 et $\lambda = 600\,\text{nm}$, la résolution axiale est d'environ 230 nm. En pratique, elle est plus faible et des mesures fournissent des épaisseurs de coupe (à partir de la largeur à mi-hauteur) proches de ce qui est obtenu en illumination structurée [18, 21]. La résolution axiale maximum de notre système est donc comparable à celle obtenue avec un microscope confocal, bien qu'en pratique les aberrations du système dégradent légèrement les performances. L'illumination structurée peut donc être aussi efficace en terme d'épaisseur de coupe optique que les microscopes confocaux commerciaux en l'absence d'aberrations.

# I.4 Limitations

Pour que le gain en discrimination axiale apporté par l'illumination structurée soit vraiment utile notamment pour l'imagerie biologique, il est nécessaire de conserver une résolution temporelle élevée, permettant d'observer des structures dynamiques dans des échantillons biologiques vivants. Nous avons vu que trois images acquises successivement permettent d'obtenir une coupe optique, ce qui permet d'envisager une cadence élevée (de l'ordre de 10 coupes optiques $512 \times 512$ par seconde), par rapport aux autres techniques commerciales de coupe optique par illumination structurée (<5 images par seconde). Toutefois, en pratique, certaines limitations empêchent d'atteindre ces cadences et réduisent le champ d'application de cette technique.

## I.4.1 Augmentation de cadence

La réalisation de coupes optiques nécessite l'acquisition de plusieurs images, ce qui provoque une perte de résolution temporelle. Nous avons essayé d'accélérer la cadence d'acquisition, mais cela s'est avéré difficile pour plusieurs raisons.

### Passage de quatre à trois images

Le réglage de la phase initiale de déplacement de la grille se fait de manière à rendre les images $I_1$ et $I_3$ égales. Cela peut donc nous permettre de nous affranchir de l'acquisition de cette dernière image. Mais si on supprime l'acquisition de la dernière image, il faut également tronquer la dernière partie de la sinusoïde de déplacement de la grille pour commencer une nouvelle acquisition. Cela provoque une discontinuité dans le déplacement du support piézoélectrique, qui peut s'avérer dramatique sur la stabilisation du système à haute cadence d'acquisition. Il est donc difficile d'implémenter ce système à haute cadence.

### Frame transfer et synchronisation

L'autre option envisagée pour accélérer la cadence d'acquisition était de tirer parti du mode *Frame Transfer* de la caméra. En mode classique, le capteur de la caméra est exposé puis l'image acquise est transférée à l'ordinateur par l'électronique de lecture. Cette lecture peut prendre 35 ms pour une image de $512 \times 512$ pixels. L'acquisition suivante démarre alors après la lecture de cette image. En mode *Frame Transfer*, le capteur est exposé en continu, et, à la fin du temps d'exposition, l'image est transférée à une partie cachée et non illuminée du capteur, avant d'être lue. Cette étape de transfert est très rapide (inférieure à la microseconde), suite à laquelle l'exposition de l'image suivante peut débuter. Ceci peut donc permettre d'accélérer l'acquisition des images, car il n'est plus nécessaire d'attendre la lecture de l'image précédente.

Cependant pour des acquisitions d'un nombre important de séquences d'images, ces temps de transfert s'additionnent et deviennent non négligeables par rapport à la période de déplacement de la grille. Cela aboutit à une désynchronisation du déplacement de la grille et de l'acquisition de l'image. Il a été très difficile de mesurer et de compenser ce décalage, le temps de transfert pouvant varier légèrement d'une image à l'autre en fonction de paramètres divers, ce qui a mis un frein à l'augmentation de cadence.

L'utilisation des nouvelles caméra sCMOS pourrait rendre possible cette accélération de cadence, au détriment d'une sensibilité plus faible.

## I.4.2 Perte d'efficacité par les aberrations optiques

Une autre limitation de cette technique est liée aux aberrations optiques générées par les échantillons épais.

En effet, lorsque que l'on veut imager un échantillon en profondeur, la lumière doit traverser les couches superficielles. Or les échantillons biologiques sont généralement diffusants, absorbants et générateurs d'aberrations optiques, car ils présentent des inhomogénéités de composition, d'indice optique, de transparence... Ainsi le contraste de grille sur les images acquises diminue fortement lorsque l'on pénètre dans l'échantillon, ce qui diminue le niveau de signal obtenu sur les images finales ainsi que le rapport signal sur bruit.

Ceci est bien visible sur des disques imaginaux de drosophile, tissus constituant la patte de la mouche. Cet échantillon (préparé par Thomas Mangeat et son équipe du LBCMCP à Toulouse) a été marqué par de l'Alexa488 qui se fixe aux jonctions des cellules sur l'extérieur de l'échantillon. L'observation se fait avec un objectif 40×, ouvert à 0,65, couramment utilisé pour ce type de tissu. L'échantillon observé, d'une épaisseur de 40 $\mu$m, pouvait être observé sur toute son épaisseur. On peut voir sur la figure I.15 les images de coupe optique, plein champ et celles obtenues par filtrage passe-haut des images plein champ à 0 et 40 $\mu$m de profondeur. On peut comparer la variation d'intensité du signal entre la première image où une faible épaisseur de tissu est traversée par la lumière à la seconde où la lumière s'est propagée à travers

40 $\mu$m de tissu biologique. Pour les images de coupe optique, on a une diminution de signal d'environ 60%, alors que pour les deux autres méthodes, cette diminution de signal n'est que de 40%. De plus, le rapport signal sur bruit dans cette dernière image de coupe optique est très faible ($\sim$ 28 dans l'image A , $\sim$ 11 dans l'image D). Ces différences sont principalement liées à l'observation à travers un échantillon biologique, qui réduit le contraste de grille au cours de la pénétration de la lumière dans l'échantillon et diminue donc la qualité de reconstruction de la coupe optique.

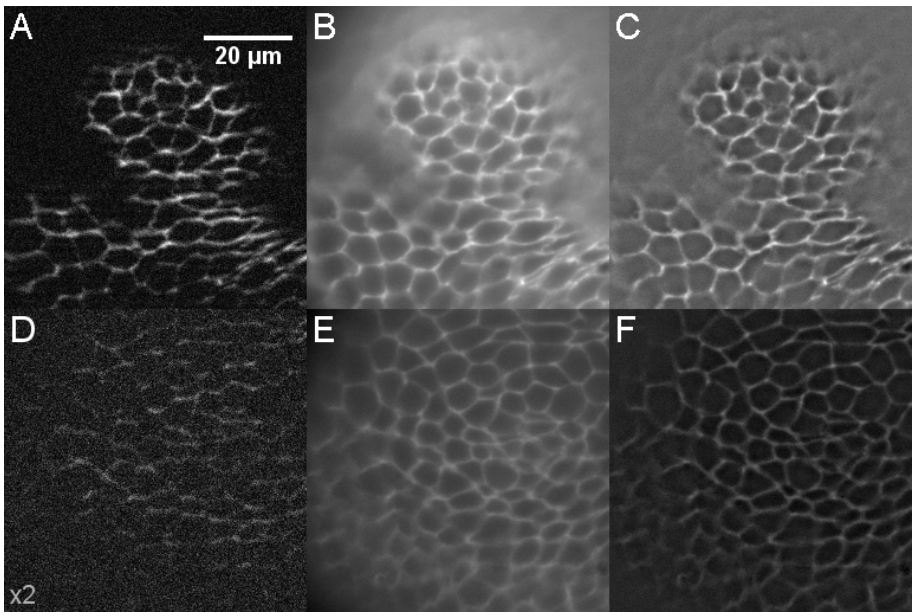


FIGURE I.15 – Disques imaginaux de drosophile marqués à l'Alexa488, observés à deux profondeurs (0 (A-C) et 40 $\mu$m (D-F)), en coupe optique (A, D), en plein champ (B, E) et avec un filtrage passe-haut (C, F) (pour chaque méthode, les images à 0 et 40 $\mu$m sont affichées avec la même échelle d'intensité, le signal étant multiplié par 2 pour l'image D).

Pour améliorer la réalisation de coupes optiques dans des échantillons épais par cette technique, il peut être intéressant d'associer un processus de correction des aberrations optiques générées par l'échantillon, comme en ont déjà bénéficié les microscopies confocales et à deux-photons [22, 23]. La mesure des aberrations induites par l'échantillon et la mise en forme du front d'onde peuvent apporter une amélioration du contraste de la grille, aussi bien à l'illumination qu'à la détection, et permettre de restaurer un niveau de signal optimal [24]. De plus, la correction des aberrations permettra de prendre en compte l'aberration sphérique générée par la mauvaise adaptation de l'épaisseur de la lamelle.

Toutefois, la correction d'aberrations en microscopie plein champ par optique adaptative est plus complexe que pour la microscopie à balayage, comme nous allons le voir dans le chapitre III, et il a d'abord été nécessaire de développer une technique

qui soit rapide et compatible avec des échantillons divers avant de la coupler avec l'illumination structurée.

### I.4.3 Comparaison à un filtrage passe-haut

Une des applications potentielles de cette technique est le suivi de molécules uniques en 3 dimensions, qui reste encore très difficile à réaliser à une cadence élevée [25–27]. L'étude du déplacement de molécules uniques en biologie permet d'obtenir une grande quantité d'informations sur le comportement des particules (mouvement brownien ou orienté), sur l'interaction de celles-ci et sur les forces mises en jeu à ces échelles (viscosité du milieu, force de maintien...).

Nous avons donc testé ce système sur des particules mobiles en suspension dans un liquide. L'effet de coupe optique fonctionne parfaitement pour des particules se déplaçant lentement dans le milieu, mais dès que la particule se déplace d'une distance supérieure à la tache d'Airy pendant l'acquisition des trois images, l'image reconstruite fait apparaître les positions successives de la particule. De plus, il est nécessaire d'imager plusieurs plans successifs pour avoir une bonne résolution axiale. Cela nécessite de nombreuses images pour déterminer la position de l'objet.

Or nous savons que l'image d'une particule unique ressemble à une tache d'Airy, qui contient notamment des hautes fréquences spatiales. Ainsi pour le suivi de particules dont la taille est inférieure à une tache d'Airy, un simple filtrage passe-haut d'images classiques fournit la même information qu'une coupe optique, avec quatre fois moins d'images. Notre instrument est donc peu intéressant pour l'étude du déplacement de particules uniques seules, contrairement à d'autres techniques [25–33]. En revanche, il peut s'avérer intéressant lorsqu'on veut observer des structures continues, constituées de basses fréquences, plus difficiles à localiser axialement. Ainsi, si on veut observer des particules uniques en diffusion associées à une structure continue, l'illumination structurée peut apporter un gain intéressant.

Il semble donc difficile d'obtenir un gain de cadence important avec cette technique, qui permettrait d'observer des échantillons vivants. Cette augmentation de cadence doit passer par une réduction du nombre d'images nécessaires à la reconstruction d'une coupe optique. La technique HiLo est une avancée importante puisqu'elle permet de réduire à deux le nombre d'images nécessaires. Il est possible d'accélérer encore cette technique pour réaliser une coupe optique à partir d'une seule acquisition où les deux images sont obtenues simultanément.

## I.5 Coupe optique à partir d'une seule image : HiLo bicouleur

Comme nous l'avons vu au paragraphe I.1.3, il est possible de réaliser des coupes optiques à partir de seulement deux images, au prix d'un traitement plus complexe. Les deux images diffèrent au niveau de l'illumination, l'une est structurée, l'autre est homogène. Nous avons proposé d'accélérer cette technique HiLo, en acquérant

les deux images simultanément, grâce à une séparation spectrale des images à l'excitation et à la détection.

### I.5.1 Passage à une seule image

Pour réaliser simultanément les deux images (structurée et uniforme) grâce à une séparation spectrale, il faut :

- marquer l'échantillon avec deux fluorophores colocalisés spatialement et séparés spectralement ;
- éclairer l'échantillon avec une illumination uniforme et une illumination structurée, dans deux fenêtres spectrales distinctes adaptées aux fluorophores ;
- séparer la fluorescence des deux fluorophores, et acquérir les deux images sur la même caméra.

Nous allons maintenant décrire les solutions techniques utilisées pour satisfaire ce cahier des charges.

#### Sonde bicouleur

La technique HiLo se base sur la combinaison d'informations basse fréquence provenant d'une image structurée et d'informations haute fréquence provenant d'une image illuminée de façon homogène, chacune étant observée dans une fenêtre spectrale distincte. Pour que cette combinaison d'information provenant d'images et de marquages différents ne génère pas d'artefacts, il est nécessaire de s'assurer de la colocalisation spatiale des fluorophores utilisés.

Pour certains marquages non spécifiques, où les fluorophores se répartissent de façon homogène dans l'échantillon, les deux marquages utilisés n'ont a priori aucune raison d'être différents et un double marquage est suffisant. Par contre, ceci n'est pas forcément le cas si les marqueurs utilisés sont spécifiques d'une structure de l'échantillon. Si les fluorophores ne sont pas couplés, il est possible de faire apparaître des inhomogénéités de marquage qui biaiseront la reconstruction des coupes optiques.

Il a donc été nécessaire de développer une sonde bicolore, constituée de deux fluorophores. Nous avons choisi de partir de quantum dots (QD) (particules inorganiques fluorescentes) auxquels sont associés des fluorophores organiques, comme le montre le schéma I.16 D.

La particule est construite autour d'un quantum dot, composé d'un cœur de sélénure de cadmium (CdSe) d'une couche de sulfure de cadmium (CdS) et d'une coque de sulfure de zinc (ZnS). Ces dots sont des particules qui ont un spectre d'absorption large (de 350 nm à 550 nm) et un spectre d'émission étroit centré autour de 575 nm, avec une largeur à mi-hauteur de 25 nm. L'AlexaFluo 750 a été choisi comme fluorophore organique. Son pic d'absorption est à 750 nm et son pic d'émission à 776 nm. Les spectres de la figure I.16 E montrent que les spectres d'absorption et de fluorescence de ces deux composés sont bien séparés.

Il a été nécessaire d'éloigner spatialement les fluorophores organiques du quantum dot pour éviter le phénomène de transfert d'énergie de type Förster (FRET) qui pourrait corrompre la séparation spectrale. Une distance de 115 Å entre le centre

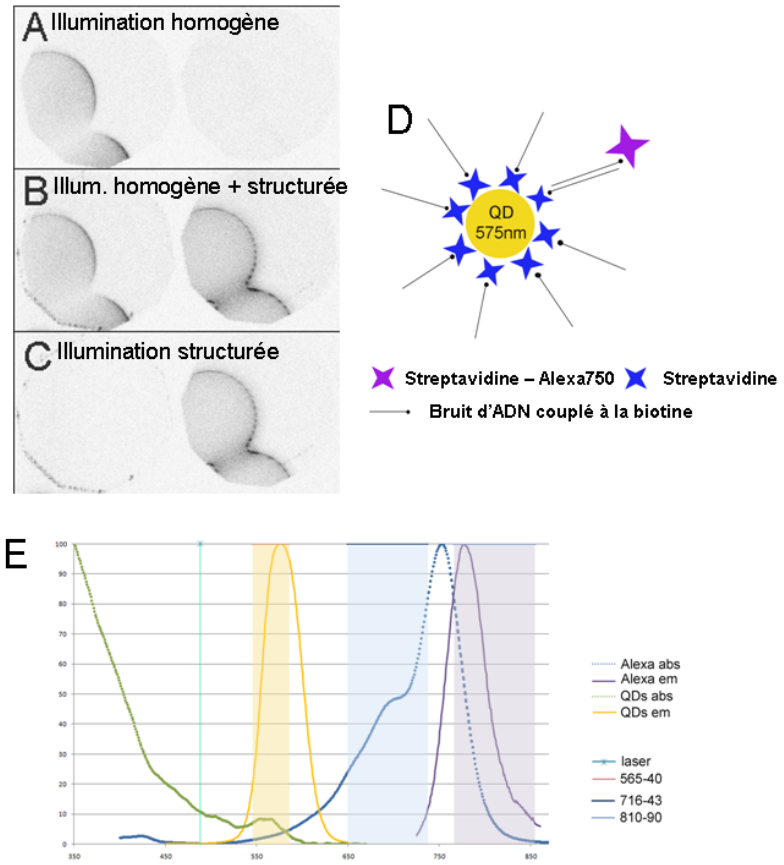


FIGURE I.16 – A-C : Vérification de l'absence de fuite de signal entre les voies structurée et homogène, D : Schéma de la particule bicolore, E : Spectres d'absorption et de fluorescence des deux fluorophores (extrait de Muro et al. [19]).

du quantum dot (d'un rayon de l'ordre de 30 Å) et l'AlexaFluor 750 a été estimée suffisante pour réduire l'efficacité du FRET à environ 0,2% [19]. Cette séparation est obtenue grâce à un oligonucléotide (un petit brin d'ADN) de 15 paires de bases d'une longueur de 50 Å. Les différents éléments de cette architecture (quantum dots, ADN et AlexaFluor750) sont maintenus grâce au couple de protéines biotine-streptavidine.

On a ainsi une particule qui combine deux fluorophores distincts en évitant le FRET entre les deux et donc la contamination entre les deux voies d'imagerie (I.16 A-C), mais assurant la concordance des marquages entre celles-ci.

### Séparation spectrale des deux images à l'illumination et à la détection

La deuxième étape est la réalisation du système optique permettant d'éclairer l'échantillon avec deux illuminations différentes et de récupérer les images sur une même caméra (Figure I.17).

L'illumination structurée de l'échantillon est réalisée en utilisant le système décrit précédemment (paragraphe I.2.1 et figure I.9). L'illumination uniforme est réalisée

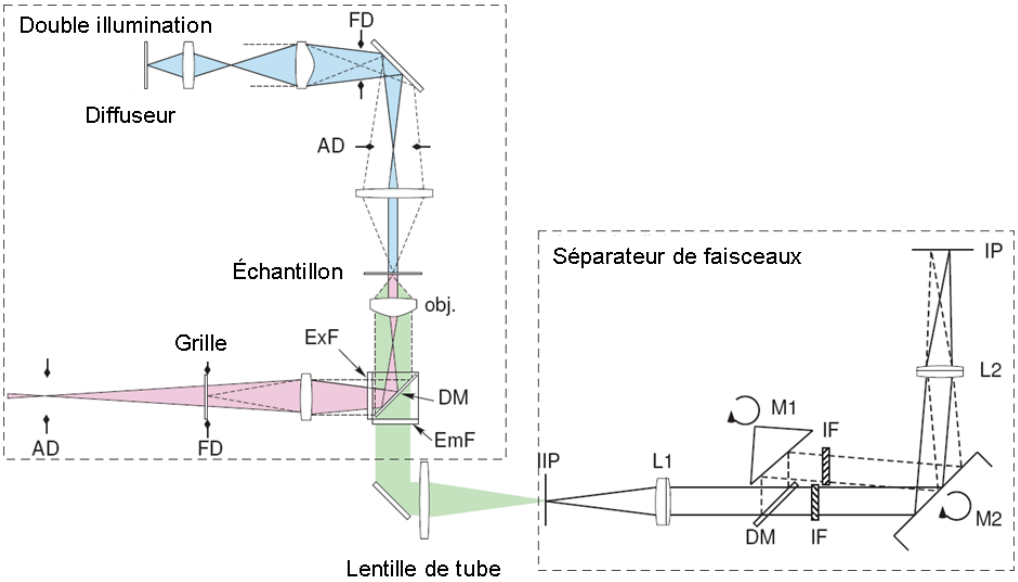


FIGURE I.17 – Schéma du montage HiLo bicouleur (FD : diaphragme de champ, AD : diaphragme d'ouverture, obj : objectif, ExF : filtre d'excitation, DM : miroir dichroïque, EmF : filtre d'émission, IIP : plan image intermédiaire, L1, L2 : lentilles, M1, M2, miroir, IF, filtre interférentiel, IP : plan image).

en trans-illumination. Un laser à 488 nm est installé à la place de l'illuminateur supérieur. Un diffuseur tournant permet de casser la cohérence spatiale du faisceau et de moyenner le speckle pour avoir une illumination parfaitement homogène pour des temps d'exposition supérieurs à 5 ms.

Nous avons choisi de structurer l'illumination pour le fluorophore proche infrarouge AlexaFluor 750, afin d'éviter l'apparition d'artefacts par un éventuel FRET résiduel. En effet, le FRET ne peut avoir lieu que du quantum dot vers l'Alexa, dans les configurations spectrales choisies (longueurs d'onde de fluorescence des QD supérieures à l'absorption de l'Alexa750). Ainsi si les quantum dots étaient utilisés pour l'illumination structurée, il serait possible de voir apparaître une faible composante modulée dans l'image uniforme, ce qui entraînerait des artefacts et des difficultés de reconstruction. Les QD étant utilisés pour l'illumination uniforme, un éventuel FRET ajoutera une composante continue dans l'image structurée ce qui diminuera le contraste final mais ne parasitera pas le traitement de l'image.

De plus, la séparation spectrale des images permet d'être moins sensible au photoblanchiment. En effet, si l'échantillon blanchit au cours de l'exposition de la grille, celle-ci sera imprimée dans l'échantillon même lors de l'acquisition des images homogènes. Dans notre cas, seules les images structurées seront perturbées, ce qui peut être évité en déplaçant lentement la grille de façon sinusoïdale par exemple, sans modifier la fréquence de modulation.

Nous avons donc utilisé des filtres d'excitation et d'émission dans le proche infrarouge pour la voie structurée et une illumination à 488 nm et un filtre d'émission dans la gamme 550-600 nm pour la voie uniforme [19].

La séparation à la détection des deux images se fait à la sortie du microscope grâce à un montage de séparation spectrale des faisceaux, utilisant un miroir dichroïque, deux filtres d'émission, deux miroirs et deux lentilles, comme le montre le schéma I.17. Les deux images sont projetées sur la même caméra, avec un grandissement d'un facteur 1,5 entre le plan image du microscope et la caméra. L'utilisation d'une seule caméra évite les problèmes de synchronisation de deux caméras, au détriment d'un champ maximum observable réduit. Cela peut être modifié en jouant sur les distances focales des lentilles du séparateur de faisceaux et la taille du capteur de la caméra.

Les chemins optiques étant différents pour les deux images, il est important de superposer le plan image du microscope au plan focal objet de la lentille $L_1$ et de placer la caméra au foyer de la lentille $L_2$ pour garantir un grandissement identique entre les deux images entre la sortie du microscope et la caméra.

On a ainsi une double illumination et un système de séparation des images qui nous permet d'acquérir simultanément les deux images, structurée et uniforme.

## Reconstruction

La reconstruction des images est largement inspirée de la méthode développée par Jerome Mertz [14, 15]. Il a été nécessaire de modifier ce traitement car l'utilisation de deux fluorophores distincts empêche certaines simplifications.

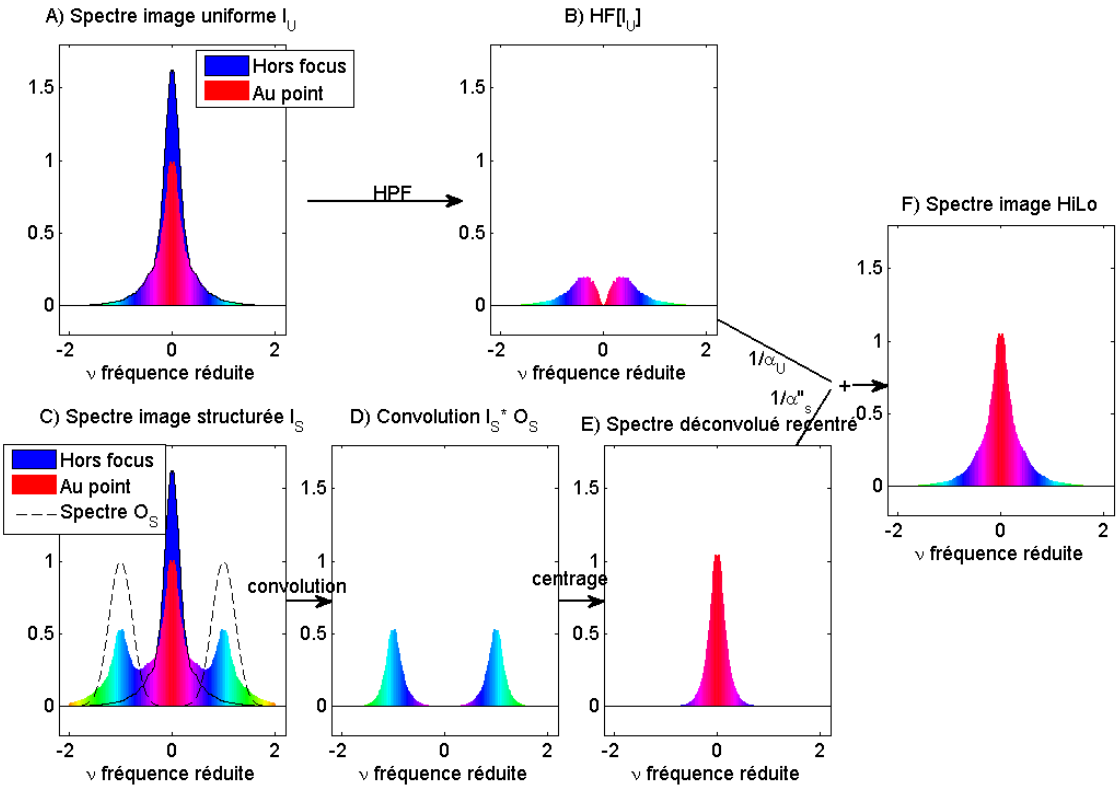


FIGURE I.18 – Principe de reconstruction de la méthode HiLo bicouleur.

Le processus de reconstruction est illustré par la figure I.18. La première étape est un simple filtrage passe-haut de l'image uniforme, afin d'isoler les hautes fréquences provenant nécessairement du plan de mise au point (spectres A et B). La deuxième étape est l'extraction de l'information basse fréquence à partir de l'image modulée. Cette information se trouve aux alentours des pics de modulation sur le spectre de l'image modulée (spectre C). Pour isoler l'information basse fréquence, on convolue l'image structurée par des ondelettes de Gabor (fonctions sinusoïdales modulées par une enveloppe gaussienne), dont la période et l'orientation sont celles de la grille. Ceci permet de ne garder que l'information basse fréquence (filtrage passe-bas par la gaussienne) à la fréquence de grille (spectres D).

Pour supprimer la modulation et remettre les basses fréquences à leur place, on somme les carrés des contributions obtenues avec l'ondelette en sinus $O_s$ et en cosinus $O_c$ (spectre E). On conserve ainsi les basses fréquences qui étaient initialement modulées dans l'image à la période de la grille $p$. Il suffit ensuite de sommer ces deux images pondérées par des termes $\alpha$ (spectre F).

La formule mathématique qui rend compte de ce traitement est la suivante [19] :

$$I_{if} = \frac{1}{\alpha_U} HF[I_U] + \frac{2}{\alpha''_S}\sqrt{(I_S \star O_S)^2 + (I_S \star O_C)^2}, \tag{I.27}$$

avec $I_U$ et $I_S$ les images uniforme et structurée, $HF$ un filtre passe-haut, $\alpha_U$ et $\alpha''_S$ les facteurs de normalisation des deux portions de spectres et $O_S$ et $O_C$ les ondelettes de Gabor en sinus et cosinus suivantes :

$$O_S(x, y, x_c, y_c) = \sin\left(2\pi\frac{x - x_c}{p}\right)\exp\left(-K\frac{(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2}{p^2}\right) \tag{I.28}$$

$$O_C(x, y, x_c, y_c) = \cos\left(2\pi\frac{x - x_c}{p}\right)\exp\left(-K\frac{(x - x_c)^2 + (y - y_c)^2}{p^2}\right) \tag{I.29}$$

où p est la période de la grille et K un paramètre à optimiser manuellement en pratique.

Trois paramètres sont ajustables dans ce traitement des images : $K$, $\alpha_U$ et $\alpha''_S$. Ils sont ajustés de manière ad hoc pour combiner les spectres partiels le plus « proprement » possible.

Une image d'un embryon de Xénope marqué par les deux fluorophores décrits précédemment montre bien le gain obtenu par cette technique HiLo (figure I.19). On repère le rejet du bruit de fond non modulé et l'image de coupe optique obtenue permet de distinguer des détails précédemment noyés dans le bruit (flèche bleue sur le profil).

### Epaisseur de coupe

L'épaisseur de coupe de cette technique est définie par la profondeur sur laquelle la modulation sera détectable. Les performances envisageables seront donc équivalentes à celles déterminées au paragraphe I.3.

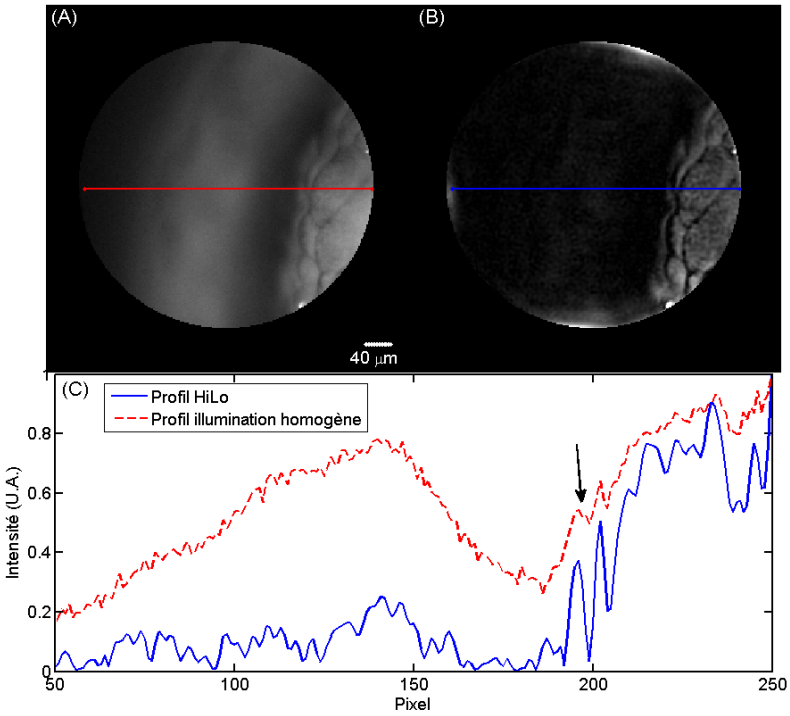


FIGURE I.19 – Images de coupe optique sur un embryon de Xénope : A) image en illumination uniforme, B) image HiLo. C) profils des images.

Les mesures de ces épaisseurs de coupe ont donné des résultats similaires à ceux obtenus avec le montage d'illumination structurée classique. Ils sont résumés dans le tableau I.4, pour différents objectifs et une grille physique de 50 $\mu$m de période, dans le cas d'un miroir ou d'un plan fluorescent. Les différences parfois importantes proviennent :

- de l'aberration sphérique générée par une lamelle de mauvaise épaisseur ;
- d'une ouverture numérique effective plus faible à l'illumination ;
- d'une épaisseur du plan fluorescent non négligeable.

| Objectif (ON) | Fluorescence | Miroir |
|---|---|---|
| 60× eau (1,2) | 2,83 (0,78) | 0,77 (0,58) |
| 10× (0,3) | 23,9 (18,6) | 20,0 (12,8) |

TABLE I.4 – Epaisseur de coupe mesurée (et théorique) en µm obtenue avec le montage HiLo.

Il pourrait être intéressant de modifier la modulation de l'image structurée pour illuminer avec du speckle. Le contraste du speckle dans l'échantillon n'étant pas sensible aux aberrations, celles-ci n'auront d'effet qu'à la détection. De plus, l'épaisseur de coupe alors obtenue est définie par les paramètres de reconstruction et est

continûment variable [34]. Ainsi, il n'est plus nécessaire de modifier le système pour l'adapter à la résolution axiale voulue.

### I.5.2 Applications et limitations

La technique de HiLo bicouleur permet donc de réaliser des coupes optiques avec une seule image acquise. Il n'y a donc plus de perte de résolution temporelle et les cadences maximales accessibles dépendent principalement du marquage de l'échantillon et de la caméra. On peut donc envisager d'étudier des systèmes dynamiques, en s'affranchissant des artefacts dus à l'acquisition d'images successives.

Toutefois, il est nécessaire d'avoir un échantillon doublement marqué, ce qui peut être difficile à réaliser pour des raisons pratiques (marquage spécifique, toxicité...) et empêche le marquage de plusieurs fluorophores pour des études de colocalisation. Il faut également bien contrôler l'absence de décalage ou la différence de grandissement entre les deux images structurée et homogène, pour éviter l'apparition d'artefacts de reconstruction.

Comme précédemment, ce système est sensible à la présence d'aberrations qui vont dégrader le contenu fréquentiel des images et notamment le contraste de grille. L'association d'un système de correction des aberrations pourrait donc être appréciable pour améliorer la qualité des images.

Nous allons maintenant présenter les différents résultats obtenus grâce à ces deux techniques pour montrer la diversité des échantillons observables.

## I.6 Applications à divers échantillons biologiques

Les deux méthodes de coupe optique présentées ont été appliquées à différents échantillons (cellules, tissus ou organismes multicellulaires) pour visualiser le gain apporté sur ces échantillons variés.

### I.6.1 Cellules HeLa

La lignée cellulaire HeLa est très utilisée en biologie pour son adaptabilité. Nous avons utilisé cette lignée pour marquer différentes protéines de la cellule, la tubuline (constituant majeur du cytosquelette de la cellule, lui donnant notamment son architecture) et la lamine (protéine de la membrane nucléaire).

#### Marquage de la tubuline

Les cellules observées sont des cellules fixées puis perméabilisées avant d'être marquées par l'Alexa488, via des anticorps spécifiques.

La figure I.20 représente des images plein champ et des coupes optiques obtenues grâce au même jeu de données, pour différents plans espacés de 400 nm. L'objectif utilisé était un 60× à eau (ON =1,2). La grille physique utilisée avait une période de 50 $\mu$m, soit une fréquence de grille réduite de 0,25. Cinq accumulations, avec

un temps d'exposition de 150 ms par image, ont été moyennées pour obtenir ces résultats (soit 3s d'exposition par plan).

Les images de coupe optique permettent de bien apprécier le rejet de la lumière hors focus : les images plein champ diffèrent peu les unes des autres sur toute l'épaisseur de la cellule, alors que les coupes optiques présentent des informations très différentes à 800 nm d'intervalle (l'épaisseur de coupe théorique dans cette configuration est de 800 nm). Un simple filtrage passe-haut ne permet pas d'obtenir une discrimination axiale aussi évidente que les images obtenues par illumination structurée.

### Marquage de la lamine

Nous avons ensuite observé des cellules Hela dont la lamine (protéine de la membrane nucléaire) a été marquée par des quantum dots, via des anticorps.

La figure I.21 permet de comparer les images plein champ A aux images de coupe optique B. De même que précédemment, l'objectif utilisé était un 60× à eau (ON =1,2). La grille physique utilisée avait une période de 50 $\mu$m, soit une fréquence de grille réduite de 0,25. Cinq accumulations, avec un temps d'exposition de 150 ms par image, ont été moyennées pour obtenir ces résultats (soit 3 s d'exposition par plan). On voit bien que le filtrage passe-haut ne permet pas d'extraire efficacement les structures plus homogènes sur le dessus et le dessous des noyaux.

La comparaison d'images x-y et x-z (figure I.22) permet de bien voir le gain apporté par la coupe optique pour la localisation en 3 dimensions de la fluorescence : grâce au rejet de la lumière hors focus l'information basse fréquence est conservée, comme pour les parties continues constituant le dessus du noyau. Ces images permettent par exemple des mesures précises de la géométrie du noyau.

On pourrait utiliser cette technique associée à un marquage de gène d'intérêt par un fluorophore différent pour mieux appréhender l'organisation du noyau et la position de certains gènes dans celui-ci.

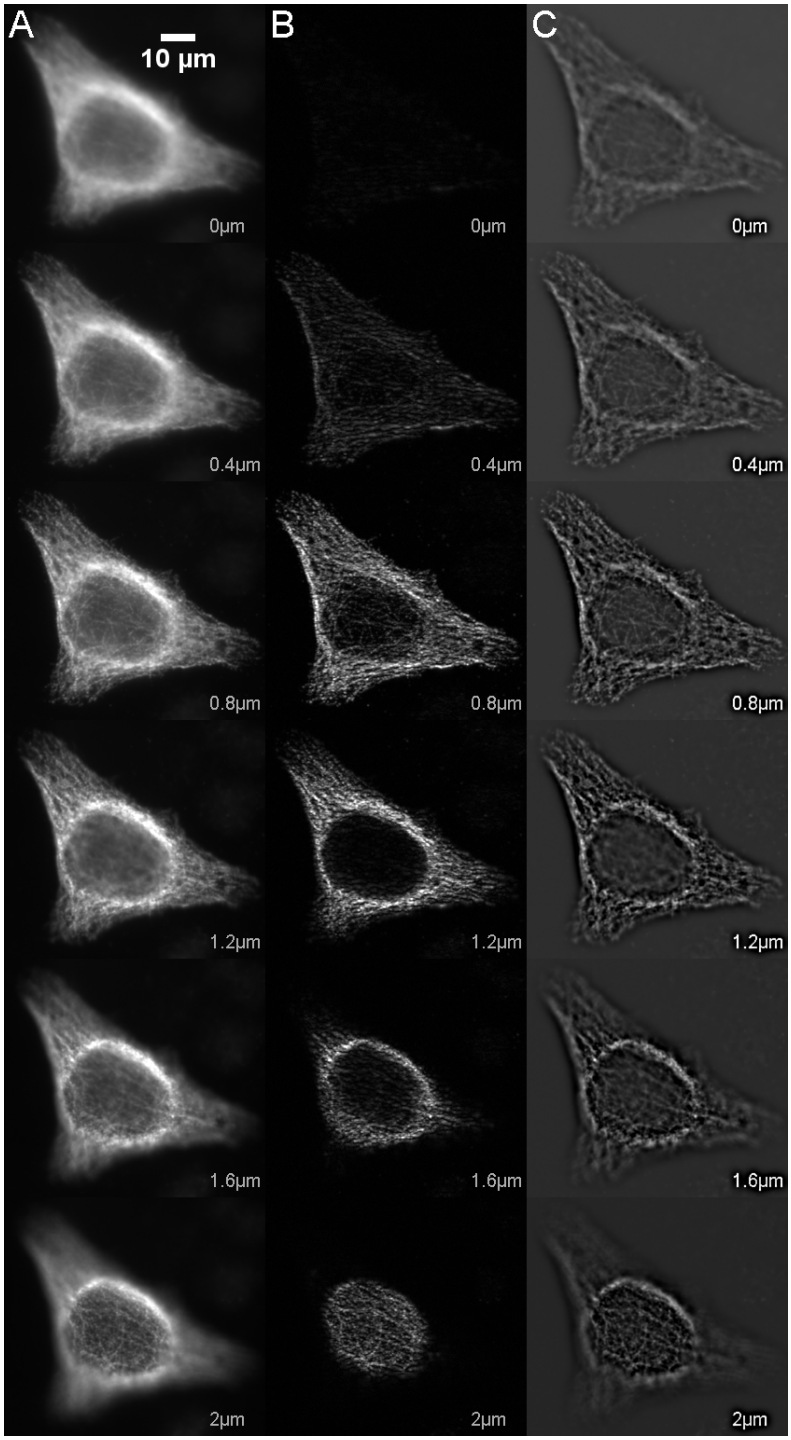


FIGURE I.20 – Cellules Hela avec la tubuline marquée par l'Alexa488. La colonne A représente des images plein champ d'une cellule pour différents plans séparés de 400 nm. La colonne B montre les images de coupe optique obtenues aux mêmes profondeurs. La colonne C est constituée d'images plein champ après filtrage passe-haut (suppression des structures inférieures à 15 pixels et supérieures à 1 pixel).

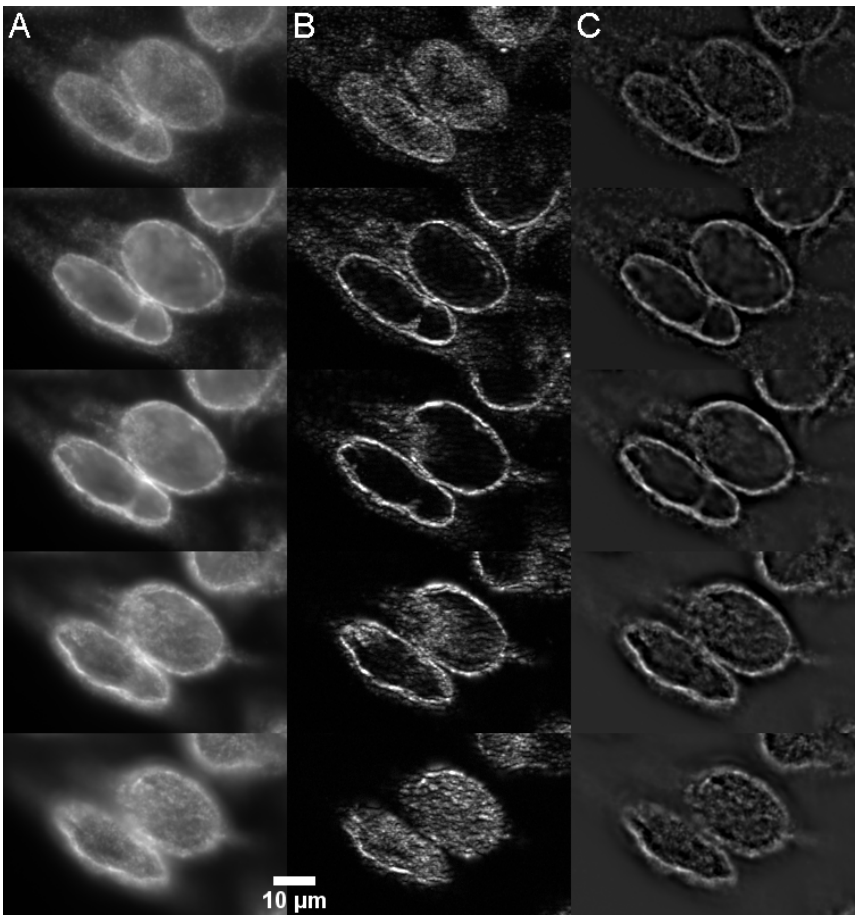


FIGURE I.21 – Cellules Hela avec la lamine marquée par des quantum dots, A en illumination plein champ, B après coupe optique, C après filtrage passe-haut des images plein champ. Les différents plans sont espacés de 500 nm axialement.

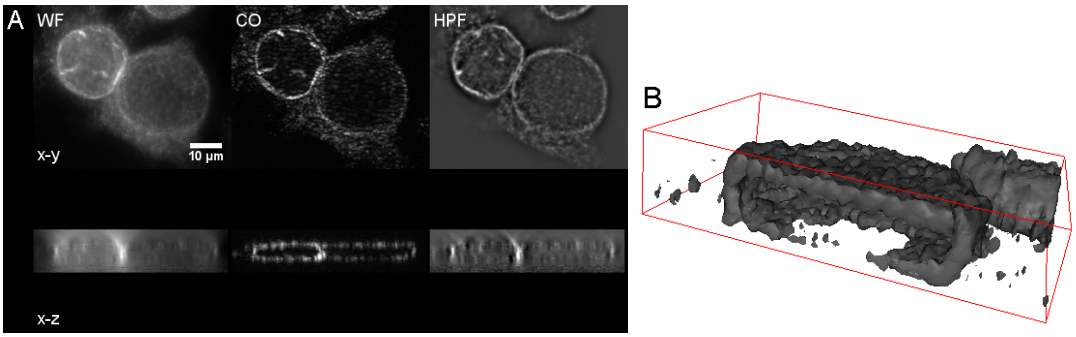


FIGURE I.22 – A : images x-y et x-z de deux cellules dont la lamine est marquée par des quantum dots. Haut x-y, bas x-z. Gauche : plein champ, centre : coupe optique, droite : plein champ après filtrage passe-haut. Les images x-z ont une hauteur de 5 $\mu$m. B : Reconstruction 3D de la géométrie de la membrane nucléaire (Volume de 24 $\mu$m $\times$ 24 $\mu$m $\times$ 5 $\mu$m).

### I.6.2 Disque imaginal de drosophile

Les disque imaginaux de pattes de drosophile sont des amas de cellules de plusieurs dizaines de micromètres d'épaisseur qui se prêtent bien à l'utilisation de la coupe optique, car ce sont des milieux très diffusants et les structures d'intérêt sont noyées dans un bruit de fond important provenant des autres régions de l'échantillon. Les membranes des cellules à l'extérieur du tissu sont marquées par de l'Alexa488. Ces tissus sont typiquement observés à un grandissement de 40×.

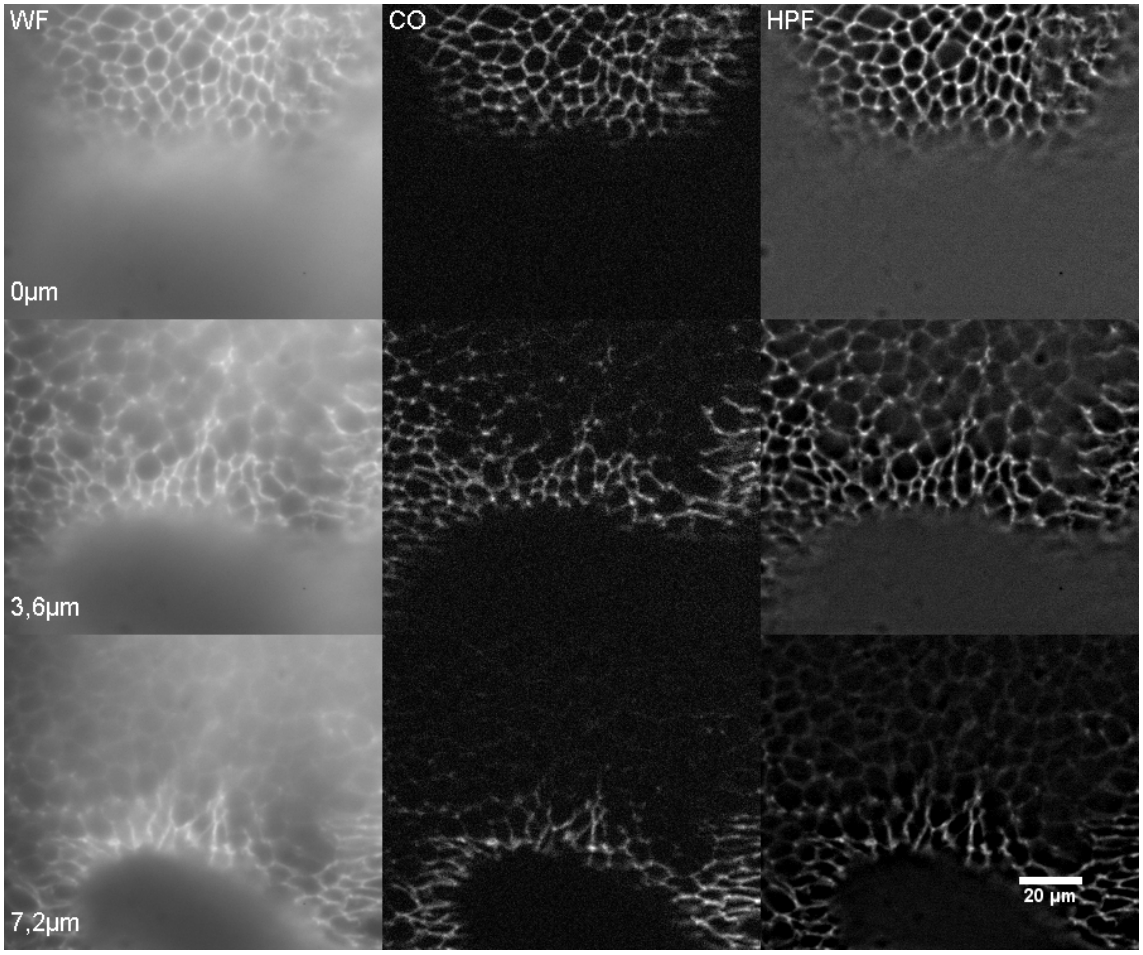


FIGURE I.23 – Disque imaginal de patte de drosophile : les membranes cellulaires externes sont marquées par l'Alexa488. WF : plein champ, CO : coupe optique, HPF : après filtrage passe-haut des images plein champ. Les différents plans sont espacés de 3,6 $\mu$m.

Sur la figure I.23, on distingue bien le signal hors focus important généré par cet échantillon ainsi que la forte suppression de cette composante sur les images de coupe optique. Cela permet de reconstruire la topologie de cette zone, comme représenté en échelle de couleur sur la figure I.24. Pour cet échantillon, un filtrage passe-haut nous fournit une information très similaire. Cependant le niveau de signal semble plus faible lorsque l'on pénètre en profondeur dans l'échantillon, probablement dû

au fait que le signal d'intérêt est mêlé à un bruit de fond important indiscernable à partir d'une image plein champ.

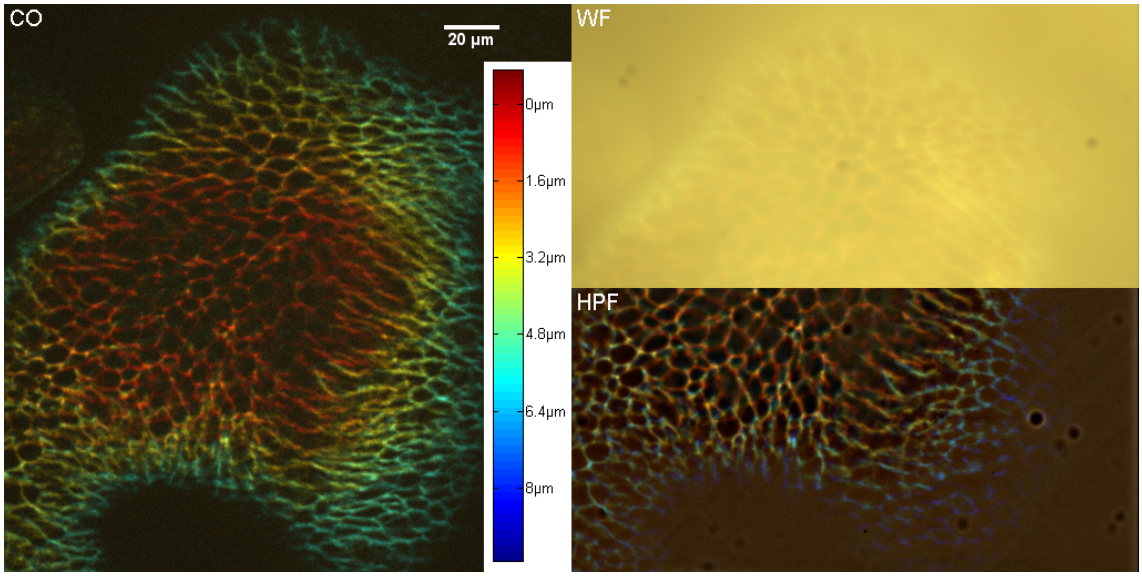


FIGURE I.24 – Reconstruction 3D d'un échantillon de disque imaginal de drosophile, codé en échelle de couleur. CO : à partir des images de coupe optique, WF : à partir des images plein champ et HPF : après filtrage passe-haut en bas.

Toutefois, comme nous l'avons vu au paragraphe I.4.2, l'observation en profondeur dans des échantillons épais et diffusant est problématique, car le contraste de grille diminue très vite. La correction des aberrations optiques pourrait permettre de résoudre ce problème.

### I.6.3 *Caenorhabditis elegans*

Le nématode *C. elegans* est un ver d'environ 1 mm de long sur 100 $\mu$m de diamètre qui est très utilisé en biologie pour de nombreuses raisons :

- très bien caractérisé (un individu adulte est composé de 959 cellules dont les lignages sont identifiés [35]) ;
- très facile à produire et entretenir en laboratoire ;
- transparent ;
- de nombreux mécanismes biologiques sont proches de ceux des vertébrés...

L'utilisation de nos systèmes sur ce type d'échantillon peut donc potentiellement intéresser un grand nombre de biologistes.

Grâce à Christian Stigloher de l'équipe de Jean-Louis Bessereau du département de biologie de l'ENS, nous avons eu accès à des vers *C. elegans* génétiquement modifiés pour que les neurones expriment la YFP (Yellow Fluorescent Protein). La plupart des images ont été obtenues sur des vers immobilisés par traitement à l'azide, une drogue qui bloque la production d'ATP du ver et qui n'est létale qu'après plusieurs dizaines de minutes.

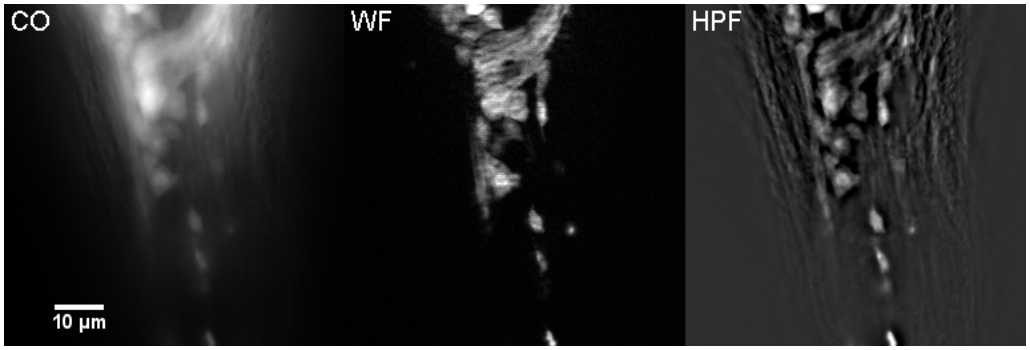


FIGURE I.25 – *C. elegans* dont les neurones expriment la YFP. WF : Image plein champ, CO coupe optique et HPF après filtrage passe-haut.

La figure I.25 présente une coupe optique réalisée au niveau de la tête du ver (Objectif 60× à eau, ON 1,2, 400 ms exposition totale). On repère bien les corps cellulaires des neurones (individuels ou en groupes) et en forçant le contraste, on peut voir les axones se projetant dans le corps. On peut ainsi extraire des cartes 3D des neurones et du réseau d'axones. La présence de zones de marquage continu est peu visible sur des images obtenues par filtrage passe-haut qui permettent surtout de détecter les filaments des neurones individuels. La figure I.26 montre ainsi des reconstructions 3D en échelle de couleur, où on repère bien les projections des neurones, notamment vers la bouche du ver sur l'image de droite. Ces reconstructions ont été réalisées à partir de respectivement 50 et 25 plans, séparés de 0,5 et 1 $\mu$m avec des temps d'intégration totaux de 400 et 800 ms par plan. Les images sont affichées en échelle linéaire pour bien voir la dynamique du signal, très variable entre un axone et un amas de noyaux, et modifiées par une courbe gamma de paramètre indiqué pour visualiser simultanément les différents composants.

Malgré l'importance du signal hors focus par rapport à la fluorescence émise par un seul neurone dans certaines zones de l'échantillon, la coupe optique permet de retrouver le signal d'intérêt comme le montrent les profils de la figure I.27.

Ces images peuvent permettre de mieux connaître la structure d'un échantillon. Il reste à observer des échantillons vivants et mobiles pour associer notre augmentation de résolution axiale à une augmentation de résolution temporelle.

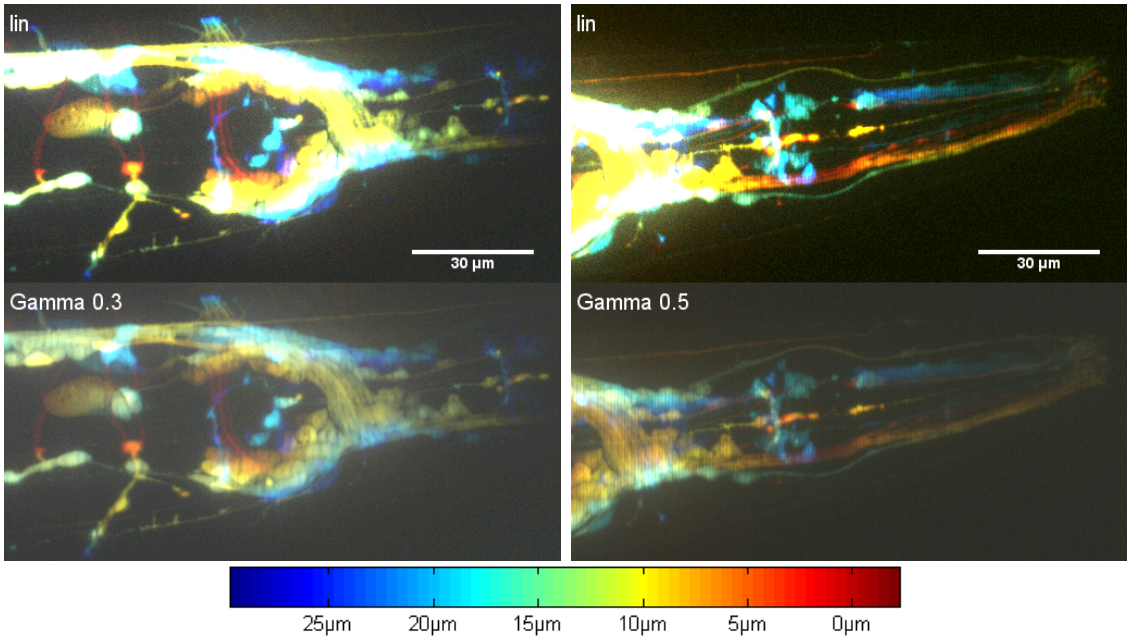


FIGURE I.26 – Reconstruction 3D, codée en échelle de couleur au niveau de la tête et de la bouche du *C. elegans*. Les images corrigées par un gamma différent de 1 permettent de bien visualiser l'arrangement du réseau de neurones.

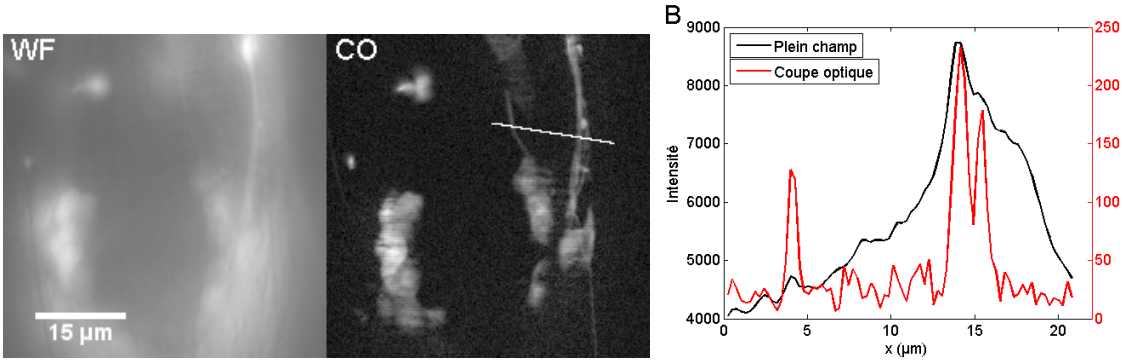


FIGURE I.27 – WF : Image plein champ et CO : de coupe optique de neurones de la tête du *C. elegans* (avec un gamma de 0,5, pour visualiser les neurones et les filaments individuels). B : profils obtenus sur les images originales (échelle linéaire) au niveau du trait repéré sur la coupe optique.

## I.7 Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons détaillé le développement de deux techniques de coupe optique par illumination structurée dans le but d'améliorer la cadence d'acquisition. La première nécessite l'acquisition de trois images, mais l'utilisation d'une grille mobile permet de s'affranchir du temps de stabilisation du système. Ce système est néanmoins rapidement limité par la cadence de la caméra et surtout l'intensité du signal de fluorescence. La seconde est dérivée de la technique HiLo et permet de réduire le nombre d'images nécessaires à une seule, en acquérant simultanément les deux images nécessaires au traitement HiLo dans deux fenêtres spectrales distinctes. Nous avons également caractérisé l'épaisseur de coupe (théorique et pratique) ce qui montre que ces systèmes ont des performances proches du microscope confocal qui reste une référence pour l'obtention d'images de coupe optique de par sa facilité d'utilisation. Enfin différents échantillons variés ont été caractérisés par ces techniques pour illustrer sa souplesse d'utilisation.

# Bibliographie

[1] J.B. Pawley. *Handbook Of Biological Confocal Microscopy*. Language of science. Springer, 2006.

[2] J. M. Murray, P. L. Appleton, J. R. Swedlow, and J. C. Waters. Evaluating performance in three-dimensional fluorescence microscopy. *Journal of microscopy*, 228(Pt 3), 2007.

[3] D. Axelrod. Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence. *The Journal of cell biology*, 89(1), 1981.

[4] D. Axelrod. Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology. *Methods in enzymology*, 361(2), 2003.

[5] J. Huisken, J. Swoger, F. Del Bene, J. Wittbrodt, and E. H. K. Stelzer. Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science*, 305(5686) :1007–1009, 2004.

[6] P. A. Santi. Light sheet fluorescence microscopy : A review. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 59(2) :129–138, 2011.

[7] J.W. Goodman. *Introduction To Fourier Optics*. McGraw-Hill physical and quantum electronics series. Roberts & Company, 2005.

[8] P.A. Stokseth. Properties of a defocused optical system. *JOSA*, 59(10), 1969.

[9] D. Karadaglić and T. Wilson. Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 39(7), 2008.

[10] M. A. Neil, A. Squire, R. Juskaitis, P. I. Bastiaens, and T. Wilson. Wide-field optically sectioning fluorescence microscopy with laser illumination. *Journal of microscopy*, 197(Pt 1), 2000.

[11] M. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics letters*, 22(24), 1997.

[12] L. G. Krzewina and M. K. Kim. Single-exposure optical sectioning by color structured illumination microscopy. *Optics Letters*, 31(4) :477–479, 2006.

[13] K. Wicker and R. Heintzmann. Single-shot optical sectioning using polarization-coded structured illumination. *Journal of Optics*, 12(8), 2010.

[14] D. Lim, K. K. Chu, and J. Mertz. Wide-field fluorescence sectioning with hybrid speckle and uniform-illumination microscopy. *Optics letters*, 33(16), 2008.

[15] S. Santos, K. K. Chu, D. Lim, N. Bozinovic, T. N. Ford, C. Hourtoule, A. C. Bartoo, S. K. Singh, and J. Mertz. Optically sectioned fluorescence endomicroscopy with hybrid-illumination imaging through a flexible fiber bundle. *Journal of biomedical optics*, 14(3), 2009.

[16] M. J. Cole, J. Siegel, S. E. Webb, R. Jones, K. Dowling, M. J. Dayel, D. Parsons-Karavassilis, P. M. French, M. J. Lever, L. O. Sucharov, M. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson. Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning. *Journal of microscopy*, 203(Pt 3), 2001.

[17] L. H. Schaefer, D. Schuster, and J. Schaffer. Structured illumination microscopy : artefact analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach. *Journal of microscopy*, 216(Pt 2), 2004.

[18] F. Chasles, B. Dubertret, and A. C. Boccara. Optimization and characterization of a structured illumination microscope. *Optics express*, 15(24), 2007.

[19] E. Muro, P. Vermeulen, A. Ioannou, P. Skourides, B. Dubertret, A. Fragola, and V. Loriette. Single-shot optical sectioning using two-color probes in HiLo fluorescence microscopy. *Biophysical journal*, 100(11), 2011.

[20] J. Mertz. *Introduction to Optical Microscopy*. Roberts, 2009.

[21] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 190(2), 2010.

[22] D. Debarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy. *Optics Letters*, 34(16) :2495–2497, 2009.

[23] N. Olivier, D. Debarre, and E. Beaurepaire. Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy. *Optics Letters*, 34(20) :3145–3147, 2009.

[24] D. Debarre, E. J. Botcherby, M. J. Booth, and T. Wilson. Adaptive optics for structured illumination microscopy. *Optics Express*, 16(13) :9290–9305, 2008.

[25] L. Holtzer, T. Meckel, and T. Schmidt. Nanometric three-dimensional tracking of individual quantum dots in cells. *Applied Physics Letters*, 90(5), 2007.

[26] T. M. Watanabe, T. Sato, K. Gonda, and H. Higuchi. Three-dimensional nanometry of vesicle transport in living cells using dual-focus imaging optics. *Biochemical and biophysical research communications*, 359(1), 2007.

[27] G. A. Lessard, P. M. Goodwin, and J. H. Werner. Three-dimensional tracking of individual quantum dots. *Applied Physics Letters*, 91(22), 2007.

[28] P. Prabhat, S. Ram, E. S. Ward, and R. J. Ober. Simultaneous imaging of different focal planes in fluorescence microscopy for the study of cellular dynamics in three dimensions. *IEEE transactions on nanobioscience*, 3(4), 2004.

[29] J. G. Ritter, R. Veith, J. P. Siebrasse, and Ul. Kubitscheck. High-contrast single-particle tracking by selective focal plane illumination microscopy. *Optics express*, 16(10), 2008.

[30] S. Ram, P. Prabhat, J. Chao, E. S. Ward, and R. J. Ober. High accuracy 3D quantum dot tracking with multifocal plane microscopy for the study of fast intracellular dynamics in live cells. *Biophysical journal*, 95(12), 2008.

[31] S. Ram, P. Prabhat, E. S. Ward, and R. J. Ober. Improved single particle localization accuracy with dual objective multifocal plane microscopy. *Optics express*, 17(8), 2009.

[32] M. J. Mlodzianoski, M. F. Juette, G. L. Beane, and J. Bewersdorf. Experimental characterization of 3D localization techniques for particle-tracking and super-resolution microscopy. *Optics express*, 17(10), 2009.

[33] M. F. Juette and J. Bewersdorf. Three-dimensional tracking of single fluorescent particles with submillisecond temporal resolution. *Nano letters*, 10(11), 2010.

[34] D. Lim, T. N. Ford, K. K. Chu, and J. Mertz. Optically sectioned in vivo imaging with speckle illumination HiLo microscopy. *Journal of biomedical optics*, 16(1), 2011.

[35] Wikipédia. Caenorhabditis elegans — wikipédia, l'encyclopédie libre, 2012. URL `http://fr.wikipedia.org/wiki/Caenorhabditis_elegans`. [En ligne ; Page disponible le 16-avril-2012].

# II

# Illumination structurée : Super-résolution à haute cadence et coupe optique

## Sommaire


**I.1 Profondeur de champ, coupe optique, état de l'art et illumination structurée . . . . . 6**

I.1.1 Profondeur de champ . . . . . 6

I.1.2 Illumination du plan focal : microscopies TIRF et à feuille de lumière . . . . . 8

I.1.3 Illumination structurée . . . . . 9

**I.2 Mise en œuvre et optimisation . . . . . 15**

I.2.1 Description du montage . . . . . 15

I.2.2 Utilisation d'une grille oscillante . . . . . 16

**I.3 Caractérisation des performances . . . . . 20**

I.3.1 Epaisseur de coupe théorique . . . . . 20

I.3.2 Mesure de l'épaisseur de coupe . . . . . 24

**I.4 Limitations . . . . . 26**

I.4.1 Augmentation de cadence . . . . . 26

I.4.2 Perte d'efficacité par les aberrations optiques . . . . . 27

I.4.3 Comparaison à un filtrage passe-haut . . . . . 29

**I.5 Coupe optique à partir d'une seule image : HiLo bicouleur 29**

I.5.1 Passage à une seule image . . . . . 30

I.5.2 Applications et limitations . . . . . 36

**I.6 Applications à divers échantillons biologiques . . . . . 36**

I.6.1 Cellules HeLa . . . . . 36

I.6.2 Disque imaginal de drosophile . . . . . 40

I.6.3 *Caenorhabditis elegans* . . . . . 41

**I.7 Conclusions et perspectives . . . . . 44**

La technique de microscopie à illumination structurée présentée au chapitre précédent permet d'augmenter la résolution axiale d'un microscope plein champ, mais est toujours limitée en résolution latérale par la limite de diffraction. Ces dernières années, différentes techniques ont vu le jour, qui permettent de dépasser cette limite fondamentale. Après un aperçu de ces différentes techniques de super-résolution, nous montrerons comment utiliser la modulation de l'illumination dans l'échantillon pour augmenter la résolution latérale en microscopie plein champ. Comme nous allons le voir, le gain en résolution de cette technique est limité à un facteur deux (avec une reconstruction linéaire), mais l'absence de contraintes sur l'échantillon permet de l'utiliser avec tous les marquages actuellement disponibles. Nous introduirons une nouvelle méthode de reconstruction permettant une réduction du nombre d'images nécessaires à l'obtention d'une image super-résolue, puis nous montrerons l'efficacité de cette technique sur des échantillons tests ainsi que sur des échantillons biologiques. Enfin nous décrirons les limitations actuelles et améliorations possibles de cette approche.

## II.1 Augmentation de résolution en microscopie optique

### II.1.1 Limite de résolution

Comme nous l'avons vu au chapitre précédent, l'image d'un point infiniment petit par un microscope, en imagerie incohérente, est une tache (réponse impulsionnelle du système ou PSF), dont le diamètre rapporté dans le plan objet du microscope est typiquement de l'ordre de la moitié de la longueur d'onde de la lumière utilisée. Les images de deux points séparés par une distance inférieure au rayon caractéristique de la PSF ne pourront pas être distinguées comme deux structures individuelles (cf figure II.1). Ceci vaut pour des structures ponctuelles, mais également pour des structures plus complexes (filaments, structures pleines ou non...). La figure II.1 illustre la perte de résolution due à la largeur de la PSF. En partant d'images simulées (images du haut), les images obtenues après convolution par la PSF du microscope (images du bas) montrent la disparition de certains détails. Chaque point de l'échantillon fluorescent est remplacé par une tache d'Airy, l'image finale étant obtenue en sommant ces taches.

Le critère généralement retenu pour quantifier la résolution spatiale d'un microscope est le critère de Rayleigh qui énonce que les images de deux objets ponctuels distincts sont séparables (observés comme les images de deux objets) si la distance séparant les maxima des deux images est supérieure au rayon de la PSF (défini comme le rayon du premier zéro de la fonction d'Airy). Ceci est illustré sur la figure II.2.

Pour un microscope optique dont la PSF peut être décrite par la forme présentée au chapitre I, le critère de Rayleigh nous donne une distance limite $d_{Rayleigh}$ dans

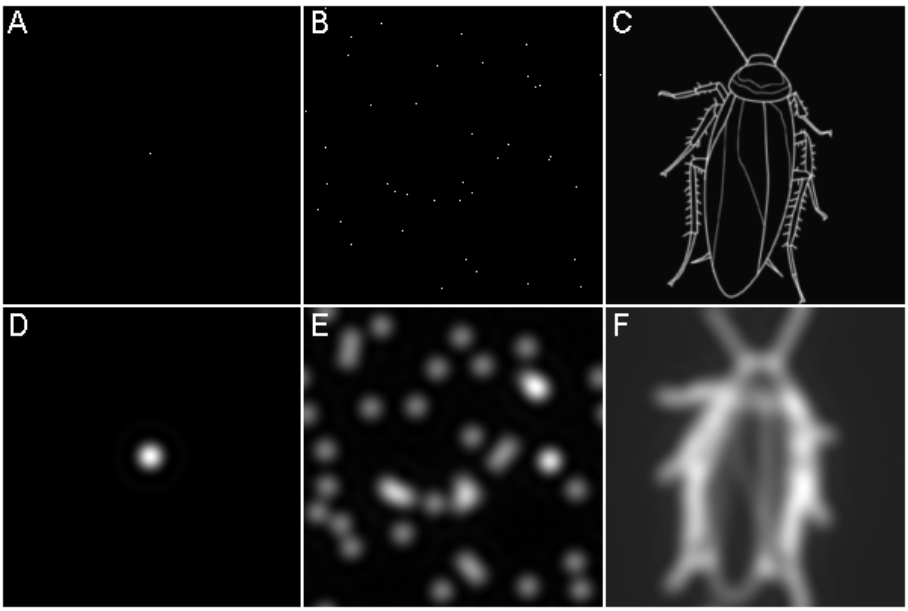


FIGURE II.1 – Images tests montrant la diminution de résolution due à la diffraction. Les images A à C sont des images tests représentant A : une seule particule bien plus petite que la longueur d'onde, B : un ensemble de particules sub-longueur d'onde réparties aléatoirement et C : un objet étendu. Les images D à F sont obtenues après convolution des images tests par une PSF théorique. On voit l'étalement des images de billes qui empêche de résoudre certains groupes de billes proches les unes des autres dans l'image E, et la disparition de structures plus petites que la PSF sur l'image F.

l'échantillon de :

$$d_{Rayleigh} = 1,22\frac{\lambda}{2ON}, \tag{II.1}$$

où $\lambda$ est la longueur d'onde de la lumière utilisée et $ON$ l'ouverture numérique du système. Avec un microscope à épifluorescence classique, la longueur d'onde typique étant de l'ordre de 500 nm et les ouvertures numériques ne dépassant pas 1,5, $d_{Rayleigh}$ sera supérieur à environ 200 nm. Ceci est bien plus grand que de nombreux objets d'intérêt en biologie (protéine $\sim 1 - 10$ nm, filament de tubuline $\sim 25$ nm de diamètre...) dont on ne peut donc pas observer la structure avec un microscope classique.

Ces vingt dernières années ont vu l'apparition de différentes techniques de microscopie permettant de dépasser cette limite de résolution. Ces techniques intéressent fortement la communauté des biologistes, car elles permettent d'obtenir de l'information à de nouvelles échelles, tout en gardant les avantages de la microscopie de fluorescence. La principale limitation de ces techniques est la faible cadence des films super-résolus, le gain en résolution latérale étant obtenu au détriment de la résolution temporelle. Leur utilisation est donc limitée à l'étude d'échantillons fixés ou

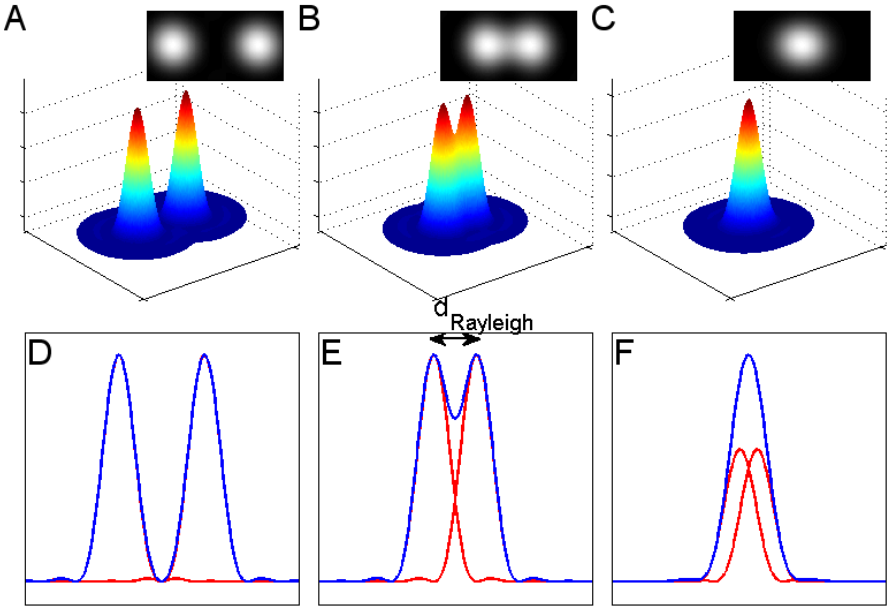


FIGURE II.2 – Schéma illustrant la limite de résolution définie par le critère de Rayleigh. A et D, deux particules fluorescentes distantes de plus de $d_{Rayleigh}$ sont bien séparées sur les images (A : image et représentation 3D du signal, l'axe z représentant l'intensité de fluorescence détectée, D : profil de l'intensité des images). Lorsque ces deux particules sont distantes de $d_{Rayleigh}$ (B et E), on atteint la limite de résolution. Pour des distances plus faibles (C et F), les deux particules sont indiscernables.

vivants mais dans lesquels les phénomènes d'intéret présentent des variations temporelles lentes (supérieures à la seconde ou dizaine de seconde). Un axe important d'amélioration de ces techniques est donc l'augmentation significative de la cadence des images super-résolues. Cela permettra d'aborder de nouvelles problématiques biologiques sur des échantillons présentant une dynamique plus rapide (dynamique du cytosquelette ou de vésicules à l'intérieur de la cellule par exemple).

Les techniques de super résolution peuvent être comparées selon de multiples critères : cadence d'acquisition, résolution latérale et axiale, toxicité pour l'échantillon, difficulté de mise en œuvre, etc. Il existe néanmoins deux familles bien distinctes : les techniques pointillistes (ou point-à-point) où les fluorophores sont observés indépendamment et les techniques d'ensemble. Il est important de souligner qu'aucune d'elle n'est fondamentalement meilleure qu'une autre, elles seront simplement plus adaptées à une problématique qu'à une autre. Le choix judicieux de la technique à employer pour un problème donné est conditionné par les performances de chacune de ces techniques pour les différents critères mentionnés.

### II.1.2 Super-résolution par super-localisation

#### Méthodes pointillistes : PALM/STORM

**Principe.** Les images de la figure II.1 montrent l'effet de la convolution sur l'image d'un échantillon avec un marquage dense : il est impossible de résoudre individuellement des objets distincts. En revanche, si on arrive à n'observer qu'un seul fluorophore, il est possible de détecter le barycentre de son image. Cette mesure permet d'obtenir une estimation de la position du barycentre du fluorophore avec une précision bien meilleure que 200 nm, dépendant du nombre de photons reçus (20 nm pour 100 photons détectés) [1]. Il s'agit donc ici de super-localisation et pas strictement de super-résolution. L'image super-résolue n'est révélée qu'en combinant les positions de tous les fluorophores présents après qu'ils aient été excités séquentiellement et individuellement. En réalisant cette manipulation pour les différents fluorophores d'un échantillon, on reconstruit donc indirectement la structure de l'objet étudié, avec une résolution bien meilleure qu'en microscopie conventionnelle.

En pratique, il faut acquérir des images de l'échantillon où seuls quelques fluorophores individuels sont brillants et suffisamment éloignés les uns des autres pour que leurs images ne se superposent pas. Ceci est réalisable grâce au développement de sondes de fluorescence photoactivables, c'est à dire qui possèdent plusieurs états stables et qui changent d'état par excitation à une longueur d'onde particulière. Plusieurs types de molécules présentent ces caractéristiques dont le choix oriente le nom de la technique (PALM : Photo Activation Localization Microscopy ou STORM : Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) :

- des protéines fluorescentes ou des fluorophores organiques qui peuvent passer d'un état non émissif à un état brillant par excitation à des longueurs d'ondes particulières [2–6] ;
- des protéines fluorescentes ou des fluorophores organiques dont la longueur d'onde de fluorescence est modifiée par excitation à une troisième longueur d'onde [7] ;
- des couples de fluorophores dont un seul est photoactivable, le second servant à améliorer l'efficacité de conversion [8].

Une fois l'échantillon marqué par ces fluorophores, seule une sous-population de ces molécules est activée par irradiation à la longueur d'onde d'activation, en contrôlant la puissance de cette excitation. Celle-ci doit être finement dosée pour éviter qu'un nombre trop important de fluorophores ne soient activés (ce qui augmenterait la probabilité d'avoir deux images superposées) ou que trop peu de molécules ne deviennent brillantes (ce qui nécessiterait beaucoup d'images afin d'obtenir une reconstruction fidèle de l'échantillon). Une fois les fluorophores activés, on excite leur fluorescence et on collecte ce signal sur une caméra classique, jusqu'au photoblanchiment (typiquement 10 à 500 ms d'exposition) [2–5, 8] (cf. figure II.3).

Il faut acquérir typiquement 5000 à 10000 images d'un échantillon pour pouvoir reconstruire une image fidèle de l'objet étudié, soit un temps total d'exposition de plusieurs minutes à plusieurs heures. Sur chaque image on localise précisément

la position de chaque particule, par ajustement d'une fonction simple (en général gaussienne) avec une précision $\Delta_{loc}$ [1] :

$$\Delta_{loc} \sim \frac{\lambda}{2ON\sqrt{N}}, \tag{II.2}$$

avec $\lambda \sim 500\,\text{nm}$ la longueur d'onde de fluorescence, $ON$ l'ouverture numérique de l'objectif utilisé et $N$ le nombre de photons détectés par PSF. En pratique on peut détecter de 100 à 10000 photons pour chaque particule, et donc atteindre une précision de localisation de l'ordre de 2 à 20 nm [2–5, 8].

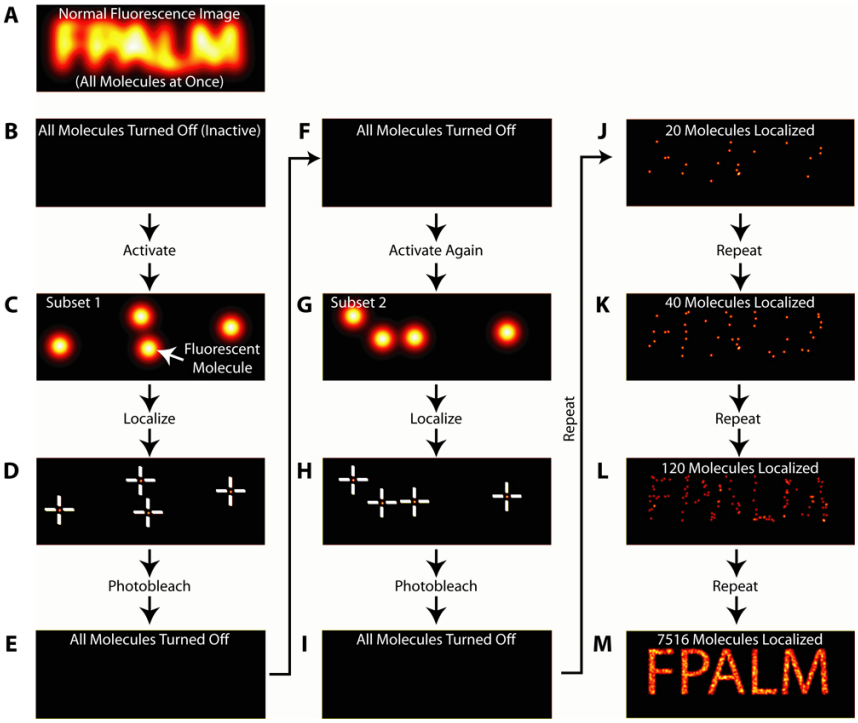


FIGURE II.3 – Principe des microscopies pointillistes : une sous-population de fluorophores est activée (C), détectée et localisée (D) avec une précision nanométrique avant d'être blanchie (E). Ce cycle est recommencé plusieurs milliers de fois (F-M) pour obtenir une image super-résolue (M) (extrait de [9]).

Dans le cas précédent, la localisation est bidimensionnelle et ne fournit pas les coordonnées axiales des fluorophores, il n'y a donc pas de super-résolution axiale. Il est cependant possible de coder la position axiale des fluorophores de différentes manières :

– en ajoutant une lentille cylindrique ou un miroir déformable qui ajoutera de l'astigmatisme. L'image d'un fluorophore sera une PSF ellipsoïdale, la longueur des axes de l'ellipse dépendant de la position axiale de la particule. Une modélisation par une PSF adaptée permet d'obtenir la position axiale avec une précision de l'ordre de 50 nm [5, 10] ;

- en réalisant l'image d'un fluorophore sur deux caméras (ou deux portions d'une même caméra) correspondant à deux chemins optiques différents. La comparaison de l'étalement des deux PSF d'une même particule sur les deux images permet, à partir d'un étalonnage, de remonter à la localisation axiale avec une précision de l'ordre de 75 nm [11] ;
- par ingénierie de la PSF. Il est possible de donner à la PSF non plus la forme d'une tache d'Airy, mais celle d'une double hélice dont l'axe est parallèle à l'axe optique, en modifiant la phase du faisceau image grâce à un SLM placé dans un plan conjugué du plan focal arrière de l'objectif de microscope. L'orientation relative des deux points images de la double hélice dans l'image code la position axiale permettant une résolution axiale de l'ordre de 20 nm [6] ;
- par interférences des photons provenant d'une particule unique par différents chemins optiques grâce à une configuration $4\pi$ (résolution axiale de l'ordre de 20 nm) [7].

La cadence d'acquisition de ces images de PALM ou STORM est très faible (entre 5 min et plusieurs heures par image [2–4]), ce qui limite fortement les processus biologiques observables à l'échelle de la cellule. Par contre, il est possible d'observer la dynamique des fluorophores individuels à haute cadence. Si le fluorophore se déplace, l'acquisition de plusieurs images avant qu'il ne photoblanchisse permet la reconstruction de sa trajectoire au cours du temps. On peut alors coupler les informations structurales obtenues à une résolution temporelle faible, avec ces données de suivi de particules uniques à haute cadence [10, 12–14].

**Performances et limitations.** La figure II.4 montre l'efficacité de cette technique sur un échantillon fixé, en deux dimensions, avec une résolution de l'ordre de 25 nm. La figure II.5 illustre quant à elle l'efficacité de la localisation 3D, permettant de réaliser une reconstruction 3D d'un échantillon avec une résolution dix fois plus importante qu'en microscopie classique ($\sim$ 25 nm latéralement et $\sim$ 50 nm axialement). L'augmentation importante de résolution se fait toujours au détriment de la cadence temporelle (les images de la figure II.4 sont acquises en 3h [2]).

Ce temps d'exposition constitue la première grande limitation de cette technique. En effet, pour que l'image reconstruite soit bien représentative de l'objet observé, il est nécessaire de détecter une proportion importante des fluorophores de l'échantillon, ce qui nécessite un nombre important de cycles d'acquisition et localisation de fluorophores. Il faut par ailleurs s'assurer que suffisamment de particules ont été détectées afin de bien reproduire la structure de l'objet [15].

De plus, du fait d'un long temps d'acquisition, le système optique est susceptible de subir des dérives thermiques. Si l'on veut que la précision de quelques nanomètres soit parfaitement révélatrice de la structure de l'échantillon, il faut s'assurer de la bonne stabilité du système optique ou compenser ses dérives à l'échelle nanométrique [8, 16].

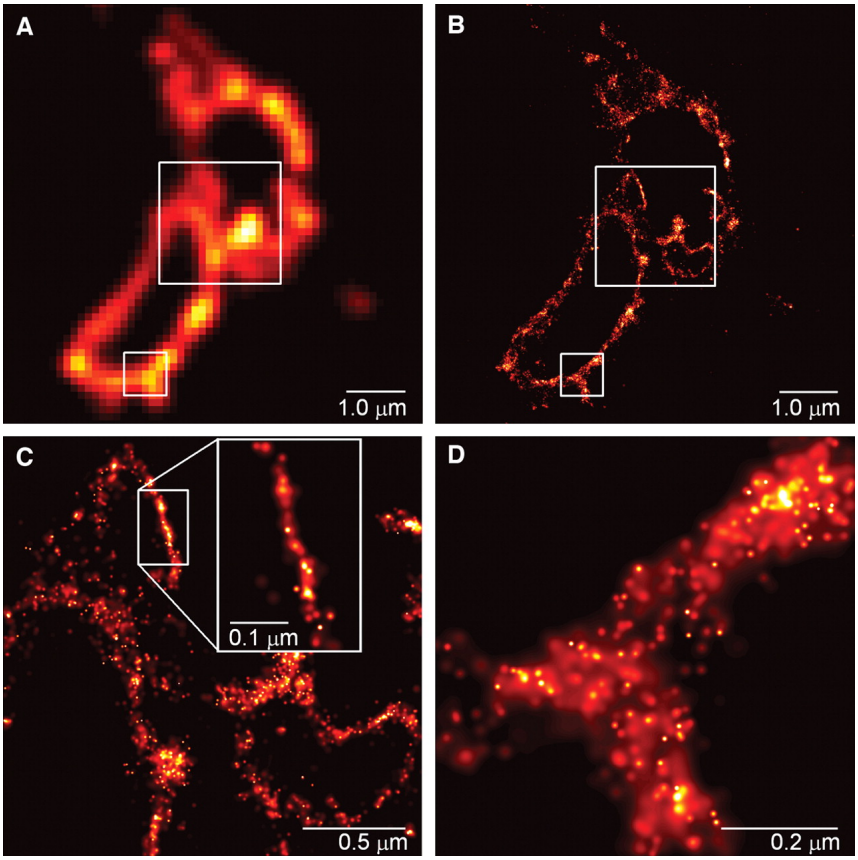


FIGURE II.4 – Cellules COS-7 exprimant une protéine de membrane de lysosome. Comparaison d'une image plein champ TIRF (A) et d'une image super-résolue (B) ainsi que des agrandissements de celle-ci (C et D) (extrait de [2]).

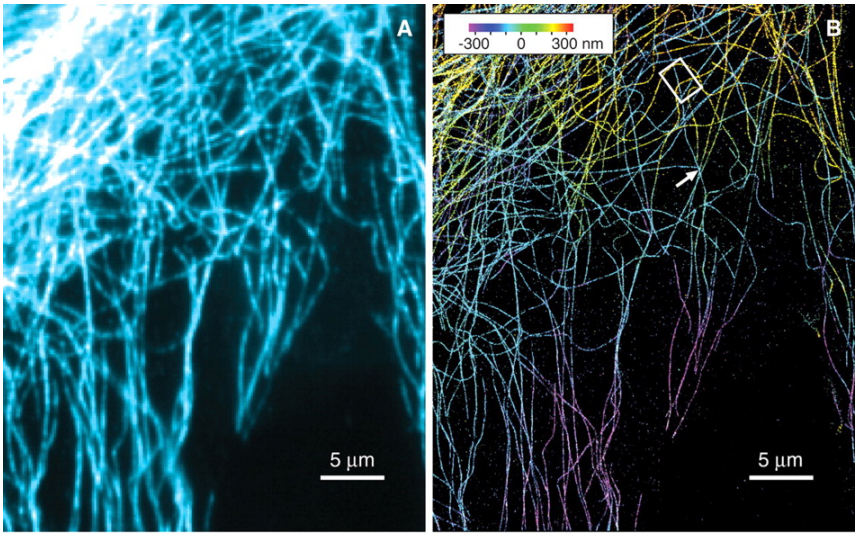


FIGURE II.5 – Images de microtubules dans une cellule. Comparaison d'une image plein champ conventionnelle (A) et d'une image STORM 3D (B), où la position axiale est codée en échelle de couleur (extrait de [5]).

Il est également important de ne pas confondre la résolution de ces images pointillistes avec la précision de localisation. Pour pouvoir séparer deux structures proches, il faut que le marquage de celles-ci soit suffisamment dense, ce qui peut être difficile à réaliser pour une résolution de quelques nanomètres [15].

La seconde limitation concerne les sondes fluorescentes. Pour atteindre une telle précision de localisation, il faut des fluorophores photoactivables avec une bonne efficacité quantique, qui puissent fournir un flux de photons suffisamment important. Il faut également valider les stratégies de marquage avec ces nouvelles sondes, ce qui n'est pas toujours aisé. Enfin, les fluorophores sont souvent utilisés comme rapporteurs d'une autre protéine ou molécule à laquelle ils sont attachés par une structure pouvant mesurer une dizaine de nanomètres (anticorps, association de protéines). Dans ce cas, une précision de localisation de 2 nm ne nous renseignera que sur la localisation du fluorophore, et non de la molécule d'intérêt [15]. Le marquage de l'échantillon est donc un aspect important de ces techniques, notamment car les marquages classiques ne sont pas adaptés.

**Méthodes dérivées.** Ces méthodes de super-localisation ont donné naissance à de nombreuses techniques dérivées basées sur la localisation de particules uniques, mais employant d'autres approches pour sélectionner une sous-population de fluorophores activés.

Dans les techniques PAINT (Point Accumulation for Imaging in Nanoscale Topography) [17] et BALM (Binding-Activated Localization Microscopy) [18], le fluorophore utilisé est fluorescent uniquement lorsqu'il se trouve respectivement dans une membrane nucléaire ou dans l'ADN. En utilisant le couplage et découplage dynamique du fluorophore avec ce milieu et en ajustant sa concentration, il est possible de n'observer que quelques molécules dans un état actif sur chaque image. Grâce à la mobilité des fluorophores, il sera possible de sonder progressivement tout l'échantillon en évitant les problèmes liés à un marquage trop dense.

La technique uPAINT (universal PAINT) [19] étend la stratégie précédente à tous types de marquage, en utilisant également les propriétés de liaison dynamique de molécules fluorescentes quelconques à un échantillon, la sélection d'une sous-population de particules fluorescentes se faisant en illuminant l'échantillon obliquement, comme représenté sur le schéma II.6.

Une autre technique tire parti du vieillissement des quantum dots pour isoler quelques fluorophores à la fois. En vieillissant, le spectre d'émission des QD se décale vers le bleu. Ce phénomène intervenant de façon aléatoire et transitoire permet de détecter uniquement quelques QD à chaque acquisition en séparant soigneusement les fenêtres spectrales à la détection [20]. Il est ainsi possible d'acquérir en parallèle des images plein champ classique et super-résolues.

Ces différentes méthodes pointillistes permettent d'atteindre une résolution bien meilleure que la microscopie classique (jusqu'à 5 nm) mais nécessitent un nombre d'images très important. D'autres algorithmes se basant sur les propriétés photo-

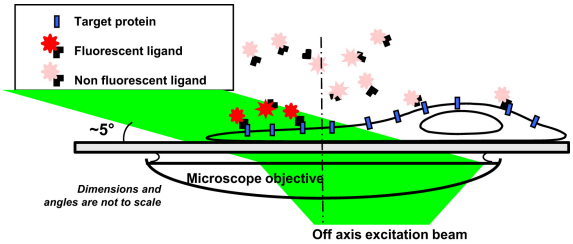


FIGURE II.6 – Schéma de principe de la technique uPAINT. Seule une faible partie des fluorophores est activée par illumination oblique. Le couplage transitoire des fluorophores en solution aux protéines d'intérêt permet de sonder progressivement tout l'échantillon (extrait de [19]).

physiques des fluorophores permettent un gain en résolution similaire, en utilisant un nombre d'images plus faible, comme nous allons le voir.

### Utilisation des fluctuations d'intensité

Les fluorophores uniques ne sont pas parfaitement stables, ils présentent généralement une intensité fluctuante et une perte de fluorescence après un certain nombre de cycles d'absorption et d'émission de photons (typiquement un million de cycles pour les fluorophores organiques). En utilisant ces fluctuations d'intensité, il est possible d'extraire un signal super-résolu à partir de plusieurs images, sans avoir besoin d'images bien distinctes des fluorophores activés.

La méthode SOFI (Super-resolution Optical Fluctuation Imaging) permet d'augmenter la résolution d'un facteur 5, à partir de la mesure de l'autocorrélation de la fluorescence pour chaque pixel [21–23]. Cette technique nécessite également plusieurs milliers d'images pour atteindre une bonne reconstruction de l'image super-résolue, avec une résolution en pratique limitée à 50-60 nm.

Une méthode de localisation bayésienne a été développée, tirant également parti du clignotement des particules individuelles [24]. À partir d'un nombre plus restreint d'images (200-300 typiquement), il est possible de déterminer la position des fluorophores avec une résolution de 50 nm. Ce nombre réduit d'images permet d'atteindre une cadence d'une image reconstruite toutes les 4 s, et ainsi d'observer des phénomènes plus rapides qu'avec les autres méthodes de super-localisation, même à grande échelle. Contrairement au suivi de particules en PALM, où les particules uniques peuvent se déplacer rapidement mais où la structure d'ensemble doit être stable, cette reconstruction bayésienne autorise les structures cellulaires à être dynamiques si les fluorophores uniques ne se déplacent pas plus rapidement. Le traitement de ces images est en revanche bien plus complexe et plus lent ($\sim 6h$), contrairement au PALM/STORM où la reconstruction peut être réalisée en parallèle de l'acquisition.

Ces techniques de super-localisation permettent d'atteindre de très grandes résolutions (quelques dizaines de nanomètres) et sont bien adaptées à l'observation

d'échantillons fixés ou de phénomènes relativement lents. D'autres techniques sont plus adaptées à l'étude de phénomènes rapides.

### II.1.3 Super-résolution

Les techniques pointillistes permettent un gain en résolution grâce à l'observation de particules isolées. Il est aussi possible d'augmenter la résolution sur des mesures d'ensemble, c'est-à-dire sans recourir à une détection de particules isolées. Pour ces mesures d'ensemble, il est nécessaire de diminuer la taille de la PSF [15]. Nous allons voir deux techniques qui le permettent, basées sur des montages classiques de microscopie confocale ou plein champ.

#### STED

**Principe.** La microscopie STED (Stimulated Emission Depletion) utilise une technique d'ingénierie de la PSF pour obtenir une augmentation de résolution spatiale, qui peut théoriquement être infinie [25]. Dans un microscope confocal, le faisceau excitateur ayant un diamètre limité par la diffraction, le signal collecté provient de l'ensemble des fluorophores présents dans la tache focale du faisceau laser. Le principe du STED est d'ajouter un faisceau laser ayant une forme d'anneau (cf figure II.7) colinéaire au faisceau d'excitation et à une longueur d'onde correspondant à l'émission des fluorophores de l'échantillon. On appelle ce faisceau « faisceau de déplétion ». Si la puissance de ce faisceau STED est suffisante, les fluorophores se désexcitent via un phénomène d'émission stimulée. Ce faisceau a une intensité nulle uniquement au centre de l'anneau, correspondant au centre du faisceau d'excitation. Ainsi, les fluorophores présents en dehors de l'axe des faisceaux et qui sont excités par le faisceau d'illumination peuvent subir un phénomène d'émission stimulée et ne contribuent pas au signal détecté, alors que les fluorophores situés sur l'axe se désexcitent spontanément. Cette fluorescence spontanée est généralement séparée spectralement de la composante stimulée, puis est mesurée par un photomultiplicateur.

Une fois un fluorophore excité, la probabilité de réémettre un photon de manière stimulée dépend directement de l'intensité de ce faisceau STED. Afin de supprimer toute émission de fluorescence spontanée dans l'anneau, il est nécessaire d'atteindre la saturation de l'émission stimulée grâce à une puissance du faisceau de déplétion suffisamment importante. Dans ce cas, la géométrie du faisceau STED assure que la fluorescence spontanée ne peut provenir que du centre de l'anneau de déplétion. La figure II.7 B indique l'étendue de cette zone avec l'intensité $I$ du faisceau STED et la PSF effective dont la taille $\Delta_{STED}$ est donnée par [26] :

$$\Delta_{STED} = \frac{\lambda}{2ON\sqrt{1+\frac{I}{I_S}}}, \tag{II.3}$$

où $I_S$ définit l'intensité caractéristique de saturation de l'émission stimulée. En théorie, il n'y a donc aucune limite sur la taille minimale de la PSF effective. Une ré-

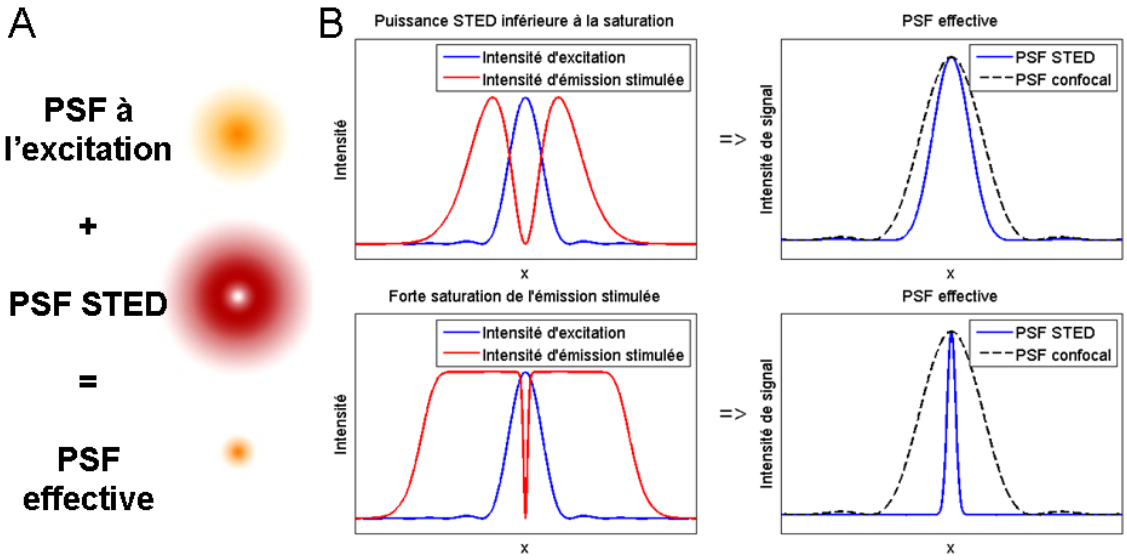


FIGURE II.7 – A : allure des faisceaux d'excitation et de déplétion en anneau et PSF effective. B : influence de la puissance du faisceau STED et de la saturation de l'émission spontanée sur la largeur de la PSF effective.

solution de 4 nm a été récemment démontrée en utilisant des puissances de plusieurs GW/cm$^2$ pour le faisceau STED.

De même qu'en microscopie confocale, il est nécessaire de balayer l'échantillon pour obtenir une image. La PSF effective étant plus petite, le balayage doit s'effectuer avec des pas plus petits (de l'ordre de la résolution attendue), ce qui diminue la cadence d'acquisition d'autant plus que la résolution est grande (par exemple, une image de $1 \times 1\,\mu$m$^2$ avec des pixels de 15 nm de côté, soit $67 \times 67$ pixels, est acquise en 1,4 s [27]).

Le STED apporte un gain en résolution latérale, mais non axiale, car le faisceau de déplétion a une intensité nulle sur l'axe optique. Il est toutefois possible de modifier ce faisceau pour lui ajouter des lobes suivant l'axe optique, et ainsi atteindre une résolution isotrope de 30 nm, grâce à une configuration $4\pi$, dénommée isoSTED [28]. Cette configuration nécessite l'emploi de deux objectifs opposés. L'alignement des faisceaux pour les deux objectifs nécessite une grande précision et sa stabilité peut être difficile à maintenir au cours de l'expérience. De plus les échantillons doivent être suffisamment fins pour être placé entre deux objectifs à fort grandissement, qui ont généralement de courtes distances de travail (par exemple 130 $\mu$m pour un objectif 100×), ce qui limite son utilisation à des échantillons particuliers [29].

**Performances et limitations.** La figure II.8 montre le gain en résolution obtenu sur des échantillons biologiques. Cette résolution est généralement de l'ordre de 20 à 30 nm afin de garder des puissances lumineuses compatibles avec des échantillons biologiques.

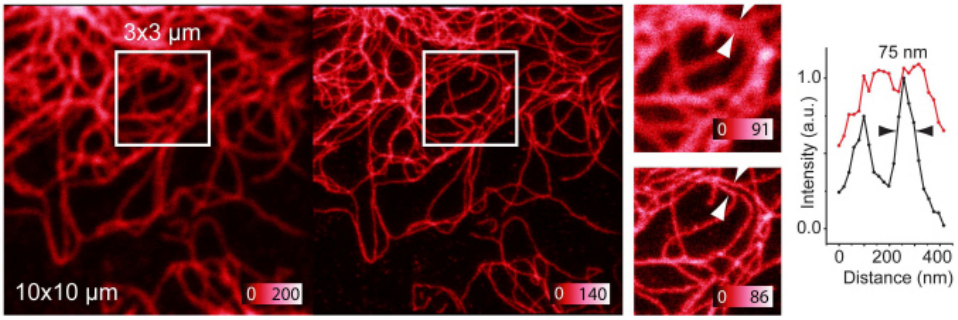


FIGURE II.8 – Images de filaments de vimentine dans des cellules marquées par le chromeo 488. Comparaison d'une image acquise en mode confocal à gauche et STED à droite, avec des élargissements de la zone centrale montrant bien le gain en résolution sur les filaments (extrait de [30]).

La résolution obtenue en STED dépend de la puissance du faisceau de déplétion. Celle-ci peut devenir très importante si on désire une résolution inférieure à 100 nm (de l'ordre de plusieurs centaines de MW/cm$^2$ voire de GW/cm$^2$ [31]), ce qui est difficilement compatible avec des échantillons biologiques, même fixés. De plus il est nécessaire de trouver des fluorophores qui supportent ces puissances (généralement des molécules organiques).

La cadence d'acquisition dépend fortement du champ observé et de la résolution (pour l'image II.8, 6 minutes d'acquisition pour une image de $4\,\mu$m $\times$ $4\,\mu$m avec des pixels de 10 nm de côté). De même qu'en microscopie confocale, l'observation de champs étendus augmente fortement le temps d'acquisition, ce qui limite les phénomènes biologiques observables à des processus intervenant à des échelles de la dizaine de seconde ou de la minute. De plus comme pour les microscopies à balayage, l'acquisition successive des différents pixels peut générer des artefacts dus à des mouvements de l'échantillon, d'autant plus importants que la résolution spatiale est grande.

La technique GSD (Ground State Depletion) est une variante du STED qui utilise un état triplet métastable des particules fluorescentes [15]. En excitant les molécules dans cet état non-émissif et à long temps de vie, on peut atteindre une augmentation de résolution similaire au STED. L'avantage de cette technique est qu'elle nécessite des puissances d'excitation plus faibles que le STED, mais avec des temps d'exposition plus longs [32].

### Illumination structurée

En 2000, Mats Gustafsson a montré expérimentalement la possibilité de gagner un facteur 2 en résolution spatiale latérale à partir d'images obtenues en illumination structurée sur un microscope plein champ [33].

**Principe.** L'augmentation de résolution par illumination structurée se base sur la modulation d'amplitude ou effet de Moiré, effet de battement obtenu entre deux

modulations de fréquences ou d'orientations différentes, comme le montre la figure II.9. L'interférence de deux structures haute fréquence dans une image fournit une composante basse fréquence qui permet de détecter une information préalablement difficile à détecter. C'est exactement ce principe qui est utilisé dans la microscopie à illumination structurée (SIM). L'illumination de l'échantillon avec un motif (généralement sinusoïdal) haute fréquence est à l'origine de basses fréquences dans l'image détectée. L'acquisition des images par le microscope agissant comme un filtre passe-bas pour les fréquences spatiales, on peut détecter ces basses fréquences. Connaissant les caractéristiques (période spatiale, orientation, phase, contraste) de la modulation, il est ainsi possible de retrouver la structure de l'échantillon au delà de la limite de résolution à partir des images modulées [33].

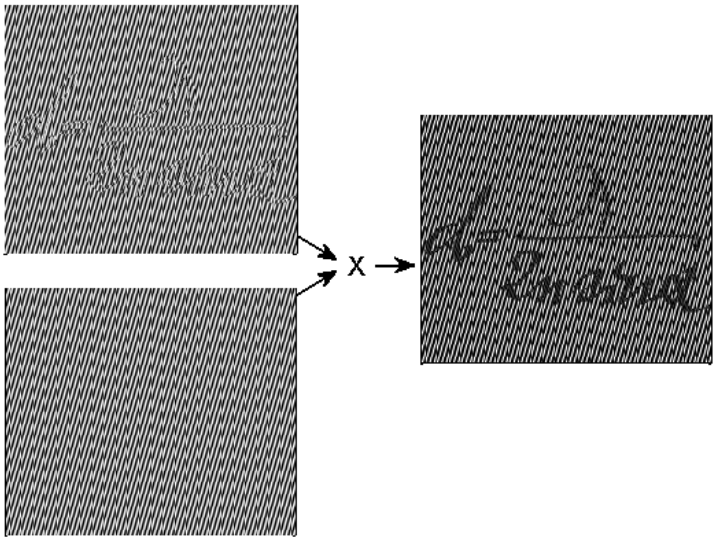


FIGURE II.9 – Exemple d'effet de Moiré : les deux images de gauche sont constituées de hautes fréquences. L'image de droite obtenue par multiplication des deux images de gauche fait apparaître un motif basse fréquence lisible, ce qui n'était pas le cas sur l'image en haut à gauche.

On peut analyser ce processus dans l'espace de Fourier, comme illustré sur la figure II.10. On considère un objet possédant des fréquences spatiales plus élevées que la fréquence de coupure du microscope (ici, un signal wobulé dont la fréquence et l'orientation du motif varient à travers l'image). Une image acquise au microscope optique ne fournira qu'une partie de l'information, celle dont les fréquences spatiales sont inférieures à la fréquence de coupure du microscope (figure C). Si on module l'illumination de cet objet par une grille sinusoïdale suivant une certaine orientation, l'image obtenue est le produit de la réponse de l'objet avec le motif d'illumination. Dans l'espace des fréquences spatiales, le spectre de l'image est donc donné par le produit de convolution du spectre de l'objet par celui de l'illumination. La transformée de Fourier (TF) de la modulation fait apparaître trois pics de Dirac, l'un à la fréquence nulle et les deux autres à la fréquence de modulation $f$, l'image modulée

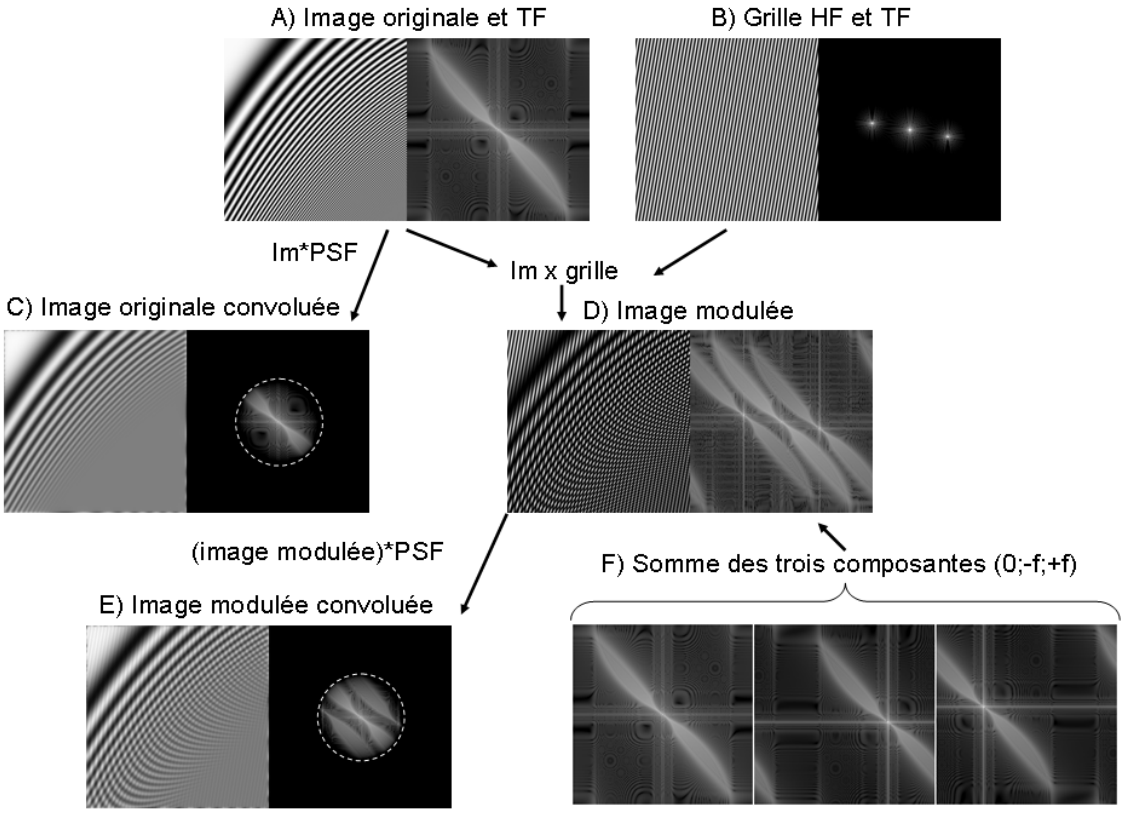


FIGURE II.10 – Schéma de principe de l'illumination structurée. A : Image test utilisée et sa transformée de Fourier (TF), B : exemple d'un motif d'illumination à haute fréquence, C : image et TF de l'échantillon obtenue après convolution par la PSF dans le cas d'une illumination homogène (les cercles en pointillés indiquent le support de la fonction de transfert du microscope), D : image modulée et TF obtenue par multiplication de A et B, E : image modulée convoluée par la PSF, F : spectres illustrant les trois composantes présentes dans l'image modulée.

(D) est donc la somme de trois composantes (F), la TF de l'image originale, autour de la fréquence nulle et cette TF décalée dans l'espace de Fourier et centrée autour des pics à $\pm f$. L'image acquise par le microscope (après convolution par la PSF) (E) montre bien que les basses fréquences générées par effet de Moiré sont transmises, et que la TF contient de l'information haute fréquence initialement inaccessible. Il faut maintenant l'extraire des images acquises pour reconstruire une image non modulée présentant un gain en résolution.

Ceci peut être fait en acquérant plusieurs images pour différentes phases de la modulation (donc en décalant latéralement la grille d'illumination). À partir de trois images $(I_1, I_2, I_3)$ avec trois phases différentes séparées de $4\pi/3$, il est possible d'extraire trois images :

- une image plein champ $I_{WF}$ correspondant à la somme des trois images modulées $(I_{WF} = I_1 + I_2 + I_3)$ ;
- une image $I_{+f}$ donnant accès aux hautes fréquences en isolant la composante correspondant à $+f$, en sommant les images obtenues pondérées par les déphasages appropriés $(I_{+f} = I_1 + I_2 e^{-4i\pi/3} + I_3 e^{4i\pi/3})$ ;
- une image $I_{-f}$ correspondant à l'information modulée à $-f$, complexe conjugué de l'image précédente $(I_{-f} = I_1 + I_2 e^{4i\pi/3} + I_3 e^{-4i\pi/3})$.

Les TF de ces trois images sont représentées sur la figure II.11 B, et illustrent bien la séparation des trois composantes autour des trois pics de modulation sur les images. Pour obtenir une image super-résolue, il faut décaler les deux TF modulées d'une distance $\pm f$ dans l'espace de Fourier pour les replacer au bon endroit (C). Un recalage précis est obtenu par corrélation des images au niveau des zones de recouvrement [34].

L'image obtenue présente ainsi une augmentation de résolution, mais uniquement dans la direction correspondant à la modulation (D). Pour générer une augmentation de résolution isotrope, il faut recommencer ce processus dans différentes directions. L'utilisation de trois directions à 60° l'une de l'autre permet d'obtenir une résolution à peu près isotrope, comme le montre la figure II.11 E. L'utilisation d'images pour trois orientations de modulations avec trois phases pour chacune d'elles impose donc l'acquisition de 9 images brutes.

La résolution de cette technique est fixée par la fréquence de modulation $f$ des images structurées et par la fréquence de coupure du microscope. En effet, sur la figure II.11 B, on voit bien que les images qui contiennent l'information haute fréquence ont le même support spectral que les images uniformes (un disque de rayon $f_c$, la fréquence de coupure de l'objectif de microscope), mais avec l'information correspondant à la fréquence nulle translatée d'une distance $f$ par rapport au centre de ce support. Ainsi la plus haute fréquence transmise par le système est $f + f_c$, qui est la résolution maximale.

**Mise en œuvre.** Le système optique généralement utilisé pour obtenir la modulation est représenté sur la figure II.12. L'interférence des ordres $\pm 1$ d'un faisceau laser

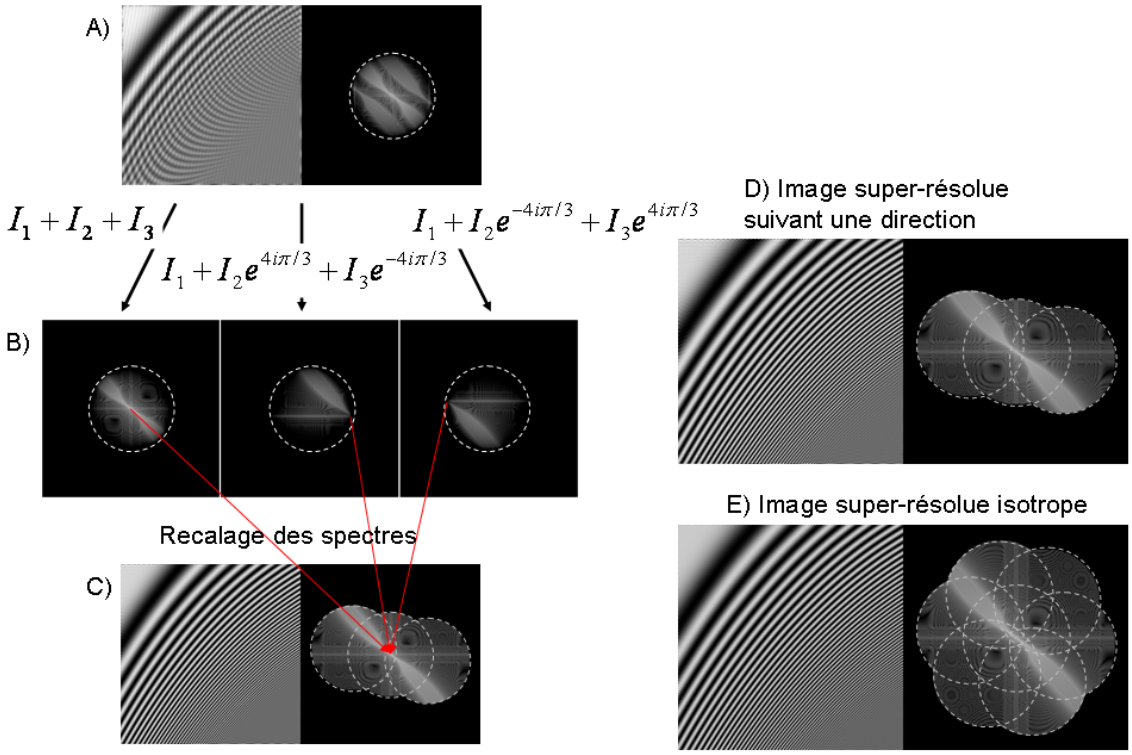


FIGURE II.11 – Schéma de principe de la reconstruction des images en illumination structurée. A : Image acquise et sa TF, B : spectres des images permettant d'isoler les différentes composantes de la modulation, C : Image obtenue après recalage des différentes parties du spectre, avec sa TF, D : Image et TF après recalage de trois images montrant un gain en résolution suivant une direction privilégiée, E : L'utilisation de trois orientations de modulation permet d'obtenir une augmentation de résolution quasiment isotrope.

(obtenus par diffraction sur un réseau) dans l'échantillon crée un motif d'illumination sinusoïdal, dont la fréquence dépend de l'angle d'incidence des deux ordres sur l'échantillon. La fréquence maximale de cette modulation correspond à la fréquence de coupure du microscope, car un objectif ne peut pas transmettre de fréquences spatiales supérieures. Contrairement au montage décrit au chapitre précédent, la modulation est ici générée par interférences. Ceci permet théoriquement d'avoir un contraste du motif d'illumination de 100 % dans l'échantillon, même à haute fréquence. Comme on s'intéresse à des fréquences qui seront fortement atténuées à la détection, il est important de maximiser le contraste à l'illumination. Un des principaux désavantages est qu'il faut réduire la cohérence des faisceaux d'illumination, si on veut éviter l'apparition de speckle parasite.

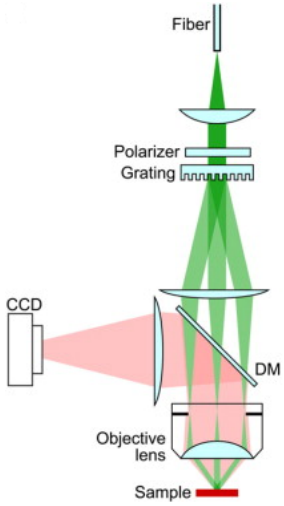


FIGURE II.12 – Schéma simplifié de l'instrument : un faisceau laser est diffracté par un réseau en différents ordres qui interfèrent dans le plan de l'échantillon pour créer le motif d'illumination. La fluorescence produite par l'échantillon est détectée par une caméra de façon classique (extrait de [35]).

Si l'échantillon répond linéairement à l'excitation, cette technique est limitée à un gain en résolution d'un facteur $1 + \frac{\lambda_{em}}{\lambda_{ex}}$, avec $\lambda_{em}$ et $\lambda_{ex}$ respectivement les longueurs d'onde d'émission de fluorescence et d'excitation (la fréquence de coupure dépendant de la longueur d'onde, elle ne sera pas la même à l'excitation et à la détection) [35]. Il est possible de dépasser ce facteur $1 + \frac{\lambda_{em}}{\lambda_{ex}}$ en utilisant à nouveau un phénomène de saturation. Si l'illumination est suffisamment puissante, la fluorescence est saturée et la modulation sinusoïdale est déformée (figure II.13). Cela fait apparaître des harmoniques de la fréquence de modulation dans la TF des images. Ces harmoniques étant plus éloignées de la fréquence nulle, elle donnent accès à une information à une fréquence plus élevée. La résolution maximale accessible par cette technique d'illumination structurée saturée (SSIM) est alors $\Delta_{SSIM} \sim \dfrac{\lambda}{2ON(2+n)}$, où $n$ est le nombre d'harmoniques détectées [34]. Une résolution infinie est donc théoriquement envisageable, mais elle nécessite à nouveau une puissance très im-

portante pour pouvoir extraire le signal d'intérêt du bruit de fond. De plus, il faut utiliser $3 + 2n$ images par orientation pour séparer les différentes composantes de la modulation, et de nombreuses orientations pour garder une résolution isotrope (avec 3 harmoniques, il faut 9 images par orientation et 12 orientations pour paver le support de l'OTF super-résolue dans l'espace de Fourier, soit 108 images pour une résolution d'environ 40 nm).

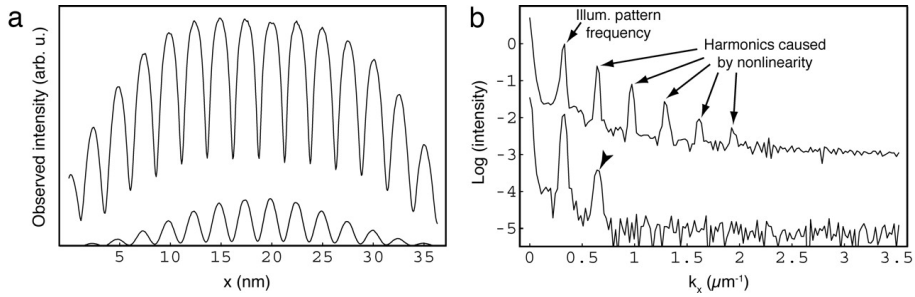


FIGURE II.13 – a) Profils de fluorescence d'un film fluorescent illuminé par un laser impulsionnel avec un motif sinusoïdal pour deux puissances d'excitation, l'une étant suffisamment importante pour saturer la fluorescence. On voit la déformation du motif sinusoïdal. b) Transformée de Fourier des courbes a) en échelle logarithmique illustrant l'apparition des harmoniques (extrait de [34]).

Il est possible d'utiliser les mêmes motifs d'illumination structurée pour obtenir des coupes optiques et ainsi augmenter la résolution axiale. Nous avons vu au chapitre précédent que si la fréquence de modulation réduite est proche de 2, l'épaisseur de coupe est importante et l'effet de coupe peu intéressant. Toutefois si on diminue la fréquence de modulation pour avoir un effet de coupe suffisant, on diminue le gain en résolution. Une solution pour obtenir un effet de coupe optique efficace, et en même temps une augmentation maximum de la résolution spatiale latérale est d'ajouter une modulation à la moitié de la fréquence de modulation initiale. Cela est réalisé facilement, en faisant interférer les ordres $\pm 1$ avec l'ordre 0, pour obtenir une modulation à deux composantes, à $f$ et à $f/2$. Dans ce cas, 5 images par orientation de grille sont nécessaires pour obtenir une image super-résolue, ce qui porte à 15 le nombre total d'images pour un gain en résolution d'un facteur 2 (sans non-linéarité). La résolution axiale est de l'ordre de 300 nm pour des objectifs à fort grandissement [35].

L'utilisation de deux objectifs opposés, de part et d'autre de l'échantillon, pour l'excitation et la détection permet également d'obtenir une super-résolution axiale et d'améliorer la résolution latérale par rapport au SIM classique [36]. Cette technique appelée $I^5S$ permet d'atteindre une résolution isotrope de 100 nm, mais souffre des mêmes inconvénients que la technique isoSTED concernant la difficulté de réglage et de mise en œuvre.

**Performances et limitations.** La figure II.14 (extraite de [33]) montre le gain en résolution obtenu sur une cellule dont l'actine a été marquée par la rhodamine. Le temps d'exposition est de l'ordre de 1-10 s. Sur la seconde image, on repère clairement des filaments distincts, indissociables dans l'image plein champ. L'image II.15 permet d'apprécier le gain apporté par la coupe optique pour des échantillons épais.

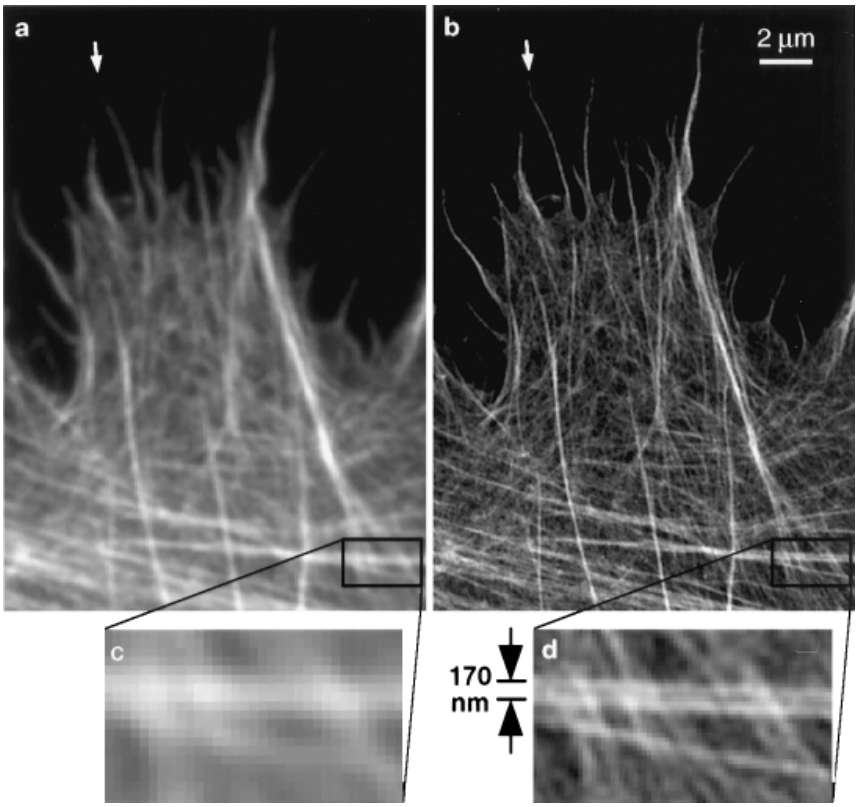


FIGURE II.14 – Filaments d'actine d'une cellule HeLa en microscopie classique (a) et en illumination structurée super-résolue (b). Les agrandissements c et d permettent de visualiser le gain en résolution de l'illumination structurée (extrait de [33]).

Le temps d'acquisition est principalement limité par le temps d'exposition (100 ms par image soit 0,9 ou 1,5 s par plan). En réduisant le temps d'exposition à 10 ms par image, il est ainsi possible d'atteindre une cadence de 11 images super-résolues par seconde [37]. Cela nécessite des fluorophores suffisamment brillants pour obtenir un rapport signal sur bruit important dans les images brutes, et résistants au photoblanchiment pour maintenir ce rapport pendant l'acquisition des 9 ou 15 images.

Toutefois, comme cette technique n'impose pas de contraintes particulières sur les fluorophores, il est possible de trouver des marqueurs satisfaisants aux puissances utilisées (qui sont comparables à celles utilisées en microscopie plein champ classique). Il n'est donc pas nécessaire de développer de nouvelles sondes spécifiques

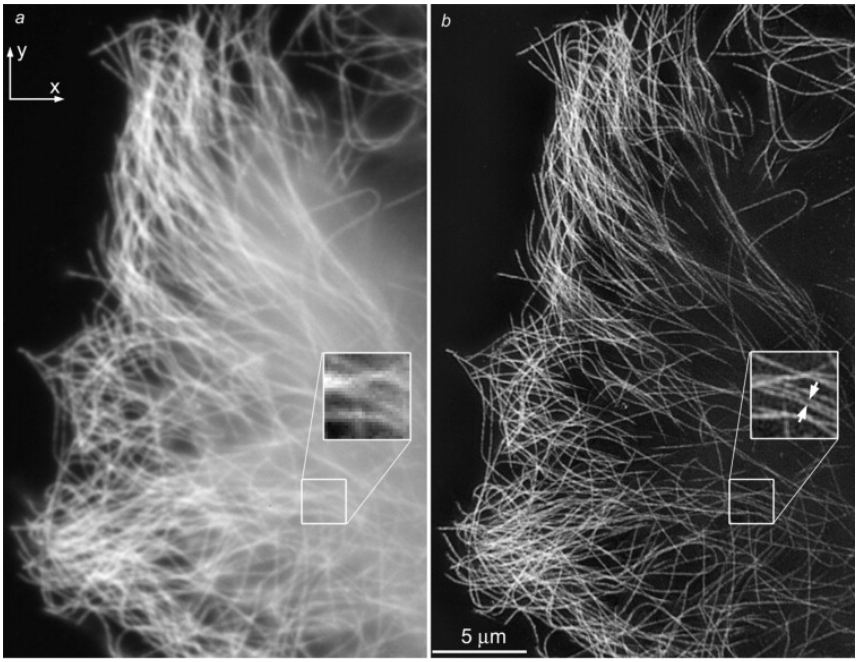


FIGURE II.15 – Microtubules d'une cellule Hela en microscopie classique (a) et SIM 3D (b) (projection du maximum d'intensité d'une pile de plusieurs images acquises à différentes positions axiales) Les inserts montrent bien l'augmentation de résolution, ainsi que le rejet de la lumière hors focus (extrait de [35]).

à cette technique contrairement au PALM ou STED. Tous les marquages existants, en particulier les constructions génétiques avec la GFP ou les autres protéines fluorescentes, sont donc susceptibles d'être utilisés directement en SIM.

La principale difficulté de l'illumination structurée reste la reconstruction des images. Si la fréquence de modulation et donc le recalage des images n'est pas estimé avec une précision sub-pixelique, l'image reconstruite présente des artefacts de reconstruction, qui limitent son utilisation pour l'étude d'échantillons biologiques [38]. Ces artefacts sont dus au mauvais rapport signal sur bruit des images brutes. Leur élimination ou réduction est délicate car durant la reconstruction leur apparition ne peut être limitée que par l'ajout de contraintes judicieusement choisies. En pratique, on se contente d'affiner au besoin les résultats en adaptant manuellement les valeurs des paramètres du modèle (ouverture numérique, contraste, etc).

Comme les autres techniques de super-résolution, l'illumination structurée nécessite l'acquisition de plusieurs images pour synthétiser une image super-résolue, ce qui réduit la cadence des images reconstruites. En pratique, celle-ci est généralement de l'ordre d'une image reconstruite par seconde. Il faut que les structures d'intérêt se déplacent d'une distance inférieure à la PSF au cours de l'acquisition des 9 images nécessaires à la reconstruction pour éviter l'apparition d'artefacts, ce qui limite la vitesse de déplacement des structures que l'on peut observer. Il est donc important de trouver des outils pour accélérer la réalisation d'images super-résolues. Dans la suite, nous allons décrire une nouvelle méthode de reconstruction permettant de réduire

le nombre d'images requis pour la reconstruction, qu'il sera intéressant d'appliquer à l'observation d'échantillons vivants pour observer des phénomènes dynamiques à haute cadence.

## II.2 Montage et reconstruction des images

Dans cette partie, nous allons décrire plus précisément le montage utilisé pour l'acquisition des images structurées ainsi qu'un algorithme de reconstruction basé sur une méthode bayésienne. Nous allons voir qu'il est possible de le coupler facilement à un traitement de coupe optique pour augmenter simultanément la résolution axiale et la résolution latérale.

### II.2.1 Description du montage

La figure II.16 présente le montage optique utilisé pour acquérir les images structurées.

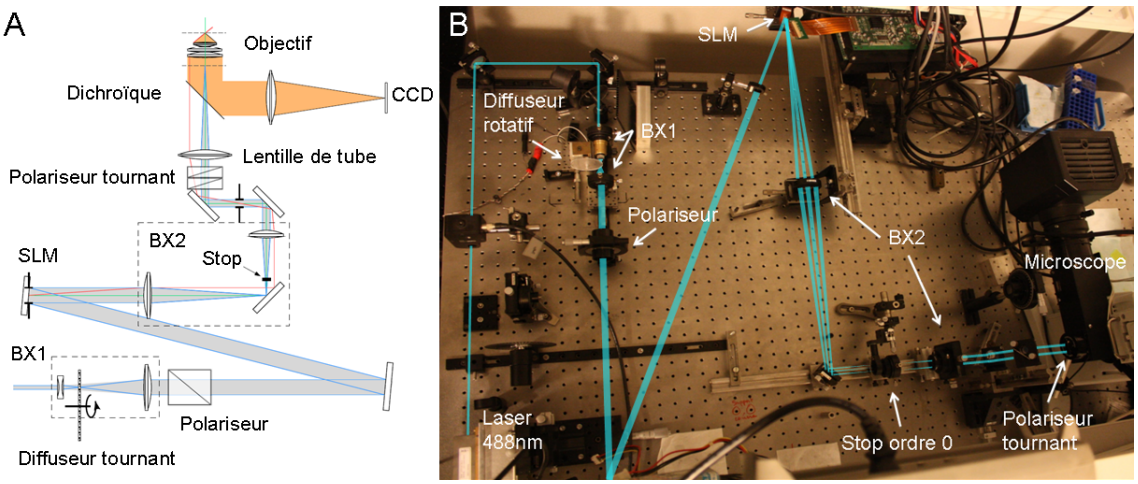


FIGURE II.16 – A : schéma du montage utilisé. En vert et rouge, on peut voir le tracé d'un rayon de l'ordre 0 et 1 respectivement (BX : élargisseur de faisceau). B : photo du montage utilisé avec les trajets des faisceaux et des différents ordres.

La source lumineuse utilisée est un laser à 488 nm (Sapphire Coherent 50 mW maximum) dont on réduit la cohérence spatiale grâce à un diffuseur tournant. Ce faisceau est agrandi par un élargisseur de faisceaux BX1 (3×) et polarisé linéairement. Il est ensuite envoyé sur un SLM (Spatial Light Modulator Holoeye HEO 1080P phase only) sur lequel est affiché un réseau de phase qui diffracte le faisceau incident en plusieurs ordres. Les ordres supérieurs à 1 sont éliminés par un diaphragme. Les ordres 0 et $\pm 1$ sont focalisés dans le plan focal arrière de l'objectif grâce à un système afocal et à la lentille de tube du microscope. Ceci permet d'adapter l'écartement des faisceaux au niveau de la pupille du microscope. Un diaphragme peut être placé au centre du faisceau pour bloquer l'ordre 0 en fonction du motif d'illumination choisi (modulation à $f$ : ordres $\pm 1$, modulation à $f$ et $f/2$ : ordres 0 et $\pm 1$). Un polariseur

tournant est placé à l'entrée du microscope pour orienter la polarisation des ordres utilisés afin d'optimiser le contraste des franges d'interférences (cf. figure II.17). Le SLM diffracte uniquement la partie du champ incident polarisé rectilignement (en l'occurence verticalement). Les ordres diffractés sont donc polarisés verticalement, quelle que soit l'orientation du motif. Le contraste des franges dans l'échantillon dépend de l'orientation des champs des deux faisceaux par rapport au plan d'incidence. On doit donc faire tourner ces champs en même temps que le plan d'incidence grâce à un polariseur tournant. Cet effet est très marqué quand les vecteurs d'onde des deux champs sont orthogonaux dans l'échantillon.

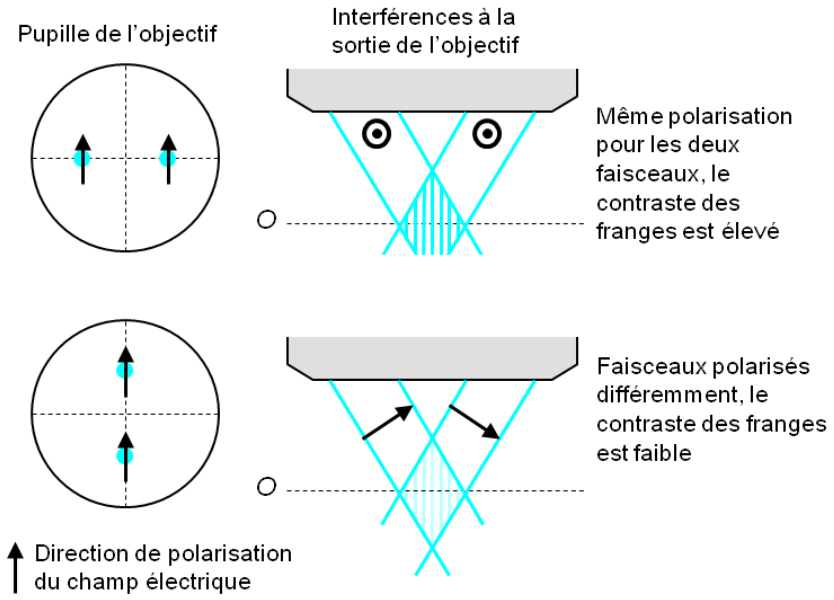


FIGURE II.17 – Influence de la polarisation des ordres sur le contraste des franges.

Les ordres sélectionnés sont donc transmis par l'objectif et les faisceaux interfèrent dans le plan focal de l'objectif. L'absence de cohérence spatiale nous assure que les interférences n'auront lieu que dans ce plan. Cela permet également d'éviter l'apparition de figures de speckle qui pourraient se mêler à la modulation et gêner la reconstruction des images [33].

La voie d'imagerie n'est pas modifiée par rapport à un microscope à épifluorescence classique, la fluorescence de l'échantillon est transmise par l'objectif, séparée de l'illumination par un miroir dichroïque et détectée par une caméra CCD (Andor Ixon 3885, $1002 \times 1004$ pixels de $8\,\mu$m de côté). Le microscope est utilisé en épifluorescence et non en configuration TIRF. Ceci nous permet d'observer des échantillons épais en profondeur, même si le signal provenant des parties de l'échantillon hors du plan de mise au point diminue le rapport signal sur bruit. Afin de limiter cet effet indésirable, nous associons un traitement de coupe optique au traitement d'image.

Le microscope est également équipé d'une platine de translation axiale, permettant de réaliser des images à différentes positions axiales dans l'échantillon.

Un logiciel maison a été développé pour contrôler et synchroniser les différents éléments du montage (puissance laser, SLM, platine z, polariseur tournant et caméra). Ce programme permet de jouer sur de nombreux paramètres, tels que la fréquence de modulation, l'orientation des grilles, etc.

### II.2.2 Reconstruction bayésienne des images super-résolues

#### Approche bayésienne en traitement d'image

Nous avons vu au paragraphe II.1.3 le principe de reconstruction développé par Gustafsson [33], par recombinaison de spectres satellites dans l'espace de Fourier. Ce recalage nécessite l'estimation de la fréquence de modulation avec une précision très importante (inférieure au dixième de pixel) pour limiter l'apparition d'artefacts de reconstruction [38]. Or la fréquence de modulation étant proche de la fréquence de coupure du microscope, le facteur de transmission est faible (inférieur à 0,1 au delà de 80 % de la fréquence de coupure) et dans les images acquises cette modulation est associé à un bruit important. Il est donc difficile en pratique de reconstruire des images sans artefacts par cette méthode, et différents outils sont utilisés pour améliorer la fidélité des images reconstruites. De plus, l'approche classique nécessite l'utilisation de nombreux paramètres ad-hoc parfois difficiles à déterminer en pratique. Une nouvelle technique de reconstruction a été développée par François Orieux [39] basée sur une approche bayésienne pour reconstruire ces images.

Le formalisme bayésien se base sur l'utilisation d'informations connues a priori sur le phénomène observé pour déterminer le résultat ou la reconstruction le plus vraisemblable [40]. Son utilisation en traitement d'images est illustrée sur la figure II.18. On veut obtenir de l'information sur un objet réel $x$ à partir des images $y$ que l'on a pu acquérir de celui-ci. Le processus d'acquisition des images est en partie connu mais est également soumis à un bruit aléatoire et à divers biais. On le modélise par la formule suivante :

$$y = f(x) + n, \tag{II.4}$$

où $f$ représente le processus d'acquisition des images et $n$ le bruit. Par exemple dans le cas d'un microscope classique, on sait que l'image acquise résulte d'une convolution avec la PSF, phénomène bien connu et maîtrisé, pouvant faire intervenir des paramètres ajustables (ouverture numérique effective, présence d'aberrations...). Le bruit présent dans les images est dû au bruit de photons ou au bruit de lecture de la caméra par exemple, impossibles à connaître exactement. Les statistiques de ces bruits peuvent néanmoins être évaluées (par exemple un bruit gaussien de moyenne et d'écart-type connus).

Les informations disponibles pour obtenir les caractéristiques de l'objet sont donc les images acquises, le processus d'acquisition avec ses quelques paramètres et parfois les statistiques du bruit. La solution la plus directe pour remonter à l'objet est de réaliser une inversion du processus physique mis en jeu par l'acquisition.

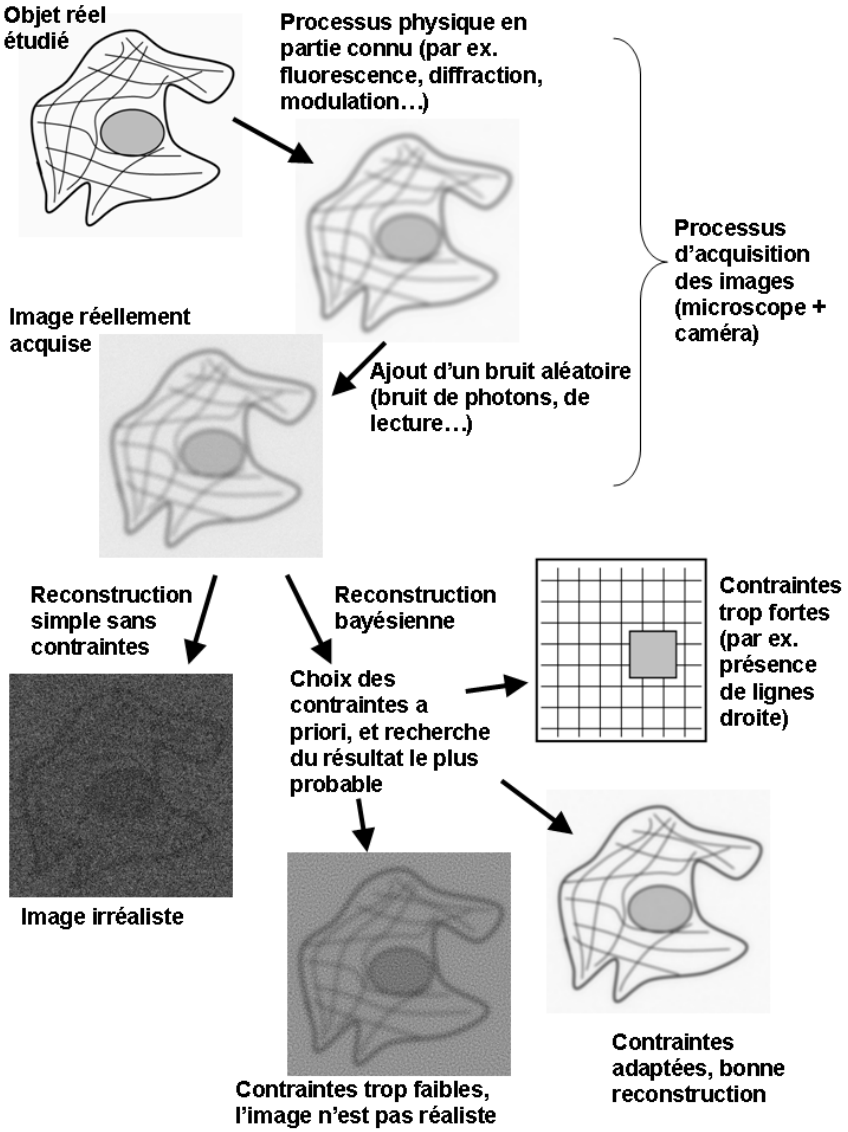


FIGURE II.18 – Schéma de principe de la reconstruction bayésienne des images.

En pratique, on cherche l'objet $x$ qui explique le mieux les résultats obtenus $y$ par une minimisation de la vraisemblance $\|y - f(x)\|$, où $f$ représente les effets des processus physiques. La vraisemblance est une mesure de la « distance » qui sépare les résultats $y$ de l'estimation que l'on en fait à partir d'un objet $x$ connaissant les processus physiques $f$ qui conduisent à $y$. La notion de distance mathématique n'est pas unique, et en pratique on utilise la norme L2 [40].

Dans le cas du traitement d'images, le nombre de variables indépendantes recherchées est très important car il s'agit au minimum du nombre de pixels de l'image finale. La minimisation de la vraisemblance aboutit alors à des solutions multiples et dégénérées, qui n'ont généralement aucune réalité physique comme on peut le voir sur la figure II.18 [41, 42].

Le principe de la reconstruction bayésienne est alors d'ajouter une ou plusieurs contraintes dans le processus de reconstruction pour rendre moins probables ces solutions non-réalistes [40–42] et tirer parti au maximum de la connaissance du processus d'acquisition. La difficulté est alors de définir ces a priori et de les pondérer correctement [40]. En effet, s'ils sont trop faibles, on ne lèvera pas efficacement la dégénerescence des solutions obtenues avec la vraisemblance seule. On risque alors d'obtenir un résultat qui n'a toujours pas de réalité physique. À l'inverse, si la contrainte ou l'a priori que l'on impose est trop restrictif, la solution obtenue est réaliste mais ne prend pas suffisamment en compte les données, et n'est donc pas révélatrice de l'objet étudié. Par exemple, on pourrait imposer le fait que l'échantillon soit constitué de lignes droites d'une certaine largeur. La solution la plus probable fera apparaître ces lignes droites bien qu'elles ne soient pas présentes dans l'objet réel.

Les contraintes doivent donc être choisies avec précaution, pour permettre une reconstruction efficace sans imposer les caractéristiques que l'on veut voir apparaître dans les images finales [40]. En pratique, on minimise maintenant la fonction $\|y - f(x)\| + \rho \|g(x)\|$, où $g$ contient les a priori choisis, et $\rho$ est un paramètre qui permet de pondérer les termes de vraisemblance et d'a priori. Ce terme est crucial pour la reconstruction, et il doit donc être choisi et évalué avec précaution.

### Application à la reconstruction d'images super-résolues

**Vraisemblance et a priori.** Ce principe de reconstruction a été appliqué à nos images structurées. Il faut tout d'abord identifier le processus d'acquisition des images. Si on note $x$ l'échantillon, les $N$ images brutes peuvent s'écrire sous la forme [39] :

$$y_i = HM_i x + n_i, \tag{II.5}$$

où : $y_i$ sont les différentes images acquises ($i$ varie de 1 à $N$),
$H$ est l'opérateur de convolution par la PSF,
$M_i$ est l'opérateur de modulation pour chaque image $i$ (dépendant de la fréquence, la phase et l'orientation de la modulation),
et $n_i$ sont les différentes réalisations du bruit,

Le terme de vraisemblance s'écrit sous la forme $\|y - HMx\|$, où $y$ et $M$ contiennent respectivement les différents $y_i$ et $M_i$ correspondant à chaque image.

Il nous faut ensuite choisir la contrainte à appliquer qui permette de trouver une solution réaliste et fidèle aux données. Nous avons choisi dans un premier temps d'utiliser une contrainte sous la forme d'un laplacien de l'image $\|\Delta x\|$. Ce laplacien limite l'apparition de hautes fréquences introduites par la déconvolution et qui sont majoritairement du bruit. La principale raison de ce choix est la corrélation des intensités des pixels voisins, car la PSF super-résolue est plus grande qu'un pixel [39]. L'influence de la contrainte est pondérée par le paramètre de régularisation $\rho$. L'expression à minimiser s'écrit sous la forme :

$$\underbrace{\|y - HMx\|}_{\text{vraisemblance}} + \underbrace{\rho\,\|\Delta x\|}_{\text{contrainte}}. \tag{II.6}$$

Pour pouvoir réaliser cette minimisation et déterminer $x$, les paramètres décrivant l'effet des opérateurs $H$ et $M$ doivent être connus.

**Opérateur de convolution.** L'opérateur $H$ est l'opérateur de convolution qui décrit l'effet de la PSF sur l'image modulée. Nous avons choisi de le décrire d'après un modèle théorique par simplicité de mise en œuvre avant d'obtenir des mesures de PSF suffisamment précises de notre système optique. Nous avons donc utilisé un modèle classique théorique de PSF scalaire, dépendant de la longueur d'onde, de l'objectif utilisé (grandissement et ouverture numérique) et de la taille des pixels de la caméra. Dans le paragraphe II.5.2 nous allons voir les avantages et limitations de ce choix.

**Estimation des paramètres de modulation.** L'opérateur $M$ décrit la modulation de l'illumination à partir de quatre paramètres : la fréquence $f_m$, l'orientation de la grille $\theta$, la phase $\varphi$ et le contraste $\alpha$. Leur estimation est réalisée sur les images acquises, préalablement à la reconstruction, par une méthode de minimisation au sens des moindres carrés de la fonction $\|y - HM(f_m, \theta, \varphi, \alpha)w\|$, où $w$ est cette fois une image plein champ déconvoluée de l'échantillon.

Dans ce cas, la minimisation ne génère pas de résultats non réalistes, car les inconnues sont peu nombreuses (4 par image) et il n'est donc pas nécessaire d'utiliser

un terme de contrainte. Cependant comme nous l'avons vu précédemment, la fréquence de modulation est élevée, donc le contraste de la modulation dans les images acquises est faible. L'estimation des paramètres de cette modulation est donc délicat et une recherche exhaustive des paramètres optimaux autour d'une position initiale repérée sur la TF des images s'est révélée être la méthode la plus efficace.

Il est possible de rendre cette estimation plus robuste, car nous acquérons pour chaque orientation, trois images à la même fréquence de modulation, avec a priori le même contraste de grille, et des phases décalées de $4\pi/3$. En ajoutant ces connaissances à l'estimation des paramètres de grille, nous obtenons généralement de bons résultats. Ces contraintes que nous imposons sur les déphasages entre images et les contrastes de modulation sont puissants, car ils interdisent tout écart à ces valeurs. Ainsi, en appliquant ces contraintes nous sommes assurés de trouver un déphasage de $4\pi/3$ entre les images, même si les déphasages effectifs sont différents. Dans la suite, nous allons voir l'influence de ces paramètres sur la reconstruction, ce qui permettra de valider ces a priori.

Avant de vérifier l'efficacité de cette méthode de reconstruction, nous allons voir comment il est possible d'associer l'augmentation de résolution à la coupe optique, sans augmenter le nombre d'images acquises.

### II.2.3 Coupe optique et super-résolution

#### Origine de la coupe optique

Nous avons choisi de travailler avec un microscope à épifluorescence classique qui nous permet d'étudier des échantillons épais en profondeur. La présence d'un signal parfois important provenant des zones de l'échantillon hors du plan de mise au point diminue fortement le contraste du signal modulé. Cet effet a pour conséquence de dégrader l'estimation des paramètres de modulation, indispensables à la reconstruction. Pour résoudre ce problème, la méthode la plus efficace consiste à réduire la fréquence de modulation. De cette manière on augmente le poids des bandes latérales. Néanmoins cette réduction de la fréquence de modulation se fait au détriment du gain en résolution. Une autre solution est d'isoler le signal modulé grâce à la détermination d'une image de coupe optique.

Le motif d'illumination créé dans l'échantillon a une étendue axiale limitée. Ceci est dû d'une part à la faible cohérence spatiale de l'illumination et d'autre part au fait que les taches focales des ordres $\pm 1$ dans le plan focal arrière de l'objectif ont un diamètre minimum de l'ordre de 50 à 100 $\mu$m (limité par les aberrations du système optique). Chaque point d'une tache focale d'un des ordres dans la pupille n'interfère qu'avec son image dans la tache focale de l'autre ordre, car le faisceau est spatialement incohérent. Cela crée un ensemble de figures d'interférences légèrement différentes, qui se brouillent dans l'échantillon sauf aux alentours du plan focal objet de l'objectif (cf. figure II.19). L'épaisseur sur laquelle les franges seront visibles dépend donc de la taille des taches dans le plan de la pupille de l'objectif. Les franges d'interférences seront localisées axialement, quelque soit la fréquence de modulation. Ainsi, même à haute fréquence, l'étendue axiale de la modulation est

faible et autorise un effet de coupe important, contrairement à ce que nous avons vu au chapitre précédent.

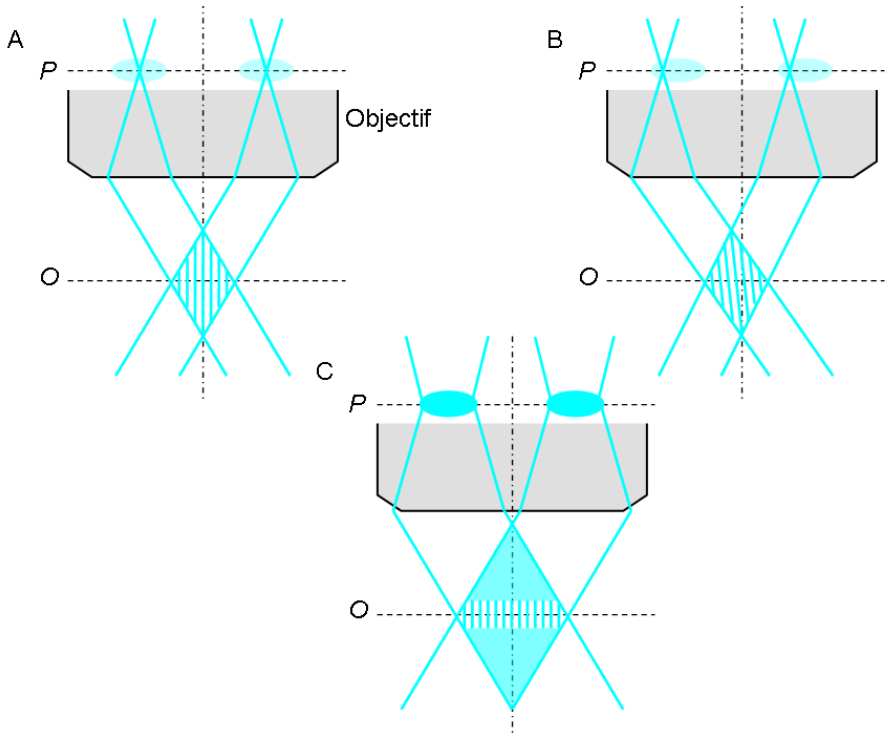


FIGURE II.19 – Origine de l'épaisseur de coupe : chaque point appartenant à un ordre dans la pupille $P$ interfère uniquement avec son image dans l'autre ordre, créant sa propre figure d'interférences (A et B). La superposition de ces différentes figures provoque un brouillage des franges sauf sur une faible épaisseur autour du plan de mise au point $O$ (C).

À partir de 9 images, nous pouvons donc extraire une image super-résolue et une image de coupe optique. Avec cette image de coupe optique, nous pouvons déterminer une image correspondant à la lumière hors focus par simple soustraction de la coupe optique à l'image plein champ. Cette image de fond peut ensuite être soustraite aux images brutes. Les images obtenues sont alors utilisées pour la reconstruction des images super-résolues.

### Amélioration de l'estimation des paramètres de modulation

Cette soustraction de fond améliore notamment l'efficacité de l'estimation des paramètres de modulation. En effet, les images brutes $I$ obtenues sont de la forme :

$$I = I_{if}\left[1 + \alpha\cos(2\pi(f_x x + f_y y) + \varphi)\right] + I_{of}, \tag{II.7}$$

avec $I_{if}$ et $I_{of}$ décrivant le signal provenant respectivement du plan de mise au point et des plans hors mise au point, $\alpha$ le contraste de la grille, $f_x$ et $f_y$ les fréquences

de modulation suivant l'axe $x$ et $y$, et $\varphi$ la phase de la modulation. Cette équation ne peut pas s'écrire sous la forme $I = HMw$, contrairement à ce que recherche le programme de reconstruction, car $I_{if}$ est généralement différent de $I_{of}$. Par contre, après soustraction de l'image de fond, on obtient l'image :

$$I_{CO} = I_{if}\alpha\cos(2\pi(f_x x + f_y y) + \varphi), \tag{II.8}$$

qui correspond bien à la forme $I_{CO} = HMw$, ce qui explique les meilleurs performances de l'algorithme de reconstruction avec la soustraction du fond non modulé.

Il conviendrait de modifier la formule utilisée lors de l'estimation des paramètres sur les images brutes et d'utiliser une fonction de la forme :

$$\|y - H(M(f_m, \theta, \varphi, \alpha)w_{if} + w_{of})\|,$$

où les images $w_{if}$ et $w_{of}$ correspondent aux contributions respectives du plan de mise au point et des plans hors mise au point. Cette solution a été testée, mais n'a pas donné les résultats attendus, probablement à cause d'erreurs sur l'estimation des images déconvoluées $w_{if}$ et $w_{of}$.

La figure II.20 résume les différentes étapes de traitement nécessaires à l'obtention d'une image super-résolue, ainsi que les images intermédiaires fournies par le programme de reconstruction. L'algorithme de reconstruction décrit a été réalisé par François Orieux. Nous allons maintenant montrer son efficacité par simulations, avant de s'intéresser à la reconstruction d'images tests.

### II.2.4 Efficacité de la reconstruction bayésienne

#### Reconstruction d'images simulées

Pour vérifier la capacité de l'algorithme de reconstruction à extraire efficacement l'information haute fréquence contenue dans les images brutes, nous avons généré des images d'illumination structurée à partir d'une image connue (Lena, que nous appelerons objet dans la suite) et analysé les images reconstruites en fonction de différents paramètres utilisés pour la génération des images modulées (amplitude, phase de la modulation, rapport signal sur bruit (SNR)...). Les images d'illumination structurée sont simulées en suivant le processus d'acquisition : modulation par la grille, ajout d'un bruit gaussien puis convolution par la PSF, et à nouveau ajout d'un bruit gaussien (ce modèle de bruit a été choisi pour sa simplicité de mise en œuvre, même s'il n'est pas le plus à même de décrire le bruit que l'on rencontrera dans des images réelles). Le rapport signal sur bruit est défini de façon globale sur l'image, comme le rapport entre l'amplitude typique du signal (par exemple l'image originale de Lena présente une amplitude de signal de 200) et l'écart-type du bruit présent dans les images (mesuré sur une zone homogène de l'objet). Les images reconstruites sont ensuite obtenues pour différentes valeurs du paramètre de régularisation.

On peut observer les caractéristiques des images reconstruites en fonction des différents paramètres à notre disposition. L'observation des images et de leurs TF (figure II.21) nous apporte de précieuses informations (comme l'extension du support fréquentiel des images SIM) mais ne permet pas de quantifier directement la

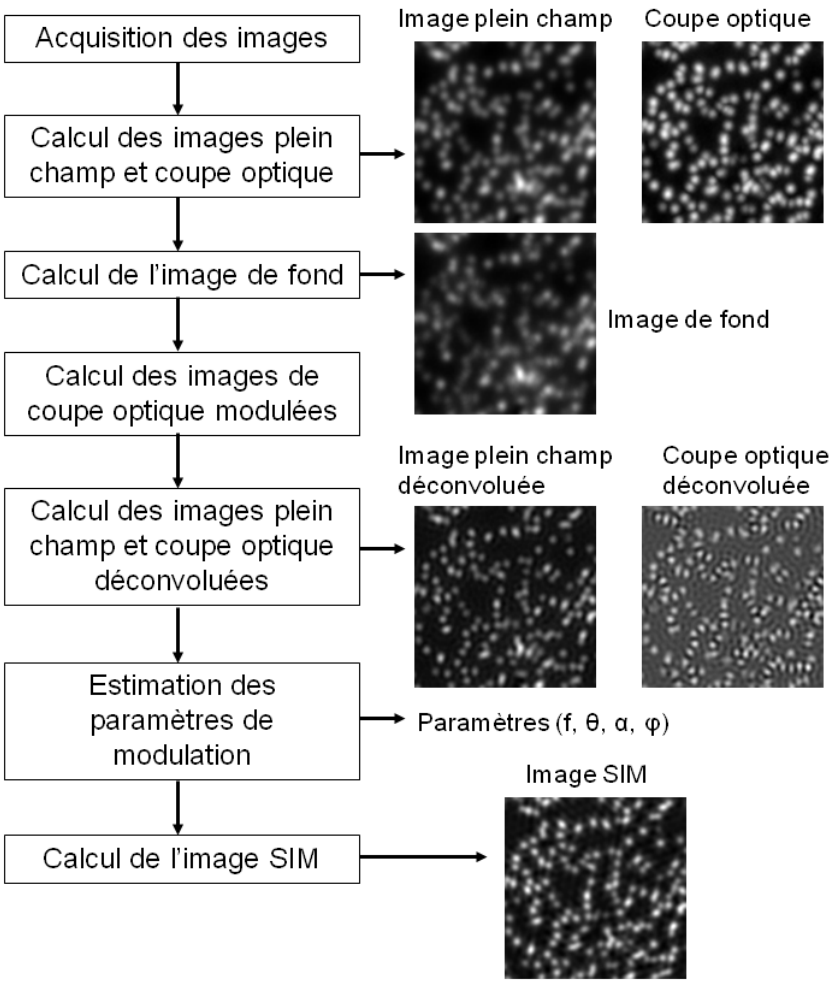


FIGURE II.20 – Schéma général du processus de reconstruction des images super-résolues à partir des images brutes.

fidélité de la reconstruction. Nous avons donc cherché un critère de mérite qui rende compte de la ressemblance des images reconstruites avec l'objet original, notamment la présence des hautes fréquences spatiales.

Une première approche consiste à comparer la transformée de Fourier des images reconstruites $\tilde{I}$ à la TF de l'objet de départ $\tilde{O}$, en utilisant par exemple le critère de mérite $\overline{\Delta E_R}$ de Heintzmann [42]. Celui-ci s'écrit sous la forme suivante :

$$\overline{\Delta E_R} = \frac{\sum_{i \in R} \left| \tilde{I} - \tilde{O} \right|}{\sum_{i \in R} 1}, \tag{II.9}$$

où les sommes ont lieu sur les pixels de la TF des images et l'indice $R$ correspond à une plage de fréquences spatiales dans les TF des images. On obtient ainsi une fonction de $R$ permettant d'analyser le comportement de la reconstruction en fonction de la fréquence spatiale, notamment l'extraction de l'information haute fréquence des images brutes.

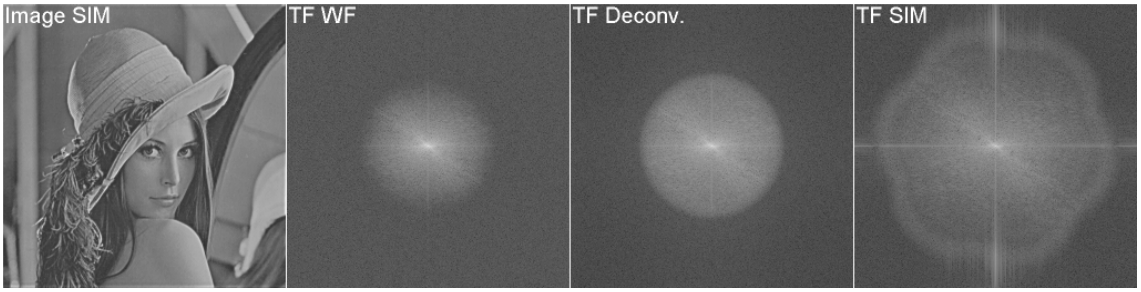


FIGURE II.21 – Image SIM ($\rho = 2 \cdot 10^{-3}$) et TF des images simulées (plein champ, déconvoluée et SIM avec $\rho = 2 \cdot 10^{-3}$).

Toutefois, ce critère est sensible à une transformation affine des images :

$$\overline{\Delta E_R}(aI + b) \neq \overline{\Delta E_R}(I).$$

Or les images obtenues par reconstruction ont subi une telle transformation (notamment à cause du traitement de coupe optique). L'objet est en effet une image 8-bit dont les valeurs des pixels varient entre 25 et 245, alors que les images fournies par le programme de reconstruction ont des valeurs de pixels comprises entre 0 et 30 ou 0 et 450, suivant les paramètres utilisés pour la génération des images.

Il n'est donc pas possible de réaliser directement une soustraction des TF des images pour obtenir un critère de mérite fiable à partir des images reconstruites. Une autre solution pour déterminer la proximité de deux images, indépendamment d'une éventuelle modification affine des intensités des pixels des images, est de calculer le coefficient de corrélation $\gamma_1$ de deux images $I$ et $O$ [41] :

$$\gamma_1(I, O) = \frac{\sum_{x,y} \left[ (I - \bar{I})(O - \bar{O}) \right]}{\sqrt{\sum_{x,y} (I - \bar{I})^2 \sum_{x,y} (O - \bar{O})^2}}, \tag{II.10}$$

où $I$ est l'image reconstruite, $\bar{I}$ sa valeur moyenne, $O$ est l'image originale, $\bar{O}$ sa valeur moyenne et $x$ et $y$ désignent les indices des pixels. Ce coefficient de corrélation varie entre -1 et 1, il vaut 1 pour une corrélation parfaite, -1 pour des images corrélées négativement ($I = -O$ par exemple) et tend vers 0 pour deux images totalement décorrélées. Ce critère est bien indépendant d'une transformation affine des intensités des pixels car $\gamma_1(aI + b, O) = \gamma_1(I, O)$ (si a est positif), grâce à la soustraction de la moyenne $\bar{I}$ et à la division par la somme des carrés des pixels.

Le problème de ce critère de mérite est qu'il accorde une très grande importance aux basses fréquences, dont le poids est généralement largement dominant dans une image. Par exemple, si on simule une image plein champ $I_{WF}$ obtenue par convolution de l'objet (Lena) par la PSF, et une image déconvoluée $I_{Deconv}$ qui en est issue, les valeurs du coefficient de corrélation obtenues sont :

$$\gamma_1(I_{WF}, O) = 0,9815 = 1 - 1{,}85 \cdot 10^{-2}\,,$$
$$\gamma_1(I_{Deconv}, O) = 0,9931 = 1 - 6{,}86 \cdot 10^{-3}\,.$$

Les hautes fréquences perdues par la convolution ont une contribution minime. Ceci est encore plus vrai si on calcule les valeurs du critère appliqué aux TF, $\gamma_1(\left|\tilde{I}\right|, \left|\tilde{O}\right|)$ :

$$\gamma_1(\left|\widetilde{I_{WF}}\right|, \left|\tilde{O}\right|) = 1 - 2{,}59 \cdot 10^{-3}$$
$$\gamma_1(\left|\widetilde{I_{Deconv}}\right|, \left|\tilde{O}\right|) = 1 - 1{,}51 \cdot 10^{-3}.$$

Pour augmenter le poids des hautes fréquences dans notre critère, nous avons remplacé, dans la formule, les images par le logarithme de leur TF $\tilde{I}$ et $\tilde{O}$ :

$$\gamma_2(I, O) = \gamma_1(\ln\left|\tilde{I}\right|, \ln\left|\tilde{O}\right|), \tag{II.11}$$

$$\gamma_2(I, O) = \frac{\sum_{\nu_x,\nu_y}\left[(\ln\left|\tilde{I}\right| - \overline{\ln\left|\tilde{I}\right|})(\ln\left|\tilde{O}\right| - \overline{\ln\left|\tilde{O}\right|})\right]}{\sqrt{\sum_{\nu_x,\nu_y}(\ln\left|\tilde{I}\right| - \overline{\ln\left|\tilde{I}\right|})^2 \sum_{\nu_x,\nu_y}(\ln\left|\tilde{O}\right| - \overline{\ln\left|\tilde{O}\right|})^2}}, \tag{II.12}$$

Si on reprend les images plein champ et déconvoluées précédentes, on obtient :

$$\gamma_2(I_{WF}, O) = 0,6142,$$
$$\gamma_2(I_{Deconv}, O) = 0,7086.$$

On a ainsi une meilleure évaluation de la présence de hautes fréquences dans les images étudiées. En revanche, ce critère n'est plus invariant par transformation affine des images :

$$\ln\left|\widetilde{aI+b}\right| = \ln\left|a\tilde{I} + b\delta(0,0)\right| \tag{II.13}$$

$$= \ln a\left|\tilde{I} + \frac{b}{a}\delta(0,0)\right| \tag{II.14}$$

$$= \ln a + \ln\left|\tilde{I} + \frac{b}{a}\delta(0,0)\right| \tag{II.15}$$

$$\neq \ln a + \ln\left|\tilde{I}\right| + ln\left|\frac{b}{a}\delta(0,0)\right| \tag{II.16}$$

$$\Rightarrow \ln\left|\widetilde{aI+b}\right| - \overline{\ln\left|\widetilde{aI+b}\right|} \neq \ln\left|\tilde{I}\right|, \text{ si } b \neq 0 \tag{II.17}$$

où $\delta(0,0)$ désigne la distribution de Dirac à fréquence nulle dans l'espace de Fourier. Ce terme $b\delta(0,0)/a$ augmente la composante de fréquence nulle dans les images. Or celle-ci domine fortement toutes les autres composantes car il s'agit de la somme des pixels de l'image. Ainsi, il faut des valeurs de $b/a$ très importantes pour modifier la valeur de $\gamma_2$ de plus de 0,1 % (dans notre cas, supérieures à $10^{10}$ sur les images utilisées). Or les coefficients $a$ et $b$ que l'on trouve en pratique sont faibles ($b < 1000$

et $a > 0,01$), on peut donc considérer que le terme $b$ a une influence négligeable sur la valeur de $\gamma_2$. En pratique, on a donc un critère de mesure indépendant d'une transformation affine de l'image :

$$\ln\left|\widetilde{aI+b}\right| \approx \ln\left|a\tilde{I}\right| \approx \ln a + \ln\left|\tilde{I}\right| \tag{II.18}$$

$$\text{et donc : } \gamma_2(aI+b,O) \approx \gamma_2(aI,O) \approx \gamma_2(I,O) \tag{II.19}$$

Ce critère ne prend en compte que la moitié de l'information présente dans l'objet et dans l'image, car la valeur absolue supprime l'information de phase. La maximisation de ce critère ne garantit donc pas la fidélité de l'image à l'objet, en revanche une valeur faible montre sans ambiguité le mauvais accord entre objet et image. D'autres fonctions de mérite peuvent évidemment être définies, qui rendront compte différemment de l'efficacité de reconstruction. Nous avons néanmoins privilégié ce critère $\gamma_2$ pour sa simplicité de mise en œuvre et sa capacité à rendre compte des observations réalisées sur les images. Dans la suite, nous allons étudier l'influence des différents paramètres sur la reconstruction à partir de ce critère de mérite.

**Influence du paramètre de régularisation.** Le premier effet que nous avons analysé est celui du paramètre de régularisation $\rho$, qui pondère l'influence des a priori par rapport à la vraisemblance. Pour cela, nous avons simulé des images structurées sans bruit à partir de Lena avec les paramètres de base suivants (fréquence de modulation : $75\% f_c$, amplitude de modulation avant convolution : 0,5, grandissement : 160×, ON : 1,4, $\lambda$ : 525 nm, taille des pixels de la caméra : 8 $\mu$m).Ces paramètres seront utilisés par défaut dans la suite des simulations s'ils ne sont pas mentionnés. Nous avons ensuite fait varier le paramètre de régularisation entre 0 et 1 au cours de la reconstruction. La figure II.22 A montre le critère de mérite mesuré pour les différentes images reconstruites.

Sur cette figure, on peut voir qu'il existe un paramètre de régularisation optimal, qui permet de retrouver une image plus proche de l'objet que ne le sont les images brutes (avant déconvolution) ou déconvoluées. Si ce paramètre de régularisation est trop faible, la solution trouvée n'est pas physiquement vraisemblable, s'il est trop important la contribution des images brutes est trop faible et la solution, bien que physiquement vraisemblable, n'est plus en accord avec l'objet. Cet optimum dépend de nombreux paramètres (définition du critère de mesure, contenu fréquentiel de l'objet, paramètres de modulation...). En pratique, il sera nécessaire de faire varier le paramètre de régularisation lors de la reconstruction afin de trouver un bon compromis entre le gain en résolution et l'apparition d'artefacts « non physiques ». Ce compromis sera déterminé de façon subjective par l'observation des images reconstruites.

**Influence du bruit de l'image.** Nous avons ensuite étudié l'influence du bruit dans les images acquises. Les images ont été simulées en ajoutant un bruit gaussien d'amplitude variable, et reconstruites pour différents paramètres de régularisation. Les résultats de cette simulation sont visibles sur la figure II.22 B.

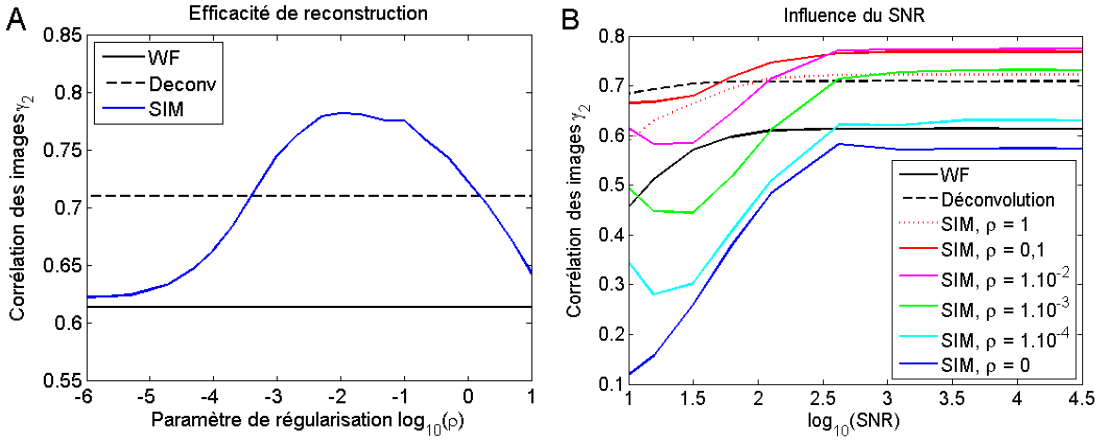


FIGURE II.22 – A : Variation du critère de mérite avec le paramètre de régularisation pour des images simulées sans bruit. B : Corrélation des images en fonction du rapport signal sur bruit des images brutes, pour différentes valeurs du paramètre de régularisation $\rho$.

Pour des images avec un bruit faible, on retrouve bien l'évolution précédente, avec un paramètre $\rho$ optimal. Cet optimum dépend naturellement du rapport signal sur bruit. En effet, si le bruit des images brutes augmente, il est nécessaire d'augmenter $\rho$ pour limiter l'influence du bruit sur la reconstruction. Si le paramètre de régularisation est trop faible, les images reconstruites sont fortement décorrélées de l'image originale.

On voit également que si le bruit est trop important (SNR $< 50$, il est préférable de se contenter d'une image déconvoluée, car l'algorithme de déconvolution est moins sensible au bruit. (L'algorithme de déconvolution utilisé a été développé par François Orieux [43], il est également basé sur une méthode bayésienne qui prend en compte le bruit des images lors du traitement, ce qui peut expliquer ses bonnes performances et la faible sensibilité au rapport signal sur bruit).

**Amplitude de modulation.** L'amplitude de modulation est également un paramètre important dans la reconstruction des images. Si elle est trop faible, l'algorithme a des difficultés à évaluer les paramètres de la modulation. Ceci est confirmé par la figure II.23 gauche, qui montre bien que à rapport signal sur bruit fixé ($\sim 100$), la reconstruction sera meilleure si l'amplitude de modulation est plus grande, quel que soit le paramètre de régularisation. Ceci nous montre qu'un contraste des franges supérieur à 40 % dans les images (avant convolution) est nécessaire pour obtenir un gain sur les images reconstruites supérieur à celui obtenu par simple déconvolution.

**Phase du motif d'illumination.** La reconstruction des images nécessite l'estimation préalable des paramètres de modulation. Deux méthodes sont envisageables pour obtenir ces valeurs. On peut soit estimer ces paramètres indépendamment pour chaque image, soit utiliser des a priori pour rendre l'estimation plus efficace (esti-

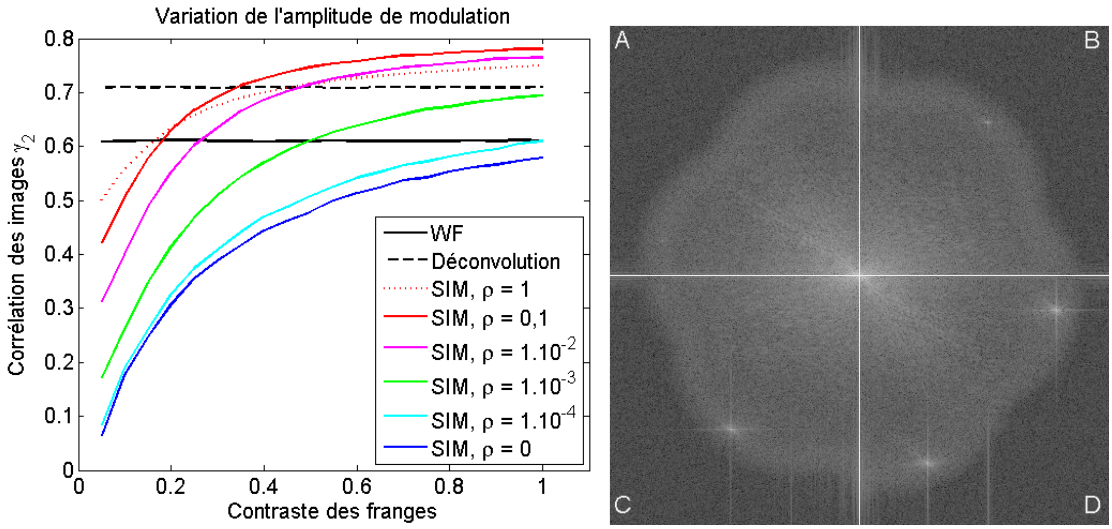


FIGURE II.23 – À gauche : efficacité de reconstruction en fonction du contraste des franges pour différentes valeurs du paramètre de régularisation. À droite : apparition d'artefacts de reconstruction suite à des erreurs de déphasage de la modulation entre images, erreurs imposées lors de la génération des données simulées (les quatre quadrants de l'image correspondent à des erreurs croissantes sur le déphasage : A : $1 \cdot 10^{-2}$ rad, B : $3 \cdot 10^{-2}$ rad, C : 0,1 rad, D : 0,3 rad).

mation conjointe des paramètres pour les trois images d'une même direction avec la même amplitude de modulation et des déphasages entre images de $4\pi/3$). Nous avons estimé la robustesse de l'estimation conjointe dans le cas défavorable où les caractéristiques du motif d'illumination s'écartent de celles attendues.

Le critère de mérite défini précédemment nous permet de mesurer l'écart introduit par ces erreurs, mais l'effet est également apparent dans les TF des images reconstruites sous la forme de pics à deux fois la fréquence de modulation. Sur la figure II.23 droite, on peut voir quatre portions de TF obtenues après reconstruction des images présentant une erreur sur le déphasage entre images (avec estimation contrainte des paramètres, $\rho = 1 \cdot 10^{-2}$, SNR = 100).

Les pics que l'on observe sur la TF correspondent à des résidus de grille dans l'image reconstruite, directement liés à une mauvaise estimation des phases de la modulation. Les simulations montrent qu'il est possible d'utiliser l'estimation contrainte des paramètres tant que l'écart entre le déphasage vrai et le déphasage imposé dans l'estimation conjointe est inférieure à 30 mrad. Cette valeur est indépendante du paramètre de régularisation et du rapport signal sur bruit, tant qu'il est possible de reconstruire une image réaliste non dominée par le bruit.

Une étude similaire portant sur l'effet des variations du contraste du motif dans les trois images d'une même orientation montre que l'algorithme reste efficace tant que les différences sur le contraste sont inférieures à $1 \cdot 10^{-2}$ entre les images.

Si le système optique génère des variations supérieures à celles que nous venons d'estimer (dues à l'échantillonnage du motif diffractant du SLM ou à la propagation

des faisceaux à travers le système), il est nécessaire d'utiliser une estimation non contrainte des paramètres de modulation. Celle-ci peut générer de faibles artefacts même en l'abscence de bruit, mais elle est plus robuste dans le cas d'erreurs importantes sur les déphasages et amplitudes de modulation. L'analyse des résultats de reconstruction sur les images vraies nous permettra de conclure sur la technique la plus appropriée pour estimer les paramètres.

## II.3 Reconstruction d'images super-résolues

Nous avons appliqué l'algorithme précédent à des images réelles acquises sur notre montage, dans un premier temps un échantillon test de caractérisation, puis un échantillon biologique.

### II.3.1 Billes fluorescentes

L'échantillon test que nous avons considéré est composé de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre émettant à une longueur d'onde de 525 nm (FluoSpheres, Molecular Probes). Ces billes sont déposées à la surface d'une lamelle de verre. Elles sont observées avec un objectif 100× à huile, d'ouverture numérique 1,4, et avec un temps d'exposition de 300 ms par image, soit 2,7 s d'exposition totale pour une image reconstruite. La fréquence de modulation est proche de 80% de la fréquence de coupure du microscope. La figure II.24 permet de comparer une image plein champ classique (A), une image déconvoluée qui en est extraite (B) et l'image super-résolue obtenue avec notre algorithme (C) (après soustraction du fond grâce à l'image de coupe optique et avec $\rho = 3 \cdot 10^{-6}$ ). Le gain en résolution apporté par la super-résolution permet de bien distinguer les billes individuelles, ce qui n'était pas le cas sur les images plein champ et de façon bien plus claire que sur les images déconvoluées.

Les TF de ces images montrent bien l'extension du support de l'image comme attendu, avec la forme de rosace classique. La figure II.25 A montre des profils tirés des images présentées qui confirment le gain en résolution apporté par ce traitement. La largeur à mi-hauteur moyenne des billes $FWHM_{mesure}$ a été mesurée avec une cinquantaine de billes réparties dans l'image. Pour obtenir la largeur à mi-hauteur de la PSF $FWHM_{PSF}$, il faut la corriger de la taille de la bille $FWHM_{bille}$ par la formule suivante [44] :

$$FWHM_{bille} = \sqrt{\frac{\ln 2}{2}} d_{bille} \tag{II.20}$$

$$FWHM_{PSF} = \sqrt{FWHM^2_{mesure} - FWHM^2_{bille}}. \tag{II.21}$$

Nous avons estimé la largeur de cette PSF pour différentes valeurs du paramètre de régularisation $\rho$ défini précédemment. La figure II.25 B montre la diminition de la largeur effective de la PSF lorsque l'on diminue ce paramètre, car le programme peut plus facilement extraire l'information haute fréquence des images. La largeur à mi-hauteur de la PSF tend vers une valeur de $98 \pm 10$ nm, pour des valeurs du paramètre

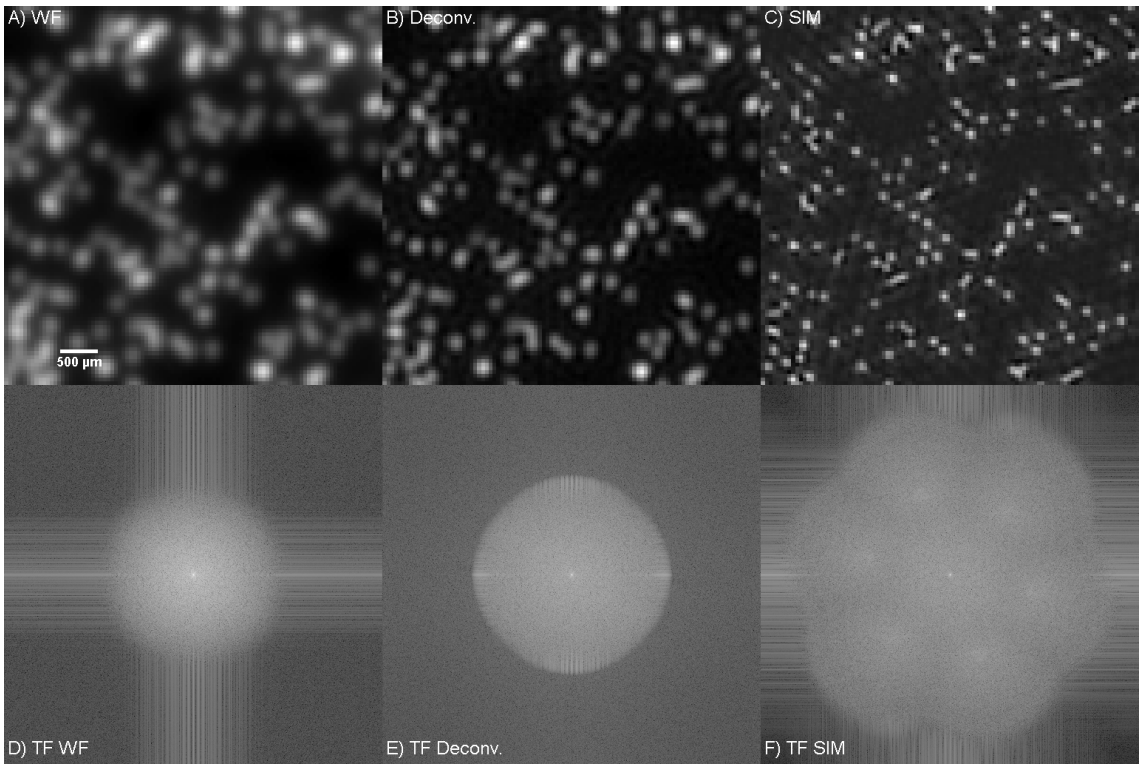


FIGURE II.24 – Images de billes fluorescentes de 100 nm de diamètre déposées sur une lamelle : A : Image plein champ, B : Image déconvoluée, C : Image SIM (avec coupe optique), D-F : TF des images supérieures.

de régularisation suffisamment faibles ($\leq 10^{-6}$). Le rapport signal sur bruit des images brutes étant très important ($SNR \sim 130$), l'image reconstruite reste peu bruitée et présente peu d'artefacts, même pour des paramètres de régularisation faibles, comme le confirme l'absence de pics dans la TF des images reconstruites. Des rebonds apparaissent néanmoins pour des valeurs très faibles du paramètre de régularisation ($\leq 10^{-6}$).

La figure II.26 montre les transformées de Fourier d'images plein champ, d'images déconvoluées et d'images SIM obtenues pour deux fréquences de modulation différentes. Les cercles rouges représentent les limites du support de la TF en prenant en compte le gain en résolution attendu avec l'illumination structurée ($1 + f_{mod}/f_c$). L'extension spectrale obtenue par reconstruction des images est bien limitée à ce support étendu.

Enfin, nous avons comparé ces largeurs à mi-hauteur mesurées à faible paramètre de régularisation pour différentes fréquences de modulation (et un paramètre de régularisation de $3 \cdot 10^{-6}$ ). Les résultats obtenus sont présentés sur la figure II.27. On voit que la largeur à mi-hauteur de la PSF sur les images SIM diminue avec la fréquence de modulation. On retrouve d'ailleurs le gain attendu de $1 + f_{mod}/f_c$ entre les images déconvoluées et les images SIM (celles-ci étant intrinsèquement déconvoluées lors de la reconstruction, il est normal que le gain entre les images WF

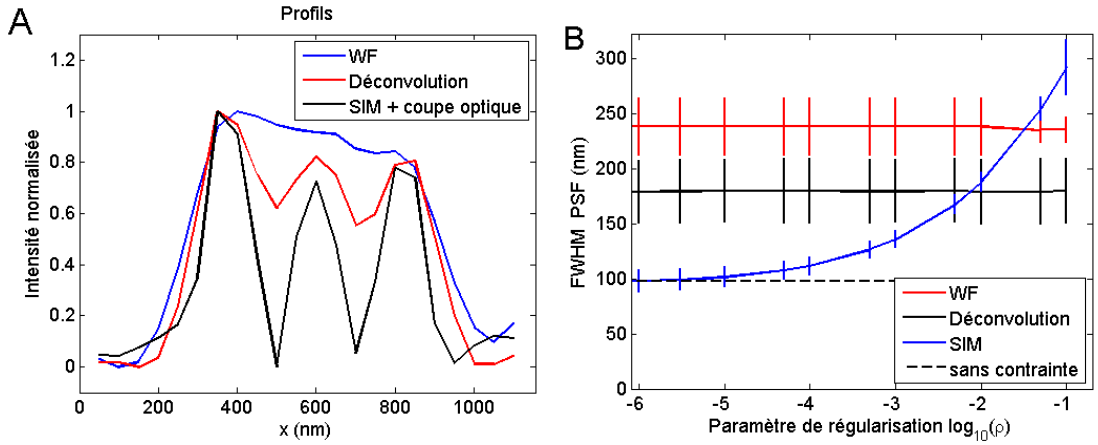


FIGURE II.25 – A : Profils de billes extraits des images de la figure II.24 illustrant le gain en résolution apporté par le SIM ($\rho = 3 \cdot 10^{-6}$). B : Variation de la largeur à mi-hauteur moyenne des PSF plein champ, déconvoluées et SIM pour différentes valeurs du paramètre de régularisation, estimée avec 50 images de billes (les barres verticales montrent l'écart-type associé à la moyenne).

et SIM soit plus important que cela).

Ces résultats montrent donc bien l'efficacité de la reconstruction bayésienne sur un échantillon test, avec notamment des résidus de modulation faibles dans la TF des images super-résolues. On peut également mentionner que l'utilisation d'une estimation contrainte des paramètres de modulation ne génère pas d'artefacts au double de la fréquence de modulation, ce qui signifie que le système optique est capable de générer des motifs d'illumination conformes à ce que nous attendons. Nous allons maintenant voir qu'il en est de même pour des échantillons biologiques.

### II.3.2 Disques imaginaux de drosophile

Pour apprécier le gain apporté par la coupe optique associée à la super-résolution, nous avons choisi d'utiliser à nouveau nos échantillons de disques imaginaux de drosophiles. La figure II.28 représente les images plein champ, déconvoluée et SIM avec coupe optique. Ces images sont obtenues avec un objectif 40× ouvert à 0,65, un temps d'exposition de 900 ms par image et une fréquence de modulation de l'ordre de 50% de la fréquence de coupure.

On voit bien que la coupe optique nous permet d'isoler efficacement le signal provenant du plan de mise au point. Des profils des parois cellulaires montrent le gain obtenu au niveau de la largeur à mi-hauteur de ces structures (750 nm sur les images plein champ, 550 nm sur les images déconvoluées et 380 nm sur les images SIM : on retrouve à nouveau un gain de l'ordre de 50 % sur la largeur à mi-hauteur entre les images déconvoluées et les images super-résolues).

Le temps d'exposition important et la faible fréquence de modulation sont principalement liés à un signal hors focus très important, qui diminue le rapport signal sur bruit de la modulation. Il serait intéressant d'utiliser des techniques de débruitage

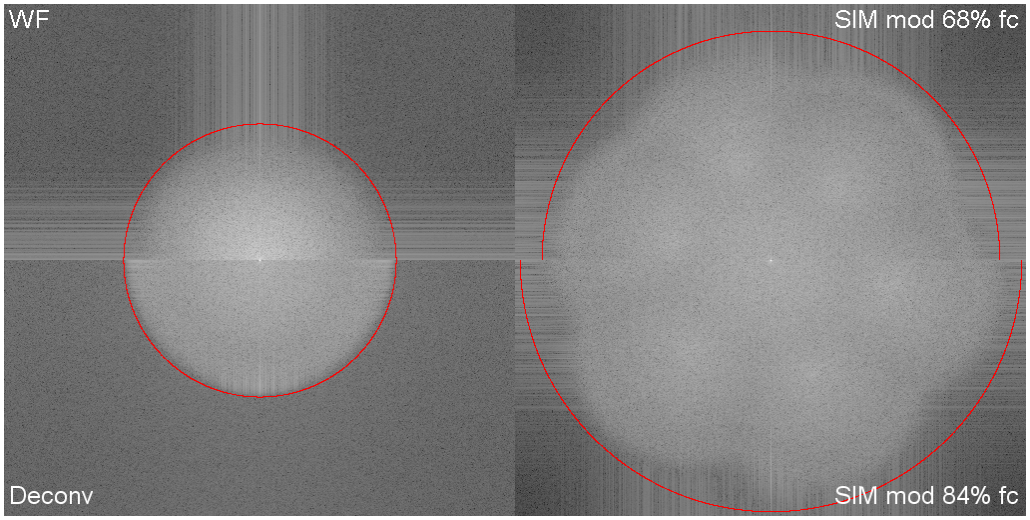


FIGURE II.26 – Comparaison des TF des images de billes, avec la limite du support de l'OTF effective indiquée en rouge : en haut à gauche : plein champ, en bas à gauche : déconvolution, en haut à droite : image SIM obtenue avec une fréquence de modulation de 68% de la fréquence de coupure, en bas à droite : image SIM avec une modulation de 84% ($\rho = 3 \cdot 10^{-6}$).

sur les images brutes, ce qui permettrait de diminuer le temps d'exposition et/ou réduire la puissance incidente et/ou augmenter la fréquence de modulation.

Ces deux échantillons nous montrent que la méthode de reconstruction bayésienne développée est une alternative intéressante aux algorithmes classiques de reconstruction. Il serait intéressant de comparer les résultats des deux méthodes à partir des mêmes données brutes, mais ne disposant pas d'un algorithme fonctionnel pour la méthode de recalage des spectres, cela n'a pas été possible.

Nous allons à présent nous intéresser à une des conséquences importantes de la reconstruction bayésienne, qui est la possibilité de réduire le nombre d'images nécessaires à la reconstruction, permettant d'espérer une augmentation de cadence de cette technique.

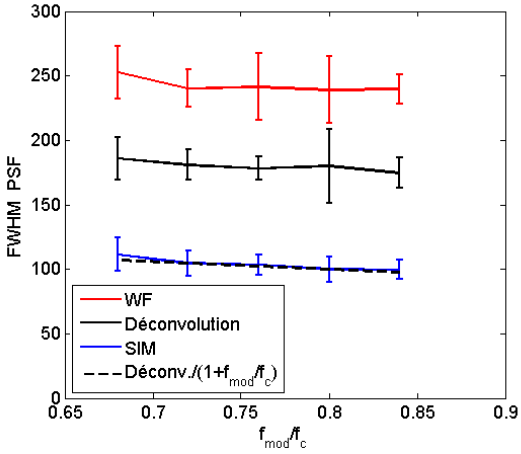


FIGURE II.27 – Comparaison des largeurs à mi-hauteur des PSF des images plein champ, déconvoluées et SIM, en fonction de la fréquence de modulation ($\rho = 3 \cdot 10^{-6}$).

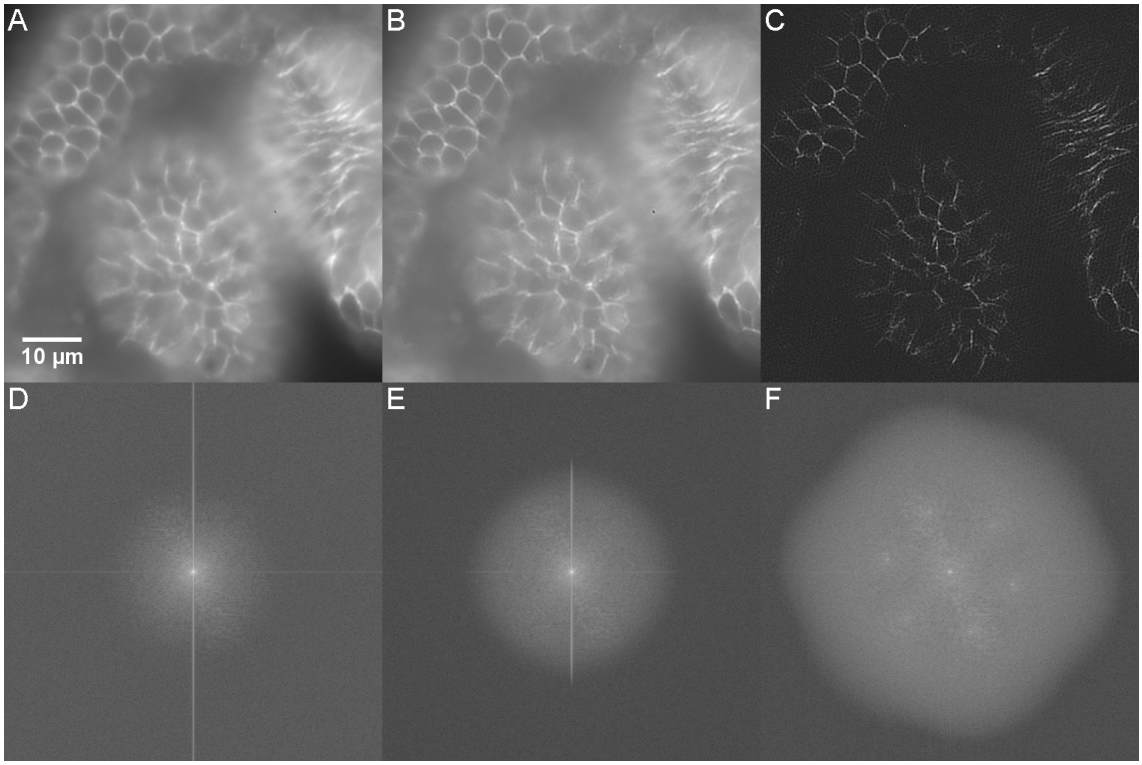


FIGURE II.28 – Disque imaginal de drosophile. A : image plein champ, B : Image déconvoluée, C : Image SIM avec coupe optique ($\rho = 5 \cdot 10^{-3}$), D-F : TF des images supérieures.

# II.4 Imagerie de super résolution à haute cadence

Nous venons de voir l'efficacité de la méthode de reconstruction bayésienne pour la super-résolution. Celle-ci ne nécessite pas de combinaison directe des images (à part pour la coupe optique) ce qui nous permet d'envisager une réduction du nombre d'images nécessaires et ainsi une augmentation de cadence.

### II.4.1 Réduction du nombre d'images requis

Le gain en résolution apporté par l'illumination structurée (linéaire) est limité à un facteur 2, car la fréquence de modulation est au maximum égale à la fréquence de coupure $f_c$ du microscope. Ainsi le support de la TF d'une image super-résolue a au plus un rayon égal à $2f_c$ (au rapport des longueurs d'onde près), alors que les images brutes ont un support de rayon $f_c$, comme le montre la figure II.29. Du point de vue de la quantité d'information, une image super-résolue contient donc au maximum quatre fois plus d'information qu'une image brute. Théoriquement, il semble donc possible de réduire à quatre le nombre d'images nécessaires à la reconstruction d'une image super-résolue.

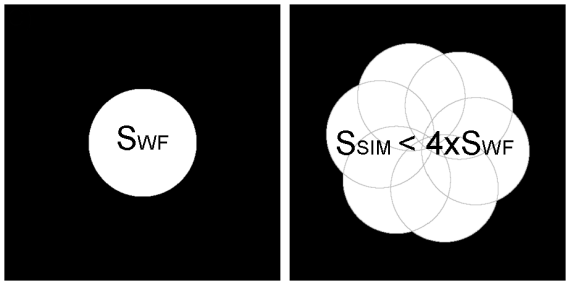


FIGURE II.29 – Supports de l'OTF d'une image plein champ de surface $S_{WF}$ et d'une image super-résolue en SIM $S_{SIM}$.

La méthode classique développée par Gustafsson [33] nécessite au minimum 7 images indépendantes pour obtenir une image reconstruite, car il est nécessaire d'isoler par combinaison des images acquises les 7 satellites dans l'espace de Fourier (une autour de la fréquence nulle et deux autour des pics de modulation pour chaque direction de modulation) (cf figure II.11). (Les 9 images utilisées habituellement fournissent une image plein champ classique pour chaque orientation de la grille. On peut donc s'affranchir de l'acquisition de deux images, une pour les 2$^{e}$ et 3$^{e}$ orientations, et obtenir les images manquantes par combinaison des autres images.)

La reconstruction bayésienne ne fait pas intervenir de combinaison d'images pour obtenir les sous-spectres, mais elle vise à expliquer l'effet de Moiré observable sur les images par ajout d'information au delà de la fréquence de coupure. Il est donc théoriquement possible de reconstruire des images super-résolues à partir de seulement quatre images. Il faut au moins une image par orientation de grille pour conserver un gain en résolution isotrope, ce qui impose trois images. La dernière image est une image plein champ, pour s'assurer que toute la surface de l'échantillon a bien

été éclairée au moins une fois lors de l'acquisition des images. Ces quatre images peuvent être acquises dans un ordre quelconque. Le logiciel de pilotage du montage a été modifié pour acquérir des images avec ce schéma d'illumination.

Il est évident que la réduction du nombre d'images utilisées pour la reconstruction la rend plus sensible au bruit que lorsqu'on utilise 9 images, car la redondance de l'information est fortement réduite. Dans la suite nous caractériserons l'influence du bruit en fonction du nombre d'images utilisées pour la reconstruction.

De plus, avec quatre images, on ne peut plus utiliser les méthodes classiques [45] permettant d'obtenir une coupe optique à partir de trois motifs d'illumination déphasés. Pour compenser cela, deux solutions sont envisageables :

- acquérir 5 images : trois phases différentes pour une orientation, puis une pour chacune des orientations restantes ;
- utiliser la méthode HiLo pour reconstruire une image de coupe optique à partir des images modulées et d'une image plein champ.

La priorité étant donnée à l'augmentation de cadence temporelle, nous avons choisi la seconde option. Cela pose toutefois des difficultés lors de la reconstruction, car il faut que le niveau de signal de la coupe optique soit identique à celui présent dans les images originales. Ceci était vérifié avec la méthode de coupe optique de Neil et al. [45], mais ne l'est plus avec la méthode HiLo car on utilise deux structures d'illuminations générées différemment. Il est donc nécessaire d'optimiser l'amplitude de l'image de coupe optique à la suite du traitement HiLo pour ne pas biaiser la soustraction du bruit de fond.

La méthode de reconstruction bayésienne que nous avons exposée permet d'envisager la reconstruction des images à partir d'un nombre d'images quelconque supérieur à quatre. Le choix du nombre d'images que l'on utilisera sera dicté par le rapport signal sur bruit des images acquises.

### II.4.2 Reconstruction à quatre images

Pour étudier l'efficacité de la reconstruction à partir de seulement quatre images, nous avons repris nos images test, et comparé la corrélation des images reconstruites avec les images test. La figure II.30 A présente la TF d'une image super-résolue reconstruite à partir de quatre images brutes. De nombreux pics correspondant à des résidus de grilles sont présents dans l'image reconstruite à la fréquence de modulation et au double de celle-ci.

La comparaison du critère de mérite de la reconstruction à 4 et à 9 images (fig. II.30 B) nous montre que la reconstruction à 9 images est d'une part plus efficace (dans tous les cas $\gamma_2$(9 images) $>$ $\gamma_2$(4 images)) mais aussi moins sensible au bruit, grâce à la redondance de l'information.

Jusqu'à présent, le rapport signal sur bruit était défini par image. Cela correspond à des images acquises avec la même durée d'exposition ou le même nombre de photons détectés pour chacune des images. Ainsi la reconstruction à 9 images bénéficie d'un nombre de photons détectés plus élevés, ce qui explique la robustesse au bruit plus importante. Si maintenant le rapport signal sur bruit est défini pour la totalité de la pile d'image utilisée pour la reconstruction, c'est à dire pour un nombre

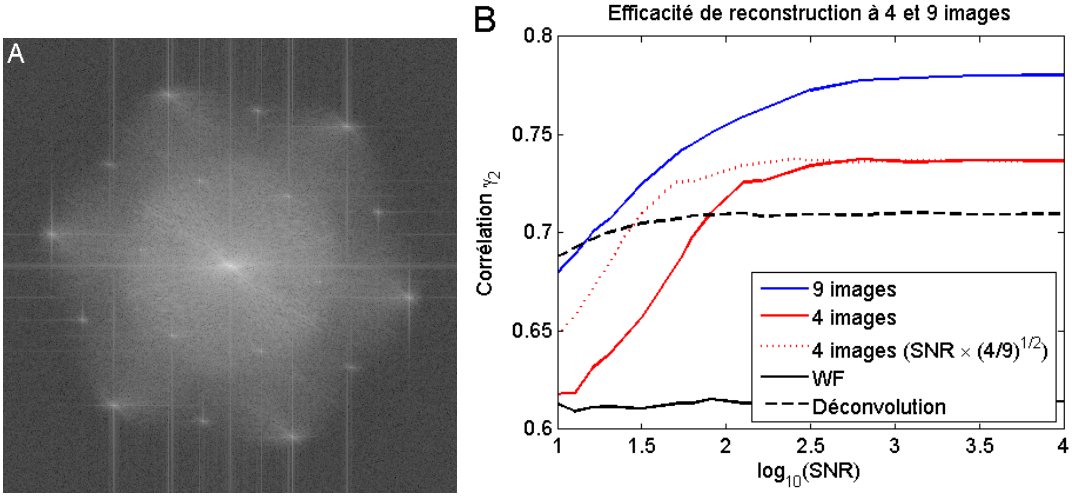


FIGURE II.30 – A : TF d'une image super-résolue reconstruite à partir de 4 images. B : comparaison de l'efficacité de reconstruction à 4 et 9 images en fonction du rapport signal sur bruit des images ($\rho = 5 \cdot 10^{-2}$).

total de photons par pile identique, il faut corriger la courbe rouge en multipliant les valeurs du SNR par $\sqrt{4/9}$, qui nous donne la courbe rouge en pointillés. Dans ce cas, l'algorithme est toujours moins efficace avec seulement 4 images mais on retrouve des sensibilités au bruit comparables. Ceci signifie qu'il faudra probablement augmenter le temps d'exposition pour obtenir des images super-résolues sans artefacts avec une reconstruction à 4 images.

La recontruction à 4 images permet donc une augmentation de résolution similaire à la reconstruction à 9 images. Elle est toutefois moins efficace, notamment face à des images bruitées, ce qui peut limiter son utilisation. Avant de montrer les résultats obtenus sur un échantillon de billes fluorescentes, nous allons exposer un outil permettant d'accélérer la cadence de films super-résolus.

### II.4.3 Utilisation d'une fenêtre glissante

Dans le cas d'un film, il est possible d'augmenter artificiellement la cadence des images super-résolues reconstruites en utilisant une fenêtre glissante. Au lieu de reconstruire une image super-résolue après l'acquisition de N images brutes, nous proposons de le faire à chaque acquisition d'une nouvelle image brute, en utilisant les trois images précédentes (cf figure II.31), car l'ordre d'acquisition des images n'est pas imposé pour la reconstruction. On obtient ainsi un film super-résolu dont la cadence est identique à celle du film original, et où chaque image contient 25% d'information nouvelle par rapport à la précédente.

### II.4.4 Observation d'un échantillon test

L'échantillon utilisé est à nouveau composé de billes de 100 nm de diamètre déposées sur une lamelle de verre qui se déplace pendant la durée de l'acquisition. Nous avons acquis des images structurées au cours du déplacement de l'échantillon,

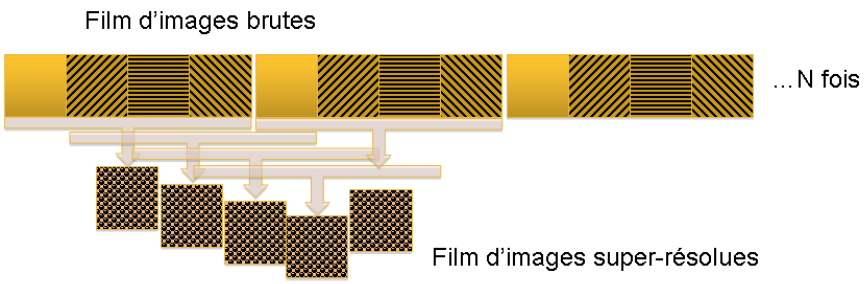


FIGURE II.31 – Schéma de principe de la reconstruction à 4 images avec une fenêtre glissante.

avec un temps d'exposition de 100 ms pendant 40 s (fréquence de grille $\sim 0,55 f_c$ pour avoir un bon contraste de grille). Les images ont été reconstruites sans coupe optique, en utilisant une fenêtre glissante et un paramètre de régularisation de $2 \cdot 10^{-3}$. Le rapport signal sur bruit des images brutes est de l'ordre de 100.

La figure II.32 montre les reconstructions obtenues pour deux images au début et à la fin du film. Les TF nous confirment bien une extension du support de l'OTF, ainsi qu'un faible poids des résidus dans les images en comparaison de ce que nous avons pu voir sur les images simulées (l'amplitude des pics dus aux résidus de modulation est faible par rapport à la figure II.30). Il est donc possible de reconstruire des images super-résolues à partir de quatre images brutes. De plus le gain est maintenu tout au long du film, indiquant la possibilité de suivre un même échantillon pendant un temps relativement long sans désalignement notable du système. Il faut à présent appliquer ces méthodes à l'observation d'échantillons biologiques. Ceci nécessitera d'importantes modifications de l'algorithme pour reconstruire efficacement des images obtenues sur des échantillons réels.

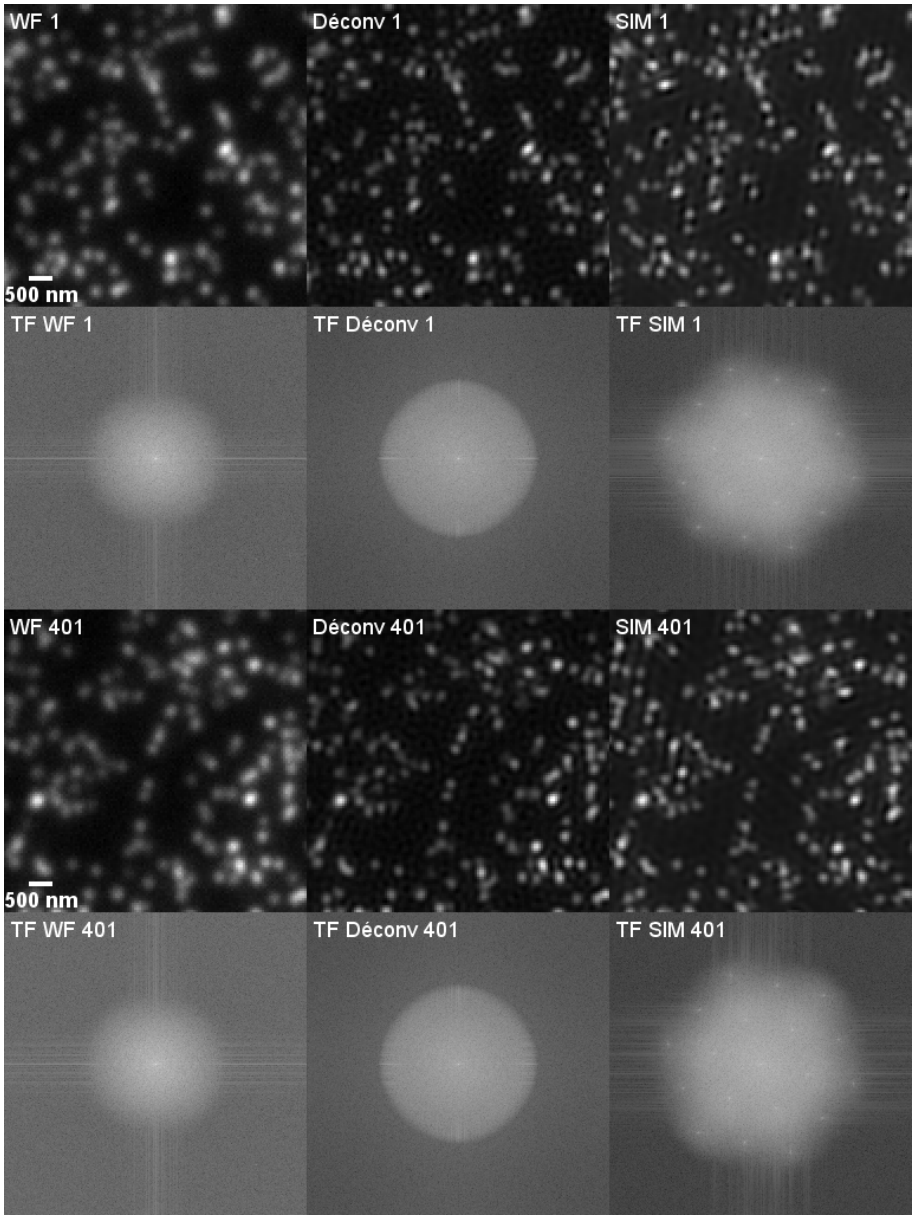


FIGURE II.32 – Comparaison des images plein champ, déconvoluées et SIM à 4 images, au début et à la fin d'un film de 40 s.

# II.5 Limitations et perspectives

Les résultats présentés montrent l'efficacité de la reconstruction bayésienne. Il existe cependant de nombreux aspects à améliorer afin de rendre cette technique applicable à l'observation d'échantillons biologiques complexes.

### II.5.1 Sensibilité au rapport signal sur bruit et débruitage

Notre algorithme de reconstruction ne fournit pas de résultat exploitable si le rapport signal sur bruit des images individuelles est inférieur à 50. En dessous d'un SNR de 50 à 100, l'information haute fréquence cachée dans le signal est fortement altérée par le bruit des images et la reconstruction devient difficile.

L'ajout d'une étape de débruitage des données brutes, à l'aide d'algorithmes existants, permettra d'améliorer la robustesse de la reconstruction des images. On pourra ainsi augmenter la cadence d'acquisition ou réduire l'intensité de l'illumination, ce qui est dans tous les cas intéressant pour observer des échantillons vivants.

### II.5.2 Optimisation de l'algorithme de reconstruction

#### Choix de la PSF et déconvolution

Comme nous l'avons vu au paragraphe II.2.2, la PSF utilisée est un modèle théorique qui ne tient pas compte des caractéristiques de notre objectif de microscope. Nous n'avons pas étudié les effets liés à l'utilisation d'une PSF incorrecte, mais la qualité des images reconstruites ne peut qu'être améliorée par l'utilisation d'une PSF proche de la réalité. Nous avons donc voulu caractériser précisément la PSF de notre système.

La technique la plus simple consiste à imager une bille isolée dans le champ du microscope. Cette bille doit être plus petite que la taille de la PSF pour éviter que la taille de la bille ne domine la taille de la PSF, mais elle doit également être suffisamment brillante pour obtenir des images avec un rapport signal sur bruit satisfaisant.

Nous avons choisi d'utiliser des billes de latex fluorescentes de 100 nm de diamètre (FluoSpheres, Molecular Probes), qui sont très brillantes et influent peu sur la largeur à mi-hauteur de la PSF attendue (avec une largeur à mi-hauteur théorique de 185 nm et des billes de 100 nm, la largeur à mi-hauteur apparente sera de l'ordre de 194 nm [44]). Le rapport signal sur bruit dans l'image d'une bille unique ne permet pas d'estimer la largeur de la PSF avec une précision suffisante pour observer les effets d'éventuelles aberrations du microscope. Nous avons donc utilisé plusieurs billes réparties dans le champ. Pour estimer correctement la PSF, il est nécessaire de sommer les images des différentes billes. Nous avons développé un algorithme, proche de celui décrit par Hirvonen et al. [44], qui additionne le signal provenant de chaque bille, après un recalage avec une précision de l'ordre d'un centième de pixel. L'image ainsi obtenue permet de mesurer la largeur à mi-hauteur de la PSF, et sa TF donne accès à l'OTF du microscope.

Les mesures effectuées jusqu'à présent ne nous ont pas permis d'obtenir une PSF ou une OTF suffisamment précises pour l'intégrer à notre programme de reconstruc-

tion, et prendre en compte les défauts de notre objectif.

Un deuxième point à améliorer concerne le processus de déconvolution qui est utilisé pour certaines étapes de la reconstruction (comme la génération d'images déconvoluées pour l'estimation des paramètres de modulation et l'initialisation de l'image super-résolue). Actuellement, l'algorithme utilisé est celui d'une déconvolution bayésienne [43]. Il est possible que cet algorithme ne soit pas optimal pour notre processus de reconstruction (concernant par exemple l'apparition d'artefacts de déconvolution ou l'influence d'une PSF différente de la PSF expérimentale) et il serait intéressant de tester différents algorithmes pour détecter des différences de comportement [46].

#### Choix de la contrainte bayésienne

Comme nous l'avons vu en décrivant le processus de reconstruction bayésienne des images II.2.2, le choix de la contrainte est crucial pour l'efficacité et le réalisme de la reconstruction. Celle-ci doit être adaptée au traitement que l'on veut utiliser, sans introduire trop d'a priori pour obtenir une image fidèle à la réalité. Les images super-résolues recherchées présentent une corrélation entre pixels, car la PSF est plus grande qu'un pixel (même en SIM), nous avons donc choisi une contrainte sous la forme d'un laplacien. Toutefois, il ne s'agit peut-être pas du choix idéal, car le laplacien a tendance à empêcher l'apparition des hautes fréquences, alors qu'il s'agit précisément de l'objectif de cette technique d'illumination structurée. D'autres contraintes peuvent être utilisées dans notre algorithme de reconstruction :

- la positivité de l'image (l'image reflétant un signal de fluorescence, il ne peut pas y avoir de valeurs négatives dans les images SIM) ;
- la réduction de l'information haute fréquence spécifiquement en dehors du support de la TF des images super-résolues (déterminé à partir de l'OTF et de la fréquence de modulation).

Enfin, le choix de la valeur du paramètre de régularisation dépendant du niveau de bruit dans les images, il est naturel d'utiliser un paramètre variable en fonction de la fréquence spatiale, faible en dessous de la fréquence de coupure, intermédiaire entre $f_c$ et $2f_c$ et important au delà.

### II.5.3 Colocalisation sur échantillons vivants

Grâce à la réduction du nombre d'images permise par la reconstruction bayésienne, il est possible d'observer des échantillons biologiques en super-résolution, avec une résolution temporelle plus élevée. Appliquée à des problématiques biologiques adaptées, cette technique permettra probablement d'apporter des informations nouvelles et utiles.

Ceci est d'autant plus vrai si l'on ajoute une seconde longueur d'onde d'excitation. Il sera alors possible de colocaliser différents marqueurs fluorescents avec une résolution meilleure que la limite de diffraction. Différentes solutions sont envisageables pour mettre en place cette deuxième longueur d'onde d'excitation. On peut

soit coupler les deux lasers dans une même fibre, et ainsi utiliser le même chemin optique (même SLM, mêmes éléments optiques...) jusqu'à l'objectif, soit doubler une partie de ces éléments, par exemple le SLM, pour générer des illuminations différentes pour les deux couleurs. Enfin à la détection, un dispositif de séparation spectrale de la fluorescence, similaire à celui développé pour la technique de HiLo bicouleur (cf. chapitre I), permettra d'acquérir en parallèle le signal des deux fluorophores, sans diminuer la cadence des images super-résolues.

## II.6 Conclusion

La microscopie à illumination structurée permet de doubler la résolution spatiale des microscopes à épifluorescence traditionnels grâce à l'acquisition de plusieurs images. Toutefois la reconstruction de ces images demande un traitement important et un nombre d'images élevé. Nous avons décrit une nouvelle approche de reconstruction de ces images utilisant un formalisme bayésien. Cette approche est très efficace sur des images simulées mais également sur des images réelles présentant un rapport signal sur bruit important. Cette reconstruction permet surtout d'envisager une réduction du nombre d'images nécessaires à la reconstruction. Ainsi 4 images permettent de reconstruire une image super-résolue. Ceci permet d'envisager une accélération de la cadence d'acquisition des images super-résolues. La perspective principale est l'observation d'échantillons biologiques, mais cela nécessitera encore un travail important sur l'algorithme de reconstruction pour optimiser le traitement des images et réduire les artefacts présents sur les images super-résolues.

# Bibliographie

[1] R. E. Thompson, D. R. Larson, and W. W. Webb. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophysical journal*, 82(5), 2002.

[2] E. Betzig, G. H. Patterson, R. Sougrat, O. W. Lindwasser, S. Olenych, J. S. Bonifacino, M. W. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, and H. F. Hess. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 313(5793), 2006.

[3] S. T. Hess, T. P. K. Girirajan, and M. D. Mason. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophysical journal*, 91(11), 2006.

[4] M. Heilemann, S. van de Linde, M. Schüttpelz, R. Kasper, B. Seefeldt, A. Mukherjee, P. Tinnefeld, and M Sauer. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 47(33), 2008.

[5] B. Huang, W. Wang, M. Bates, and X. Zhuang. Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 319(5864), 2008.

[6] S. Pavani, M. A. Thompson, J. S. Biteen, S. J. Lord, N. Liu, R. J. Twieg, R. Piestun, and W. E. Moerner. Three-dimensional, single-molecule fluorescence imaging beyond the diffraction limit by using a double-helix point spread function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(9), 2009.

[7] G. Shtengel and J.A. Galbraith. Interferometric fluorescent super-resolution microscopy resolves 3d cellular ultrastructure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 2009.

[8] M. J. Rust, M. Bates, and X. Zhuang. Imaging by stochastic optical reconstruction microscopy ( storm ). *Nature Methods*, 3(10), 2006.

[9] S. Hess. Fpalm concept. URL `http://gsbs.umaine.edu/people/profile/sam_hess`. [En ligne ; Page disponible le 6-juillet-2012].

[10] I. Izeddin, C. G. Specht, M. Lelek, X. Darzacq, A. Triller, C. Zimmer, and M. Dahan. Super-resolution dynamic imaging of dendritic spines using a low-affinity photoconvertible actin probe. *PloS one*, 6(1), 2011.

[11] M. F. Juette, T. J. Gould, M. D. Lessard, M. J. Mlodzianoski, B. S. Nagpure, B. T. Bennett, S. T. Hess, and J. Bewersdorf. Three-dimensional sub-100 nm resolution fluorescence microscopy of thick samples. *Nature Methods*, 5(6), 2008.

[12] V. Tatavarty, E. Kim, V. Rodionov, and J. Yu. Investigating sub-spine actin dynamics in rat hippocampal neurons with super-resolution optical imaging. *PloS one*, 4(11), 2009.

[13] N. A. Frost, H. Shroff, H. Kong, E. Betzig, and T. A. Blanpied. Single-molecule discrimination of discrete perisynaptic and distributed sites of actin filament assembly within dendritic spines. *Neuron*, 67(1), 2010.

[14] I. Izeddin, M. El Beheiry, J. Andilla, D. Ciepielewski, X. Darzacq, and M. Dahan. Psf shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking. *Optics express*, 20(5), 2012.

[15] C. G. Galbraith and J. A. Galbraith. Super-resolution microscopy at a glance. *Journal of cell science*, 124(Pt 10), 2011.

[16] M. J. Mlodzianoski, J. M. Schreiner, S. P. Callahan, K. Smolkova, A. Dlaskova, J. Santorova, P. Jezek, and J. Bewersdorf. Sample drift correction in 3d fluorescence photoactivation localization microscopy. *Optics express*, 19(16), 2011.

[17] A. Sharonov and R. M. Hochstrasser. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(50), 2006.

[18] I. Schoen, J. Ries, E. Klotzsch, H. Ewers, and V. Vogel. Binding-activated localization microscopy of dna structures. *Nano letters*, 11(9), 2011.

[19] G. Giannone, E. Hosy, F. Levet, A. Constals, K. Schulze, A. I. Sobolevsky, M. P. Rosconi, E. Gouaux, R. Tampé, D. Choquet, and L. Cognet. Dynamic superresolution imaging of endogenous proteins on living cells at ultra-high density. *Biophysical journal*, 99(4), 2010.

[20] P. Hoyer, T. Staudt, J. Engelhardt, and S.W. Hell. Quantum dot blueing and blinking enables fluorescence nanoscopy. *Nano letters*, 2011.

[21] T. Dertinger, R. Colyer, G. Iyer, S. Weiss, and J. Enderlein. Fast, background-free, 3d super-resolution optical fluctuation imaging (sofi). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(52), 2009.

[22] T. Dertinger, R. Colyer, R. Vogel, and S. Enderlein, J.and Weiss. Achieving increased resolution and more pixels with superresolution optical fluctuation imaging (sofi). *Optics express*, 18(18), 2010.

[23] S. Geissbuehler, C. Dellagiacoma, and T. Lasser. Comparison between sofi and storm. *Biomedical optics express*, 2(3), 2011.

[24] S. Cox, E. Rosten, J. Monypenny, T. Jovanovic-Talisman, D. T. Burnette, J. Lippincott-schwartz, G. E. Jones, and R. Heintzmann. Bayesian localization microscopy reveals nanoscale podosome dynamics. *Nature Methods*, 9(2), 2012.

[25] S. W. Hell and J. Wichmann. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission : stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Optics letters*, 19(11), 1994.

[26] G. Donnert, J. Keller, R. Medda, M A. Andrei, S. O. Rizzoli, R. Lührmann, R. Jahn, C. Eggeling, and S. W. Hell. Macromolecular-scale resolution in biological fluorescence microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), 2006.

[27] K.I. Willig, S.O. Rizzoli, V. Westphal, R. Jahn, and S. W. Hell. Sted microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 440(7086), 2006.

[28] R. Schmidt, C.A. Wurm, A. Punge, A. Egner, S. Jakobs, and S. W. Hell. Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano letters*, 9(6), 2009.

[29] L. Schermelleh, R. Heintzmann, and H. Leonhardt. A guide to super-resolution fluorescence microscopy. *The Journal of cell biology*, 190(2), 2010.

[30] B. R. Rankin and S. W. Hell. Sted microscopy with a mhz pulsed stimulated-raman-scattering source. *Optics express*, 17(18), 2009.

[31] V. Westphal and S. W. Hell. Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope. *Physical Review Letters*, 94(14), 2005.

[32] S. Bretschneider, C. Eggeling, and S.W. Hell. Breaking the diffraction barrier in fluorescence microscopy by optical shelving. *Physical Review Letters*, 98(21), 2007.

[33] M. G. L. Gustafsson. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *Journal of microscopy*, 198(Pt 2), 2000.

[34] M. G. L. Gustafsson. Extended-resolution reconstruction of structured illumination microscopy data. In *Computational Optical Sensing and Imaging*, number 1, 2005.

[35] M. G. L. Gustafsson, L. Shao, P. M. Carlton, C. J. R. Wang, I. N. Golubovskaya, W. Z. Cande, D. A. Agard, and J. W. Sedat. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination. *Biophysical journal*, 94(12), 2008.

[36] L. Shao, B. Isaac, S. Uzawa, D. A. Agard, J. W. Sedat, and M. G. L. Gustafsson. I5s : wide-field light microscopy with 100-nm-scale resolution in three dimensions. *Biophysical journal*, 94(12), 2008.

[37] P. Kner, B. B. Chhun, E. R. Griffis, l. Winoto, and M. G. L. Gustafsson. Super-resolution video microscopy of live cells by structured illumination. *Nature methods*, 6(5), 2009.

[38] S. A. Shroff, J. R. Fienup, and D. R. Williams. Phase-shift estimation in sinusoidally illuminated images for lateral superresolution. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 26(2), 2009.

[39] F. Orieux, E. Sepulveda, V. Loriette, B. Dubertret, and J. C. Olivo-Marin. Bayesian estimation for optimized structured illumination microscopy. *IEEE Transactions on image processing*, 21(2), 2012.

[40] K. M. Hanson. Introduction to bayesian image analysis. *Proceedings of SPIE*, 1898 :716–731, 1993.

[41] W. H. Press, W. T. Teukolsky, S. A. ans Vetterling, and B. P. Flannery. *Numerical recipes in C.* Cambridge University Press, 18.4 p. 804, 1992.

[42] R. Heintzmann. Estimating missing information by maximum likelihood deconvolution. *Micron (Oxford, England : 1993)*, 38(2), 2007.

[43] F. Orieux, J.F. Giovannelli, and T. Rodet. Bayesian estimation of regularization and point spread function parameters for wiener-hunt deconvolution. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 27(7), 2010.

[44] L. M. Hirvonen, K. Wicker, O. Mandula, and R. Heintzmann. Structured illumination microscopy of a living cell. *European biophysics journal : EBJ*, 38(6), 2009.

[45] M. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson. Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope. *Optics letters*, 22(24), 1997.

[46] J.B. Sibarita. Deconvolution microscopy. In *MICROSCOPY TECHNIQUES*, volume 95 of *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*. 2005.

# III

# Optique adaptative pour la microscopie de fluorescence plein champ d'échantillons épais optiquement aberrants

## Sommaire


**II.1 Augmentation de résolution en microscopie optique . . 50**
II.1.1 Limite de résolution . . . . . 50
II.1.2 Super-résolution par super-localisation . . . . . 53
II.1.3 Super-résolution . . . . . 59
**II.2 Montage et reconstruction des images . . . . . 70**
II.2.1 Description du montage . . . . . 70
II.2.2 Reconstruction bayésienne des images super-résolues . . . 72
II.2.3 Coupe optique et super-résolution . . . . . 76
II.2.4 Efficacité de la reconstruction bayésienne . . . . . 78
**II.3 Reconstruction d'images super-résolues . . . . . 85**
II.3.1 Billes fluorescentes . . . . . 85
II.3.2 Disques imaginaux de drosophile . . . . . 87
**II.4 Imagerie de super résolution à haute cadence . . . . . 90**
II.4.1 Réduction du nombre d'images requis . . . . . 90
II.4.2 Reconstruction à quatre images . . . . . 91
II.4.3 Utilisation d'une fenêtre glissante . . . . . 92
II.4.4 Observation d'un échantillon test . . . . . 92
**II.5 Limitations et perspectives . . . . . 95**
II.5.1 Sensibilité au rapport signal sur bruit et débruitage . . . 95
II.5.2 Optimisation de l'algorithme de reconstruction . . . . . 95
II.5.3 Colocalisation sur échantillons vivants . . . . . 96
**II.6 Conclusion . . . . . 97**

Ce troisième chapitre détaille les premières étapes du développement d'un système d'optique adaptative pour la microscopie de fluorescence plein champ. Nous exposerons l'intérêt d'un tel système ainsi que la difficulté de corriger les aberrations sur un champ de vue étendu. Nous présenterons ensuite la solution retenue et le système mis en place, ainsi que ses performances et les premiers résultats obtenus.

# III.1 Dégradation des capacités d'imagerie par les aberrations optiques

### III.1.1 Aberrations optiques

Les images obtenues avec des systèmes optiques réels peuvent fortement différer de ce que prévoit l'approximation paraxiale de la formation des images, entre autres car les conditions de Gauss ne sont plus respectées. Ces différences sont regroupées sous le terme d'aberrations optiques et ont des origines diverses. Elles peuvent être chromatiques (par exemple l'indice optique des lentilles dépendant de la longueur d'onde, les relations de conjugaison varient avec celle-ci ; un point source à spectre large donne ainsi des images différentes suivant la longueur d'onde considérée) ou géométriques (les rayons émis par un point source avec des angles différents n'interceptent le plan image, ni tous au même point, ni au point prévu par les règles de l'imagerie paraxiale). Ces aberrations sont générées par les différents éléments à travers lesquels se propage la lumière, c'est à dire le système optique mais également l'échantillon, son support, le milieu dans lequel il est plongé, etc. et dégradent les performances du système d'imagerie. En pratique, on constate une PSF effective plus large que ce que prévoit la théorie de la diffraction en absence d'aberrations, ce qui dégrade la qualité des images obtenues.

#### Système optique

Les objectifs de collection utilisés en microscopie de fluorescence ayant une forte ouverture numérique, le système optique peut être très sensible aux aberrations géométriques, car les angles d'incidence des rayons provenant de l'échantillon peuvent être importants sur les dioptres. Ces effets sont en partie limités en utilisant de nombreuses lentilles intermédiaires en matériaux différents, permettant de réduire et compenser l'apparition des aberrations chromatiques et géométriques pour une conjugaison et un champ donnés. Les objectifs de microscope disponibles commercialement sont conçus pour réduire ces aberrations au maximum et atteindre des performances limitées par la diffraction.

Ainsi un objectif classique, utilisé dans la configuration pour laquelle il a été spécifiquement conçu, est très performant et génère des aberrations très faibles, même sur un champ large [1]. Toutefois, à forte ouverture numérique, de faibles écarts à la configuration nominale produisent des aberrations importantes qui compromettent la résolution du système. Il est en pratique très difficile d'obtenir la configuration idéale, soit parce que la lamelle de microscope utilisée n'a pas l'épaisseur requise,

soit parce que les différents milieux d'immersion et d'observation n'ont pas les indices optiques adéquats. Ceci devient notamment critique lorsque l'on observe un échantillon biologique en profondeur. La figure III.1 A montre que l'observation d'un échantillon à travers une couche de 50 $\mu$m d'eau avec un objectif à huile divise par deux l'efficacité du système au niveau de l'intensité collectée et des fréquences transmises. De même la figure B montre qu'avec des objectifs à forte ouverture numérique, une variation d'épaisseur de la lamelle de l'ordre de 10 % réduit l'efficacité de collection de plus de 50 %. Or les lamelles disponibles commercialement sont fournies avec des tolérances de l'ordre de 15 % [2].

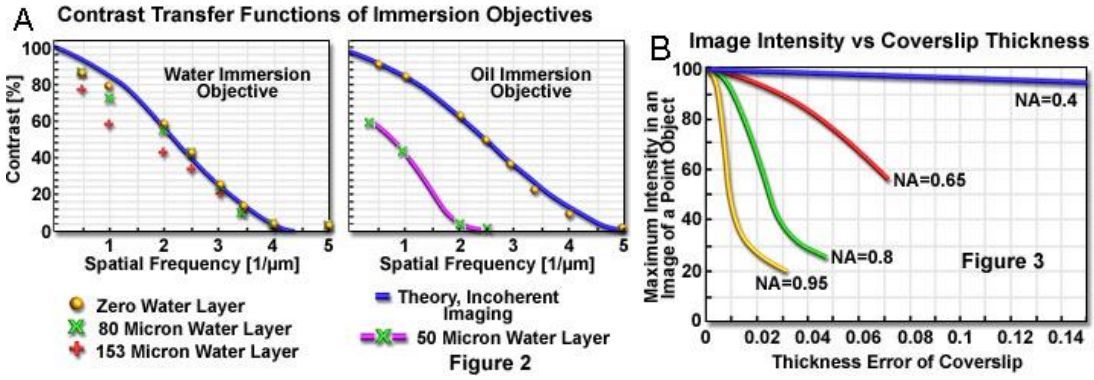


FIGURE III.1 – Effet d'une mauvaise configuration d'imagerie sur l'efficacité de collection. A : variation de la fonction de transfert en fonction de l'épaisseur de la couche d'eau à travers laquelle l'échantillon est observé. B : Variation de l'intensité de l'image en fonction de l'écart entre l'épaisseur de la lamelle utilisée et l'épaisseur de consigne (en mm) pour des objectifs à air d'ouverture numérique variable (extrait de [2]).

Ces différences altèrent donc couramment la qualité des images obtenues en imagerie biologique, même s'il est possible de les corriger si on connait parfaitement la configuration utilisée [3–5].

### Échantillons biologiques

Lorsque l'on observe un échantillon biologique épais, la lumière provenant d'un point en profondeur doit se propager à travers l'échantillon. Or ces objets sont généralement peu homogènes en composition, en indice, en transparence... L'échantillon ajoutera donc son lot d'aberrations optiques, qui sont imprévisibles, qui dépendent de la position et parfois du temps (si l'échantillon est vivant). Il est donc impossible de concevoir un objectif de microscope qui intégrerait la correction de ces aberrations .

Le système optique et l'échantillon générant des aberrations optiques propre à chaque échantillon, l'ajout d'un élément adaptable, qui puisse compenser les aberrations de manière ad-hoc, peut s'avérer très utile afin de restaurer les performances

d'imagerie. Ceci est d'autant plus intéressant pour les techniques d'illumination structurée présentées aux chapitres précédents, car la grille (imagée dans l'échantillon via l'objectif de microscope) présente un contraste très sensible à certaines aberrations [6]. L'augmentation de ce contraste par correction des aberrations peut donc améliorer les performances et le rapport signal sur bruit des images reconstruites.

Le but de l'optique adaptative est de corriger ces aberrations en ajoutant un élément adaptable, dont on détermine la forme au cours du temps. Cela peut être un miroir déformable ou un modulateur spatial de lumière, qui permettent de modifier localement la phase d'un front d'onde incident. Nous allons maintenant voir comment de tels éléments peuvent être utilisés pour améliorer nos images.

### III.1.2 Optique adaptative

#### Principe de fonctionnement

Le schéma classique de fonctionnement d'un système d'optique adaptative (OA) est présenté sur la figure III.2. On observe une source de lumière ponctuelle, le front d'onde émis par cette source est déformé par la propagation à travers les éléments aberrants du système. L'élément correcteur, un miroir déformable généralement, est placé dans le plan de Fourier du système et prend une forme qui va permettre de corriger les défauts du front d'onde incident. Le front d'onde résultant est ainsi à nouveau plan et permet de faire l'image du point source avec une résolution limitée uniquement par la diffraction.

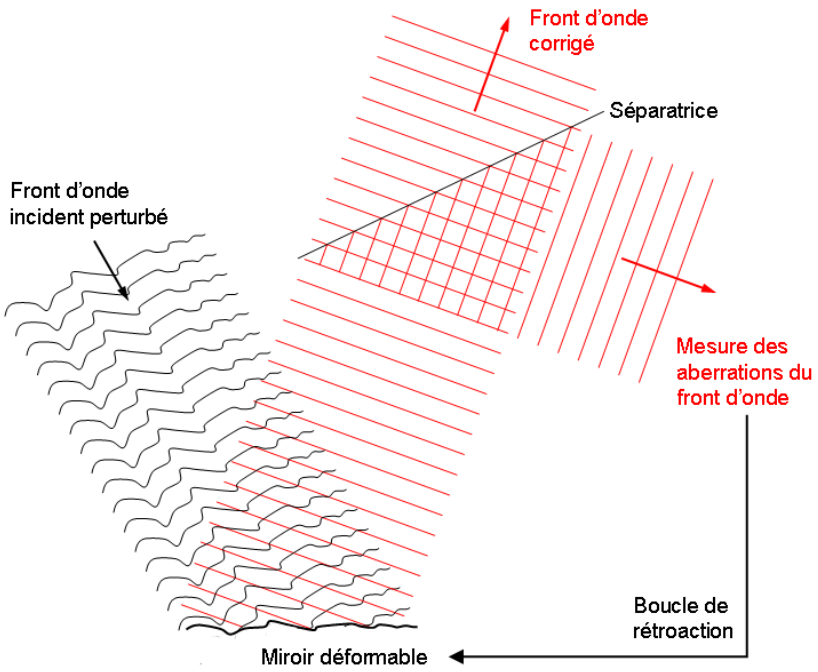


FIGURE III.2 – Schéma de principe de l'optique adaptative.

En plaçant directement un miroir déformable dans un plan conjugué de la pupille de sortie d'un microscope, on se trouvera dans la configuration décrite précédemment. Il reste à déterminer la forme optimale de l'élément correcteur à l'aide d'un critère de correction. Il peut être fourni par un analyseur de front d'onde (comme un analyseur de front d'onde de Shack-Hartmann (S-H) ou un montage interférométrique) ou par une caméra et un programme de traitement dédié. Différents montages d'optique adaptative ont été développé suivant ce schéma général, autant en microscopie à balayage qu'en microscopie plein champ.

### Optique adaptative en microscopie à balayage

Le schéma de correction à mettre en place pour les microscopies à balayage est relativement direct. En effet pour ces techniques, le signal est collecté point par point, à partir d'un faisceau excitateur focalisé. Les aberrations optiques vont altérer la focalisation de ce faisceau et diminuer l'efficacité de collection de la fluorescence. Ainsi, la forme optimale de l'élément correcteur sera associée à un maximum d'intensité détectée.

C'est généralement ce critère qui est utilisé pour corriger les images. L'optimisation du signal peut se faire pour chaque pixel séparément ou sur l'intensité totale de l'image. Dans le premier cas, une routine de maximisation utilisant un algorithme génétique [7] permet de trouver la correction adéquate. Une autre méthode permet d'assurer la convergence en un nombre réduit de mesures. Elle se base sur la mesure directe des aberrations générées par le système. Cela nécessite de décomposer les aberrations sur une base, généralement les polynômes de Zernike ou les fonctions de Lukosz et de les associer à des modes de déformations du modulateur de front d'onde. Pour chacun de ces modes d'aberrations, on réalise trois mesures du signal d'intérêt (figure III.3) : la première dans l'état inital du système (pas de déformation du front d'onde par le modulateur), la seconde est obtenue en déformant le modulateur de front d'onde d'une forme et amplitude connue, la dernière mesure est réalisée avec une déformation de même forme, mais d'amplitude opposée à la précédente.

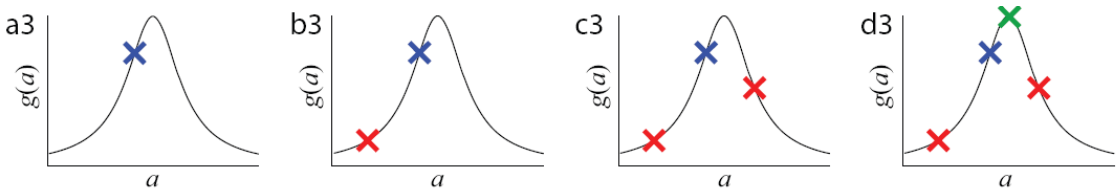


FIGURE III.3 – Mesures des aberrations par ajout de biais connus. La courbe noire représente le comportement du critère de mesure $g$ avec l'amplitude $a$ du mode d'aberration considéré. Ce critère est maximale pour une certaine valeur de $a$ que l'on recherche. Les valeurs initiale du critère (croix bleue) et avec ajout de biais maitrisés positif et négatif (croix rouges) permettent de déterminer l'amplitude $a$ qui maximise le critère $g$ (croix verte) (extrait de [8]).

.

À partir de ces trois mesures, on peut déterminer l'amplitude à imposer au modulateur pour ce mode de déformation afin de minimiser les aberrations qui lui sont associées. On peut ainsi corriger chaque mode individuellement à partir de trois mesures et $N$ modes d'aberrations avec $(2N + 1)$ mesures [9].

Lorque la correction s'effectue sur l'intensité totale de l'image, on utilise également l'ajout de biais maitrisés [10, 11]. La correction déterminée dans ce cas est une correction globale, moyennée sur l'échantillon, alors que la technique point à point permet d'avoir une correction optimale pour tous les pixels.

On voit directement l'inconvénient de ces techniques pour l'observation d'échantillons fragiles ; il est nécessaire d'acquérir au moins $2N + 2$ images pour obtenir une image corrigée. De plus, si les aberrations sont très importantes, ces techniques risquent de ne pas converger vers la correction optimale mais de détecter des minima secondaires du critère de correction.

L'utilisation d'un analyseur de front d'onde est une alternative à ces mesures utilisant le signal de l'échantillon. Pour chaque point de mesure, l'analyseur mesure directement les aberrations du faisceau d'intérêt. À partir de cette information, et après étalonnage du système, on peut adapter la forme de l'élément correcteur pour réduire les aberrations [12–14]. La mesure du front d'onde aberrant au cours de la correction fournit une mesure précise de l'efficacité de correction de ces méthodes. La réalisation de ces systèmes est toutefois plus complexe, car elle nécessite l'insertion de l'analyseur de front d'onde dans le chemin optique, correctement conjugué avec le miroir déformable.

Ces techniques de correction développées en imagerie à balayage ne sont pas directement applicables en microscopie plein champ, car on ne considère plus l'émission provenant d'un point source de volume confocal. Il faut donc trouver des solutions différentes pour développer un système d'optique adaptative dédié à la microscopie plein champ.

### Optique adaptative en microscopie plein champ

Comme précédemment, la correction d'aberrations en microscopie plein champ peut se faire de deux manières : soit on détermine un critère de correction directement sur les images obtenues, soit on mesure le front d'onde aberrant pour le corriger avant acquisition des images.

**Correction à partir des images obtenues.** Contrairement à la microscopie confocale, on ne peut pas se contenter de maximiser le signal detecté par la caméra, car il n'y a aucune raison pour que l'image corrigée soit plus intense qu'une image déformée. Il faut donc déterminer un critère à partir de l'image qui reflète sa qualité et la quantité d'aberration du front d'onde incident.

Une possibilité est de s'intéresser à la quantité de signal dans certaines bandes de fréquences, comme l'ont démontré Debarre et al. [6]. En effet lorsqu'une image

est déformée par des aberrations, elle perd en netteté, ce qui correspond à la pertes des hautes fréquences. Mais les basses fréquences sont également affectées par les aberrations. La maximisation du signal dans certaines bandes de fréquences permet donc de corriger des images plein champ, à partir de $2N + 1$ mesures avec des biais connus. De même que précédemment, la correction obtenue correspond à une moyenne sur l'image. Elle est intéressante si les aberrations induites sont homogènes à l'échelle du champ de vision. Si les aberrations dépendent beaucoup du champ, cette méthode de correction ne sera pas optimale.

Une méthode dérivée utilisant le piqué de l'image (somme des carrés des pixels) permet également de corriger des images structurées, en vue d'un traitement de coupe optique [6]. Cette méthode nécessite toujours la mesure de $2N + 1$ images avec des biais d'aberrations connus pour obtenir une image corrigée.

Ces techniques de correction d'aberrations sans mesure de front d'onde sont très efficaces, mais elles nécessitent l'illumination de l'échantillon durant la phase de correction, qui peut être longue. Elle n'est donc pas adaptée pour des objets dynamiques ou enclins au photoblanchiement, contrairement aux méthodes utilisant des mesures de front d'onde.

**Mesure du front d'onde déformé.** Comme pour les microscopies à balayage, la mesure du front d'onde permet une correction directe et robuste de celui-ci. Cette mesure peut être obtenue par interférométrie [12] ou grâce à un analyseur de front d'onde de Shack-Hartmann (S-H) [15–19]. Ce dernier est plus facile à utiliser, car il fonctionne avec n'importe quelle source de lumière, à condition qu'elle se comporte comme un point source pour le S-H. Il faut donc que l'échantillon contienne ces points sources. Pour éviter d'utiliser le marquage d'intérêt, on ajoute généralement de petites billes à l'échantillon qui vont nous servir de sources ponctuelles de référence, pour la mesure du front d'onde [15–19].

Ces billes ont un rôle tout à fait similaire aux étoiles artificielles utilisées en astronomie [20], on les appelera donc étoiles guides ou étoiles artificielles par analogie. Elles peuvent générer un signal important, différent de l'échantillon, qui va permettre une mesure précise et rapide du front d'onde issu de la bille. De plus, elles permettent de corriger des aberrations locales, ce qui assure une correction optimale aux alentours de l'étoile guide, même dans un échantillon très inhomogène. En revanche, cette correction ne sera probablement pas valable pour d'autres endroits dans le champ et la correction d'un large champ d'observation sera plus difficile. La mesure de cette zone corrigée (ou zone d'isoplanétisme) est une caractéristique importante de ces techniques d'optique adaptative plein champ par mesure du front d'onde.

Nous avons choisi de développer une technique d'optique adaptative pour l'observation d'échantillons biologiques fluorescents par mesure du front d'onde à partir d'étoiles artificielles. L'idée principale est de protéger au maximum l'échantillon en séparant spectralement la fluorescence des étoiles et de l'échantillon (à l'illumination comme à la détection). Ceci nous permet d'envisager l'observation d'échantillons fra-

giles, pour lesquels il est nécessaire d'utiliser le maximum de photons de fluorescence pour l'imagerie. La suite de ce chapitre décrit le système retenu et le montage optique qui en résulte.

# III.2 Description du système

### III.2.1 Conception de l'expérience

Nous avons conçu un système d'optique adaptative pour la microscopie de fluorescence plein champ utilisable avec tous types d'échantillons, notamment les plus sensibles au photoblanchiment, et compatible avec la technique d'illumination structurée. Un montage d'optique adaptative par mesure de front d'onde s'avère indispensable si l'on veut protéger l'échantillon, et réduire le nombre d'acquisitions nécessaires à la correction. Il faut donc injecter des étoiles guides dans les échantillons.

Pour limiter l'illumination de l'objet au cours de la correction, nous avons choisi d'utiliser des étoiles pouvant s'exciter et émettant à une longueur d'onde différente de l'échantillon. Il est ainsi possible de séparer efficacement les deux voies de détection (front d'onde et image) grâce à des miroirs dichroïques, et de limiter les pertes de fluorescence dans les différentes voies. Ce choix permet également l'utilisation d'étoiles guides très brillantes pour une mesure fiable et rapide du front d'onde sans perturber la voie d'imagerie.

Nous allons corriger les images à partir de la mesure du front d'onde par le S-H et acquérir l'image corrigée sur une caméra. Pour que la correction apportée aboutisse à une amélioration de l'image, il faut que les aberrations mesurées par l'analyseur soient identiques à celles qui dégradent l'image acquise par la caméra. Pour cela, la différence de chemin optique entre les deux dispositifs d'acquisition est minimisée pour s'assurer que les aberrations générées par cette différence soient faibles. Enfin le dispositif de correction est placé entre la sortie d'un microscope optique et la caméra, ce qui permet d'envisager facilement un couplage à un système d'illumination structurée pour laquelle seule la partie illumination est modifiée.

### III.2.2 Montage

La figure III.4 présente le montage mis en place, basé sur un microscope commercial Olympus IX71 avec un objectif 60×, ($ON = 1,2$). À la sortie du microscope, la lumière est envoyée sur le miroir déformable (Mirao e52 Imagine Optic), via un triplet de lentille (+100 mm/−40 mm/+150 mm). Ce triplet permet d'une part d'ajuster la taille de la pupille à celle du miroir pour utiliser au maximum ses différents actuateurs et d'autre part de conjuguer le miroir déformable avec la pupille de sortie de l'objectif. Cette conjugaison permet d'éviter le vignettage de la pupille par le miroir lors de la mesure des aberrations sur une étoile guide qui n'est pas sur l'axe optique. Après le miroir déformable, une lentille de 300 mm assure la conjugaison du plan focal objet du microscope avec la caméra CCD (QuantEM:512SC Roper Scientific). La fluorescence de l'échantillon est séparée de celle des étoiles guides par une lame dichroïque et un filtre interférentiel.

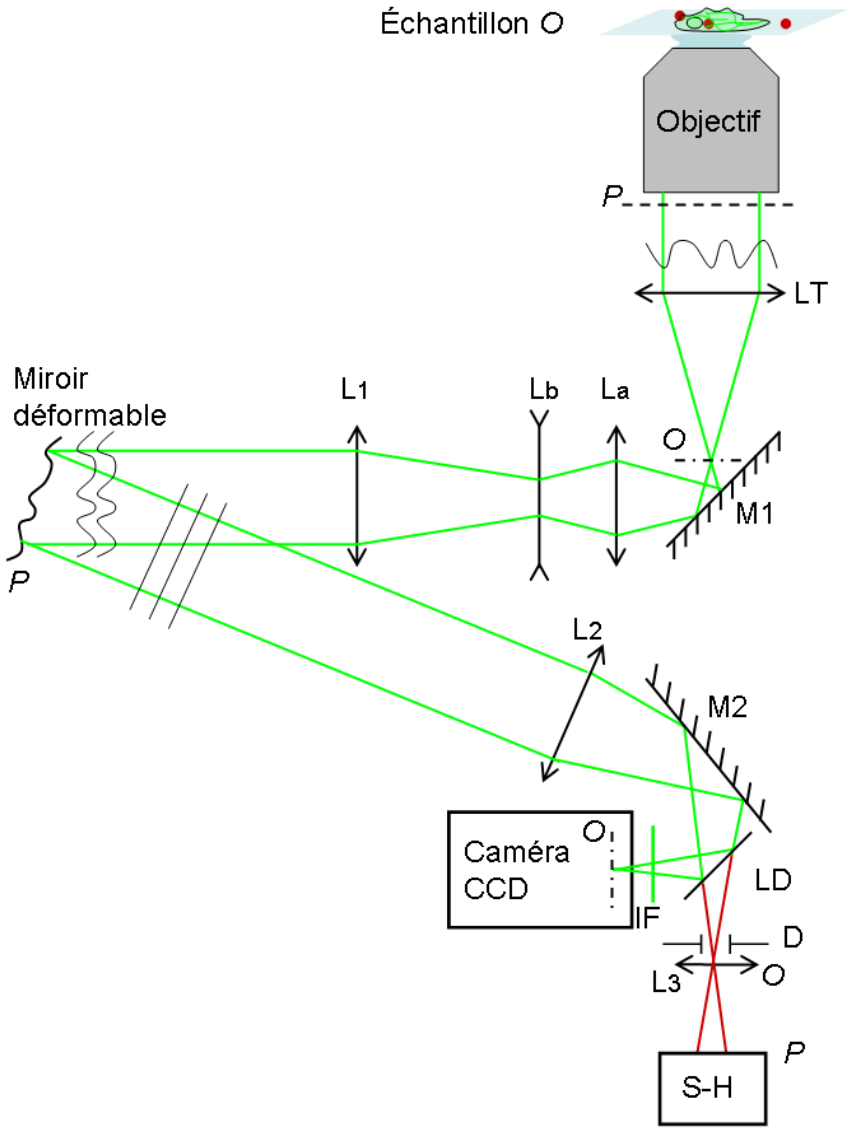


FIGURE III.4 – Montage d'optique adaptative : $O$ : Plan objet et plans conjugués, $P$ : pupille de l'objectif et plans conjugués, LT : lentille de tube, M1, M2 : miroirs, La, Lb : doublet afocal (lentilles de +100 et −40 mm), L1 : lentille de +150 mm, L2 : lentille de +300 mm, LD : miroir dichroïque, IF : filtre interférentiel, D : Diaphragme, L3 : lentille de +70 mm, S-H : Analyseur de front d'onde de Shack-Hartmann.

La fluorescence des étoiles guides est transmise par le miroir dichroïque vers l'analyseur de front d'onde de Shack-Hartmann (Haso3 first Imagine Optic). Celui-ci est constitué d'une matrice de microlentilles et d'un capteur CCD placé dans le plan focal image de la matrice. Le front d'onde provenant d'un point source à grande distance est échantillonné par ces microlentilles, chacune réalisant une image du point source sur une portion de la caméra. La position de cette image sur le capteur est liée à l'orientation moyenne du front d'onde intercepté par la microlentille. Connaissant cette orientation locale (autrement dit la dérivée) du front d'onde en chaque point de la matrice, on peut en déduire sa forme globale [15].

À partir de cette mesure de front d'onde, on pourra modifier la forme du miroir déformable pour réduire les aberrations mesurées. Ceci se fait par rétroaction de l'analyseur de front d'onde sur le miroir déformable. Le fonctionnement du programme de contrôle de la boucle impose que le front d'onde mesuré soit identique à celui présent au niveau du miroir déformable et donc que celui-ci soit conjugué de la matrice de microlentilles (si ce n'était pas le cas, il faudrait tenir compte de la propagation du front d'onde entre le miroir déformable et le plan conjugué de la matrice de microlentilles). Il faut donc s'assurer que la matrice de microlentilles soit conjuguée du miroir déformable et de la pupille de sortie de l'objectif. Cette conjugaison est obtenue en ajoutant une lentille ($L_3$ 70 mm) entre le miroir dichroïque et le Shack-Hartmann. La distance focale de cette lentille a été choisie de façon à adapter le diamètre de la pupille à la taille du capteur du S-H.

L'ajout de cette lentille peut poser un problème important. Le front d'onde mesuré est affecté par les aberrations de cette dernière lentille, et il est donc différent de celui qui arrive sur la caméra. Pour réduire au maximum ces aberrations différentielles, la dernière lentille est placée au foyer image de la lentille d'imagerie de 300 mm. L'image de l'étoile source se forme alors sur la lentille ce qui minimise les différences de chemin optique entre les différentes portions du front d'onde.

Toutefois la lentille ayant une épaisseur non nulle et l'image de l'étoile guide étant finie, l'influence de cette dernière lentille sur le front d'onde ne peut pas être totalement supprimée. La séparation du faisceau par le dichroïque pose le même problème de façon plus critique encore. Malgré notre volonté de réduire au maximum la différence entre les chemins optiques d'analyse du front d'onde et d'imagerie, il reste des éléments qui peuvent perturber la bonne réussite de l'expérience.

Nous avons caractérisé le miroir dichroïque grâce à l'analyseur de front d'onde et une source à l'infini pour mesurer la déformation du front d'onde qu'il peut apporter, en transmission vers l'analyseur et en réflexion vers la caméra. La figure III.5 montre les fronts d'onde obtenus après transmission ou réfléxion par le dichroïque d'un front d'onde plan étalonné grâce au S-H. Les déformations apportées sont faibles, inférieures à 5 nm en moyenne (écart quadratique moyen). Le rapport de Strehl (cf III.4.1) que l'on obtiendrait si le dichroïque était le seul élément aberrant serait 0,98, ce qui correspond à un système optique très performant. Enfin, des mesures identiques effectuées sur le filtre interférentiel montrent que celui-ci introduit des déformations du front d'onde encore plus faibles.

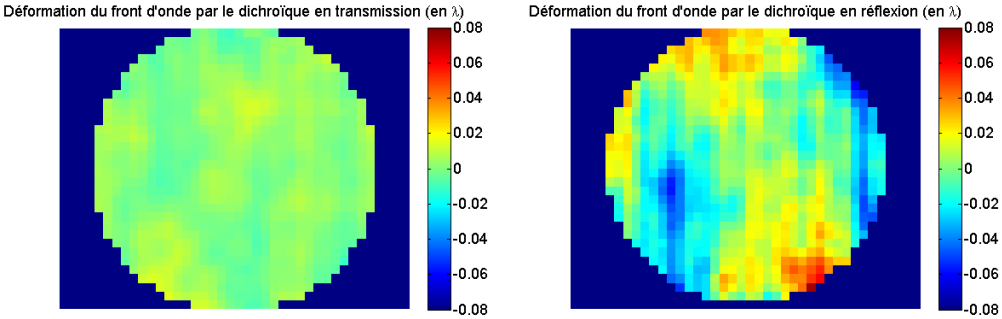


FIGURE III.5 – Carte de déformation des fronts d'onde en transmission ou en réflexion sur le miroir dichroïque, déformations exprimées en unités de longueur d'onde (longueur d'onde correspondante pour la mesure $\lambda = 750\,\text{nm}$).

Dans un premier temps, nous avons donc choisi de négliger les aberrations différentielles qui sont plus faibles que les aberrations générées par le reste du système (qui sont de l'ordre de $\lambda/4$, soit une amplitude moyenne de 100 à 150 nm). Dans la suite, nous verrons comment il est possible d'en tenir compte grâce à un étalonnage précis du système.

### III.2.3 Étoiles artificielles

#### Caractéristiques optiques des étoiles

Intéressons-nous maintenant aux étoiles guides adaptées à notre système. Nous avons besoin de « petites » billes fluorescentes très brillantes absorbant et émettant à des longueurs d'onde différentes de celles de l'échantillon.

La taille maximale des étoiles est principalement imposée par les caractéristiques du Shack-Hartmann, le programme d'analyse des images fournit par celui-ci (développé par Imagine Optic) doit être capable de séparer les images de l'étoile créées par chaque microlentille de la matrice. Ces différentes images ne doivent donc pas se chevaucher. Beverage et al. [15] proposent un critère simple pour estimer la taille maximum des billes : l'image d'une étoile guide doit être plus petite qu'un dixième de la taille des microlentilles :

$$d_{\text{étoile}} \leq \frac{d_{\mu\text{-lentille}}}{10} \frac{f_3 f_{1eq}}{G_{obj} f_{\mu\text{-lentille}} f_2} \tag{III.1}$$

avec : $d_{\text{étoile}}$ le diamètre des billes,

$d_{\mu\text{-lentille}} = 114\,\mu\text{m}$ la taille des microlentilles,

$f_{\mu\text{-lentille}} \sim 3{,}5\,\text{mm}$ la distance focale des microlentilles,

$G_{obj} = 60\times$ le grandissement de l'objectif,

$f_{1eq} = 381\,\text{mm}$ la distance focale équivalente du triplet de lentilles,

$f_2 = 300\,\text{mm}$ la distance focale de la lentille 2,

$f_3 = 70\,\text{mm}$ la distance focale de la lentille 3.

La distance focale des lentilles du S-H a été déterminée à partir des images qu'il fournit, en considérant que la taille des images d'une bille de 1 $\mu$m était limitée par l'ouverture numérique des microlentilles. La formule III.1 s'interpréte simplement : sur la caméra CCD placée derrière la matrice, une zone est allouée à chaque microlentille, dont la surface est égale à la section de cette microlentille. La taille de l'image d'une étoile par une microlentille doit être bien inférieure à la taille du capteur correspondant à cette microlentille. On reconnait dans la formule le facteur de grandissement entre l'image intermédiaire du microscope et l'image sur la CCD du S-H $\frac{f_2 f_{\mu\text{-lentille}}}{f_{1eq} f_3}$ et $G$ le facteur de grandissement entre l'objet et l'image intermédiaire. Le facteur 1/10 choisi est peut-être un peu sévère, mais un choix plus approprié nécessiterait de connaître plus précisément le fonctionnement du programme de localisation des images de billes.

On obtient ainsi un diamètre maximum de l'ordre de 5 $\mu$m, ce qui laisse beaucoup de marge pour réaliser des particules suffisamment brillantes. Ce critère de taille correspond également à la taille d'une PSF dans l'objet, lorsque l'ouverture numérique limitante est celle du Shack-Hartmann.

Pour avoir un signal important, nous avons choisi d'utiliser des quantum dots comme éléments de base de nos étoiles. Ils sont en général plus brillants et résistants que des fluorophores organiques. De plus, il est possible de choisir leur longueur d'onde d'émission sur une gamme très large (de 500 à 1 000 nm) en jouant sur la taille et la composition des QD, tout en préservant une largeur d'émission étroite (de l'ordre d'une cinquantaine de nm). Enfin le large spectre d'absorption permet de trouver facilement une plage d'excitation à laquelle l'échantillon est insensible. Dans un premier temps, nous avons choisi d'utiliser des quantum dots émettant autour de 620 nm car la synthèse de ces quantum dots est bien maîtrisée et fournit des objets brillants et résistants. De plus, cela permet d'utiliser des échantillons fluorescents jusqu'à 580 nm (l'écart minimum entre la longueur d'onde d'émission des étoiles et celle des marqueurs de l'échantillon dépend des capacités de séparation spectrale du filtre dichroïque. Généralement la largeur de la zone de transition entre la bande reflectrice et transmissive d'un filtre dichroïque est de quelques dizaines de nanomètres), ce qui laisse la possibilité d'utiliser de nombreux fluorophores usuels.

### Préparation des étoiles

Les quantum dots seuls ne sont pas suffisamment brillants pour servir d'étoile guide. Pour augmenter le signal, nous avons choisi de les accumuler dans des billes de quelques micromètres de diamètre, facilement dispersables dans l'eau et biocompatibles. Nous avons opté pour des billes de polystyrène, contenant les quantum dots et stabilisées, en milieu aqueux par des surfactants.

Nous avonc choisi de réaliser nos étoiles artificielles à partir de quantum dots CdSe/CdS/ZnS émettant à 620 nm. La synthèse des billes de polystyrène contenant les QD est décrite en annexe B. Ces billes ont une taille très variable mais certaines sont dans la gamme recherchée et sont suffisamment brillantes pour servir d'étoiles

artificielles pour le Shack-Hartmann. Ces billes en solution dans l'eau sont compatibles avec la plupart des échantillons biologiques, et les quantum dots étant très hydrophobes, la diffusion hors du polymère est fortement limitée, ce qui évite une éventuelle toxicité.

Il faut ensuite placer ces billes dans l'échantillon d'intérêt. Dans un premier temps, ces billes sont directement mélangées aux cultures cellulaires lors de la préparation de l'échantillon, en espérant trouver des étoiles correctement positionnées pour la correction. La figure III.6 montre une image de cellules dont la tubuline a été marquée, en présence d'étoiles d'une couleur différente. Dans la suite, il sera nécessaire de travailler sur le marquage de l'échantillon par ces étoiles afin de viser les zones d'intérêt et optimiser leur répartition.

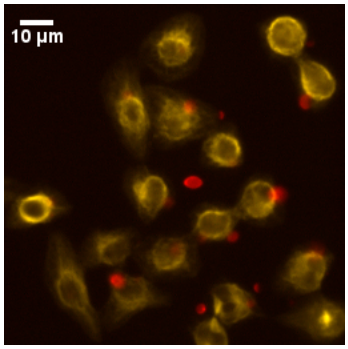


FIGURE III.6 – Exemple d'échantillon de cellules avec la tubuline marquée par l'Alexa 580 et les étoiles artificielles reparties dans l'échantillon.

Maintenant que nous avons les différents éléments nécessaires à la correction d'aberrations, nous allons décrire le protocole d'acquisition d'une image corrigée.

### III.2.4 Protocole d'acquisition des images

Avant de réaliser une première correction, il est nécessaire de réaliser un étalonnage de la boucle de rétroaction entre le Shack-Hartmann et le miroir déformable. Pour que la boucle d'optique adaptative puisse corriger un front d'onde aberrant, il faut que le programme de pilotage connaisse la matrice d'interaction, c'est à dire l'effet des différents actuateurs du miroir déformable sur le front d'onde mesuré par l'analyseur. La mesure de cette matrice se fait en utilisant une étoile guide isolée dans le système, le front d'onde émis étant mesuré en « poussant » ou « tirant » chaque actuateur, en lui appliquant une tension de consigne connue. La matrice d'interaction regroupe ainsi l'influence de chaque actuateur sur le front d'onde. L'inversion de cette matrice fournit une nouvelle matrice qui indique quels sont les actuateurs du miroir déformable à solliciter pour corriger un mode donné du front d'onde. Cela permettra de fermer la boucle d'optique adaptative : à partir de la mesure du front d'onde et donc des différents modes d'aberrations, le programme de contrôle de la boucle connaît les tensions de consigne à appliquer aux actuateurs du miroir pour atteindre un front d'onde plan.

La première étape du protocole de mesure est de trouver dans l'échantillon une zone d'intérêt présentant une étoile de taille et de brillance adéquates et suffisamment isolée pour que le champ illuminé, une fois diaphragmé, ne contienne que cette étoile. On place cette bille au centre du champ et on s'assure que seule l'étoile est éclairée, et non l'échantillon en fermant le diaphragme de champ. On peut ensuite mesurer le front d'onde émis par celle-ci, lorsque le miroir se comporte comme un miroir plan classique. On obtient alors un front d'onde affecté par toutes les aberrations du système optique. La contribution dominante ne provient pas du microscope lui même, mais des composants que nous avons placés entre celui-ci et le S-H. Un front d'onde typique est présenté sur la figure III.7. On peut décomposer ce front d'onde sur la base des polynômes de Zernike qui permet de déterminer quelles sont les imperfections du système optique qui ont généré ce front d'onde aberrant. La figure III.7 B montre la décomposition sur les 25 premiers modes de Zernike correspondant aux aberrations du 3$^{e}$ au 7$^{e}$ ordre [21]. Les trois premiers modes de Zernike ont été écartés, car ils ne sont pas à proprement parler des aberrations (les basculements (modes 1 et 2) sont associés à la position latérale de l'étoile dans le champ et la défocalisation (mode 3) à la sphéricité du front d'onde après la dernière lentille).

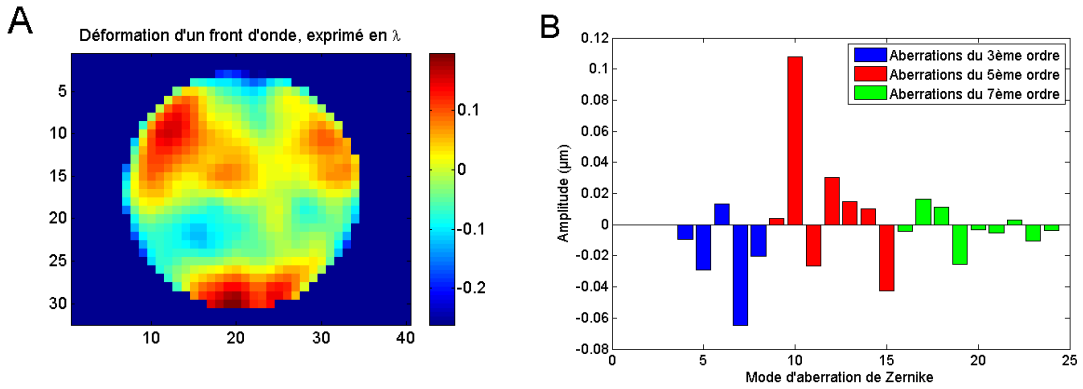


FIGURE III.7 – A : Exemple de carte de front d'onde obtenue pour un échantillon aberrant. B : décomposition des aberrations sur la base des polynômes de Zernike (les trois premiers coefficients (basculements et défocalisation) ne sont pas représentés)

À partir de cette mesure, on peut fermer la boucle d'optique adaptative. On choisit le nombre de modes aberrants que l'on désire corriger (typiquement entre 20 et 50), le programme de contrôle détermine alors l'inverse de la matrice d'interaction nécessaire à la correction. On définit également le gain utilisé pour la correction, qui règle l'amplitude de la correction. S'il est fixé à 1, la boucle tente de corriger le front d'onde en une seule itération. Pour des valeurs proches de 0, il faudra de nombreuses itérations pour atteindre la correction recherchée, les aberrations du front d'onde étant faiblement réduite à chaque itération. Ce gain doit donc être suffisamment grand pour que le système converge en quelques itérations, et suffisamment petit pour éviter la divergence de la correction (due au bruit des mesures). Le programme de correction est lancé et à chaque itération, la forme du

miroir sera modifiée en fonction des aberrations résiduelles du front d'onde mesuré. Cinq à dix itérations sont en général suffisantes pour atteindre une solution stable et satisfaisante (écart quadratique moyenne du front d'onde après correction inférieur à $\lambda/30$). La correction optimale étant déterminée, on peut illuminer l'échantillon et en acquérir une image sur la caméra CCD.

## III.3 Correction et mesure des aberrations sur échantillon test

Nous avons tout d'abord testé notre système sur un échantillon simple : des billes fluorescentes vertes de 200 nm de diamètre (FluoSpheres, Molecular Probes) déposées aléatoirement à la surface d'une lamelle de verre en présence d'étoiles. La configuration d'observation est proche de la configuration idéale car les billes fluorescentes n'induisent pas d'aberrations et se trouvent directement au contact de la lamelle. Dans ces conditions les aberrations observées proviennent essentiellement du montage optique que nous avons installé. Ces billes permettent également de mesurer le gain apporté par la correction des aberrations.

La figure III.8 montre des images de ces billes fluorescentes pour trois formes du miroir. La première (A) correspond au miroir déformable sans aucune tension appliquée, il a alors une forme quelconque (comme une chips), qui génère des aberrations très importantes. L'image B est obtenue avec le miroir plan, en utilisant les caractéristiques déterminées par le constructeur. L'image C est acquise après correction des aberrations mesurées sur une étoile voisine des billes observées. Ceci nous montre surtout que le système optique et le miroir déformable génèrent beaucoup d'aberrations. Pour évaluer honnêtement le gain apporté au microscope par la boucle d'OA, il est donc important de comparer les résultats finaux à ceux obtenus avec une correction préalable des défauts de notre système optique seul. Montrer le gain entre le système avec la boucle d'OA non active et après correction des aberrations est sans intérêt puisque ce système optique, cause essentielle des dégradations, est à l'origine absent du microscope.

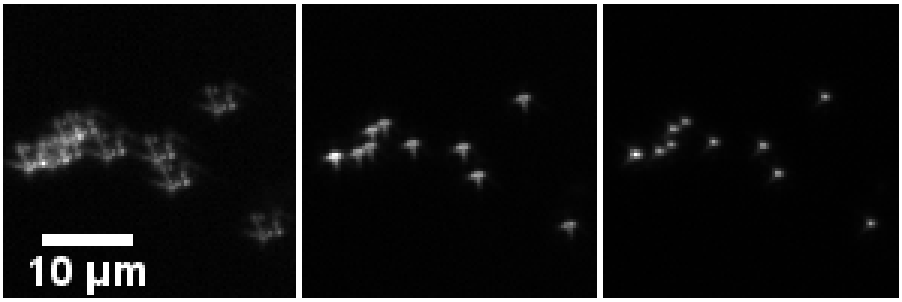


FIGURE III.8 – Images de billes de 200 nm pour différentes configurations du miroir déformable. A : boucle éteinte, forme inconnue, B : miroir plan, C : forme obtenue après correction sur une étoile proche.

En pratique les aberrations apportées par notre système sont automatiquement prises en compte lors de la correction d'un échantillon aberrant mais seule la correction résiduelle supplémentaire est considérée pour l'évaluation des performances. Cette correction intrinsèque du système utilise environ 5 % de la dynamique de déformation du miroir.

Les fronts d'onde représentés sur la figure III.9 permettent de quantifier l'importance de la dégradation du signal par le système optique ainsi que les principales aberrations présentes. En effet, l'échantillon, constitué de billes placées directement au contact de la lamelle, génère des aberrations dont l'amplitude peut être négligée en comparaison de celles apportées par le système.

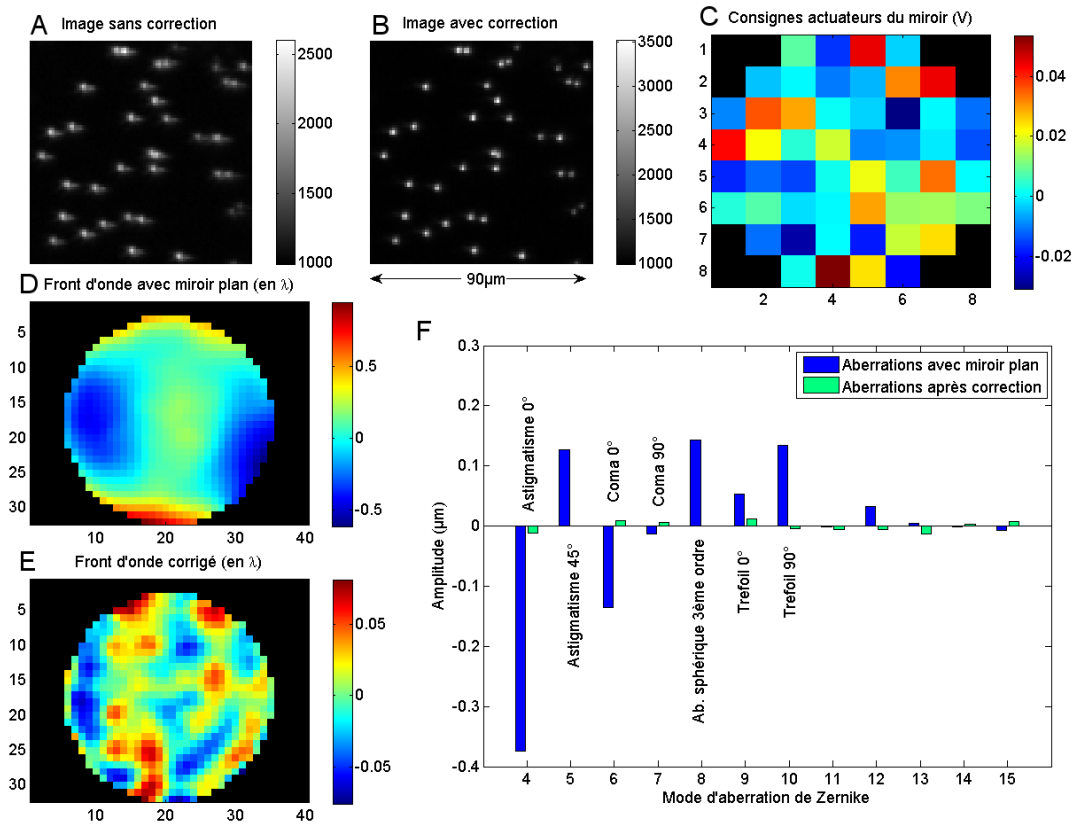


FIGURE III.9 – Correction d'un échantillon test. A et B : Comparaison des images acquises avec un miroir plan (A) et après correction (B). C : Tensions de consigne des actuateurs du miroir déformable (en V) pour l'image corrigée. D et E : comparaison des fronts d'onde issus de l'étoile source avant (D) et après correction (E) (exprimés en $\lambda$). F : amplitude des modes d'aberrations de Zernike dans les fronts d'onde D et E, avant et après correction.

L'image III.9 A obtenue avant correction montre la dégradation qu'engendre notre système optique, puisque le miroir est considéré plan et que l'on est très proche des conditions idéales d'observation. On peut voir d'importantes trainées, qui déforment les images des billes. Le front d'onde mesuré D montre des varia-

tions importantes, de l'ordre de la longueur d'onde. La déformation moyenne (écart quadratique moyen) de ce front d'onde vaut $0,25\lambda$. Le rapport de Strehl associé à un tel front d'onde est 0,094, ce qui est très faible (l'approximation utilisée pour l'estimer n'est d'ailleurs plus vraiment valable). La figure F montre l'amplitude des aberrations (en µm) correspondant aux fronts d'onde présentés, on voit que notre montage génère principalement des aberrations d'ordre faible comme de l'astigmatisme (principalement généré par la présence de miroirs dichroïques), de la coma (probablement dûe à des défaults d'alignement d'éléments optiques dans notre système) et de l'aberration sphérique (utilisation des lentilles dans des configurations de conjuguaison qui ne sont pas optimales compte tenu de leurs formes et épaisseur de lamelle différente de la valeur nominale).

On peut comparer ces données à ce qui est obtenu après correction (B) (des 30 premiers modes d'aberration). On retrouve des images de billes dont la largeur à mi-hauteur est de l'ordre d'un pixel (la PSF théorique a un diamètre inférieur à deux pixels) et qu'il est difficile de mesurer précisément (cf III.4.1). L'intensité des images de billes est également fortement augmentée. L'image C représente les tensions appliquées aux actuateurs du miroir déformable qui permettent de corriger les aberrations du système. Ces tensions sont comprises entre $-31\,\mathrm{mV}$ et $+54\,\mathrm{mV}$, alors que les tensions maximales applicables sont de $\pm 1\,\mathrm{V}$. 5 % de la dynamique du miroir suffisent à compenser les aberrations du montage, laissant la possibilité de corriger des échantillons bien plus aberrants.

Le front d'onde mesuré après correction (E) montre une importante réduction des aberrations. Les variations résiduelles sont dues à des aberrations d'ordre élevé que le miroir est incapable de corriger (la limite pratique du nombre de modes que le système peut corriger est imposée par le nombre d'actuateurs qui permettent de déformer le miroir. Notre miroir dispose de 52 actuateurs). La valeur moyenne (écart quadratique moyen) du front d'onde vaut $0{,}028\lambda$ après correction, soit quasiment une réduction d'un facteur 10. Le rapport de Strehl correspondant est alors 0,97, ce qui est considéré comme très bon pour un système d'imagerie. Enfin la quantification des modes de Zernike montre que les amplitudes de toutes les aberrations du système sont ramenées à des niveaux très faibles, du même ordre que les aberrations d'ordre supérieur.

Notre système d'optique adaptative déteriore donc les performances du microscope par rapport à un microscope classique utilisé dans la configuration pour laquelle il a été conçu. Mais l'activation de la boucle d'optique adaptative compense cette dégradation en utilisant seulement 5 % de la dynamique du miroir. Il sera donc possible de corriger des aberrations supplémentaires provenant d'une mauvaise configuration ou de l'échantillon.

## III.4 Caractérisation de l'efficacité de correction

Nous venons de voir que le système d'optique adaptative mis en place permet d'estimer et de corriger les aberrations du système. Nous allons maintenant carac-

tériser l'efficacité de cette correction en fonction du champ et du nombre de modes corrigés.

### III.4.1 Étendue de la zone corrigée

La correction du front d'onde est obtenue grâce à l'utilisation de l'analyseur de front d'onde, qui corrige les aberrations générées entre l'étoile guide et le S-H. Cela n'implique pas nécessairement une amélioration des images acquises à la caméra. Nous avons toutefois constaté une amélioration visuelle des images de billes de la figure III.9 qu'il reste à estimer. Dans un premier temps, nous allons déterminer l'efficacité de correction en fonction du champ. Il faut définir un critère qui reflète la quantité d'aberrations résiduelles après correction directement sur les images acquises par la caméra CCD. Nous avons opté pour une méthode de mesure qui utilise les billes fluorescentes de 200 nm de l'échantillon test. En effet des billes de cette taille se comportent quasiment comme des points sources, et les images des billes sont proches de la PSF. En acquérant des images de ces billes réparties dans le champ, il est possible d'estimer la différence entre une image de bille réelle et une image de bille parfaite (sans aberrations) en utilisant le rapport de Strehl.

#### Évaluation de la correction : le rapport de Strehl

Le rapport de Strehl $S$ est un indicateur de la qualité d'un système optique. Il est égal, à intensité totale identique, au rapport entre l'irradiance (où éclairement) maximale dans l'image d'un point en présence d'aberrations à cette même valeur en absence d'aberration. La figure III.10 illustre la signification du rapport de Strehl.

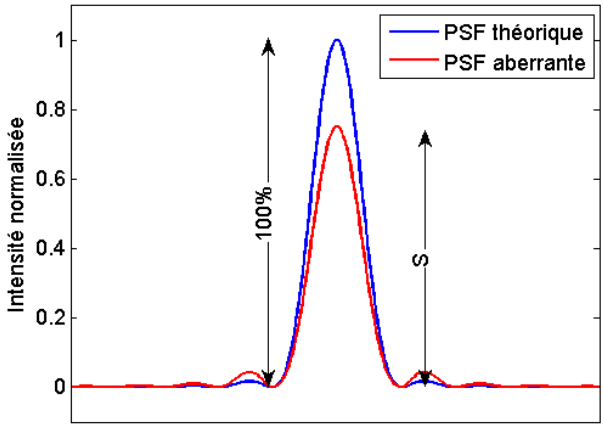


FIGURE III.10 – Signification du rapport de Strehl (S).

Cette mesure simple peut être associée à une mesure de la déformation moyenne du front d'onde, par la formule suivante :

$$S \approx e^{-(2\pi\sigma_w)^2}, \tag{III.2}$$

où $\sigma_w$ est l'écart quadratique moyen du front d'onde, exprimé en unités de longueur d'onde [21]. Cette approximation est valable tant que le rapport de Strehl est supérieur à 0,1. Ainsi d'après le critère de Maréchal [21], un rapport de Strehl supérieur à 0,8, considéré comme satisfaisant pour un système d'imagerie, correspond à un écart quadratique moyen du front d'onde de $\frac{\lambda}{14}$.

La mesure de ce rapport de Strehl est toutefois plus complexe que sa définition ne le laisse croire. En effet de nombreuses approximations peuvent fournir des estimations du rapport de Strehl très variables, comme le démontrent Roberts et al. [22]. Pour réduire les erreurs de mesure, il faut disposer d'un échantillonnage spatial avec une période plus petite que le rayon de la PSF, et prendre en compte l'effet de la pixellisation (échantillonnage et intégration sur la surface des pixels).

### Mesure de la zone corrigée pour des échantillons peu aberrants

Pour étudier l'efficacité de correction dans le champ, nous devons donc acquérir des images d'un échantillon de billes de 200 nm réparties aléatoirement, comme les images présentées dans la figure III.9.

Afin de mesurer le rapport de Strehl, nous avons remplacé la caméra CCD Roper par une caméra disposant de pixels de taille inférieure (6,45 $\mu$m contre 16 $\mu$m), afin d'avoir un échantillonnage suffisant. Avec cette nouvelle caméra nous obtenons des images de billes d'environ quatre pixels de diamètre (contre deux avec la caméra précédente).

Nous avons ensuite mis au point un programme d'estimation du rapport de Strehl pour les différentes billes détectées dans le champ prenant en compte :

- la taille des billes dans l'estimation de la PSF réelle ;
- la position centrale de la bille avec une précision inférieure au pixel ;
- la pixellisation.

Le programme compare l'intensité du pixel le plus brillant de l'image obtenue par rapport à la valeur simulée en prenant en compte les corrections précédentes. On peut ainsi estimer le rapport de Strehl de nombreuses billes dans le champ d'observation, comme l'illustre la figure III.11, et étudier la variation des aberrations en fonction du champ et notamment de la distance à l'étoile guide.

Sur l'image A on peut voir que suivant la distance à l'étoile guide, les images de billes sont plus ou moins étalées. Ceci correspond effectivement à des rapports de Strehl variables, comme le montre la carte B. Le rapport de Strehl est maximal (entre 0,95 et 1) près de l'étoile guide au centre et il diminue lorsqu'on s'en éloigne. Une moyenne radiale sur 140 billes permet de caractériser cette décroissance, malgré les importantes variations des mesures individuelles. Ces variations ont deux origines. D'une part l'estimation des rapports de Strehl individuels souffre d'une incertitude de 5 à 10 % [22]. D'autre part les aberrations dépendant du trajet optique, elles ne sont pas nécessairement symétriques par rapport à l'axe optique du microscope, d'où des variations parfois importantes dans le champ d'observation.

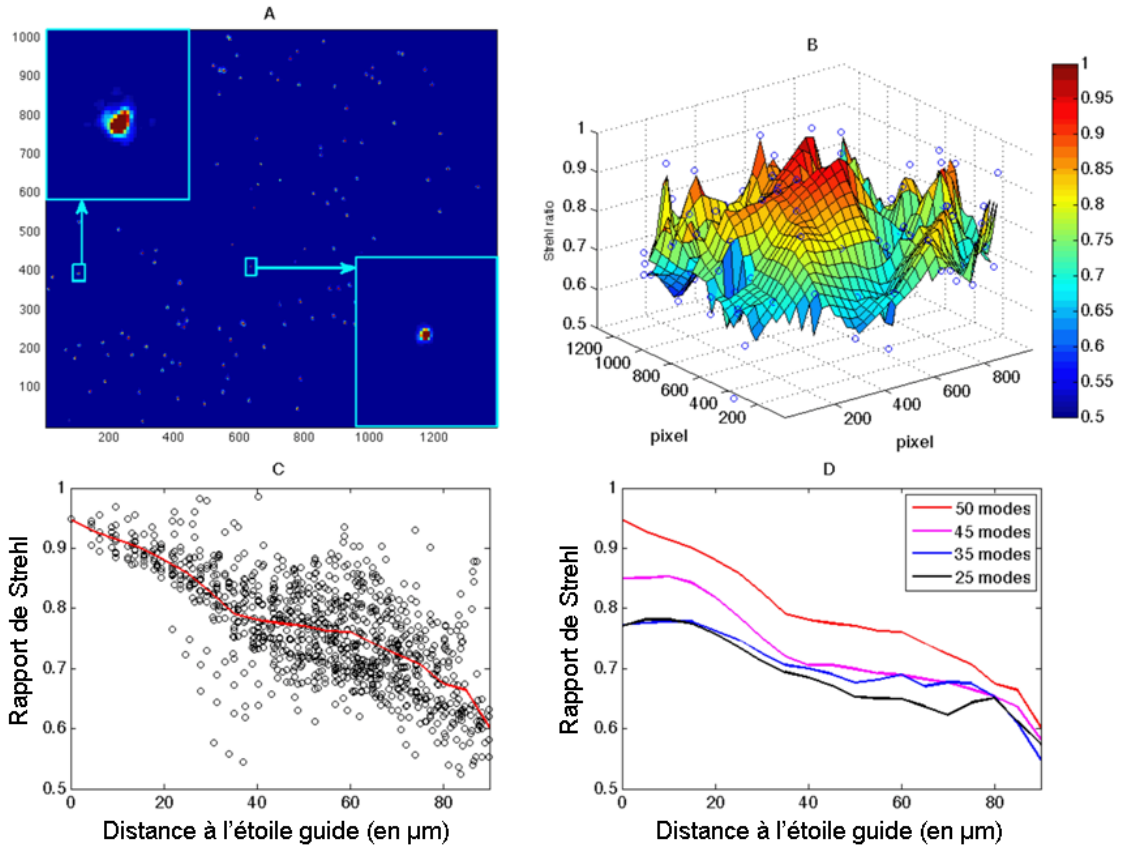


FIGURE III.11 – Variation de l'efficacité de correction en fonction du champ. A : image de billes après correction (champ de 136x177 $\mu m^2$), les encarts représentent des billes individuelles à environ 10 $\mu$m (bas droite) et 50 $\mu$m (haut gauche) de l'étoile guide, B : carte du rapport de Strehl dans le champ, C : Variation du rapport de Strehl avec la distance à l'étoile guide, répartition des mesures individuelles et moyenne radiale, D : comparaison des efficacités de correction avec la distance à l'étoile guide, en fonction du nombre de modes corrigés.

Enfin la figure D représente l'efficacité de correction pour différents nombres de modes corrigés. Ces modes correspondent aux vecteurs propres de la matrice d'interaction déterminés par la boucle d'optique adaptative, au cours de l'étalonnage. Ils correspondent aux modes de déformation du miroir qui ont le plus d'effet sur le front d'onde. Les premiers modes correspondent à des formes du miroir de basses fréquences spatiales, qui corrigent des ordres d'aberration faibles. Les modes d'ordre élevé, de plus hautes fréquences spatiales, sont plus difficiles à imposer au miroir, car deux actuateurs voisins peuvent avoir des effets opposés sur la membrane du miroir. Cela peut nécessiter une dynamique trop importante pour le miroir déformable, et aboutir à la divergence de la correction.

On remarque que plus on corrige de modes, meilleur est le rapport de Strehl au centre de l'image, ce qui correspond à la correction de plus d'aberrations. Les premiers modes corrigent des aberrations d'ordre faible avec une longueur de corrélation

dans le champ importante, alors que les modes d'ordre élevé ont un effet local. Le rapport de Strehl atteint ainsi une valeur proche de $0,96 \pm 0,04$, ce qui est bien en accord avec la valeur dérivée des variations du front d'onde mesuré ($\sigma_w = 0,033\lambda$, d'où $S_{S-H} = 0,957$).

Finalement, on peut quantifier la taille de la zone corrigée en utilisant le critère de Maréchal [21], c'est à dire un écart-type quadratique moyen du front d'onde inférieur à $\frac{\lambda}{14}$, soit un rapport de Strehl égal à 0,82. Dans le cas d'une correction avec 50 modes, la zone effectivement corrigée est un disque d'environ 30 $\mu$m de rayon, centré sur l'étoile guide (pour un microscope avec un objectif plan apochromatique utilisé dans sa configuration optimale, cette zone peut s'étendre jusqu'à un rayon de 85 % du rayon du champ d'observation [1]). Ceci est uniquement valable si les aberrations sont faibles et homogènes. Pour des échantillons plus aberrants l'étendue de la zone corrigée sera probablement plus faible.

Le champ total accessible sur la caméra étant d'environ 170 $\mu$m de côté, on ne pourra pas obtenir une image bien corrigée pour tout le champ à partir d'une seule étoile guide, au centre du champ. Pour augmenter le champ de vision corrigé, il est nécessaire d'utiliser plusieurs étoiles comme nous allons le voir par la suite.

### III.4.2 Influence du nombre de modes corrigés

Nous avons étudié l'influence du nombre de modes utilisés sur l'efficacité de correction et la dynamique du miroir utilisée. Pour un champ et une étoile donnés, nous avons déterminé la correction à appliquer pour un nombre de modes variable, puis nous avons estimé la dynamique du miroir utilisée et le rapport de Strehl obtenu via l'écart quadratique moyen du front d'onde fourni par le Shack-Hartmann. Les résultats sont donnés sur la figure III.12. On constate que les premiers modes, qui correspondent à des aberrations introduites par des défauts du système optique (défauts d'alignement et d'orientation des composants, etc.) dominent le poids total des aberrations. Malgré cela, on doit noter que la correction de ces modes ne nécessite que 5 % de la dynamique du miroir, comme nous l'avons vu précédemment. Si on veut corriger plus de modes, il est nécessaire d'utiliser une plus grande dynamique du miroir, qui peut devenir importante (23 % pour 50 modes corrigés). Toutefois les aberrations d'ordre élevé associées à ces modes étant généralement plus faibles que celles d'ordre faible (cf figure III.9), l'augmentation du rapport de Strehl qui leur est associé est faible.

Il ne sera donc pas toujours avantageux d'utiliser un grand nombre de modes pour avoir une bonne correction. Le nombre de modes nécessaires à la correction des aberrations introduites par notre système est 20, si on fixe comme critère de qualité de l'image un rapport de Strehl de l'étoile guide égal à 0.8. Le choix du nombre de modes à considérer dépendra des aberrations supplémentaires introduites par l'échantillon.

Ces caractérisations de notre système nous permettent de mieux appréhender son fonctionnement, ses possibilités et ses limitations. La principale limitation est

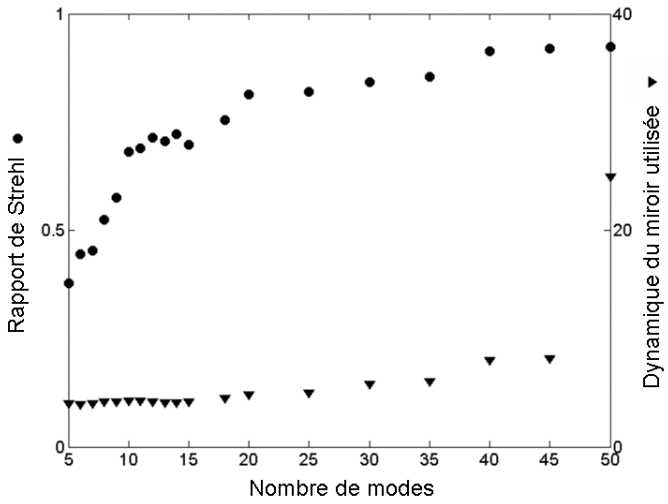


FIGURE III.12 – Influence du nombre de modes de correction. Rond : rapport de Strehl obtenu à partir du front d'onde de l'étoile guide (échelle de gauche). Triangle : dynamique du miroir utilisée (échelle de droite).

le faible champ de vue effectivement corrigé efficacement ($\sim 60\,\mu$m de diamètre au maximum pour un échantillon peu aberrant avec un objectif 60× ($ON = 1,2$) et un champ total de $170\,\mu$m sur la caméra). Nous allons maintenant voir comment modifier nos système et protocole pour obtenir une image corrigée sur un champ plus important.

# III.5 Augmentation de l'étendue de la zone corrigée

La correction du front d'onde d'une seule étoile artificielle ne permettant d'améliorer la qualité d'imagerie que sur une faible portion du champ, la solution qui nous a paru la plus simple pour agrandir la zone corrigée est d'utiliser plusieurs étoiles et de réaliser des corrections successives pour différentes zones de l'échantillon. Pour chaque étoile, nous allons réaliser le même protocole que précédemment (mesure du front d'onde aberrant, correction, acquisition d'une image de l'échantillon). Il faut donc préalablement repérer et isoler les différentes étoiles d'intérêt, ce qui nécessite de modifier le montage. Enfin, nous verrons comment créer une image composite associant les différentes images corrigées.

## III.5.1 Adaptation de l'instrument à la correction multiétoile

Pour corriger les aberrations à partir d'une constellation d'étoiles, il faut pouvoir illuminer individuellement et séquentiellement les différentes étoiles réparties dans le champ. Nous ne pouvons donc plus utiliser une source lumineuse plein champ. Nous avons choisi d'utiliser une source laser, focalisée dans l'échantillon que l'on peut balayer dans le champ. Pour bien séparer spectralement l'excitation et l'émission

des étoiles et de l'échantillon, la longueur d'onde d'émission des étoiles a été décalée vers l'infrarouge, avec l'utilisation de nouveaux QD.

### Synthèse des étoiles guides

Nous utiliserons désormais des nanocristaux de semi-conducteurs ou quantum dots CdTeSe/CdZnS, émettant autour de 800 nm, que nous excitons avec un laser à 675 nm. Ces quantum dots étant moins brillants que les précédents, nous avons dû tester plusieurs protocoles de fabrication (décrits en annexe B) pour obtenir des étoiles répondant aux critères définis au III.2.3.

La préparation des étoiles qui est actuellement utilisé repose sur l'adsorption de quantum dots à l'intérieur de billes poreuses. Cette synthèse permet de charger efficacement les billes de quantum dots [23, 24]. Les premiers résultats sur ces billes sont prometteurs, mais il est nécessaire de vérifier que les étoiles seront observables suffisamment longtemps pour déterminer la correction adaptée (environ 10 mesures de front d'onde successives).

### Illumination et détection des étoiles

Pour illuminer séparément l'échantillon d'intérêt et les étoiles, nous avons mis en place une double illumination, comme schématisée sur la figure III.13. Parallèlement à la lampe de fluorescence à spectre large classique, nous avons installé un laser à 675 nm, ainsi que des miroirs galvanométriques pour déplacer le laser dans l'échantillon. Le faisceau laser passe dans le chemin optique d'illumination au niveau du miroir de renvoi à l'arrière du microscope, qui a été remplacé par un miroir dichroïque approprié. Le système a été réglé pour que le faisceau laser ait un diamètre de l'ordre de 5 $\mu$m dans le plan focal du microscope. On a ainsi un faisceau laser focalisé dans l'échantillon, dont la position peut être contrôlée grâce aux miroirs galvanométriques. Il nous reste maintenant à détecter la position des étoiles d'intérêt.

Pour cela, nous avons ajouté une caméra au montage optique. Cette caméra, placée derrière un miroir transmettant 2 % de la lumière et équipée d'un filtre passe-haut à 700 nm, est sensible à la fluorescence des étoiles. Ainsi au début d'une mesure, nous réalisons une cartographie des étoiles en balayant le laser à travers l'échantillon et en récoltant la fluorescence des billes sur la caméra. Le traitement de cette image permet de repérer les étoiles d'intérêt et fournit leurs positions. En focalisant le laser sur ces billes, on peut illuminer séparément et séquentiellement chaque étoile guide.

Pour réaliser ce second montage, il a été nécessaire d'ajouter des élements entre la caméra dédiée à l'échantillon et le S-H. Ceux-ci peuvent apporter des aberrations différentielles que l'on peut corriger grâce à un étalonnage préalable de l'expérience.

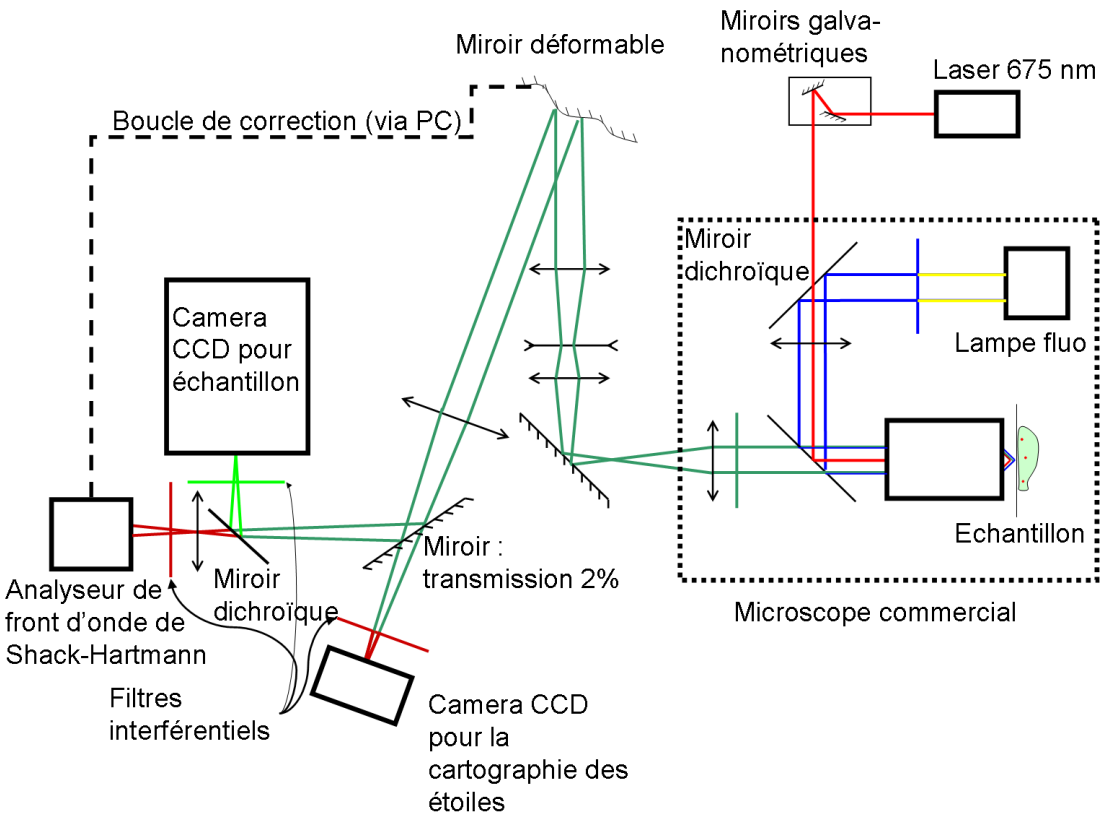


FIGURE III.13 – Schéma du montage d'optique adaptative pour la configuration multiétoile.

### Aberrations différentielles

Le montage présenté sur la figure III.13 montre que nous avons dû placer des éléments entre le Shack-Hartmann et la caméra CCD dédiée à l'échantillon (un filtre interférentiel devant la caméra, le miroir dichroïque, la lentille de +70 mm et deux filtres intérférentiels devant le Shack-Hartmann). Tous ces éléments induisent des modifications du front d'onde différentes dans le chemin optique menant au S-H et dans celui emprunté par le signal destiné à la caméra. Nous avons vu au paragraphe III.2.2 que ces éléments ont un effet faible si on les considère séparément, mais le nombre élevé (5) d'éléments différents peut générer une dissymétrie importante des chemins optiques (notamment le dichroïque initialement utilisé générait particulièrement peu d'aberrations). Ces aberrations différentielles doivent donc être prise en compte. Cela nécessite une calibration préliminaire du système ; il faut obtenir une image parfaitement corrigée d'un objet sur la caméra CCD et enregistrer le front d'onde correspondant sur le Shack-Hartmann. Ce front d'onde décrit les aberrations différentielles du système. Pour les compenser lors du processus de correction, au lieu de tendre vers un front d'onde plan, on assignera le front d'onde précédent comme cible.

La mesure de ce front d'onde cible est effectuée en utilisant un algorithme gé-

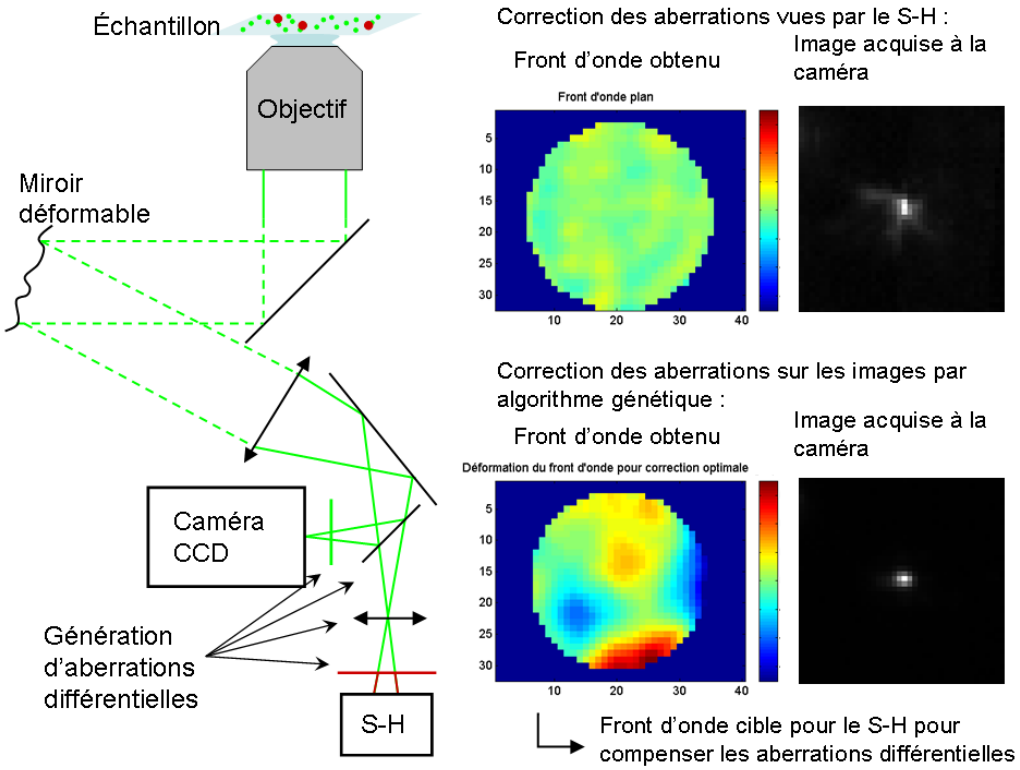


FIGURE III.14 – Principe de la correction des aberrations différentielles : elles sont induites par la différence de chemin optique entre la caméra et le Shack-Hartmann (montage simplifié à gauche). Lorsque le front d'onde provenant d'une étoile guide est parfaitement corrigé, l'image de l'échantillon obtenue sur la caméra est encore dégradée par des aberrations. Un algorithme génétique permet de déterminer la correction adaptée pour supprimer les aberrations du front d'onde vu par la caméra. Le front d'onde mesuré au S-H peut ensuite servir de cible pour la suite des mesures. Celui-ci caractérise les aberrations induites par les éléments entre la caméra et le S-H (échelles de couleur en unités arbitraires mais identiques pour les deux fronts d'onde).

nétique sur les billes fluorescentes vertes de 200 nm qui nous servent d'échantillon test (cf figure III.14). Il faut trouver une bille verte à proximité d'une étoile. On exécute alors un algorithme génétique pour trouver la configuration optimale du miroir permettant d'obtenir des images de billes parfaitement corrigées (en pratique, l'intensité des billes dans l'image est maximisée, ce qui correspond à un rapport de Strehl maximum et donc à des aberrations minimales). Une fois cette forme du miroir déterminée, on mesure au S-H le front d'onde émis par l'étoile voisine. Les aberrations résiduelles de celui-ci sont caractéristiques des aberrations générées par les éléments optiques entre la caméra et le Shack-Hartmann. Il faut cependant s'assurer que la dépendance de ces aberrations résiduelles avec la position dans le champ est négligeable. Comme aucun des éléments générant ces aberrations dissymétriques n'est placé dans un plan conjugué de la pupille du système, les aberrations différen-

tielles n'ont aucune raison d'être constante dans tout le champ.

On peut à présent acquérir les images de l'échantillon, après correction de chaque étoile détectée. Il faut ensuite reconstruire l'image corrigée finale.

### III.5.2 Reconstruction d'images corrigées composites

Chaque image de l'échantillon est acquise avec une correction différente, efficace pour un champ d'observation limité. Il faut donc fusionner ces informations en une image tirant au mieux parti de l'information présente dans les différentes images obtenues pour chaque étoile.

Nous avons vu que l'efficacité de correction diminue avec la distance à l'étoile de référence. Dans un premier temps, nous avons donc simplement gardé pour chaque pixel de l'image finale le pixel provenant de l'image corrigée avec l'étoile la plus proche. Cette reconstruction est obtenue en utilisant un diagramme de Voronoï construit à partir des positions des étoiles guides utilisées. Le principe de reconstruction est illustré par la figure III.15.

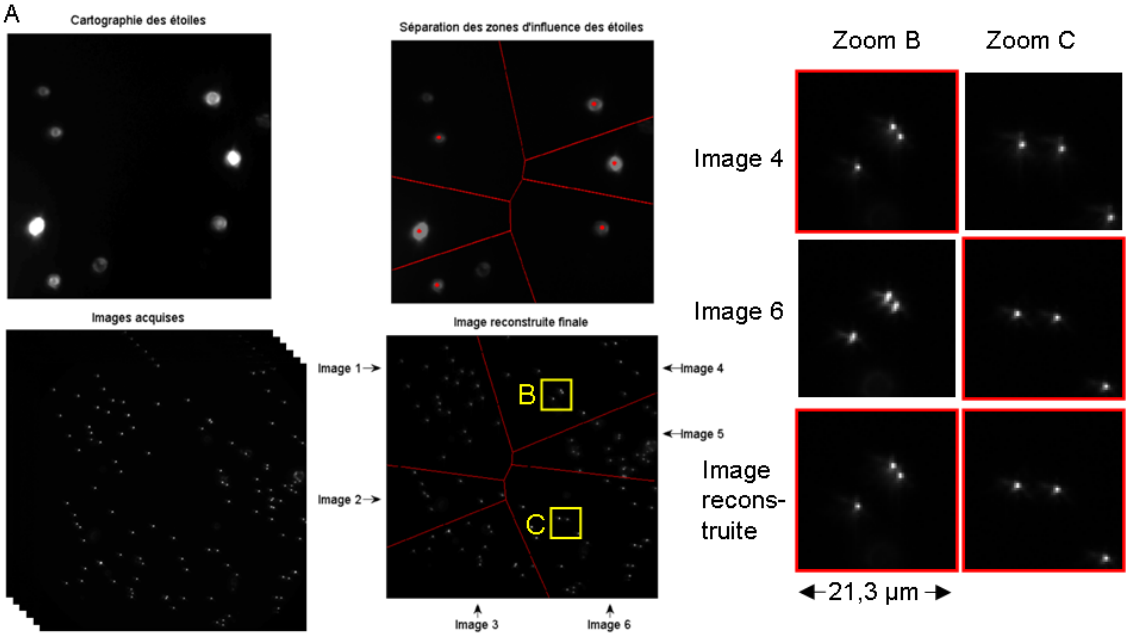


FIGURE III.15 – A) Schéma de la reconstruction des images corrigées composites, en multiétoile. B et C) Agrandissement des images corrigées pour deux régions du champ. Les images sont encadrées en rouge lorsque la correction a été déterminée à partir de l'étoile la plus proche des billes représentées. L'image reconstruite intégre ces corrections.

Cette méthode de reconstruction a l'avantage d'être simple à mettre en place et de minimiser la distance entre les pixels affichés et les étoiles artificielles. Elle est bien adaptée dans le cas d'objets ponctuels, comme les billes des échantillons tests car ils ne sont imagés que sur quelques pixels. En revanche, si l'on observe des échantillons

étendus l'image finale risque de juxtaposer des images originales décalées (décalage latéral induit par la correction ou différence de correction à distance des étoiles guides, par exemple) et donc de faire apparaître des discontinuités.

Pour résoudre ce problème, plusieurs solutions sont envisageables. Si les objets d'intérêt sont étendus mais séparés, on pourrait prendre en compte une étape de segmentation des images avant d'appliquer la reconstruction décrite précédemment. On pourrait également déterminer une correction moyenne à partir des différentes mesures d'aberrations à travers le champ, qui soit valable pour tout le champ, au risque d'avoir une correction plus faible voire insuffisante sur un champ large (cf paragraphe III.7.2).

Cette technique a donné des premiers résultats encourageants, sur un échantillon test constitué de billes de 200 nm de diamètre (figure III.15). Les images B et C permettent de voir que la correction est adaptée pour une seule des deux positions dans les images 4 et 6 (images encadrées en rouge). Cette correction adaptée est intégrée dans l'image reconstruite finale. Il reste à caractériser précisément l'amélioration obtenue en fonction du champ et à tirer parti des mesures d'aberrations à travers le champ de vue.

## III.6 Application à un échantillon biologique

Avant de passer aux perspectives que l'on peut envisager pour cette technique d'optique adaptative, nous allons voir un premier résultat d'utilisation avec un échantillon biologique.

Nous avons appliqué la première méthode de correction à partir d'une seule étoile à un échantillon composé de cellules Hela fixées dont la tubuline était marquée par de l'Alexa488.

La préparation de l'échantillon est la même que pour un échantillon classique, la seule différence est l'injection des étoiles artificielles avant de monter et fixer les cellules. Il faut bien évidemment maîtriser la concentration de ces étoiles pour réussir à isoler aisément des zones d'intérêt. Les étoile guides étant ajoutées après les cellules, elles se placeront au dessus de celles-ci, c'est à dire que la fluorescence provenant des billes traversera l'échantillon avant de se propager à travers le système optique.

Pour bien visualiser l'effet de la cellule sur le front d'onde, nous avons comparé la correction obtenue sur une cellule à partir d'une étoile, à la correction du système déterminée grâce à une étoile déposée directement au contact de la lamelle. Le protocole d'acquisition est donc le suivant :

- recherche d'une étoile guide déposée directement sur la surface de la lamelle et correction de celle-ci pour compenser les aberrations du système (correction avec 50 modes, 20 % de la dynamique du miroir utilisée, rapport de Strehl final 0,98) ;
- recherche d'une étoile artificielle derrière une cellule, acquisition du front d'onde aberrant (rapport de Strehl de 0,73) et d'une image de l'échantillon ;

– correction des aberrations sur cette étoile (50 modes, 34 % de la dynamique du miroir, rapport de Strehl de 0,99) et acquisition d'une image de l'échantillon.

Le temps d'exposition était fixé à 100 ms pour les images de l'échantillon et entre 50 et 100 ms pour la mesure de front d'onde. La correction nécessitant moins de 10 itérations de la boucle d'OA, une solution stable est généralement obtenue en moins de 5 s.

Le système permet donc de corriger les aberrations générées par l'échantillon, comme le confirment les fronts d'onde et la quantification des aberrations obtenus après correction du système seul ou du système et de la cellule (figure III.16). Toutefois pour que cette technique ait un intérêt, il faut vérifier l'amélioration de l'image acquise. Comparons donc les images de cellules obtenues (figure III.17 A et B). L'image de gauche (A) a été obtenue avec la correction du montage, l'image de droite (B) avec la correction déterminée sur l'étoile dont la position est indiquée par la flèche. À première vue ces images sont identiques, car les aberrations générées par la cellule sont faibles. Toutefois en regardant plus attentivement, on peut voir que certains zones sont un peu plus brillantes et mieux définies dans la seconde image, c'est notamment le cas au niveau du pont mitotique entre les deux cellules en fin de division.

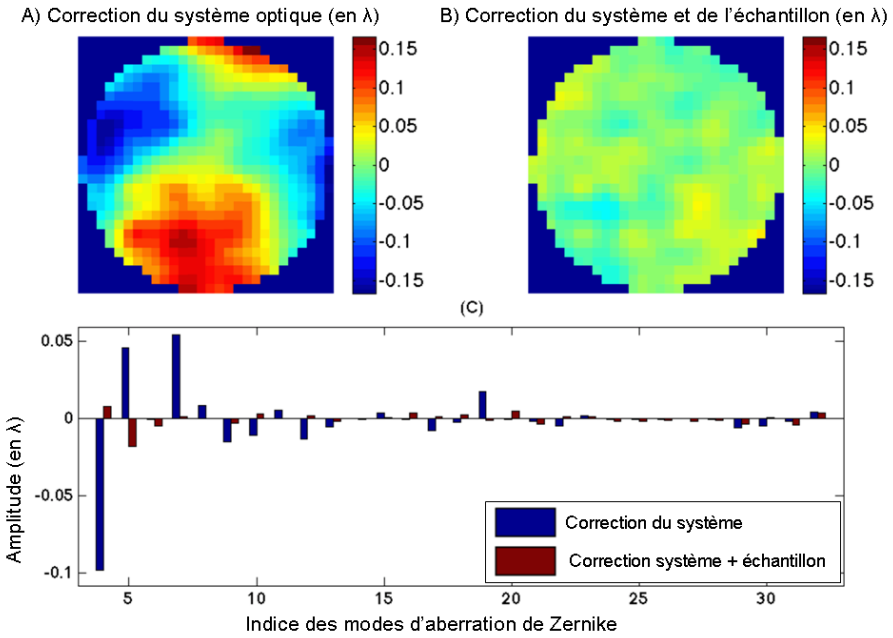


FIGURE III.16 – Comparaison des fronts d'onde et de leurs aberrations avant et après correction des aberrations induites par une cellule.

Ceci est confirmé par la figure III.17 C qui représente la moyenne radiale de la densité spectrale de puissance des images précédentes (carré du module de la transformée de Fourier) en échelle logarithmique. Les composantes basses fréquences sont

les mêmes entre les deux images car les faibles aberrations apportées par la cellule affecteront principalement les hautes fréquences de l'image. Par contre les hautes fréquences sont renforcées après correction. Cette technique ne permet cependant pas de dépasser la fréquence de coupure du microscope, car l'optique adaptative corrige les aberrations uniquement à l'intérieur de la pupille du microscope sans l'étendre.

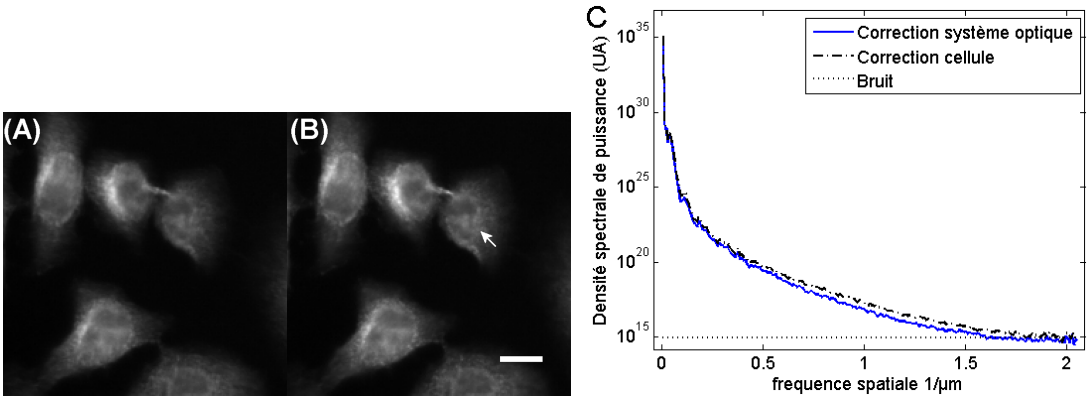


FIGURE III.17 – A et B : cellules avec la tubuline marquée par l'Alexa488 (A) avec correction du système optique, (B) avec correction du système et d'une cellule, déterminée sur l'étoile dont la position est indiquée par la fléche. Barre d'échelle 10 $\mu$m. C : moyenne radiale de la densité spectrale de puissance (en unité arbitraire et en échelle logarithmique) en fonction de la fréquence spatiale pour les deux images.

Cet échantillon biologique simple et peu aberrant nous montre donc que l'on peut espérer un gain en imagerie biologique, il reste maintenant à le démontrer pour des objets plus aberrants afin d'évaluer les capacités de correction de notre système (gel d'agarose épais, *C. elegans*...).

# III.7 Perpectives

Les résultats obtenus grâce à ce montage montrent la possibilité de corriger efficacement des échantillons simples. Il faut maintenant caractériser des échantillons plus aberrants et vivants. Des modifications du montage optique et de la procédure de correction sont envisagés pour améliorer les performances de cette technique.

### III.7.1 Caractérisation et observation d'échantillons vivants

La suite directe des résultats présentés est la caractérisation précise de la correction multiétoile, notamment en fonction du champ (variation des aberrations différentielles et de celles générées par le système). Il faut également caractériser l'efficacité de la correction multiétoile, et vérifier que notre méthode d'assemblage des images corrigées par des polygones de Voronoï ne produit pas d'artefacts de reconstruction (recollement de portions d'images acquises séparément par exemple).

Enfin, il faut tester notre système sur des échantillons biologiques épais. Nous avons déjà vu des échantillons qui peuvent aisément s'y prêter (*C. elegans*, disques imaginaux de drosophiles...). Toutefois cela soulève deux difficultés. La première est le marquage avec les étoiles artificielles, qui doivent être placées au plus près de la zone d'intérêt dans l'échantillon. Il est donc nécessaire d'imaginer des stratégies de marquage plus efficace qu'un répartition aléatoire des étoiles. La seconde difficulté est la reconstruction des images finales pour un marquage étendu. Il est difficile de déterminer la meilleure stratégie sans connaître le comportement du système, mais il sera nécessaire de développer une méthode robuste et versatile pour cette reconstruction.

### III.7.2 Optique adaptative multiconjuguée

Une autre perspective à plus long terme est le développement d'un système d'optique adaptative multiconjuguée. Notre système d'optique adaptative étant inspiré des techniques développées en astronomie, il est intéressant de suivre les avancées récentes dans ce domaine pour en faire bénéficier notre système. Un de ces développements est la multiconjugaison, c'est à dire l'utilisation de plusieurs miroirs déformables conjugués de différents plans, associée à plusieurs mesures de fronts d'onde provenant de plusieurs étoiles. Cette technique est très efficace pour corriger des champs plus important que la méthode classique, et quelques étoiles et miroirs déformables sont généralement suffisants [25–27].

Avec notre montage multiétoile, nous avons directement accès à la mesure des aberrations provenant de plusieurs étoiles (dans un premier temps, il n'est pas nécessaire d'avoir plusieurs Shack-Hartmann car nous observons des échantillons dont les aberrations ont une dynamique temporelle faible voire nulle). Une collaboration avec des spécialistes des algorithmes associés pourrait nous permettre de tirer le meilleur parti de nos mesures, même si la géométrie du système et les aberrations y sont très différentes. L'ajout d'autres miroirs déformables dans le système, conjugués de différents plans permettrait également de compenser efficacement les différents sources d'aberrations [28].

### III.7.3 Cartographie des aberrations et tomographie

La méthode de correction que nous avons développée est basée sur la mesure du front d'onde provenant d'étoiles guides, réparties dans l'échantillon. Cela nécessite donc de préparer l'échantillon spécifiquement dans ce but, ce qui peut être complexe pour différentes raisons (taille et toxicité des étoiles, échantillon fragile...). Il serait donc intéressant d'utiliser des billes qui ne sont plus directement dans l'échantillon, mais dont la lumière traverse l'échantillon avant d'être captée par le S-H. Ceci est possible en utilisant des étoiles disposées au delà de l'échantillon, par rapport à l'objectif (figure III.18). Le schéma C montre que le front d'onde mesuré a été déformé par la traversée d'une portion de l'échantillon.

Les fronts d'onde émis par différentes étoiles réparties dans l'échantillon seront affectés différemment par l'objet aberrant d'intérêt. Chaque mesure donne accès à une information sur une portion conique de l'échantillon. Cette mesure ne permet pas

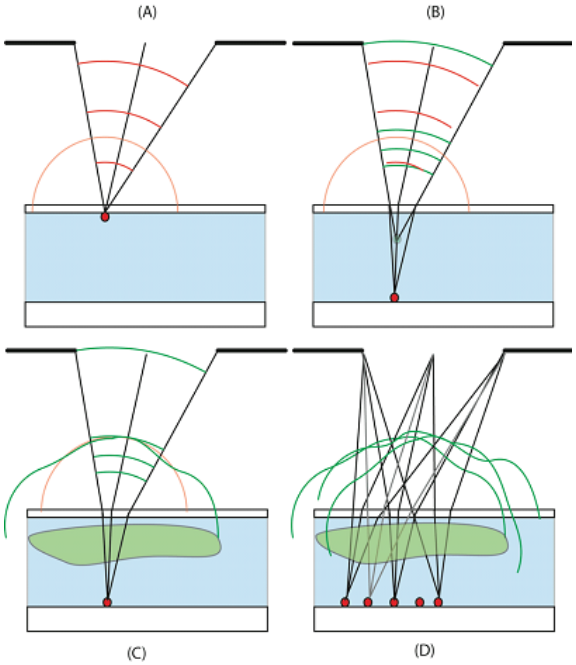


FIGURE III.18 – Schéma de principe de la tomographie par optique adaptative. A : configuration idéale du microscope, aucune aberration n'est générée. B : étoile guide placée dans un plan différent du plan focal objet, le front d'onde détecté présente de l'aberration sphérique. C : en présence d'un échantillon aberrant, le front d'onde mesuré a été déformé. D : avec des étoiles réparties dans l'échantillon, chaque mesure de front d'onde fournit de l'information sur une portion de l'échantillon.

de déterminer directement la correction à appliquer pour obtenir une image corrigée de l'objet étudié. Il faut pour cela résoudre le problème inverse de propagation des fronts d'onde à partir des mesures, ce qui peut être difficile. Est-il possible d'obtenir une information 3D à partir du recouvrement de ces cônes d'interaction ? Nous savons que dans des géométries plus simple (comme pour la tomographie par rayon X (figure III.19 A) ou l'optique adaptative multiconjuguée (figure III.19 B)), il est possible d'obtenir cette information 3D. La géométrie de notre système étant très différente (forte ouverture numérique, interaction entre le front d'onde et l'échantillon dans un volume limité...), un important travail d'analyse est nécessaire pour déterminer la possibilité de résoudre le problème inverse.

Ce système pourrait permettre d'une part d'avoir accès à une information structurale de l'échantillon et d'autre part de corriger plus efficacement la totalité de l'échantillon. En effet, connaissant les variations d'indice dans l'échantillon, il serait possible d'estimer les aberrations générées pour chaque zone de l'échantillon et ainsi de déterminer une correction adaptée sur toute son étendue. Cela évite également l'injection des étoiles au cœur de l'échantillon, permettant d'utiliser cette technique sans préparation particulière des objets d'intérêt, seules des lames recouvertes d'étoiles étant nécessaires.

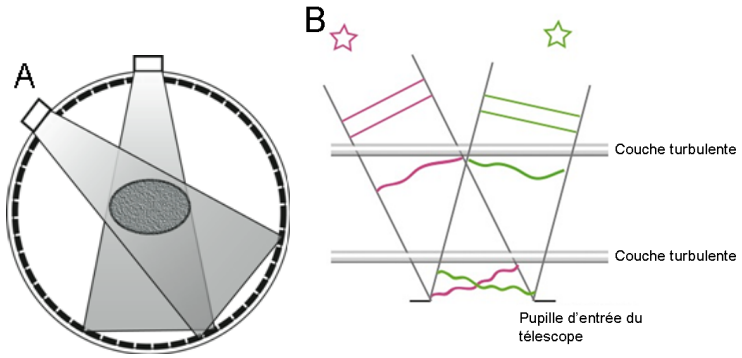


FIGURE III.19 – Schéma illustrant les géométries où le problème inverse est maîtrisé. A : en tomographie à rayons X, l'interaction se fait suivant un faisceau conique mais l'intégralité de l'échantillon participe au signal détecté pour toutes les mesures. B : en optique adaptative multiconjuguée, différentes couches turbulentes sont corrigées mais à partir de fronts d'onde plans et d'un système à faible ouverture numérique.

Ces différentes perspectives montrent l'étendue des possibilités qu'apporte l'optique adaptative en microscopie de fluorescence. De plus la maturité des techniques développées en astronomie [25–27] ainsi qu'en imagerie de l'œil [29] permet d'espérer un transfert efficace et rapide à la microscopie de fluorescence.

## III.8 Conclusion

Nous avons développé dans ce chapitre la réalisation d'un système d'optique adaptative pour la microscopie de fluorescence à partir d'étoiles artificielles implantées dans l'échantillon. Les résultats obtenus par la correction d'une étoile dans le champ ont montré la capacité de corriger efficacement les aberrations du système optique et de l'échantillon sur une faible étendue du champ d'observation. L'utilisation de plusieurs étoiles ouvre d'intéressantes perspectives pour l'extension de cette zone corrigée, ainsi que pour une reconstruction tomographique de l'échantillon. Enfin, cette technique étant développée comme un module séparé du microscope, il est toujours possible d'envisager un couplage avec les techniques d'illumination structurée présentées aux chapitres précédents.

# Bibliographie

[1] H. Gross, F. Blechinger, and B. Achtner. *Handbook of Optical Systems*. Wiley-VCH vol. 4, p. 564, 2008.

[2] Olympus Resource center. Spherical aberration from coverslip thickness variations, 2012. URL `http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/coverslipcorrection.html`. [En ligne ; Page disponible le 23-avril-2012].

[3] B. Potsaid, Y. Bellouard, and J. T. Wen. (ASOM) : A multidisciplinary optical microscope design for large field of view and high resolution imaging Abstract :. *Optics express*, 13(17), 2005.

[4] Z. Kam, P. Kner, D. Agard, and J.W. Sedat. Modelling the application of adaptive optics to wide-field microscope live imaging. *Journal of microscopy*, 226(1), 2007.

[5] P. Kner, J. W. Sedat, D. A. Agard, and Z. Kam. High-resolution wide-field microscopy with adaptive optics for spherical aberration correction and motionless focusing. *Journal of microscopy*, 237(2), 2010.

[6] D. Debarre, E. J. Botcherby, M. J. Booth, and T. Wilson. Adaptive optics for structured illumination microscopy. *Optics Express*, 16(13) :9290–9305, 2008.

[7] L. Sherman, J. Y. Ye, O. Albert, and T. B. Norris. Adaptive correction of depth-induced aberrations in multiphoton scanning microscopy using a deformable mirror. *Journal of microscopy*, 206(Pt 1), 2002.

[8] D. Debarre, M. J. Booth, and T. Wilson. Image based adaptive optics through optimisation of low spatial frequencies. *Optics Express*, 15(13) :8176–8190, 2007.

[9] M. J Booth, M. A. A. Neil, R. Juskaitis, and T. Wilson. Adaptive aberration correction in a confocal microscope. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(9), 2002.

[10] D. Debarre, E. J. Botcherby, T. Watanabe, S. Srinivas, M. J. Booth, and T. Wilson. Image-based adaptive optics for two-photon microscopy. *Optics Letters*, 34(16) :2495–2497, 2009.

[11] N. Olivier, D. Debarre, and E. Beaurepaire. Dynamic aberration correction for multiharmonic microscopy. *Optics Letters*, 34(20) :3145–3147, 2009.

[12] M. Feierabend, M. Rückel, and W. Denk. Coherence-gated wave-front sensing in strongly scattering samples. *Optics letters*, 29(19), 2004.

[13] M. Rueckel, J. A. Mack-Bucher, and W. Denk. Adaptive wavefront correction in two-photon microscopy using coherence-gated wavefront sensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(46), 2006.

[14] X. Tao, B. Fernandez, O. Azucena, M. Fu, D. Garcia, Y. Zuo, D. C. Chen, and J. Kubby. Adaptive optics confocal microscopy using direct wavefront sensing. *Optics letters*, 36(7), 2011.

[15] J. L. Beverage, R. V. Shack, and M. R. Descour. Measurement of the three-dimensional microscope point spread function using a Shack-Hartmann wavefront sensor. *Journal of microscopy*, 205(Pt 1), 2002.

[16] M. Reicherter, W. Gorski, T. Haist, and W. Osten. Dynamic correction of aberrations in microscopic imaging systems using an artificial point source. In *Proc. SPIE*, volume 5462, 2004.

[17] M. Oberlaender, P. J. Broser, B. Sakmann, and S. Hippler. Shack-Hartmann wave front measurements in cortical tissue for deconvolution of large three-dimensional mosaic transmitted light brightfield micrographs. *Journal of microscopy*, 233(2), 2009.

[18] O. Azucena, J. Crest, J. Cao, W. Sullivan, P. Kner, D. Gavel, D. Dillon, S. Olivier, and J. Kubby. Wavefront aberration measurements and corrections through thick tissue using fluorescent microsphere reference beacons. *Optics express*, 18(16), 2010.

[19] P. Vermeulen, E. Muro, T. Pons, V. Loriette, and A. Fragola. Adaptive optics for fluorescence wide-field microscopy using spectrally independent guide star and markers. *Journal of biomedical optics*, 16(7), 2011.

[20] F. Roddier. *Adaptive Optics in Astronomy.* Cambridge University Press, 1999.

[21] J. C. Wyant and K. Creath. *Applied optics and optical engineering, vol. Xl.* Academic Press, pp. 1-39, 1992.

[22] L. C. Roberts, M. D. Perrin, F. Marchis, A. Sivaramakrishnan, R. B. Makidon, J. C. Christou, B. A. Macintosh, L. A. Poyneer, M. A. van Dam, and M. Troy. Is that really your Strehl ratio ? *Proceedings of SPIE*, 5490, 2004.

[23] X. Gao and S. Nie. Doping Mesoporous Materials with Multicolor Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(42), 2003.

[24] X. Gao and S. Nie. Quantum dot-encoded mesoporous beads with high brightness and uniformity : rapid readout using flow cytometry. *Analytical chemistry*, 76(8), 2004.

[25] T. Fusco, J. M. Conan, V. Michau, L. M. Mugnier, and G. Rousset. Efficient phase estimation for large-field-of-view adaptive optics. *Optics letters*, 24(21), 1999.

[26] T. Fusco, J. M. Conan, G. Rousset, L. M. Mugnier, and V. Michau. Optimal wave-front reconstruction strategies for multiconjugate adaptive optics. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 18(10), 2001.

[27] M. Lloyd-Hart and N. M. Milton. Fundamental limits on isoplanatic correction with multiconjugate adaptive optics. *Journal of the Optical Society of America. A, Optics, image science, and vision*, 20(10), 2003.

[28] J. Thaung, P. Knutsson, Z. Popovic, and M. Owner-Petersen. Dual-conjugate adaptive optics for wide-field high-resolution retinal imaging. *Optics express*, 17(6), 2009.

[29] P. A. Bedggood, R. Ashman, G. Smith, and A. B. Metha. Multiconjugate adaptive optics applied to an anatomically accurate human eye model. *Optics express*, 14(18), 2006.

# IV

# Mesure de rendement quantique par effet de lentille thermique

## Sommaire

**III.1 Dégradation des capacités d'imagerie par les aberrations optiques . . . . . 104**
III.1.1 Aberrations optiques . . . . . 104
III.1.2 Optique adaptative . . . . . 106
**III.2 Description du système . . . . . 110**
III.2.1 Conception de l'expérience . . . . . 110
III.2.2 Montage . . . . . 110
III.2.3 Étoiles artificielles . . . . . 113
III.2.4 Protocole d'acquisition des images . . . . . 115
**III.3 Correction et mesure des aberrations sur échantillon test 117**
**III.4 Caractérisation de l'efficacité de correction . . . . . 119**
III.4.1 Étendue de la zone corrigée . . . . . 120
III.4.2 Influence du nombre de modes corrigés . . . . . 123
**III.5 Augmentation de l'étendue de la zone corrigée . . . . . 124**
III.5.1 Adaptation de l'instrument à la correction multiétoile . . 124
III.5.2 Reconstruction d'images corrigées composites . . . . . 128
**III.6 Application à un échantillon biologique . . . . . 129**
**III.7 Perpectives . . . . . 131**
III.7.1 Caractérisation et observation d'échantillons vivants . . . 131
III.7.2 Optique adaptative multiconjuguée . . . . . 132
III.7.3 Cartographie des aberrations et tomographie . . . . . 132
**III.8 Conclusion . . . . . 134**

DANS CE CHAPITRE nous présentons un outil de mesure du rendement quantique de fluorescence par la mesure de la chaleur dissipée par les fluorophores grâce à un phénomène de lentille thermique. Le principe de l'instrument est décrit puis des mesures de fluorophores organiques et inorganiques sont comparées à la méthode de mesure standard pour évaluer l'efficacité de notre approche.

# IV.1 Rendement quantique de fluorescence

## IV.1.1 Définition

Un fluorophore est un composé qui a la propriété d'émettre des photons après avoir été excité par d'autres photons plus énergétiques. Le principe est décrit sur le schéma IV.1 : un composé fluorescent absorbe un photon, qui amène la molécule dans un état excité. Une partie de l'énergie absorbée est libérée de façon non radiative et la molécule se retrouve sur le niveau énergétique le plus bas de l'état excité. Enfin, la molécule excitée retombe dans son état fondamental en libérant son énergie sous la forme d'un photon de fluorescence, d'énergie plus faible que le photon excitateur absorbé. Ce phénomène se déroule typiquement en 1-10 ns pour les fluorophores organiques [1].

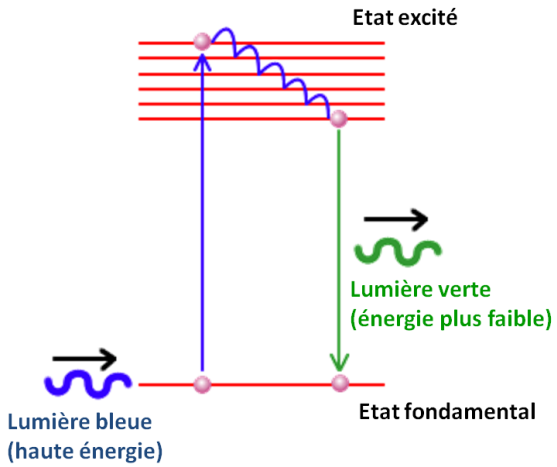


FIGURE IV.1 – Principe de la fluorescence.

Les caractéristiques principales d'un fluorophores sont :

- le spectre d'absorption, qui décrit les longueurs d'ondes ou les énergies des photons préférentiellement absorbés ;
- le spectre d'émission caractérisant la lumière réémise par le fluorophore ;
- le temps de vie de fluorescence, intervalle de temps caractéristique entre l'absorption et l'émission d'un photon ;
- la résistance au photoblanchiment, qui va définir la capacité du fluorophore à émettre de nombreux photons avant d'être détruit, modifié ou dégradé ;

– le rendement quantique de fluorescence, efficacité de conversion des photons absorbés en photons de fluorescence.

Le rendement quantique de fluorescence varie entre 0 et 100 % et correspond au rapport du nombre de photons émis au nombre de photons absorbés. L'énergie non convertie en lumière est dissipée sous forme de chaleur dans le milieu. En effet, une molécule excitée peut également retourner dans son état fondamental par des chemins non-radiatifs. Le rendement quantique résulte de la compétition de ces phénomènes non-radiatifs avec l'émission de photons de fluorescence. Le rendement quantique peut dépendre de nombreux paramètres [2, 3] :

– la température ;
– la nature du solvant ou de la matrice dans lequel se trouve le fluorophore ;
– le pH ;
– la longueur d'onde d'excitation ;
– la concentration...

Généralement, on recherche des composés ayant de forts rendements quantiques pour optimiser l'utilisation de la lumière absorbée. Un meilleur rendement quantique permettra de réduire l'intensité d'excitation de l'échantillon et/ou le temps d'exposition ce qui protégera l'échantillon lors de l'observation d'objets fluorescents. Il aura également une influence importante sur les choix techniques adoptés en microscopie, notamment sur le choix du détecteur ou la conception du système optique. Toutefois la mesure de ces rendements est très délicate, si on veut obtenir un résultat précis et fiable [2–4], comme nous allons le voir.

### IV.1.2 Méthodes de mesure et limitations

Différentes techniques ont été développées pour mesurer le rendement quantique de fluorophores. Pour l'estimer, on doit connaître deux des trois termes suivants :

– le nombre de photons absorbés ou la puissance absorbée ;
– le nombre de photons de fluorescence émis ou la puissance correspondante ;
– la fraction d'énergie transférée au milieu de façon non-radiative, majoritairement sous forme de chaleur.

La puissance absorbée est facile à déterminer grâce à un spectromètre d'absorption. Les deux autres termes sont plus difficiles à évaluer. Les différentes méthodes de mesures se basent sur la mesure de l'une ou l'autre de ces quantités.

#### Comparaison à un fluorophore de référence

La méthode la plus simple pour estimer le rendement quantique d'un fluorophore d'intérêt est de le comparer à un composé connu [1–6]. Pour déterminer le rendement quantique $\phi_x$ d'un fluorophore inconnu, il faut déterminer pour une solution de ce composé le nombre de photons absorbés $N_{abs}$ et le nombre de photons réémis $N_{em}$, à la longueur d'onde d'excitation $\lambda_{ex}$ :

$$\phi_x = \frac{N_{em}(\lambda_{ex})}{N_{abs}(\lambda_{ex})} \tag{IV.1}$$

On détermine facilement le nombre de photons absorbés grâce à un spectromètre d'absorption. Il est plus difficile de mesurer le nombre de photons émis, car ceux-ci sont émis de façon isotrope. Avec un spectromètre de fluorescence classique, on ne récupère qu'une faible partie de la lumière réémise. On utilise alors une solution de référence de rendement quantique connu, pour estimer la fraction de lumière collectée par le système. Connaissant le nombre de photons collectés pour une solution de référence, d'absorption et de rendement quantique connus, le rendement quantique du composé étudié est déduit par simple rapport des différentes grandeurs, et la géométrie de collection du système de mesure n'a alors plus d'influence. Si le solvant change entre la référence et le composé étudié, une correction géométrique est néanmoins apportée pour compenser les effets géométriques liés à la différence des indices optiques des solvants, comme le montre la formule suivante [1, 5] :

$$\frac{\phi_x}{\phi_r} = \frac{F_x}{F_r}\frac{a_r}{a_x}\left(\frac{n_x}{n_r}\right)^2 \tag{IV.2}$$

avec : $\phi$ le rendement quantique de fluorescence
$F$ l'intensité de fluorescence intégrée
$a$ l'absorption de la solution
$n$ l'indice optique du solvant
l'indice $x$ désignant le composé inconnu
et l'indice $r$ désignant la référence.

Il est préférable de choisir un fluorophore de référence absorbant et émettant dans les mêmes gammes de longueur d'onde que le fluorophore d'intérêt afin d'être dans les mêmes configurations pour les spectromètres [2].

En pratique, on prépare des solutions de ces deux fluorophores de différentes concentrations et donc absorptions, en s'assurant qu'elles soient suffisamment faibles pour éviter des effets de filtre interne (qui incluent la réabsorption de la fluorescence par l'échantillon et la variation de la puissance d'excitation au cours de la traversée de la solution due à l'absorption de la lumière). On mesure l'absorption à la longueur d'onde d'excitation et l'intensité de fluorescence intégrée pour les différentes solutions (grâce à des spectromètres). Si la concentration est suffisamment faible, l'intensité de fluorescence intégrée est proportionnelle à l'absorption des solutions. Le rapport des pentes de ces droites $F/a$ (éventuellement corrigé des indices optiques des solvants), fournit le rapport des rendements quantiques et donc la valeur recherchée (cf équation IV.2).

Cette méthode est la plus simple à mettre en œuvre, mais elle souffre de nombreuses limitations qui aboutissent à une incertitude sur la mesure finale de l'ordre de 10 % [2, 4]. Tout d'abord il est nécessaire d'avoir des fluorophores de référence pour toutes les gammes de longueur d'onde, dont le rendement quantique soit connu avec une bonne exactitude. Cela nécessite donc des méthodes alternatives pour mesurer l'efficacité quantique d'au moins un fluorophore de référence. Dans le visible, de

nombreuses références existent, avec un rendement quantique connu avec une incertitude de l'ordre de 5 % [5]. Par contre, dans le proche infrarouge, peu de références sont disponibles, ce qui rend difficile l'utilisation de cette méthode de mesure.

Outre l'incertitude sur les rendements quantiques de la référence, les sources d'erreur de mesure sont nombreuses :

- correction absente ou imparfaite de la réponse spectrale des détecteurs ;
- résultats à exprimer en nombre de photons et non en énergie (car le rendement quantique renvoie à un rapport de nombre de photons et non de puissance) ;
- absorbance ou fluorescence résiduelle des solvants utilisés...

De nombreux articles [2–5, 7] fournissent des conseils et recommandations pour réaliser ces mesures, mais elles ne sont pas encore couramment appliquées. Un contrôle important à réaliser est notamment la comparaison avec un second fluorophore de référence, pour bien vérifier la fiabilité de la méthode de mesure.

Cette méthode de mesure simple a donc une incertitude limitée à environ 10 %, difficile à améliorer. C'est pourquoi des techniques de mesure absolue ont été développées afin de s'affranchir de l'utilisation d'une référence fluorescente.

### Sphère intégrante

La fluorescence étant isotrope, il est difficile de collecter tous les photons émis par un échantillon fluorescent. On peut toutefois utiliser une sphère intégrante, dans laquelle on place l'échantillon fluorescent. Il s'agit d'une sphère dont la surface est réfléchissante ou diffusante (avec une absorption très faible), excepté un port d'entrée de lumière et un port de sortie pour mesurer la puissance lumineuse. À partir d'un étalonnage précis de cet instrument, il est possible de mesurer le nombre de photons émis par la solution et donc le rendement quantique.

De même que pour la mesure de référence, de nombreuses sources d'erreur peuvent fausser le résultat (réabsorption de la fluorescence, correction spectrale, mauvais étalonnage...)[3, 8] Cet outil est ainsi peu utilisé en routine et sert principalement pour la mesure d'échantillons diffusants [3].

La seconde voie de dissipation d'énergie par les fluorophores excités étant essentiellement thermique, il est possible de contourner le problème en estimant la part de l'énergie perdue sous forme de chaleur dans le milieu, pour remonter au rendement quantique. Des mesures acoustiques ou thermiques permettent d'évaluer cette énergie.

### Mesures thermiques

**Principe.** La puissance absorbée $aP_0$ par un échantillon fluorescent (où $P_0$ est la puissance d'excitation incidente sur l'échantillon et $a$ la fraction d'énergie absorbée par la solution) est dissipée soit sous forme de photons de fluorescence $P_{fluo}$, soit sous forme de chaleur dans le milieu ambiant $P_{th}$. Si on arrive à mesurer cette chaleur dissipée, on peut calculer le rendement quantique de fluorescence [9] :

$$P_0 = P_{transmis} + P_{fluo} + P_{th} \tag{IV.3}$$

$$a = 1 - \frac{P_{transmis}}{P_0} \tag{IV.4}$$

$$P_{fluo} = aP_0 - P_{th} \tag{IV.5}$$

Le terme $P_{fluo}$ peut s'écrire sous la forme suivante :

$$P_{fluo} = \int_0^\infty P_\nu(\nu)\,\mathrm{d}\nu = \int_0^\infty P_{fluo} S_\nu(\nu)\,\mathrm{d}\nu \tag{IV.6}$$

avec $P_\nu(\nu)$ la densité spectrale de puissance, qui caractérise la puissance émise dans une bande de fréquence $\mathrm{d}\nu$ centrée sur $\nu$. Le terme $S(\nu)$ correspond à cette densité de puissance normalisée par la puissance totale, ($\int_0^\infty S_\nu(\nu)\,\mathrm{d}\nu = 1$). On peut écrire ce terme en fonction de $\nu$ ou de $\lambda$ :

$$P_{fluo} = P_{fluo} \int_0^\infty S_\nu(\nu)\,\mathrm{d}\nu = P_{fluo} \int_0^\infty S_\lambda(\lambda)\,\mathrm{d}\lambda \tag{IV.7}$$

Pour remonter au rendement quantique, il faut exprimer le nombre de photons émis par rapport à la puissance totale $P_{fluo}$ :

$$N_{em} = \int_0^\infty N(\nu)\,\mathrm{d}\nu = \int_0^\infty \frac{P(\nu)}{h\nu}\mathrm{d}\nu \tag{IV.8}$$

$$= P_{fluo} \int_0^\infty \frac{S_\nu(\nu)}{h\nu}\mathrm{d}\nu \tag{IV.9}$$

$$= \frac{P_{fluo}}{hc} \int_0^\infty \lambda S_\lambda(\lambda)\mathrm{d}\lambda = \frac{P_{fluo}}{hc}\langle\lambda_f\rangle \tag{IV.10}$$

$$\text{D'où : } \phi_f = \frac{N_{em}(\lambda_{ex})}{N_{abs}(\lambda_{ex})} = \frac{\frac{P_{fluo}}{hc}\langle\lambda_f\rangle}{\frac{aP_0}{h\nu_0}} \tag{IV.11}$$

$$= \frac{\frac{aP_0 - P_{th}}{hc}\langle\lambda_f\rangle}{\frac{aP_0\lambda_0}{hc}} \tag{IV.12}$$

$$\phi_f = \frac{\langle\lambda_f\rangle}{\lambda_0}\left(1 - \frac{P_{th}}{aP_0}\right), \tag{IV.13}$$

avec $h$ la constante de Planck, $\langle\lambda_f\rangle$ la longueur d'onde moyenne et $\lambda_0$ la longueur d'onde d'excitation.

Il faut donc mesurer le terme $P_{th}$ ou un signal permettant de remonter à cette valeur. On peut par exemple utiliser un effet de lentille thermique : un échauffement

local de l'échantillon engendre des variations locales d'indice optique, qui créent une lentille. Un faisceau sonde, dévié ou défocalisé par cette lentille thermique, permet de mesurer la distance focale de la lentille thermique et d'en déduire la puissance dissipée.

Toutefois, il est difficile de déterminer directement la puissance thermique dissipée à partir de la déviation du faisceau sonde et des paramètres thermiques du système, car certains paramètres ne sont pas connus avec précision (par exemple la dépendance de l'indice avec la température $\mathrm{d}n/\mathrm{d}T$ ou les paramètres géométriques). On utilise donc généralement une référence non fluorescente pour estimer cette puissance thermique [9, 10].

**Mesure du signal thermique.** Pour détecter un signal à l'aide d'une lentille thermique, on utilise généralement deux faisceaux laser en mode pompe-sonde. Le faisceau pompe focalisé absorbé par le composé fluorescent est à l'origine de la lentille thermique. Le faisceau sonde non absorbé par le fluorophore n'est sensible qu'à la lentille thermique et fournit une mesure de la puissance thermique dissipée dans la solution (Figure IV.2). La déviation ou la défocalisation de ce faisceau sonde est mesurée par un photodétecteur.

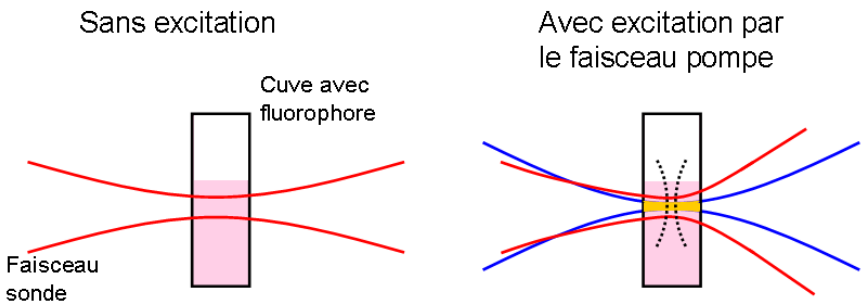


FIGURE IV.2 – Schéma de principe de la mesure par lentille thermique : un faisceau sonde qui traverse l'échantillon sans être absorbé est affecté par la lentille thermique générée par un faisceau d'excitation focalisé dans l'échantillon et absorbé par celui-ci.

Ces mesures sont généralement réalisées en mode transitoire, le faisceau d'excitation étant modulé par un obturateur. L'intensité mesurée $I(t)$ du faisceau sonde varie suivant la forme suivante [11] :

$$I(t) = I_0 \left(1 - \frac{\theta}{2} tan^{-1} \left( \frac{2mV}{[(1+2m)^2 + V^2]\frac{\tau_c}{2t} + 1 + 2m + V^2} \right) \right) \tag{IV.14}$$

$$\text{avec : } \theta = \frac{P_{th}}{\lambda_0 k} \frac{dn}{dT}, \tag{IV.15}$$

$I_0$ est l'intensité initiale avant excitation, $t_c$ le temps caractéristique d'établissement du régime permanent ($\sim 100\,\mathrm{ms}$ typiquement), $m$ et $V$ des paramètres dépen-

dant de la géométrie des faisceaux lasers utilisés, $k$ la conductivité thermique et $\frac{dn}{dT}$ la dépendance de l'indice du milieu avec la température.

Le paramètre $\theta$ peut donc servir de mesure de la puissance thermique dissipée dans le milieu. Comme il est difficile de connaître précisément les valeurs de $k$, $\frac{dn}{dT}$ et $P_0$, on utilise généralement une référence non fluorescente pour déterminer ces paramètres manquants.

**Utilisation d'une référence non fluorescente.** Si on utilise un composé non fluorescent ayant la même absorption à la longueur d'onde d'excitation, on peut écrire que $P_{th}^{ref} = aP_0$, car toute l'énergie absorbée est convertie en chaleur. On a donc $\theta_{ref} = \alpha a P_0$ où $\alpha$ est le coefficient de proportionnalité entre le signal mesuré $\theta$ et $P_{th}$. On peut donc réécrire l'équation IV.13 sous la forme suivante [9, 12, 13] :

$$\phi_f = \frac{\langle \lambda_f \rangle}{\lambda_0} \left( 1 - \frac{\alpha \theta_x}{\alpha \theta_{ref}} \right) \tag{IV.16}$$

$$\phi_f = \frac{\langle \lambda_f \rangle}{\lambda_0} \left( 1 - \frac{\theta_x}{\theta_{ref}} \right) \tag{IV.17}$$

Si les absorptions des deux solutions sont différentes, il faut prendre en compte le rapport de ces absorptions (si le signal thermique est bien proportionnel à la puissance thermique, ce qu'on considère généralement vrai dans le cas de faibles énergies dissipées) :

$$\phi_f = \frac{\langle \lambda_f \rangle}{\lambda_0} \left( 1 - \frac{\theta_x a_{ref}}{\theta_{ref} a_x} \right) \tag{IV.18}$$

L'utilisation d'un échantillon de référence nous permet donc de nous affranchir d'une part de la mesure de la puissance incidente $P_0$ et d'autre part du coefficient de proportionnalité entre le signal mesuré et la puissance thermique dissipée. Contrairement à l'utilisation d'une référence fluorescente, il est très facile de trouver des composés non fluorescents, avec un rendement quantique nul, on n'a donc pas d'incertitude ajoutée par la méconnaissance ou les variations de ce composé [13].

Toutefois, il est nécessaire d'acquérir les mesures de l'échantillon d'intérêt et de la référence dans les mêmes conditions géométriques (le signal mesuré dépend de la géométrie des faisceaux) ce qui peut être difficile avec des faisceaux laser focalisés et une géométrie sensible à de faibles variations d'alignement .

Il est également possible d'utiliser directement le composé fluorescent étudié comme référence interne pour réaliser une mesure absolue.

**Utilisation d'une référence interne.** Lima et al. [14] ont proposé une méthode permettant de s'affranchir d'une référence externe en utilisant plusieurs longueurs d'onde d'excitation. On sait que même pour un fluorophore de rendement quantique

égal à 1, une partie de la puissance absorbée est convertie en chaleur, par le décalage entre les longueurs d'onde d'excitation et d'émission. Les signaux thermiques mesurés ont donc une double composante :

- la relaxation thermique des états excités jusqu'au niveau vibrationnel le plus bas de l'état excité, pour toutes les molécules excitées ;
- la désexcitation non radiative des molécules n'émettant pas de photons pour une fraction $(1 - \phi_f)$ des molécules.

Les variations du signal thermique mesuré avec différentes longueurs d'onde d'excitation ne proviennent que de la première composante, si le rendement quantique ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation. Cela fournit une référence interne, ces longueurs d'onde étant connues. On peut réécrire l'équation IV.13 de la façon suivante [14] :

$$\frac{\lambda_0}{\langle\lambda_f\rangle}\phi_f = 1 - \frac{P_{th}}{aP_0} \tag{IV.19}$$

$$\frac{P_{th}}{aP_0} = 1 - \frac{\lambda_0}{\langle\lambda_f\rangle}\phi_f \tag{IV.20}$$

$$\frac{\theta_{th}(\lambda_{ex})}{aP_0(\lambda_{ex})} = \alpha\left(1 - \frac{\lambda_{ex}}{\langle\lambda_f\rangle}\phi_f\right) = \alpha - \beta\lambda_{ex} \tag{IV.21}$$

$$\frac{\beta}{\alpha} = \frac{\phi_f}{\langle\lambda_f\rangle} \tag{IV.22}$$

On voit donc que $\frac{\theta_{th}}{aP_0}$ varie linéairement avec $\lambda_{ex}$, et le rapport $\frac{\beta}{\alpha}$ donne accès au rendement quantique du composé d'intérêt.

Pour que cette mesure soit correcte, il faut néanmoins s'assurer que le rendement quantique ne varie pas avec la longueur d'onde d'excitation. On considère généralement que c'est le cas si les phénomènes mis en jeu sont les mêmes (même niveau excité, pas de génération de multi-excitons...) donc pour des longueurs d'onde d'excitation proches (règle de Kasha-Vavilov [1]). Il faut également que la géométrie des faisceaux utilisés soit identique, ce qui peut être difficile à cause du chromatisme des éléments optiques.

Cette technique a été appliquée avec succès autant pour des échantillons solides [14, 15] que pour des fluorophores organiques (rhodamine 6G) [16] et inorganiques (quantum dots) [17–19].

### Mesure photoacoustique

Une dernière catégorie de mesure utilise une détermination acoustique de la quantité d'énergie dissipée sous forme de chaleur [20]. Lors d'une excitation transitoire d'un échantillon fluorescent, la chaleur dissipée provoque une dilatation locale et rapide du milieu, ce qui génère une onde de choc que l'on peut détecter acoustiquement. L'amplitude du signal détecté est proportionnelle à la puissance thermique ce qui permet d'estimer le rendement quantique de fluorescence, en utilisant une référence externe ou interne.

### IV.1.3 Mesure de rendement quantique de quantum dots infrarouges

La technique de mesure la plus couramment utilisée reste la mesure par comparaison à un fluorophore de référence, de par sa facilité de mise en œuvre. Toutefois pour une mesure fiable, il est nécessaire de réaliser de nombreux contrôles, ce qui est lent et fastidieux, pour une incertitude rarement inférieure à 10 %. De plus, cette technique n'est pas facilement utilisable dans le domaine du proche infrarouge (NIR), car peu de références de fluorescence avec un rendement quantique élevé et bien connu sont disponibles dans cette gamme.

Nous avons voulu développer une mesure thermique du rendement quantique de quantum dots visibles et NIR. La sensibilité des mesures thermiques et l'absence de référence fluorescente nous laissant espérer une incertitude finale sur la mesure plus faible que 10 %. Des comparaisons entre des mesures thermiques et des mesures spectrométriques pour des composés organiques ou des quantum dots nous permettront d'évaluer la précision et la dispersion des mesures obtenues avec cette technique.

## IV.2 Détection homodyne de lentille thermique

Dans cette partie, nous décrivons l'instrument que nous avons développé pour la mesure de rendement quantique.

### IV.2.1 Principe de la mesure

La technique de mesure proposée se base sur le développement d'un microscope confocal à lentille thermique proposé par Julien Moreau [21, 22]. Cet outil permet de mesurer des coefficients d'absorption (en surface ou en volume) très faibles ($\alpha \Delta z = 1,2.10^{-7}$). Un faisceau pompe absorbé par l'échantillon crée une lentille thermique qui modifie la géométrie d'un faisceau sonde. Une détection confocale de cette modification permet de remonter à l'absorption. Contrairement aux résultats présentés au paragraphe IV.1.2, la modulation du faisceau pompe permet après démodulation électronique de mesurer un signal stationnaire et non plus transitoire, grâce à une détection synchrone du signal sonde. Cela permet de détecter des signaux très faibles dans un bruit de fond important.

Cet instrument permet la détection d'un signal proportionnel à la puissance thermique dissipée par l'échantillon. Associé à la mesure d'un échantillon de référence, nous pouvons en extraire une mesure du rendement quantique d'un composé fluorescent (équation IV.18). Comme nous l'avons vu précédemment, l'utilisation d'une référence non fluorescente n'ajoute pas d'incertitude à la mesure, car il est très facile de trouver de tels composés. L'utilisation d'une référence interne a été envisagée, mais elle a été écartée pour différentes raisons :

- il faut au minimum trois ou quatre longueurs d'onde pour pouvoir extraire une valeur fiable du tracé de $\frac{P_{th}}{aP_0}$ ;

- il est préférable d'avoir des longueurs d'onde d'excitation proches pour être dans le même régime de fonctionnement des fluorophores, tout en étant proche de la longueur d'onde moyenne de fluorescence (l'erreur de mesure variant avec $\frac{\lambda_{ex}}{\langle\lambda_f\rangle}$ cf équation IV.29), ce qui est difficile à obtenir pour une large gamme de fluorophores ;
- il faut que ces différents faisceaux lasers soient alignés, notamment que les cols des faisceaux laser excitateurs soient à la même position, malgré le chromatisme des éléments optiques ;
- la puissance au niveau de l'échantillon doit être connue précisément.

Nous avons préféré utiliser une référence externe, avec deux longueurs d'onde d'excitation.

### IV.2.2 Montage expérimental

La figure IV.3 présente le montage utilisé, dérivé du montage de Julien Moreau [21].

Nous utilisons trois faisceaux laser, deux pompes et une sonde. La sonde est un laser à 1 550 nm (Thorlabs 1,5 mW maximum). Nous avons voulu concevoir un système capable de mesurer le rendement quantique d'échantillons émettant dans le proche infrarouge, jusqu'à 1 $\mu$m. Afin d'être assuré que les fluorophores n'absorberont pas ce faisceau sonde, nous avons choisi une longueur d'onde de sonde élevée, bien supérieure aux longueurs d'onde de fluorescence des échantillons (1 550 nm). Ce choix permet de mesurer le rendement quantique de fluorophores sur une très large gamme spectrale, au prix de contraintes que nous verrons plus loin. Les longueurs d'onde des lasers pompes ont également été choisies pour pouvoir exciter de nombreux fluorophores organiques et inorganiques. La première pompe est un laser à 405 nm (Cube Coherent, 50 mW maximum), modulé par un signal délivré par un générateur basse fréquence (GBF). Le deuxième faisceau pompe est un laser à 488 nm (Sapphire Coherent 50 mW maximum), modulé par un hacheur (thorlabs chopper), asservi à la fréquence du GBF.

Les deux lasers de pompe sont injectés dans une même fibre optique via un coupleur. Les trois lasers sont rendus colinéaires par un miroir dichroïque, puis focalisés au niveau d'une cuve contenant les solutions d'intérêt avec un objectif de microscope (10× Olympus, f=18 mm). Un second objectif identique collecte les faisceaux à la sortie de la cuve, et permet leur propagation jusqu'au trou P via une lentille L1 (120 mm). Le signal transmis par le trou est envoyé sur un détecteur infrarouge (PDA10D Thorlabs) via une lentille L2 (60 mm). Pour ne détecter que le faisceau sonde, deux miroirs infrarouges (M1 et M2) et un filtre passe-haut 1 400 nm sont placés sur le trajet du faisceau. Le signal détecté est envoyé en entrée d'une détection synchrone pour en extraire la composante à la fréquence de modulation du GBF.

La position latérale du trou est déterminée par maximisation du signal DC de la sonde en absence de pompe. Sa position axiale est déterminée par maximisation du signal thermique sur la détection synchrone. Celui-ci doit être maximal lorsque le col du faisceau sonde se trouve à une distance de Rayleigh du trou [21].

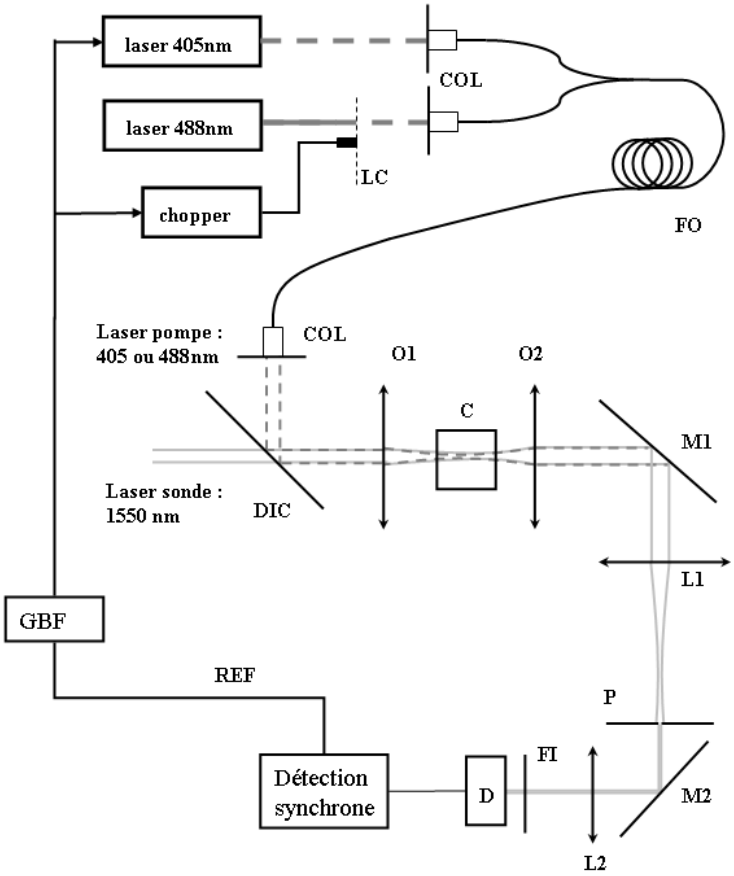


FIGURE IV.3 – Schéma du montage : LC lame de chopper, COL collimateur, FO fibre optique, DIC miroir dichroïque, O1 et O2 objectifs de microscope, C cuvette en quartz, M1 et M2 miroir infrarouge, L1 et L2 lentilles (respectivement 120 et 60 mm), FI filtre interférentiel passe-haut 1 400 nm, D détecteur, REF signal de référence. Les pointillés indiquent les faisceaux laser modulés, les traits continus les faisceaux non modulés.

La modulation du GBF est sinusoïdale à une fréquence $f$ de 571,5 Hz. Cette fréquence a été déterminée expérimentalement et donne un maximum du rapport signal sur bruit sur la détection synchrone. Ce choix est un compromis entre une fréquence suffisamment basse pour avoir un signal important (car le signal thermique varie en $1/f$) et une fréquence élevée pour minimiser les bruits aux basses fréquences.

D'après Moreau and Loriette [22], le signal thermique détecté peut être exprimé à partir de la focale équivalente de la lentille thermique $f_{th}$ :

$$f_{th} = \frac{\pi f w_p^4 \kappa}{\alpha z_{RP} \frac{\partial n}{\partial T} D P_P}, \tag{IV.23}$$

avec :

- $f$ la fréquence de modulation ;
- $w_p$ la taille du col du faisceau pompe dans l'échantillon ;
- $\kappa$ la conductivité thermique de l'échantillon ;
- $\alpha$ l'absorption de la solution en $\mathrm{m}^{-1}$(si on considère que toute l'énergie absorbée est convertie en chaleur) ;
- $z_{RP}$ la distance de Rayleigh du faisceau pompe ;
- $n$ l'indice optique de la solution ;
- $T$ la température ;
- $D$ le coefficient de diffusion thermique de la solution ;
- $P_P$ la puissance du faisceau pompe.

Cette distance focale est modulée à la fréquence $f$ de modulation du laser. Si les deux faisceaux pompe et sonde sont bien alignés, la lentille thermique défocalise le faisceau sonde au niveau du trou d'une quantité $\delta w$, également à la fréquence $f$ :

$$\frac{\delta w}{w} = \frac{\frac{z_0^2}{z_{R0}} - z_{R0}}{2 f_{th}}, \tag{IV.24}$$

avec :
- $w$ la taille du col du faisceau sonde au niveau du trou ;
- $z_0$ la distance entre le col du faisceau sonde et la lentille thermique ;
- $z_{R0}$ la longueur de Rayleigh du faisceau sonde dans l'échantillon.

Cette variation de diamètre du faisceau induit une variation de la puissance transmise $\delta P_t$ :

$$P_t = P_0(1 - e^{\frac{-2R^2}{w^2}}) \tag{IV.25}$$

$$\delta P_t = -P_0 \frac{4R^2}{w^2} e^{\frac{-2R^2}{w^2}} \frac{\delta w}{w} \propto \frac{1}{f_{th}}, \tag{IV.26}$$

avec :
- $P_t$ la puissance transmise par le trou ;
- $P_0$ la puissance totale du faisceau sonde incident au niveau du trou ;
- $R$ le rayon du trou ;
- $w$ la taille du col du laser.

Le signal mesuré par la détection synchrone correspond à cette variation de puissance et est bien proportionnel à la puissance thermique dissipée par l'échantillon (au premier ordre). Nous avons vérifié la linéarité du signal avec :
- la puissance du faisceau sonde ;
- la puissance du faisceau pompe (pour des puissances dissipées inférieures à 0,5 mW en moyenne) ;
- l'inverse de la fréquence de modulation, pour des fréquences suffisamment hautes (>250 Hz) ;
- l'absorption de la solution (également pour des puissances dissipées inférieures à 0,5 mW en moyenne).

Si la puissance dissipée dans l'échantillon dépasse 0,5 mW, des effets non-linéaires apparaissent, alors qu'ils ne sont pas pris en compte dans le modèle présenté. Afin de réaliser des mesures dans le régime linéaire, nous avons utilisé des solutions d'absorption faibles ($\alpha < 20\,\mathrm{m}^{-1}$) et des puissances d'excitation inférieures à 5 mW.

De plus, en utilisant le modèle de chauffage d'un matériau par un faisceau laser proposé par Hello et Vinet [23], nous avons évalué une élévation de température dans l'échantillon inférieure au Kelvin, donc trop faible pour modifier les processus mis en œuvre au cours du phénomène de fluorescence et générer l'apparition d'un phénomène de convection. Nous avons calculé le nombre de Rayleigh $R_a$, qui permet de s'assurer que l'on a bien un transfert thermique par conduction (pour $R_a << 2000$) :

$$R_a = \frac{g\beta\Delta T d^3}{\nu D} \tag{IV.27}$$

avec : $g = 9{,}81\,\mathrm{m}^2.\mathrm{s}^{-1}$ l'accélération de la pesanteur,
$\beta = 1{,}43 \cdot 10^{-3}\,\mathrm{K}^{-1}$ le coefficient de dilatation thermique de l'acétone,
$\Delta T \sim 1\,\mathrm{K}$ l'élévation de température,
$d = 150\,\mu\mathrm{m}$ la taille caractéristique du gradient de température,
$\nu = 3{,}9 \cdot 10^{-7}\,\mathrm{m}^2.\mathrm{s}^{-1}$ la viscosité cinématique de l'acétone,
et $D = 1{,}1 \cdot 10^{7}\,\mathrm{m}^2.\mathrm{s}^{-1}$ le coefficient de diffusion thermique de l'acétone,
on obtient : $R_a \sim 1,1 << 2000$.

### IV.2.3 Protocole de mesure

Le protocole de mesure commence systématiquement par la préparation de solutions fraîches du fluorophore à étudier et de la référence (en général une solution de ferrocène) avec des absorptions connues (inférieures à 15 % sur 1 cm ou $16\,\mathrm{m}^{-1}$). Les solvants utilisés sont l'acétone ou le tétrachloroéthylène pour leur transparence aux trois longueurs d'onde utilisées et leur capacité à dissoudre les composés utilisés (ferrocène, fluorophores organiques, quantum dots...)

La mesure commence par l'utilisation d'une référence de ferrocène qui nous permet d'aligner le système optique et d'optimiser le signal thermique. On ajuste la position du trou pour obtenir un signal maximum sur la détection synchrone. On réalise alors la mesure du signal thermique pour les deux longueurs d'onde de pompe et pour différentes valeurs du coefficient d'absorption de la référence. La modification du coefficient d'absorption est obtenue par ajout de solvant dans la cuve de mesure (typiquement 10 concentrations différentes). La concentration finale est environ 5 fois plus faible que la concentration initiale. Avant de réaliser la mesure pour l'échantillon d'intérêt, on enlève la référence de la cuve que l'on rince à l'éthanol et l'acétone (au moins trois fois au total). Au cours de cette étape, l'alignement ne doit pas être modifié (on peut vérifier que le système n'a pas été désaligné en comparant le flux moyen reçu par le détecteur en l'absence de pompe avant et après le changement de solution, car sa valeur est également très sensible à l'alignement). On place

donc la solution fluorescente à analyser et on réalise les mesures thermiques au cours d'un protocole de dilution similaire. Pour s'assurer que les réglages du système n'ont pas varié au cours du protocole, nous réalisons finalement une seconde mesure de la référence après la mesure du fluorophore.

Nous traçons ensuite les courbes de variation du signal thermique (normalisé par le flux moyen sur le détecteur), $S_{th}$ en fonction de l'absorption de la solution, comme représenté sur la figure IV.4. Ces courbes présentent deux particularités :

- à absorption élevée, le signal est parfois non-linéaire, avec une courbure positive ou négative. Il s'agit probablement d'une non-linéarité due à un signal thermique trop important, pouvant varier avec le réglage de l'expérience [12] ;
- les mesures réalisées dans le tétracholoéthylène avec le laser pompe à 405 nm, présentent un signal à concentration nulle. Il est dû à l'absorption du faisceau pompe à 405 nm par ce solvant.

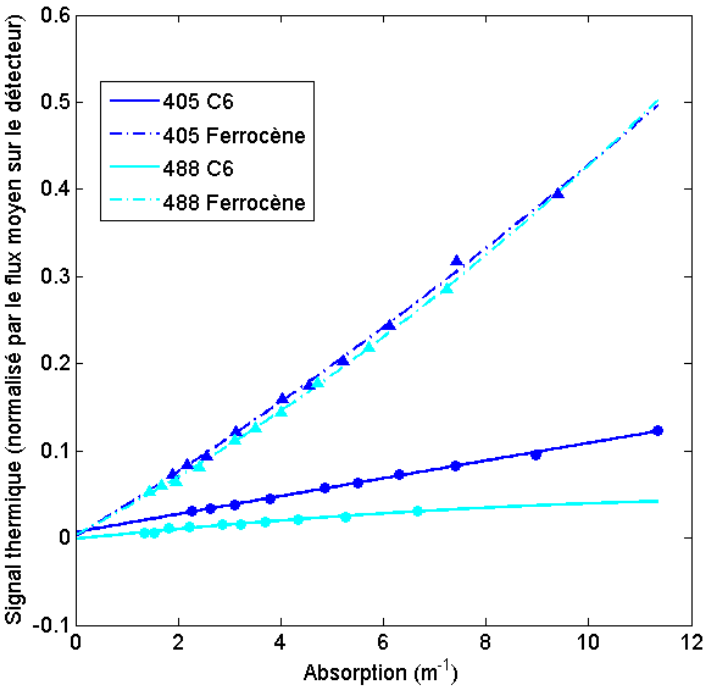


FIGURE IV.4 – Exemple de mesures thermiques sur la coumarine 6 et le ferrocène dans l'acétone avec excitation à 405 et 488 nm. Les symboles pleins représentent les points de mesures, les traits continus et pointillés les ajustements par des fonctions quadratiques.

Pour tenir compte de ces deux effets, nous avons ajusté ces mesures avec un polynôme d'ordre 2 pour obtenir la pente $\frac{S_{th}}{a}$ pour les faibles absorptions. Le rendement quantique est obtenu à partir du rapport des pentes du fluorophore et de la référence :

$$\frac{S_{th}^{fluo}}{S_{th}^{ref}}\frac{a^{ref}}{a^{fluo}} = 1 - \frac{\phi_f \lambda_{ex}}{\langle \lambda_f \rangle} \tag{IV.28}$$

Les mesures relatives ont été réalisées grâce à un spectromètre d'absorbance (Cary 5E Varian) et un spectromètre de fluorescence (FluoroMax-3 Jobin-Yvon), en suivant les recommandations évoquées précédemment [5, 7]. Les références fluorescentes utilisées sont la rhodamine 6G dans l'éthanol (RQ = 95 %), la rhodamine B dans l'éthanol (RQ = 70 %) et la coumarine 6 dans l'éthanol (RQ = 78 %).

Nous allons maintenant voir les résultats obtenus avec cette technique sur des fluorophores organiques et des quantum dots.

# IV.3 Rendement quantique de fluorophores organiques et inorganiques

### IV.3.1 Rendement quantique de composés de référence

Dans un premier temps, nous avons caractérisé des fluorophores organiques (rhodamine 6G (R6G) et coumarine 6 (C6)) de rendements quantiques connus dans l'éthanol, pour vérifier les performances du montage. Ce solvant n'étant pas transparent à 1 550 nm (longueur d'onde de la sonde), nous avons placé ces composés dans l'acétone. Nous avons comparé les rendements quantiques mesurés par notre instrument aux rendements quantiques obtenus par des mesures spectrométriques. Les spectres d'absorption et de fluorescence de ces composés sont visibles sur la figure IV.5.

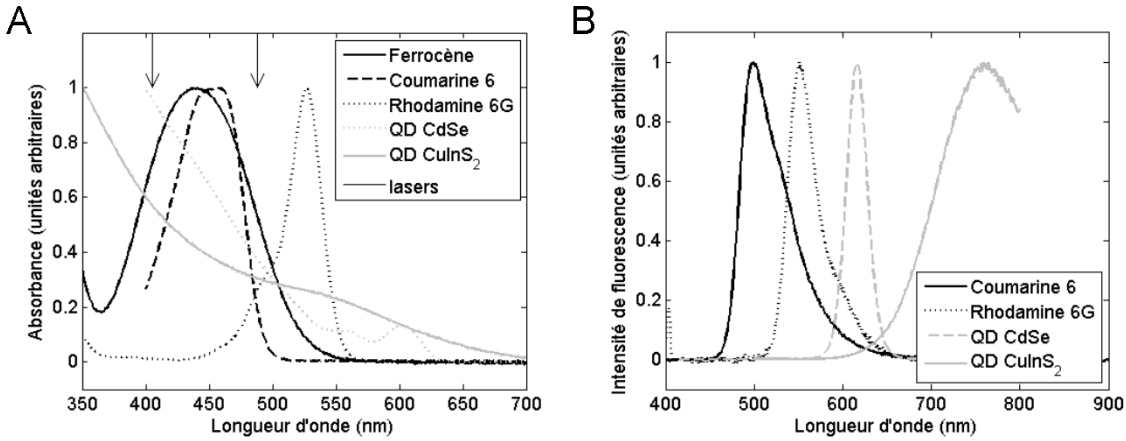


FIGURE IV.5 – Spectres d'absorbance A et de fluorescence B des différents composés utilisés (spectres normalisés au maximum d'absorption ou d'émission).

Le tableau IV.1 présente les résultats obtenus pour les deux fluorophores organiques et le ferrocène (en utilisant une première mesure de ferrocène comme référence). Les longueurs d'ondes d'excitation et d'émission sont précisées, ainsi que

la moyenne du rapport $\frac{S_{th}^{fluo}}{S_{th}^{ref}}\frac{a^{ref}}{a^{fluo}}$ pour plusieurs mesures (nombre de mesures entre parenthèses), le rendement quantique moyen qui en découle et celui mesuré au spectromètre.

| Échantillon | $\lambda_{ex}$ | $\langle\lambda_f\rangle$ | $\frac{S_{th}^{fluo}}{S_{th}^{ref}}\frac{a^{ref}}{a^{fluo}}$ | RQ lentille thermique (%) | RQ spectromètre (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| Ferrocène | 405 nm | - | $0,98 \pm 0,11$ (10) | - | - |
| (acétone) | 488 nm | - | $0,89 \pm 0,12$ (10) | - | - |
| R6G (acétone) | 488 nm | 565 nm | $0,17 \pm 0,02$ (6) | $96,1 \pm 2,7$ (6) | $95,2 \pm 4,5$ (3) |
| C6 (acétone) | 405 nm | 524 nm | $0,27 \pm 0,02$ (5) | $94,8 \pm 3,0$ (5) | $76,1 \pm 3,3$ (2) |
| | 488 nm | 524 nm | $0,14 \pm 0,03$ (5) | $92,8 \pm 3,7$ (5) | $76,3 \pm 2,4$ (2) |

TABLE IV.1 – Comparaison des mesures de rendement quantique de composés organiques dans l'acétone par lentille thermique et par spectrométrie pour deux longueurs d'onde d'excitation (Nombre de mesures entre parenthèses).

On peut tout d'abord voir que les mesures sur le ferrocène fournissent un rapport $\frac{S_{th}^{fluo}}{S_{th}^{ref}}\frac{a^{ref}}{a^{fluo}}$ proche de 1, ce qui est attendu car le rendement quantique du ferrocène est nul. Par contre, on voit que l'écart-type sur cette mesure est important. Les autres valeurs de ce rapport sont inférieures à 1, correspondant bien à un rendement quantique non nul. Les mesures de rendement quantique de la rhodamine 6G dans l'acétone fournissent une valeur de 96 %, bien en accord avec les mesures relatives effectuées au spectromètre et avec les valeurs de la littérature ($\sim$ 95 % et qui montrent une faible dépendance avec le solvant [13]). De plus les écart-types observés sont plus faibles que pour le ferrocène et sont meilleurs que ceux obtenus avec des mesures traditionnelles. La rhodamine 6G absorbant très peu à 405 nm, il n'a pas été possible d'utiliser cette longueur d'onde d'excitation. Nous avons donc choisi un autre fluorophore, la coumarine 6 qui absorbe bien les deux longueurs d'onde à notre disposition, pour vérifier l'accord des mesures pour deux faisceaux pompes différents.

Pour la coumarine 6, les mesures thermiques fournissent des résultats proches aux deux longueurs d'onde, de l'ordre de 94 %. Par contre, ces mesures sont significativement différentes des résultats obtenus par spectrométrie, qui sont plus proches de 76 %. Cet écart, n'apparaissant pas pour tous les échantillons et étant nettement supérieur à la dispersion des mesures, est potentiellement lié à un comportement particulier de la coumarine.

Afin de déterminer l'origine de cette différence, nous avons ajouté un petit spectromètre fibré à côté de la cuve, perpendiculairement aux faisceaux d'excitation, pour collecter la fluorescence émise par le composé et ainsi mesurer le rendement quantique avec une approche spectrométrique, mais dans les mêmes conditions d'excitation que la mesure thermique. Nous avons comparé l'émission de fluorescence de la coumarine 6 à celle de la rhodamine 6G, en parallèle des mesures thermiques. La rhodamine 6G dans l'acétone joue ainsi le rôle de référence fluorescente, dont on

considère un rendement quantique de 96 %. Dans ce cas, on trouve pour la coumarine 6 un rendement quantique de 93 % ± 3 % à 488 nm, cohérent avec les mesures thermiques (92,8 % à 488 nm et 94,8 % à 405 nm).

Nous avons ensuite réalisé des mesures comparatives entre le spectromètre fibré et les spectromètres classiques. Des spectres de fluorescence ont été enregistrés à l'aide des deux spectromètres en parallèle, pour remonter au rendement quantique. Ces comparaisons ont montré que les mesures effectuées avec le spectromètre fibré sont identiques à celles effectuées avec le spectromètre à réseau. Il semble donc que cette différence de rendement quantique soit due à la réponse de la coumarine 6 à l'excitation laser sur le montage thermique. Différentes explications sont envisageables :

- un éclairement trop important lors de la mesure thermique (même si en pratique il est bien inférieur à l'éclairement produisant la saturation des fluorophores ($E \sim 15\,\mathrm{W.cm^{-2}}$, alors que $E_{sat} \sim 2{,}5 \cdot 10^4\,\mathrm{W.cm^{-2}}$) [24]) ;
- effet d'indice du solvant non pris en compte lors des mesures relatives ;
- réponse intrinsèque de la coumarine 6, dont le rendement quantique varie avec la puissance d'excitation par exemple.

Chartier et al. [10], Georges et al. [24] ont déjà mis en évidence des différences de comportement entre les mesures thermiques et spectrométriques dues à une saturation des fluorophores ou à l'intervention d'un état triplet, mais leur montage utilisait un laser impulsionnel, donc dans un régime différent du nôtre.

Nous n'avons à ce jour pas réussi à déterminer l'origine de ces écarts de mesure de rendement quantique entre les deux instruments pour la coumarine 6. De nombreuses expériences complémentaires sont donc nécessaires pour déterminer l'origine exacte de ces différences (par exemple remplacement de la source lumineuse du spectromètre par une source cohérente, variation de la puissance d'excitation pour les deux méthodes de mesure, étude de la coumarine 6 dans l'éthanol...). De plus, il serait intéressant de tester le comportement d'autres fluorophores organiques dans les mêmes conditions, mais peu de fluorophores sont solubles dans l'acétone ou le tétrachloroéthylène (solvants imposés par la longueur d'onde de notre laser sonde). Le choix initial d'une sonde à 1 550 nm est donc très limitant, et pour réaliser les expériences évoquées, il faudra modifier cette sonde. Malheureusement, par manque de temps et de matériel, nous n'avons pu réaliser ces mesures.

### IV.3.2 Rendement quantique de quantum dots visibles et IR

Nous avons mesuré le rendement quantique de deux échantillons de quantum dots. Le premier est un échantillon de quantum dots cœur-coque CdSe/CdS/ZnS [25, 26], émettant vers 600 nm. Le second est composé de $CuInS_2$/ZnS [27], émettant vers 735 nm (les spectres d'absorption et de fluorescence sont présentés sur la figure IV.5). Après synthèse, ces composés sont lavés et dispersés dans le tétrachloroéthylène ($C_2Cl_4$).

Le tableau IV.2 présente les résultats obtenus sur ces deux échantillons. La mesure au spectromètre des quantum dots NIR $CuInS_2$ a été obtenue indirectement car il n'a pas été possible de trouver de fluorophore de référence absorbant à 405 nm et émettant autour de 735 nm.

Nous avons dû évaluer le rendement quantique en deux étapes : tout d'abord nous l'avons évalué en excitant à 700nm et en utilisant comme référence le vert d'indocyanine. Une fois le rendement quantique mesuré à cette longueur d'onde d'excitation nous avons comparé les intensités de fluorescence des QD à 700 nm et à 405 nm (corrigés de l'absorption des solutions) afin d'obtenir une mesure du rendement quantique avec une excitation à 405 nm.

| Échantillon | $\lambda_{ex}$ | $\langle\lambda_f\rangle$ | $\frac{S_{th}^{fluo}}{S_{th}^{ref}}\frac{a^{ref}}{a^{fluo}}$ | RQ lentille thermique (%) | RQ spectromètre (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| CdSe ($C_2Cl_4$) | 405 nm | 616 nm | $0,57 \pm 0,09$ (3) | $64,7 \pm 14,2$ (3) | $33,5$ (1) |
| | 488 nm | 616 nm | $0,55 \pm 0,10$ (3) | $56,8 \pm 12,5$ (3) | $35,6$ (1) |
| $CuInS_2$ ($C_2Cl_4$) | 405 nm | 735 nm | $0,62 \pm 0,10$ (5) | $69,1 \pm 18,8$ (5) | $50,0$ (1) |
| | 488 nm | 735 nm | $0,50 \pm 0,14$ (5) | $75,4 \pm 21,4$ (5) | - |

Table IV.2 – Comparaison des mesures de rendement quantique de quantum dots dans le tétrachloroéthylène ($C_2Cl_4$) par lentille thermique et par spectrométrie pour deux longueurs d'onde d'excitation (Nombre de mesures entre parenthèses).

Notons tout d'abord que les écarts-types des mesures thermiques sont très importants, supérieurs à ceux obtenus avec les fluorophores organiques. Ceci est en partie dû au fait que la longueur d'onde d'excitation est éloignée des longueurs d'onde d'émission des quantum dots. En effet, si on différencie la formule IV.18, l'erreur sur la valeur du rendement quantique $d\phi_f$ s'écrit :

$$d\phi_f = \frac{\langle\lambda_f\rangle}{\lambda_0} d\left(\frac{\theta_x a_{ref}}{\theta_{ref} a_x}\right). \tag{IV.29}$$

Ainsi on peut s'attendre à des incertitudes plus importantes sur les mesures de fluorophores infrarouges à cause de cette pondération des longueurs d'onde. Une autre explication peut être le comportement des quantum dots, qui sont moins stables en solution que des fluorophores organiques. Ils peuvent se déposer sur les parois de la cuve de mesure ou former des agrégats et ainsi fausser les mesures.

Enfin, nous observons un écart très important entre les mesures thermiques et les mesures spectrométriques. Ces résultats sont donc peu concluants. Il est possible que dans cette configuration, l'éclairement à l'excitation soit proche de l'éclairement

qui engendre la saturation de la fluorescence $E_{sat}$, et que cela perturbe les mesures :

$$E_{sat} \sim \frac{h\nu_{ex}}{2\sigma\tau} \quad [24], \tag{IV.30}$$

avec : $h$ la constante de Planck,
$\nu_{ex}$ la fréquence du faisceau d'excitation,
$\sigma$ la section efficace d'absorption,
$\tau$ le temps de vie de fluorescence.

Les quantum dots présentent des sections efficaces de l'ordre de $1 \cdot 10^{-14}\,\mathrm{cm}^2$ [28] et des temps de vie pouvant atteindre $\tau \sim 50\,\mathrm{ns}$, d'où un éclairement à la saturation de l'ordre de $50\,\mathrm{W.cm}^{-2}$, alors que nous utilisons avec un éclairement $E \sim 15\,\mathrm{W.cm}^{-2}$.

Outre les biais de mesures entre les deux instruments, les écarts-type des mesures thermiques présentées dans le tableau IV.2 ne nous fournissent pas de meilleure estimation du rendement quantique que les mesures spectrométriques. Pour que cette technique soit utile, il faut donc diminuer la dispersion des mesures. Pour cela, nous avons déterminé les principales sources d'incertitude de nos mesures, pour proposer des améliorations du montage.

# IV.4 Limitations et perspectives

## IV.4.1 Faible précision des mesures

L'écart-type observé sur les mesures thermiques de ferrocène ou de quantum dots est très important, et fournit des incertitudes bien plus importantes que la méthode de mesure relative. Ces variations peuvent provenir du comportement des quantum dots au cours de la mesure (agrégation, photodégradation, oxydation...), mais aussi des incertitudes de mesure. Pour estimer l'influence des différents paramètres sur la mesure, nous avons simulé des mesures avec des sources et des amplitudes de bruits variables.

### Simulations

À partir des équations obtenues au début de ce chapitre, nous avons généré des résultats de mesures avec des bruits variables. Nous avons analysé l'influence de deux paramètres sur la mesure : la longueur d'onde d'émission et le rendement quantique du fluorophore imposés lors de la génération des données simulées. Nous avons également étudié l'infuence des différents bruits de mesures sur l'incertitude de mesure finale, en simulant plusieurs amplitudes pour ceux-ci. Ces bruits, ainsi que leurs amplitudes typiques lors des mesures, sont :

- l'incertitude sur la mesure du signal thermique ($\sim 1\,\mu\mathrm{V}$) ;
- l'incertitude sur le flux moyen mesuré par le détecteur ($\sim 0{,}5\,\mathrm{mV}$) ;
- l'erreur sur l'absorption initiale des solutions ($\sim 0{,}1\,\%$ de la valeur mesurée) ;

– l'incertitude sur les volumes ajoutés au cours de la dilution ($\sim 1\,\%$ du volume ajouté).

Pour chaque combinaison d'amplitudes de bruit, 1000 à 10000 tirages ont été effectués. L'incertitude sur la mesure du rendement quantique a été obtenue à partir de la dispersion des résultats.

Ces simulations ont montré que pour des incertitudes de mesures fixées, la dispersion des résultats augmente lorsque le rendement quantique diminue ou que la longueur d'onde de fluorescence augmente (figure IV.6). Comme nous l'avons vu, la dépendance avec la longueur d'onde peut s'expliquer par le fait que l'incertitude sur le rapport des signaux thermiques et de l'absorbance soit multipliée par le rapport des longueurs d'onde d'émission et d'excitation (cf équation IV.29). Ainsi pour une fluorescence très éloignée de l'excitation, l'influence des erreurs de mesure sera plus importante. Ceci peut en partie expliquer pourquoi les résultats sur les fluorophores organiques présentent moins de dispersion que sur les quantum dots rouges et dans le proche infrarouge.

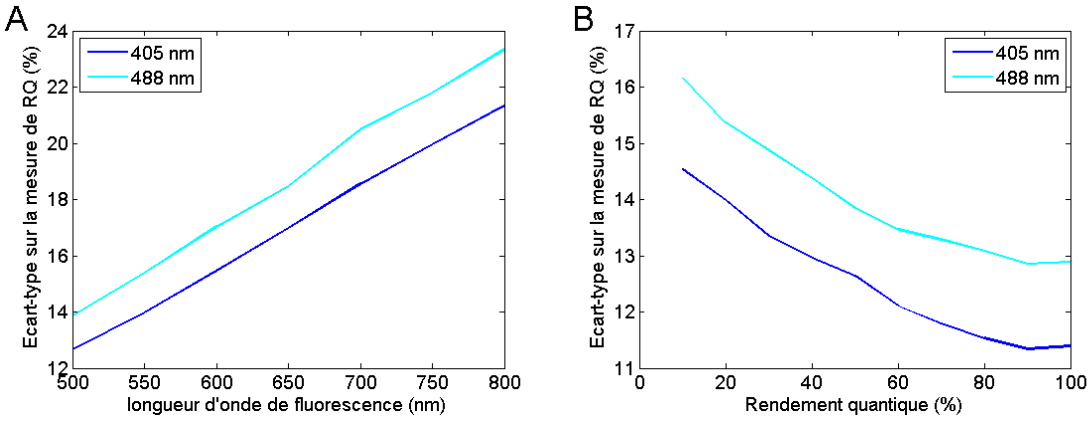


FIGURE IV.6 – A : influence de la longueur d'onde moyenne de fluorescence sur la dispersion des résultats (pour $\phi_f = 50\,\%$ et les bruits de mesures estimés). B : influence du rendement quantique sur la dispersion des résultats (pour $\langle\lambda_f\rangle = 500\,\text{nm}$ et les bruits de mesures estimés).

La dispersion des résultats simulés est importante, entre 10 et 25 %, ce qui est bien plus élevé que ce que nous avons obtenu pour les mesures sur fluorophores organiques, et proche de ce que nous fournissent les mesures sur les quantum dots. Afin de comprendre l'origine de ces écart-types importants, nous avons étudié l'influence des différentes sources de bruits sur l'incertitude finale (pour une valeur de rendement quantique et une longueur d'onde moyenne d'émission fixée).

La principale source d'erreur est l'incertitude sur la mesure du signal thermique (figure IV.7). L'incertitude estimée vaut environ $1\,\mu$V pour des valeurs mesurées comprises entre 10 et $150\,\mu$V. Différents facteurs peuvent expliquer ce bruit important. D'une part des variations de la puissance des lasers ou de la modulation influent sur la puissance incidente à la fréquence de modulation dans l'échantillon. D'autre part, la présence de poussières dans les solutions peut générer des variations brutales

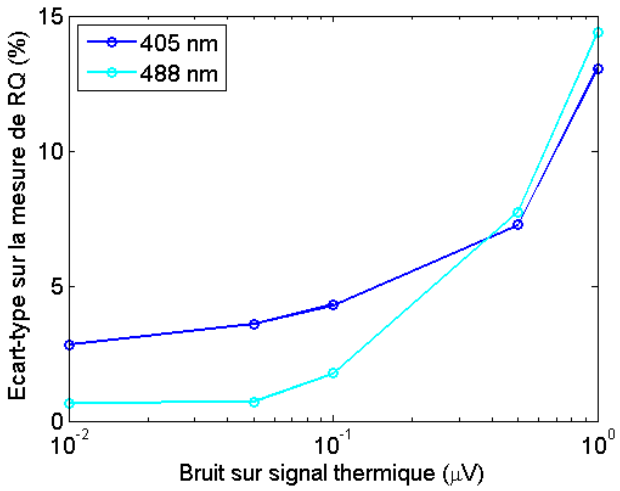


FIGURE IV.7 – Influence de l'incertitude de mesure du signal thermique sur la dispersion des résultats de simulations (avec $\lambda = 550\,\text{nm}$, $\phi_f = 80\,\%$, les autres bruits étant les incertitudes de mesure estimées lors des expériences).

et importantes. Malgré la filtration de ces solutions, il est difficile de les supprimer totalement. Il semble difficile de diminuer cette erreur de mesure sans modification du système pour différentes raisons :

- la fréquence de modulation a été choisie pour maximiser le rapport signal sur bruit ;
- une constante de temps d'une seconde a été choisie pour la détection synchrone. L'augmentation de cette constante ralentirait beaucoup les mesures et les rendrait plus sensibles à la dégradation des échantillons au cours du temps (oxydation, photodégradation, évaporation du solvant...)

Une division par 10 du bruit sur la valeur de signal thermique permettrait d'obtenir des incertitudes finales sur le rendement quantique inférieures à 5 %, similaires aux autres techniques de mesures actuellement utilisées. Pour cela, il est nécessaire de modifier le système. Dans cette dernière partie, nous allons voir les améliorations possibles du montage, qui permettraient d'atteindre la précision voulue.

### IV.4.2 Perspectives

#### Applications potentielles pour des mesures dans l'infrarouge

Une application prometteuse de cette technique reste la mesure de rendement quantique dans l'infrarouge et le proche infrarouge, car peu de fluorophores organiques sont aisément utilisables comme référence dans cette gamme spectrale. Toutefois nous avons vu que dans l'état actuel du système, il était préférable de diminuer le rapport $\frac{\langle\lambda_f\rangle}{\lambda_{ex}}$. On peut ainsi envisager l'utilisation de faisceaux d'excitation de longueur d'onde plus élevée et choisir une sonde de longueur d'onde plus basse,

compatible avec une plus grande gamme de solvants, notamment les plus courants (eau, éthanol, hexane...).

Ceci permettrait d'une part de caractériser des composés pouvant servir de référence pour des mesures relatives et d'autres part de caractériser plus précisément le rendement quantique de fluorescence des nouveaux quantum dots NIR actuellement développés, qui sont très intéressants pour des applications d'imagerie biologiques.

### Modifications du montage

De nombreuses modifications sont envisageables pour améliorer le montage proposé.

**Sonde collimatée.** Le modèle proposé utilise des faisceaux laser focalisés et fait intervenir la distance entre le col du faisceau pompe et celui du faisceau sonde. La qualité de la mesure peut donc être dégradée si cette distance varie au cours d'une expérience (à cause de poussières ou d'un dérèglement du montage).

Pour éviter ce problème, il est possible d'utiliser une configuration où le laser sonde est collimaté au niveau de l'échantillon [29], une faible variation de l'alignement des faisceaux aura ainsi une influence beaucoup plus faible sur le signal thermique.

**Automatisation des mesures.** Lors d'une mesure, beaucoup d'étapes simples sont réalisées par l'opérateur, alors qu'elles pourraient être automatisées. Ceci permettrait probablement d'avoir des résultats plus reproductibles et plus stables, en réduisant l'intervention de l'opérateur. On pourrait par exemple automatiser l'enregistrement du signal thermique ou l'ajout de solvant pour réaliser les dilutions. On peut ainsi espérer une diminution du temps de mesure, bénéfique pour des échantillons fragiles et peu stables, et limiter les dérives du système.

**Mesures multilongueur d'onde.** L'utilisation d'une référence interne développée au paragraphe IV.1.2 est très intéressante car elle permet de s'affranchir d'une référence externe et donc du changement d'échantillon au cours de la mesure. On pourrait envisager l'utilisation d'un laser argon, d'une source blanche puissante associée à un monochromateur ou d'un supercontinuum (en tenant compte des effets associés à une source pulsée), donnant accès à un large choix de longueurs d'onde d'excitation, permettant de couvrir tout le spectre d'absorption des composés considérés.

**Couplage de différentes méthodes de mesures.** Une amélioration significative serait l'association de différents types de mesure pour confronter les résultats plus facilement. Nous avons présenté le couplage d'une mesure thermique et d'une mesure relative par spectrométrie, mais le choix des solvants ne permettait pas une étude approfondie. On peut envisager de modifier le système pour mieux prendre en

compte la mesure relative qui reste la plus utilisée. L'association de détections thermique et acoustique est également possible, si on utilise des mesures transitoires, comme celles présentées dans la première partie de ce chapitre. La confrontation directe des résultats de différentes techniques pourrait apporter beaucoup à ces mesures de rendement quantique.

Ces différentes améliorations du montage permettront sans doute d'améliorer la reproductibilité et la précision des mesures de rendement quantique, et surtout de les rendre plus faciles à réaliser.

## IV.5 Conclusion

La détermination du rendement quantique de composés fluorescents est très difficile si l'on veut une mesure précise et reproductible. Nous avons choisi de développer une technique basée sur l'utilisation d'une lentille thermique pour supprimer la variabilité due à la référence fluorescente utilisée la plupart du temps. Les caractérisations de cet outil ont montré qu'il pouvait fournir des résultats intéressants, même si l'approche proposée n'améliore pas la dispersion des résultats dans de nombreux cas. De plus, les mesures réalisées sur la coumarine 6 ont fourni des résultats surprenants et pas encore compris. Des mesures de caractérisations et des expériences complémentaires sont nécessaires pour bien comprendre l'origine de ces variations et écarts. La réduction de l'incertitude sur la principale source d'erreur, qui nécessite plusieurs modifications du système, apportera sans doute des éléments de réponse. Enfin, le couplage de différentes méthodes de mesure en parallèle améliorerait la robustesse des mesures, en fournissant un moyen de comparer facilement les résultats et d'éviter les biais de mesure.

# Bibliographie

[1] J. R. Lakowicz. *Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Number vol. 1. Springer, 2006.

[2] Horiba Jobin-Yvon. A Guide to Recording Fluorescence Quantum Yields.

[3] C. Würth, M. Grabolle, J. Pauli, M. Spieles, and U. Resch-Genger. Comparison of methods and achievable uncertainties for the relative and absolute measurement of photoluminescence quantum yields. *Analytical chemistry*, 83(9), 2011.

[4] S. Fery-Forgues and D. Lavabre. Are Fluorescence Quantum Yields So Tricky to Measure ? A Demonstration Using Familiar Stationery Products. *Journal of Chemical Education*, 76(9), 1999.

[5] M. Grabolle, M. Spieles, and V. Lesnyak. Determination of the fluorescence quantum yield of quantum dots : suitable procedures and achievable uncertainties. *Analytical*, 81(15), 2009.

[6] S. Xu, C. Wang, Q. Xu, R. Li, H. Shao, H. Zhang, M. Fang, W. Lei, and Yiping Cui. What is a Convincing Photoluminescence Quantum Yield of Fluorescent Nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry C*, 2010.

[7] P. C. DeRose and U. Resch-Genger. Recommendations for fluorescence instrument qualification : the new ASTM Standard Guide. *Analytical chemistry*, 82 (5), 2010.

[8] N. Murase and C. Li. Consistent determination of photoluminescence quantum efficiency for phosphors in the form of solution, plate, thin film, and powder. *Journal of Luminescence*, 128(12), 2008.

[9] J. H. Brannon and D. Magde. Absolute quantum yield determination by thermal blooming. Fluorescein. *The Journal of Physical Chemistry*, 353(27), 1978.

[10] A. Chartier, J. Georges, and J. M. Mermet. Limitation of the thermal-lens method in fluorescence quantum yield measurements. *Chemical Physics Letters*, 17(4), 1990.

[11] M. L. Baesso and A. C. Bento. Absolute thermal lens method to determine fluorescence quantum efficiency and concentration quenching of solids. *Physical Review B*, 57(17), 1998.

[12] M. Fischer. Fluorescence quantum yield of rhodamine 6g in ethanol as a function of concentration using thermal lens spectrometry. *Chemical Physics Letters*, 2614(September), 1996.

[13] D. Magde, R. Wong, and P. G. Seybold. Fluorescence quantum yields and their relation to lifetimes of rhodamine 6G and fluorescein in nine solvents : improved absolute standards for quantum yields. *Photochemistry and photobiology*, 75(4), 2002.

[14] S. M. Lima, A. A. Andrade, R. Lebullenger, A. C. Hernandes, T. Catunda, and M. L. Baesso. Multiwavelength thermal lens determination of fluorescence quantum efficiency of solids : Application to Nd[3+]-doped fluoride glass. *Applied Physics Letters*, 78(21), 2001.

[15] A. A. Andrade, S. M. Lima, V. Pilla, J. A. Sampaio, T. Catunda, and M. L. Baesso. Fluorescence quantum efficiency measurements using the thermal lens technique. *Review of Scientific Instruments*, 74(1), 2003.

[16] C. Jacinto, S. M. Lima, and T. Catunda. Determination of fluorescence quantum efficiency in solutions by thermal lens measurements at several wavelengths : Application to Rhodamine 6G. *Journal of Physics IV*, 125, 2005.

[17] V. Pilla, L. Alves, E. Munin, and M. Pacheco. Radiative quantum efficiency of CdSe/ZnS quantum dots suspended in different solvents. *Optics Communications*, 280(1), 2007.

[18] V. Pilla, L. Alves, M. Pacheco, and E. Munin. Radiative quantum efficiency of CdSe/ZnS core-shell colloidal solutions : Size-dependence. *Optics Communications*, 281(23), 2008.

[19] R. A. Cruz, V. Pilla, and T. Catunda. Quantum yield excitation spectrum (UV-visible) of CdSe/ZnS core-shell quantum dots by thermal lens spectrometry. *Journal of Applied Physics*, 107(8), 2010.

[20] P. Sathy, R. Philip, V. P. N. Nampoori, and C. P. G. Vallabhan. Fluorescence quantum yield of rhodamine-6g using pulsed photoacoustic technique. *Pramana-Journal of physics*, 34(6), 1990.

[21] J. Moreau and V. Loriette. Confocal thermal-lens microscope. *Optics letters*, 29(13), 2004.

[22] J. Moreau and V. Loriette. Confocal Dual-Beam Thermal-Lens Microscope : Model and Experimental Results. *Japanese Journal of Applied Physics*, 45(9A), 2006.

[23] P. Hello and J. Y. Vinet. Analytical models of thermal aberrations in massive mirrors heated by high power laser beams. *Journal de physique*, 51(12), 1990.

[24] J. Georges, N. Arnaud, and L. Parise. Limitations Arising from Optical Saturation in Fluorescence and Thermal Lens Spectrometries Using Pulsed Laser Excitation : Application to the Determination of the Fluorescence Quantum Yield of Rhodamine 6G. *Solutions*, 50(12), 1996.

[25] L. Qu, Z. A. Peng, and X. Peng. Alternative Routes toward High Quality CdSe Nanocrystals. *Nano Letters*, 1(6), 2001.

[26] L. Qu and X. Peng. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *Journal of the American Chemical Society*, 124(9), 2002.

[27] L. Li, T. J. Daou, I. Texier, T. K. C. Tran, Nguyen Q. L., and P. Reiss. Highly Luminescent CuInS 2 / ZnS Core / Shell Nanocrystals : Cadmium-Free Quantum Dots for In Vivo Imaging. *Chemistry of Materials*, 21(12), 2009.

[28] C. A. Leatherdale, F. V. Mikulec, and M. G. Bawendi. On the absorption cross section of cdse nanocrystal quantum dots. *Journal of physical Chemistry*, 106 (31), 2002.

[29] A. Marcano, H. Cabrera, M. Guerra, R. A. Cruz, C. Jacinto, and T. Catunda. Optimizing and calibrating a mode-mismatched thermal lens experiment for low absorption measurement. *Journal of the Optical Society of America B*, 23 (7), 2006.

# Conclusion

Les développements récents en microscopie de fluorescence ont démontré la possibilité de dépasser certaines limites, qu'elles soient fondamentales, comme la limite de résolution, ou pratiques, comme la perte de résolution par les aberrations induites par les échantillons biologiques. Des techniques très performantes ont ainsi été développées, qui intéressent fortement les utilisateurs de ces microscopes de fluorescence. Mais ces outils ne sont pas toujours directement utilisables à cause de fortes contraintes sur les échantillons ou de difficultés techniques dans la réalisation des images. Il est donc important de poursuivre le développement de ces techniques et de trouver des solutions alternatives pour élargir leurs champs d'application.

Au cours de ma thèse, je me suis principalement intéressé aux techniques d'illumination structurée et d'optique adaptative pour la microscopie plein champ. Ces techniques permettent de répondre aux limitations importantes que sont la lumière parasite provenant des plans hors mise au point, la résolution limitée par la diffraction, la dégradation des performances d'imagerie par les aberrations ou encore le long temps d'acquisition.

Le travail que j'ai effectué a porté sur l'amélioration et le développement de ces outils d'illumination structurée et d'optique adaptative adaptés à l'observation d'échantillons biologiques en microscopie plein champ, afin de proposer des solutions originales pour contourner certaines de ces limitations.

Une première partie de mon travail a été consacrée à l'accélération de la cadence des techniques de coupe optique par illumination structurée. Deux méthodes ont été considérées. La première, qui utilise la projection d'une grille oscillante, nécessite l'acquisition d'au moins trois images et est de ce fait limitée en cadence d'acquisition. La seconde méthode est dérivée de la technique HiLo, où deux images sont nécessaires à la reconstruction (une structurée et une homogène). Dans notre montage, elles sont acquises simultanément, dans deux fenêtres spectrales distinctes, ce qui permet de reconstruire des images de coupe optique à une cadence similaire à celle obtenue en microscopie plein champ classique (typiquement de l'ordre de 30 images par seconde pour des images $512 \times 512$). En revanche, l'utilisation de deux marqueurs fluorescents pour l'acquisition simultanée des deux images limite la possibilité d'observer deux structures d'intérêt en parallèle, car cela nécessiterait l'emploi de quatre marqueurs fluorescents, difficiles à séparer à l'excitation et à l'émission. Une perspective intéressante est néanmoins l'observation d'échantillons fluorescents

très dynamiques (C. Elegans, par exemple).

Un second volet de ma thèse a concerné l'étude d'une seconde technique d'illumination structurée pour dépasser la limite de résolution imposée par la diffraction. Elle permet de doubler la résolution spatiale d'un microscope plein champ classique, à partir d'un effet de Moiré entre l'échantillon et la modulation de l'illumination. Un des principaux intérêts de cette technique est qu'elle impose peu de restrictions sur le marquage de l'échantillon, il n'est donc pas nécessaire de développer de nouveaux marqueurs ou de nouvelles stratégies de marquage. Les échantillons fluorescents existants (notamment les constructions à base de protéines fluorescentes) peuvent directement être observés en super-résolution, ce qui explique l'intérêt des biologistes pour cette technique. Néanmoins, jusqu'à présent pour obtenir une image super-résolue, 9 images au minimum étaient nécessaires à la reconstruction, ce qui limite la résolution temporelle et donc les phénomènes dynamiques observables.

Nous avons mis en œuvre une nouvelle méthode de reconstruction basée sur une approche bayésienne, qui relaxe les contraintes sur le nombre d'images nécessaires à la reconstruction. Quatre images sont ainsi suffisantes pour obtenir une image super-résolue. Associée à une fenêtre de reconstruction glissante, cette approche augmente la cadence de réalisation d'images super-résolues. Des échantillons tests ont permis de valider cette méthode de reconstruction, qu'il faut à présent appliquer à des échantillons biologiques réels. Des modifications du montage d'acquisition des images et de l'algorithme de traitement des images sont envisagées pour améliorer la reconstruction, notamment la sensibilité au bruit présent dans les images brutes. Ce travail ouvre ainsi de nombreuses perspectives pour l'étude de réelles problématiques biologiques.

Une limitation importante en microscopie de fluorescence plein champ, liée à l'observation d'échantillons épais, est la présence d'aberrations optiques introduites par les échantillons eux-mêmes, qui dégradent les performances nominales des microscopes en terme de résolution spatiale. Ceci est également valable pour les techniques d'illumination structurée développées, car le contraste du motif d'illumination diminue avec les aberrations, ce qui réduit le signal d'intérêt et donc le rapport signal sur bruit des images reconstruites. Il est possible de compenser ces aberrations par l'utilisation d'un système d'optique adaptative. L'ajout d'un miroir déformable dans le système optique permet de corriger les aberrations introduites par le système optique et l'échantillon pour restaurer des capacités d'imagerie limitées par la diffraction.

Nous avons développé un montage d'optique adaptative basé sur la mesure du front d'onde émis par des billes placées dans l'échantillon. Ces billes ont des spectres d'absorption et d'émission distincts du marquage d'intérêt dans l'échantillon, ce qui permet de préserver la fluorescence de celui-ci au cours de la correction. Nous avons montré que ce système est capable de corriger les aberrations induites par le système optique et les échantillons observés. Nous avons caractérisé les capacités de correction de notre système, notamment en ce qui concerne l'étendue de la zone corrigée. Pour des échantillons peu aberrants, cette zone s'étend jusqu'à environ 30 $\mu$m au-

tour des billes utilisées pour la mesure de front d'onde. Ceci étant faible comparé au champ total accessible par la caméra d'imagerie (170 $\mu$m), nous avons mis en place une correction successive de plusieurs billes réparties dans le champ. Les premiers résultats obtenus avec cette technique sont encourageants, mais de nombreuses caractérisations sont encore nécessaires pour déterminer les performances.

Une des limitations de la méthode proposée est la nécessité d'avoir des billes fluorescentes dans l'échantillon pour la mesure de front d'onde. Cela nécessite une préparation spécifique des échantillons, qui peut-être complexe au vu de la taille des billes utilisées ($\sim 5\,\mu$m). Une solution possible pour contourner ce problème est le développement de la tomographie par optique adaptative où les billes sont placées derrière l'échantillon et où les mesures de front d'onde de plusieurs billes permettent de cartographier en 3D les aberrations de l'échantillon. Cette information pourra ensuite être utilisée pour déterminer les corrections du front d'onde afin d'observer différentes zones de l'objet d'intérêt et ainsi restaurer une qualité d'imagerie optimale dans tout l'échantillon.

Les différentes applications de microscopie que nous venons d'aborder nécessitent des fluorophores brillants et résistants. La caractérisation de ces paramètres est primordiale afin de choisir les fluorophores les plus adaptés à chaque application. Une des caractéristiques les plus importantes est le rendement quantique qui traduit l'efficacité de conversion des photons absorbés en photons de fluorescence. La mesure de cette grandeur physique par les mesures usuelles est délicate, en particulier pour les sondes infrarouges.

Un instrument de mesure du rendement quantique de fluorophores infrarouges par effet de lentille thermique a été développé. Il se base sur la mesure de la chaleur dissipée par le composé pour déterminer indirectement l'efficacité de fluorescence. Cet outil a été développé dans le but d'améliorer la précision de mesure de rendement quantique, mais nous avons en pratique pu constater d'une part des comportements étranges de certains fluorophores et d'autre part une précision des mesures plus faible que ce qui était recherché (incertitude de 20 %, contre 10 % pour les méthodes classiques). Des améliorations ont été envisagées pour améliorer la précision de la mesure, et ainsi proposer une alternative aux méthodes de mesure classiques.

# Annexe A : Calculs d'illumination structurée

## A.1 Remarques préliminaires

Les réglages de la grille dans le microscope à illumination structurée ont pour but de rendre le système, basé sur une détection synchrone multiplexée, identique à un système dans lequel on prendrait simplement quatre images pour quatre positions différentes de grille. Dans le cas classique, le but de la combinaison d'images est de faire disparaître l'image de la grille de l'image finale ; c'est donc ce que nous chercherons à faire dans le cas de la détection synchrone multiplexée. Pour effectuer les calculs on peut soit partir d'une illumination réaliste, un réseau carré éventuellement convolué par la psf du système optique, ou bien simplifier les calculs en prenant une grille sinusoidale.

Dans ce qui suit on notera $I_p(x, y)$ l'image, éventuellement indexée par $p$, enregistrée par la caméra ; $R(x, y)$ le facteur de réflexion de l'objet, $F(x, y)$ un fond dans l'image qui n'est pas modifié par la présence de la grille, et $E_p(x, y)$ l'illumination.

## A.2 Cas de l'éclairage statique

Dans ce cas, $E_p$ ne dépend pas du temps et on a

$$I_p = R \times E_p + F \tag{A.1}$$

L'illumination, dans le cas sinusoidal, a la forme

$$E_p(x, y) = \frac{1}{2}\left(1 + \cos\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi\right)\right) \tag{A.2}$$

où $p_x$ est la période de modulation et $\varphi$ est la phase de la structure par rapport à l'origine des coordonnées. On peut écrire également

$$E_p(x, y) = \frac{1}{2}\left(1 + \cos\left(2\pi\frac{x + x_\varphi}{p_x}\right)\right) \tag{A.3}$$

le décalage de la structure est $x_\varphi$ et

$$\varphi = 2\pi\frac{x_\varphi}{p_x} \tag{A.4}$$

On prend 4 images avec quatre déphasages différents

$$\varphi_p = \varphi_0 + p\frac{\pi}{2} \tag{A.5}$$

avec $p = \{0, 1, 2, 3\}$ les quatre images s'écrivent

$$I_0 = R \times \frac{1}{2}\left(1 + \cos\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi_0\right)\right) + F \tag{A.6}$$

$$I_1 = R \times \frac{1}{2}\left(1 - \sin\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi_0\right)\right) + F \tag{A.7}$$

$$I_2 = R \times \frac{1}{2}\left(1 - \cos\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi_0\right)\right) + F \tag{A.8}$$

$$I_3 = R \times \frac{1}{2}\left(1 + \sin\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi_0\right)\right) + F \tag{A.9}$$

On voit que

$$I_0 - I_2 = R \times \cos\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi_0\right) \tag{A.10}$$

$$I_3 - I_1 = R \times \sin\left(2\pi\frac{x}{p_x} + \varphi_0\right) \tag{A.11}$$

et donc que

$$R = \sqrt{(I_0 - I_2)^2 + (I_1 - I_3)^2} \tag{A.12}$$

permet de retrouver le facteur de réflexion de l'objet.

## A.3 Cas de l'éclairage dynamique

Comme dans le cas précédent, on va chercher une combinaison d'images qui va nous donner la valeur de $R$. Dans ce cas, le déplacement de la grille dépend du temps et on écrit :

$$x_\varphi(t) = X \sin(2\pi f t + \psi) + x_{\varphi_0} \tag{A.13}$$

Dans cette équation le terme $x_{\varphi_0}$ est celui qui donne $\varphi_0$ lorsqu'on calcule le déphasage. Il est compris entre $-p_x/2$ et $p_x/2$. La variable $\psi$ est un décalage temporel qui est présent car on tient compte de la synchronisation entre la position de la grille et l'acquisition par la caméra. La caméra intègre quatre images durant quatre quarts de période successifs, $p = \{0, 1, 2, 3\}$.

$$I_p = \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} R \times \frac{1}{2}\left(1 + \cos\left(2\pi\frac{x + x_\varphi(t)}{p_x}\right)\right) + F dt \tag{A.14}$$

soit

$$I_p = \frac{FT}{4} + R \times \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} \frac{1}{2}\left(1 + \cos\left(2\pi\frac{x + x_\varphi(t)}{p_x}\right)\right) dt \tag{A.15}$$

$$I_p = \frac{FT}{4} + \frac{RT}{8} + \frac{R}{2} \times \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} \cos\left(2\pi \frac{x + x_\varphi(t)}{p_x}\right) dt \tag{A.16}$$

$$I_p = \frac{FT}{4} + \frac{RT}{8} + \frac{R}{2} \times \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} \cos\left(2\pi \left[\frac{x}{p_x} + \frac{X}{p_x}\sin(2\pi f t + \psi)\right] + \varphi_0\right) dt \tag{A.17}$$

Pour simplifier les notations on écrit $K = FT/4 + RT/8$, $\xi = 2\pi x/p_x + \varphi_0$ et $f_x = 1/p_x$

$$I_p = K + \frac{R}{2} \times \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} \cos(\xi + 2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi))\, dt \tag{A.18}$$

Le cosinus dans l'intégrale est transformé en somme de fonctions de Bessel

$$\begin{aligned}\cos(\xi + 2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi)) &= \cos(\xi)\cos(2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi)) \\ &\quad - \sin(\xi)\sin(2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi))\end{aligned} \tag{A.19}$$

$$\cos(\xi + 2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi)) = \cos(\xi)\left\{\begin{array}{c} J_0(2\pi X f_x) \\ +2\sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(2\pi X f_x)\cos\{2k(2\pi f t + \psi)\} \end{array}\right\} \tag{A.20}$$

$$- \sin(\xi)\left\{2\sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(2\pi X f_x)\sin\{(2k+1)(2\pi f t + \psi)\}\right\}$$

On a donc à évaluer les deux intégrales

$$\Delta_c = \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} \cos\{2k(2\pi f t + \psi)\}\, dt \tag{A.21}$$

$$\Delta_s = \int_{p\frac{T}{4}}^{(p+1)\frac{T}{4}} \sin\{(2k+1)(2\pi f t + \psi)\}\, dt \tag{A.22}$$

qui permettront de calculer

$$\begin{aligned} I_p = K &+ \\ &+ \frac{R}{2}\cos(\xi)\left\{\frac{T}{4}J_0(2\pi X f_x) + 2\sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(2\pi X f_x)\Delta_c\right\} \\ &- \frac{R}{2}\sin(\xi)\left\{2\sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(2\pi X f_x)\Delta_s\right\} \end{aligned} \tag{A.23}$$

On a

$$\begin{aligned}\int_{x_1}^{x_2} \cos(ax+b)\, dx &= \int_{x_1}^{x_2} \cos(ax)\cos(b) - \sin(ax)\sin(b)\, dx \\ &= \frac{1}{a}\left\{\begin{array}{c} (\sin(ax_2) - \sin(ax_1))\cos(b) \\ +(\cos(ax_2) - \cos(ax_1))\sin(b) \end{array}\right\} \\ &= \frac{1}{a}\{\sin(ax_2 + b) - \sin(ax_1 + b)\}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\int_{x_1}^{x_2} \sin(ax+b)\,dx &= \int_{x_1}^{x_2} \sin(ax)\cos(b) + \cos(ax)\sin(b)\,dx \\ &= \frac{1}{a}\left\{\begin{array}{c} -(\cos(ax_2)-\cos(ax_1))\cos(b) \\ +(\sin(ax_2)-\sin(ax_1))\sin(b) \end{array}\right\} \\ &= \frac{1}{a}\{-\cos(ax_2+b)+\cos(ax_1+b)\}\end{aligned}$$

d'où

$$\Delta_c = \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\left\{2k\left((p+1)\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} - \sin\left\{2k\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right) \tag{A.24}$$

$$\Delta_s = \frac{T}{2\pi(2k+1)}\left(-\cos\left\{(2k+1)\left((p+1)\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} + \cos\left\{(2k+1)\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right)$$

On a donc

$$\begin{aligned} I_p &= K + \frac{R}{2}\cos(\xi)\frac{T}{4}J_0(2\pi X f_x) \qquad (A.25) \\ &+ \frac{R}{2}\cos(\xi)\left\{\frac{T}{\pi}\sum_{k=1}^{\infty}\frac{J_{2k}(2\pi X f_x)}{2k}\left(\sin\left\{2k\left((p+1)\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} - \sin\left\{2k\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right)\right\} \\ &- \frac{R}{2}\sin(\xi)\left\{\frac{T}{\pi}\sum_{k=0}^{\infty}\frac{J_{2k+1}(2\pi X f_x)}{2k+1}\left(\begin{array}{c} -\cos\left\{(2k+1)\left((p+1)\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} \\ +\cos\left\{(2k+1)\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} \end{array}\right)\right\}\end{aligned}$$

Etudions les deux fonctions $\Delta_c$ et $\Delta_s$. Dans le cas de $\Delta_c$, quand on passe d'une valeur de p à la suivante, on ajoute $k\pi$ à l'argument des sinus, on multiplie donc par $(-1)^k$. On peut écrire

$$\begin{aligned}\Delta_c(p=0) &= \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\left\{2k\left(\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} - \sin\{2k(\psi)\}\right) \\ &= \frac{T}{4\pi k}(\cos\{k\pi\}\sin\{2k\psi\} - \sin\{2k\psi\}) \\ &= \frac{T}{4\pi k}\left((-1)^k - 1\right)\sin\{2k\psi\} \\ \Delta_c(p=1) &= \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\{2k(\pi+\psi)\} - \sin\left\{2k\left(\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right) \\ &= -\Delta_c(p=0) \\ \Delta_c(p=2) &= \Delta_c(p=0) \\ \Delta_c(p=3) &= -\Delta_c(p=0)\end{aligned}$$

On note

$$\Delta_c^0 = \frac{T}{4\pi k}\left((-1)^k - 1\right)\sin(2k\psi) \tag{A.26}$$

Dans le cas de $\Delta_s$, quand on passe d'une valeur de p à la suivante, on ajoute $(2k+1)\,\pi/2$ à l'argument des cosinus. On peut écrire

$$\begin{aligned}
\Delta_s\,(p=0) &= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left(-\cos\left\{(2k+1)\left(\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}+\cos\left\{(2k+1)\,(\psi)\right\}\right)\\
&= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\begin{pmatrix} -\cos\left\{(2k+1)\,\frac{\pi}{2}\right\}\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\} \\ +\sin\left\{(2k+1)\,\frac{\pi}{2}\right\}\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}+\cos\left\{(2k+1)\,(\psi)\right\}\end{pmatrix}\\
&= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left((-1)^k\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}+\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\}\right)\\
\Delta_s\,(p=1) &= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left(\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\}-(-1)^k\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}\right)\\
\Delta_s\,(p=2) &= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left(-\cos\left\{(2k+1)\left(3\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}+\cos\left\{(2k+1)\left(2\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right)\\
&= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\begin{pmatrix} -\cos\left\{(2k+1)\,3\frac{\pi}{2}\right\}\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\} \\ +\sin\left\{(2k+1)\,3\frac{\pi}{2}\right\}\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\} \\ +\cos\left\{(2k+1)\,\pi\right\}\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\} \\ -\sin\left\{(2k+1)\,\pi\right\}\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}\end{pmatrix}\\
&= \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left(-(-1)^k\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}-\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\}\right)\\
&= -\Delta_s\,(p=0)\\
\Delta_s\,(p=3) &= -\Delta_s\,(p=1)
\end{aligned}$$

en notant

$$\Delta_s^0 = \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left((-1)^k\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}+\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\}\right) \tag{A.27}$$

$$\Delta_s^1 = \frac{T}{2\pi\,(2k+1)}\left(\cos\left\{(2k+1)\,\psi\right\}-(-1)^k\sin\left\{(2k+1)\,\psi\right\}\right) \tag{A.28}$$

On peut écrire les quatre images comme

$$I_0 = K^0 + R\left(\cos(\xi)\sum_{k=1}^{\infty}J_{2k}\,(2\pi X f_x)\Delta_c^0 - \sin(\xi)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\,(2\pi X f_x)\Delta_s^0\right) \tag{A.29}$$

$$I_1 = K^0 + R\left(-\cos(\xi)\sum_{k=1}^{\infty}J_{2k}\,(2\pi X f_x)\Delta_c^0 - \sin(\xi)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\,(2\pi X f_x)\Delta_s^1\right) \tag{A.30}$$

$$I_2 = K^0 + R\left(\cos(\xi)\sum_{k=1}^{\infty}J_{2k}\,(2\pi X f_x)\Delta_c^0 + \sin(\xi)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\,(2\pi X f_x)\Delta_s^0\right) \tag{A.31}$$

$$I_3 = K^0 + R\left(-\cos(\xi)\sum_{k=1}^{\infty}J_{2k}\,(2\pi X f_x)\Delta_c^0 + \sin(\xi)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\,(2\pi X f_x)\Delta_s^1\right) \tag{A.32}$$

## A.4 Cas de l'éclairage dynamique réduit

Dans le cas ou la caméra intègre quatre images durant des périodes successives de durée $\tau$ inférieure à un quart de période de modulation on a, $p = \{0, 1, 2, 3\}$.

$$I_p = \frac{FT}{4} + \frac{RT}{8} + \frac{R}{2} \times \int_{p\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}+\tau} \cos\left(2\pi \frac{x + x_\varphi(t)}{p_x}\right) dt \tag{A.33}$$

$$I_p = \frac{FT}{4} + \frac{RT}{8} + \frac{R}{2} \times \int_{p\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}+\tau} \cos\left(2\pi \left[\frac{x}{p_x} + \frac{X}{p_x}\sin(2\pi f t + \psi)\right] + \varphi_0\right) dt \tag{A.34}$$

Avec les notations définies précédemment $K = FT/4 + RT/8$, $\xi = 2\pi x/p_x + \varphi_0$ et $f_x = 1/p_x$

$$I_p = K + \frac{R}{2} \times \int_{p\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}+\tau} \cos\left(\xi + 2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi)\right) dt \tag{A.35}$$

Le cosinus dans l'intégrale est transformé en somme de fonctions de Bessel

$$\cos\left(\xi + 2\pi X f_x \sin(2\pi f t + \psi)\right) = \cos(\xi) \left\{ \begin{array}{c} J_0(2\pi X f_x) \\ +2\sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(2\pi X f_x) \cos\{2k(2\pi f t + \psi)\} \end{array} \right\} \tag{A.36}$$

$$- \sin(\xi) \left\{ 2\sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(2\pi X f_x) \sin\{(2k+1)(2\pi f t + \psi)\} \right\}$$

On a donc à évaluer les deux intégrales

$$\Delta_c = \int_{p\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}+\tau} \cos\{2k(2\pi f t + \psi)\} dt \tag{A.37}$$

$$\Delta_s = \int_{p\frac{T}{4}}^{p\frac{T}{4}+\tau} \sin\{(2k+1)(2\pi f t + \psi)\} dt \tag{A.38}$$

qui permettront de calculer

$$\begin{aligned} I_p = K + & \\ & + \frac{R}{2}\cos(\xi) \left\{ \frac{T}{4} J_0(2\pi X f_x) + 2\sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}(2\pi X f_x) \Delta_c \right\} \\ & - \frac{R}{2}\sin(\xi) \left\{ 2\sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}(2\pi X f_x) \Delta_s \right\} \end{aligned} \tag{A.39}$$

On a

$$\begin{aligned} \int_{x_1}^{x_2} \cos(ax+b)\, dx &= \int_{x_1}^{x_2} \cos(ax)\cos(b) - \sin(ax)\sin(b)\, dx \\ &= \frac{1}{a} \left\{ \begin{array}{c} (\sin(ax_2) - \sin(ax_1))\cos(b) \\ + (\cos(ax_2) - \cos(ax_1))\sin(b) \end{array} \right\} \\ &= \frac{1}{a} \{\sin(ax_2 + b) - \sin(ax_1 + b)\} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\int_{x_1}^{x_2} \sin(ax+b)\,dx &= \int_{x_1}^{x_2} \sin(ax)\cos(b) + \cos(ax)\sin(b)\,dx \\ &= \frac{1}{a}\left\{\begin{array}{c} -(\cos(ax_2)-\cos(ax_1))\cos(b) \\ +(\sin(ax_2)-\sin(ax_1))\sin(b) \end{array}\right\} \\ &= \frac{1}{a}\{-\cos(ax_2+b)+\cos(ax_1+b)\}\end{aligned}$$

Ici $x_1 = pT/4 = p/(4f)$ et $x_2 = pT/4+\tau = p/(4f)+\tau$ et $a$ vaut $4k\pi f$ où $(2k+1)(2\pi f)$ d'où

$$\Delta_c = \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\left\{2k\left(p\frac{\pi}{2}+2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} - \sin\left\{2k\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right) \tag{A.40}$$

$$\Delta_s = \frac{T}{2\pi(2k+1)}\left(-\cos\left\{(2k+1)\left(p\frac{\pi}{2}+2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} + \cos\left\{(2k+1)\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right)$$

On a donc

$$\begin{aligned} I_p = K &+ \frac{R}{2}\cos(\xi)\frac{T}{4}J_0(2\pi X f_x) \qquad (A.41)\\ &+ \frac{R}{2}\cos(\xi)\left\{\frac{T}{\pi}\sum_{k=1}^{\infty}\frac{J_{2k}(2\pi X f_x)}{2k}\left(\sin\left\{2k\left(p\frac{\pi}{2}+2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} - \sin\left\{2k\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right)\right\} \\ &- \frac{R}{2}\sin(\xi)\left\{\frac{T}{\pi}\sum_{k=0}^{\infty}\frac{J_{2k+1}(2\pi X f_x)}{2k+1}\left(\begin{array}{c} -\cos\left\{(2k+1)\left(p\frac{\pi}{2}+2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} \\ +\cos\left\{(2k+1)\left(p\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\} \end{array}\right)\right\}\end{aligned}$$

Etudions les deux fonctions $\Delta_c$ et $\Delta_s$. Dans le cas de $\Delta_c$, quand on passe d'une valeur de p à la suivante, on ajoute $k\pi$ à l'argument des sinus, on multiplie donc par $(-1)^k$. On peut écrire

$$\begin{aligned}\Delta_c(p=0) &= \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\left\{2k\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} - \sin\{2k(\psi)\}\right) \\ \Delta_c(p=1) &= \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\left\{2k\left(\frac{\pi}{2}+2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} - \sin\left\{2k\left(\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right) \\ &= (-1)^k\Delta_c(p=0) \\ \Delta_c(p=2) &= \Delta_c(p=0) \\ \Delta_c(p=3) &= (-1)^k\Delta_c(p=0)\end{aligned}$$

On note

$$\Delta_c^0 = \frac{T}{4\pi k}\left(\sin\left\{2k\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\} - \sin\{2k(\psi)\}\right) \tag{A.42}$$

Dans le cas de $\Delta_s$, quand on passe d'une valeur de p à la suivante, on ajoute $(2k+1)\pi/2$ à l'argument des cosinus. On peut écrire

$$
\begin{aligned}
\Delta_s\left(p=0\right) &= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(-\cos\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}+\cos\left\{\left(2k+1\right)\left(\psi\right)\right\}\right)\\
\Delta_s\left(p=1\right) &= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(-\cos\left\{\left(2k+1\right)\left(\frac{\pi}{2}+2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}+\cos\left\{\left(2k+1\right)\left(\frac{\pi}{2}+\psi\right)\right\}\right)\\
&= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(\begin{array}{c}\sin\left\{\left(2k+1\right)\frac{\pi}{2}\right\}\sin\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}-\\ \sin\left\{\left(2k+1\right)\frac{\pi}{2}\right\}\sin\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\}\end{array}\right)\\
&= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(-1\right)^k\left(\sin\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}-\sin\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\}\right)\\
\Delta_s\left(p=2\right) &= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(\begin{array}{c}\sin\left\{\left(2k+1\right)\left(\frac{\pi}{2}+\pi\right)\right\}\sin\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}-\\ \sin\left\{\left(2k+1\right)\left(\frac{\pi}{2}+\pi\right)\right\}\sin\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\}\end{array}\right)\\
&= -\Delta_s\left(p=0\right)\\
\Delta_s\left(p=3\right) &= -\Delta_s\left(p=1\right)
\end{aligned}
$$

en notant

$$\Delta_s^0 = \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(-\cos\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}+\cos\left\{\left(2k+1\right)\left(\psi\right)\right\}\right) \tag{A.43}$$

$$\Delta_s^1 = \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(-1\right)^k\left(\sin\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T}+\psi\right)\right\}-\sin\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\}\right) \tag{A.44}$$

On peut écrire les quatre images comme

$$I_0 = K^0 + R\left(\cos\left(\xi\right)\sum_{k=1}^{\infty}J_{2k}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_c^0 - \sin\left(\xi\right)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_s^0\right) \tag{A.45}$$

$$I_1 = K^0 + R\left(\cos\left(\xi\right)\sum_{k=1}^{\infty}(-1)^k J_{2k}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_c^0 - \sin\left(\xi\right)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_s^1\right) \tag{A.46}$$

$$I_2 = K^0 + R\left(\cos\left(\xi\right)\sum_{k=1}^{\infty}J_{2k}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_c^0 + \sin\left(\xi\right)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_s^0\right) \tag{A.47}$$

$$I_3 = K^0 + R\left(\cos\left(\xi\right)\sum_{k=1}^{\infty}(-1)^k J_{2k}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_c^0 + \sin\left(\xi\right)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_s^1\right) \tag{A.48}$$

## A.5 Réglage de $\psi$

Pour pouvoir régler $\psi$ qui est le déphasage entre la modulation de la grille et l'acquisition caméra, on doit pouvoir repérer une valeur particulière. On calcule la combinaison d'images $I_1 - I_3$ :

$$I_1 - I_3 = -2R\sin\left(\xi\right)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}\left(2\pi X f_x\right)\Delta_s^1 \tag{A.49}$$

Cette combinaison est nulle quelle que soit la valeur de l'amplitude $X$ quand $\Delta_s^1 = 0$ quel que soit $k$, c'est à dire quand

$$-\left(-1\right)^k \sin\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\} + \cos\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\} = 0 \forall k \tag{A.50}$$

Cela est vérifié pour $\psi = \pi/4$.

Pour $\psi = \pi/4$ on a :

$$\begin{aligned}
\Delta_c^0 &= \frac{T}{4\pi k}\left(\left(-1\right)^k - 1\right)\sin\left(k\frac{\pi}{2}\right) \\
\Delta_s^1 &= 0 \\
\Delta_s^0 &= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}\left(\left(-1\right)^k \sin\left\{\left(2k+1\right)\frac{\pi}{4}\right\} + \cos\left\{\left(2k+1\right)\frac{\pi}{4}\right\}\right)
\end{aligned}$$

Pour $\psi = 0$ on a :

$$\begin{aligned}
\Delta_c^0 &= 0 \\
\Delta_s^1 &= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)} \\
\Delta_s^0 &= \frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)}
\end{aligned}$$

On peut utiliser le réglage $\psi = 0$ pour étalonner $X$.

Dans le cas général on doit résoudre

$$\sin\left\{\left(2k+1\right)\left(2\pi\frac{\tau}{T} + \psi\right)\right\} - \sin\left\{\left(2k+1\right)\psi\right\} = 0 \forall k \tag{A.51}$$

Par exemple pour $\tau/T = 0,15$ on trouve $\psi = 63\,\mathrm{deg} = 1.1 rad$

## A.6 Réglage de $X$

Dans le cas où $\psi = 0$ on calcule la combinaison $I_1 - I_3$

$$I_1 - I_3 = -2R\sin\left(\xi\right)\sum_{k=0}^{\infty} J_{2k+1}\left(2\pi X f_x\right)\frac{T}{2\pi\left(2k+1\right)} \tag{A.52}$$

Cette combinaison s'annule quand $2\pi X f_x = 4.33\ rad$.

Dans le cas où $\psi = \pi/4$ on calcule la combinaison $I_0 - I_1$

$$I_0 - I_1 = -2R\cos\left(\xi\right)\sum_{k=1}^{\infty} J_{2k}\left(2\pi X f_x\right)\frac{T}{4\pi k}\left(\left(-1\right)^k - 1\right)\sin\left(k\frac{\pi}{2}\right) \tag{A.53}$$

Cette combinaison s'annule quand $2\pi X f_x = 5.01\ rad$

## A.7 Combinaisons d'images

On utilise les combinaisons (dans le cas où on expose sur un quart de période)

$$\Sigma_c = I_0 - I_1 + I_2 - I_3 \tag{A.54}$$
$$\Sigma_s = I_0 - I_1 - I_2 + I_3 \tag{A.55}$$

On a

$$\Sigma_c = 4R\frac{T}{2\pi}\cos(\xi)\sum_{k=1}^{\infty}\frac{J_{2k}(2\pi X f_x)}{2k}\left((-1)^k - 1\right)\sin(2k\psi) \tag{A.56}$$
$$\Sigma_s = 2R\sin(\xi)\sum_{k=0}^{\infty}J_{2k+1}(2\pi X f_x)\left(\Delta_s^1 - \Delta_s^0\right) \tag{A.57}$$
$$= -4R\frac{T}{2\pi}\sin(\xi)\sum_{k=0}^{\infty}\frac{J_{2k+1}(2\pi X f_x)}{2k+1}(-1)^k\sin\{(2k+1)\psi\} \tag{A.58}$$

On note

$$\Gamma_c = \sum_{k=1}^{\infty}\frac{J_{2k}(2\pi X f_x)}{2k}\left((-1)^k - 1\right)\sin(2k\psi) \tag{A.59}$$
$$\Gamma_s = \sum_{k=0}^{\infty}\frac{J_{2k+1}(2\pi X f_x)}{2k+1}(-1)^k\sin\{(2k+1)\psi\} \tag{A.60}$$

On peut donc écrire

$$R = \frac{\pi}{2T}\sqrt{\left(\frac{\Sigma_c}{\Gamma_c}\right)^2 + \left(\frac{\Sigma_s}{\Gamma_s}\right)^2} \tag{A.61}$$

Le choix des valeurs de $\Gamma_c$ et $\Gamma_s$ est arbitraire, on peut calculer leur valeur à partir du moment on on sait quelle valeur a été attribuée à $\psi$ et a $X$. Pour simplifier les réglages on peut toujours choisir $\psi = \pi/4$. Un choix qui paraît naturel est de prendre $\Gamma_c = \Gamma_s$. Cela est vérifié pour $2\pi X f_x = 2.078\ rad$ et à ce point $\Gamma_c = \Gamma_s = 0.369$.

# Annexe B : Synthèse des étoiles artificielles

## B.1 Étoiles guides émettant à 620 nm

Les billes utilisées avec le premier montage d'optique adaptative développé contiennent des quantum dots émettant à 620 nm. Les synthèses de ces objets étant bien maitrisées, les quantum dots obtenus sont des objets très brillants (section efficace d'absorption importante et rendement quantique de fluorescence élevé). Il a donc été facile de réaliser des étoiles artificielles de taille adéquate ($\sim 5\,\mu$m) suffisamment brillantes et résistantes pour mesurer le front d'onde émis (100 ms d'acquisition par front d'onde et plusieurs centaines de mesures possibles par étoile).

La synthèse des billes mise en place est la suivante : on crée une émulsion de bulles de $CHCl_3$, contenant les QD et le polystyrène, dans l'eau. L'émulsion est stabilisée par des surfactants (Laurylsulfate de sodium ou SDS). Ensuite, on laisse le $CHCl_3$ s'évaporer afin d'obtenir des billes de polystyrène contenants les quantum dots.

Cette synthèse fournit des billes de tailles très variées (100 nm à 20 $\mu$m), mais il est facile d'isoler les billes de taille recherchée lors de la mesure de front d'onde.

## B.2 Étoiles guides émettant à 800 nm

La synthèse des quantum dots CdTeSe/CdZnS utilisés pour la formation des billes à 800 nm est moins robuste et fournit des objets moins brillants que les QD CdSe/CdS/ZnS. La réalisation de billes suffisamment brillantes est donc plus délicate. Notamment la synthèse décrite précédemment fournit peu de billes à la fois assez petites et suffisamment brillantes pour réaliser des mesures satisfaisantes de front d'onde (temps d'exposition de 1 à 2 s par front d'onde et moins de 15 mesures possibles avant blanchiment des étoiles). D'autres synthèses de billes ont donc été mise en place.

Nous nous sommes dans un premier temps orientés vers des billes calibrées en taille dans lesquelles sont immobilisés des quantum dots. En jouant sur l'affinité des quantum dots pour les milieux hydrophobes, nous avons voulu faire pénétrer les quantum dots à l'intérieur de billes de polystyrène de 2 $\mu$m de diamètre en les gonflant, par un jeu de bons ou mauvais solvants. En pratique, on mélange :

– quelques gouttes de solution aqueuse de billes de taille calibrée ($\sim 2\,\mu$m) ;
– $500\,\mu$L de butanol ;
– $50\,\mu$L d'une solution de QD dans le chloroforme $CHCl_3$,

et on laisse réagir pendant environ une heure sous agitation. On passe alors les billes dans l'eau par centrifugation forte et redispersion du culot dans de l'eau contenant un surfactant (Igépal CO-520 par exemple).

Cette technique fournit des billes marquées uniquement en surface, avec des concentrations de quantum dots trop faibles pour être utilisables. De plus les particules adsorbées en surface ont une forte tendance à se désorber des billes, ce qui diminue la biocompatibilité.

Nous avons alors cherché à déposer les quantum dots en surface de ces billes de latex de façon plus stable, en utilisant des interactions électrostatiques [1]. À la surface des billes, on dépose successivement :
– une couche de polymères chargés positivement ;
– une couche de quantum dots, entourés de ligands chargés négativement ;
– une couche de polymères chargés négativement.

Les polymères utilisés sont l'acide polyacrilique (chargé négativement) et le chlorure de polydiallyldiméthylammonium (chargé positivement), dissous dans un tampon borate à 20 mM, à une concentration d'environ 5 mg/mL. Les billes sont mises en présence des solutions de polymères ou de QD pendant environ 15 min pour s'assurer de l'adsorption des composés. Elles sont ensuite lavées deux fois en les centrifugeant et en les redispersant dans le tampon borate seul avant de déposer la couche suivante.

Les quantum dots sont ainsi solidement adsorbés à la surface des billes, via des interactions électrostatiques. De plus, il est possible de déposer plusieurs couches pour augmenter la charge des billes. Toutefois, après dépot de six couches, ces billes sont tout juste assez brillantes pour une observation prolongée du front d'onde (pas plus de 10 mesures successives à cause du photoblanchiment), ce qui est limitant pour la correction. Pour résoudre ce problème, nous pourrions :
– augmenter la taille des billes, pour augmenter la surface utile (en gardant des billes de diamètre inférieur à $\sim 5\,\mu$m pour le Shack-Hartmann) ;
– ajouter un grand nombre de couches de quantum dots, le problème principal étant qu'après un certain nombre de couches, les billes ont tendance à s'agréger en amas de 3, 5, 10 ou plusieurs milliers de billes ;
– marquer les billes en volume.

La dernière solution est réalisable en utilisant des billes de silice mésoporeuse (c'est à dire, contenant des pores de l'ordre d'une dizaine de nanomètres de diamètre rendus hydrophobes). D'après Gao and Nie [2, 3], il est possible de charger efficacement ces billes de quantum dots en volume grâce à la large taille des pores. Les premiers résultats sur ces billes sont prometteurs, mais il est nécessaire de vérifier que les étoiles seront observables suffisamment longtemps afin de déterminer la correction adaptée (entre 10 et 20 mesures de front d'onde successives).

# Bibliographie

[1] C. N. Allen, N. Lequeux, C. Chassenieux, G. Tessier, and B. Dubertret. Optical Analysis of Beads Encoded with Quantum Dots Coated with a Cationic Polymer. *Advanced Materials*, 19(24), 2007.

[2] X. Gao and S. Nie. Doping Mesoporous Materials with Multicolor Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(42), 2003.

[3] X. Gao and S. Nie. Quantum dot-encoded mesoporous beads with high brightness and uniformity : rapid readout using flow cytometry. *Analytical chemistry*, 76(8), 2004.

# Résumé

Les récentes avancées en microscopie de fluorescence (augmentation de résolution spatiale, correction des aberrations induites par l'échantillon...) ouvrent de nombreuses perspectives en imagerie biologique. Mais pour que ces techniques se répandent, il est nécessaire de réduire les contraintes qu'elles imposent sur la préparation des échantillons, sur les sondes fluorescentes, sur la complexité de mise en œuvre ou la cadence d'acquisition. Pendant ma thèse, j'ai travaillé sur le développement et l'amélioration de quelques-unes de ces techniques.

Dans un premier temps, deux systèmes d'illumination structurée ont été réalisés dans le but d'accélérer la cadence de réalisation de coupes optiques pour l'observation d'échantillons épais vivants. Une deuxième partie de mon travail a concerné la mise en place d'une nouvelle approche de reconstruction en illumination structurée afin de dépasser la limite de résolution imposée par le microscope. Cet outil permet de réduire le nombre d'images requises pour la reconstruction d'une image super-résolue, ce qui ouvre la voie à une augmentation de la cadence de réalisation de ces images.

Un montage d'optique adaptative a également été développé afin de corriger les aberrations introduites par les échantillons épais, permettant une amélioration des capacités d'imagerie en profondeur. L'accent a été mis sur la protection de l'échantillon, grâce à l'utilisation de billes fluorescentes pour déterminer la correction à appliquer sans illuminer l'échantillon. Enfin, un instrument de mesure du rendement quantique de fluorescence dédié à la caractérisation de fluorophores infrarouges a été mis en œuvre afin de pallier les limitations des méthodes de mesure classiques dans le proche infrarouge.



# Abstract

Recent developments in fluorescence microscopy (spatial resolution improvement, sample-induced aberrations correction...) offer many opportunities in biological imaging. But spreading of these techniques will require reduction of the restrictions on sample preparation, fluorescent probes, utilisation complexity, or imaging frame rate. During my Ph.D, I worked on the development and improvement of some of these techniques.

Two structured illumination systems have first been built in order to accelerate optical sectioning realisation in thick samples. A second part of my work focused on the implementation of a new reconstruction approach in structured illumination microscopy to overcome the resolution limit imposed by the diffraction. This tool allows the reduction of the number of images required for reconstruction of a super-resolution image, leading to an increase in imaging speed.

Additionally, an adaptive optics set-up has been developed to correct the sample-induced aberrations, improving imaging abilities in thick samples. The main purpose of this technique is to provide efficient correction, while protecting the sample through the use of independent fluorescent beads for correction estimation. Finally, an instrument for fluorescence quantum yield measurement dedicated to the characterization of infrared fluorophores has been studied to overcome the limitations of conventional methods in the infrared spectral range.