



Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps: applications biomédicales

Pierre Blandin

► To cite this version:

Pierre Blandin. Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps: applications biomédicales. Physique Atomique [physics.atom-ph]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. \langle NNT: \rangle . \langle tel-00376116 \rangle

HAL Id: tel-00376116

<https://pastel.hal.science/tel-00376116v1>

Submitted on 16 Apr 2009

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.



HAL Authorization

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE PARIS XI

présentée par
M. Pierre Blandin

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI

Sujet de la thèse :

DEVELOPPEMENT INSTRUMENTAL POUR LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS : APPLICATIONS BIOMEDICALES

Soutenue le **7 novembre 2008**

Devant le jury composé de :

M. Patrick GEORGES
Mme Sandrine LEVEQUE-FORT
M. Frédéric LOURADOUR
M. Hervé RIGNEAULT
M. Marc TRAMIER
Mme Nathalie WESTBROOK

Directeur de thèse
Coencadrante
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Présidente du jury

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Philippe Bréchnac, directeur du Laboratoire de Photophysique Moléculaire (LPPM), et Pierre Chavel, directeur du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique (LCFIO) qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire respectif et ont tout mis en œuvre pour le bon déroulement de cette thèse, qui s'est effectuée en partenariat entre ces deux unités de recherche. Merci également à Patrick GEORGES, responsable de l'équipe Lasers et Biophotonique du LCFIO et Marie-Pierre FONTAINE-AUPART, responsable de l'équipe Biophotonique du LPPM, qui, en instaurant une collaboration étroite entre leurs deux équipes (entre autres) ont permis le développement du Centre de Photonique Bio-Médicale (CPBM), et l'émergence de projets à l'interface entre l'optique et les sciences du vivant, comme ce fut le cas pour ma thèse. Je remercie aussi Christophe JOUVET, le directeur du Centre Laser de l'Université Paris Sud (auquel appartient le CPBM), laboratoire où j'ai réalisé une grande partie de mes expériences.

Je remercie ensuite sincèrement les membres de mon jury : Frédéric LOURADOUR, Professeur à l'Université de Limoges, et Hervé RIGNEAULT directeur de recherches à l'Institut Fresnel à Marseille qui ont accepté d'être rapporteurs de ce travail ; Nathalie WESTBROOK, Professeur à l'Université Paris Sud qui a bien voulu présider ce jury, et Marc TRAMIER, Ingénieur de Recherche à l'Institut Jacques Monod qui a examiné attentivement mes travaux.

Bien entendu, je remercie de tout cœur Patrick GEORGES, mon directeur de thèse, et Sandrine LEVEQUE-FORT, qui ont défini ce projet de recherche, et m'ont encadré de la meilleure des façons au cours de ces trois années. Je leur associe bien évidemment Frédéric DRUON, qui a également été très présent scientifiquement et humainement tout au long de cette thèse. L'ensemble de ces travaux a été possible uniquement grâce à l'investissement et à la complémentarité scientifique de ces trois encadrants. Pour tout ce que vous avez fait pour moi, un énorme merci à tous les trois, mais j'y reviendrai dans la suite...

En travaillant entre deux équipes de recherche, et à l'interface entre plusieurs disciplines, j'ai été amené au cours de ces trois années à côtoyer de nombreuses personnes, grâce auxquelles ce travail a été possible. Ils m'ont tous appris énormément, et m'ont également permis de vivre très agréablement ces trois années. Je tiens donc à tous les remercier. Il y en a un certain nombre, mais je me lance, et d'avance je vous prie de m'excuser pour la longueur de ce chapitre...

Les collaborateurs

Je voudrais vivement remercier Vincent COUDERC et les membres de son équipe, Philippe LEPROUX, Christelle LESVIGNE, Alessandro TONELLO, du département photonique du Laboratoire Xlim de Limoges, avec qui nous avons travaillé pour la génération de supercontinua. Un grand merci à eux pour les fibres microstructurées, les simulations qui allaient avec, les expériences en régimes ns. Merci aussi pour les discussions que nous avons pu avoir autour des effets non linéaires et de ce mélange à quatre ondes intermodal si particulier (en tout cas pour moi !)...

Je tiens également à remercier chaleureusement nos collaborateurs du Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire. Merci à Marie-Claude POTIER et à Jack-Christophe COSSEC, avec qui nous nous sommes intéressés à l'homodimérisation de l'APP. Cette collaboration très active nous a permis de démontrer l'intérêt du développement instrumental réalisé sur une problématique biomédicale de tout premier ordre. Merci Jack, pour tes explications biologiques claires et à ma portée, ta très grande disponibilité, et ta patience lors de ces journées de manips dans le noir, surtout les premières quand les réglages n'étaient pas toujours optimaux et les résultats obtenus difficilement interprétables... Je n'oublie pas Catherine MARQUER qui a rejoint l'équipe plus récemment et qui elle aussi a participé à l'initiation des physiciens que nous sommes à la neurobiologie. J'adresse également un grand merci à Vincent STUDER, physicien du même laboratoire qui nous a non seulement fait rencontrer ses collègues biologistes, ouvrant ainsi la porte à cette collaboration, mais qui nous a également aidé pour réaliser notre TIRF. Merci également à Zsolt LENKEI, avec qui nous avons fait les premières images en TIRFLIM sur des cellules, et avec qui nous avons commencé à travailler sur les récepteurs cannabinoïdes.

Mes sincères remerciements vont également à Emmanuel FORT, et à toute son équipe au sein du Centre d'Imagerie Plasmonique Appliquée à l'ESPCI. Merci Emmanuel pour les discussions très riches que nous avons pu avoir, et aussi pour toutes ces simus Matlab dont tu as le secret. Un grand merci aussi à Yannick GOULAM HOUSSEN, compagnon thésard avec qui j'ai pu partager des séjours notamment en Corse et en Allemagne, mais aussi quelques journées de manips quand le fameux bâti le permettait... J'ai également une pensée pour Eric LE MOAL, ancien de l'équipe qui est parti apprendre la langue de Goethe outre-Rhin, et pour Karla BALAA, récemment arrivée à Paris : nos calendriers respectifs ne nous ont pas permis de beaucoup travailler ensemble, mais merci à vous pour ces quelques manips que nous avons pu faire ensemble.

Les équipes de recherche qui m'ont accueilli

L'équipe ELSA du LCFIO

Je voudrais adresser des millions de mercis, tous plus sincères les uns que les autres, à Patrick GEORGES, qui m'a encadré pendant ma thèse, et qui a été mon directeur de thèse officiel. Merci Patrick pour ta disponibilité et ta présence en toutes circonstances à mes côtés. Ton dynamisme et ta réactivité ont été une vraie locomotive pour mon travail. Tes conseils et tes avis concernant l'évolution des travaux, mais également mon avenir ont toujours été très précieux. Merci pour toutes tes lectures, relectures, et même rerelectures de résumés, d'articles, de thèse, bref de choses plus ou moins passionnantes que je t'ai imposées... Tu as été le directeur de thèse parfait pour moi, et j'ai beaucoup apprécié de passer ces trois années à tes côtés. Alors merci...

Tout ce travail doit aussi énormément à Frédéric DRUON. Merci Fred ! J'ai envie de dire que ta bonne humeur et ton sens de l'humour sans limite et en toutes circonstance n'ont d'égal que ton ingéniosité et ta dextérité à aligner un laser impulsional. Autrement dit, travailler avec toi garantit résultats et bonne humeur, ce qui est plutôt pas mal... Je retiendrai également (en tout cas j'essaierai...) tout ce que tu as pu m'apprendre sur le monde des lasers. Toi aussi tu as su, par ton dynamisme et ton enthousiasme, me motiver et me faire avancer au cours de ces trois ans.

Un énorme merci également à Marc HANNA qui m'a apporté toute son expertise sur les fibres, m'a guidé sur les monts escarpés de l'optique non linéaire dans les fibres microstructurées.

La bonne ambiance et la dynamique qui règnent dans l'équipe ELSA sont aussi pour beaucoup dans le bon déroulement de ces travaux : je tiens donc à remercier toute l'équipe ! Merci Gaëlle pour tes avis éclairés et ton aide précieuse, notamment concernant les aberrations et les obstacles que doit surmonter un thésard qui voudrait devenir maître de conf, et merci aussi d'avoir pris soin de Benjamin ! Merci François pour ta disponibilité, et tes conseils précieux avant la thèse (je t'avais consulté pour m'aider à choisir mon sujet de thèse...), pendant la thèse, mais aussi pour l'après thèse. Merci Gérard pour ta gentillesse, et pour tous tes dessins, tes astuces et tes bricolages; et surtout profite bien de ta retraite ! Et merci Arnaud d'avoir récemment amené plus de biophotonique dans l'équipe ELSA...

L'équipe ELSA regorge aussi de non permanents comme on aime à les appeler. Il y a ceux qui sont arrivés en étant déjà docteur : Dimitris (le « créateur » du laser basse cadence que nous avons utilisé, et le plus brillant guitariste grec de tous les temps), et Mickaël (le meilleur microscopiste ch'ti). Il y a ceux qui ont été ou sont non permanents de longue durée, pour au moins 3 ans : Mathieu Jacquemet (qui m'a accueilli le jour de mon arrivée au labo, qui m'a expliqué et montré comment être un bon thésard et qui a écouté beaucoup de reggae), Emilie (merci dans le désordre pour les Cowboys Fringants, les lasers à 914 nm, le jeu des 7 erreurs, la danse du papa pingouin...), Laurent (qui quand il mange comme quand il rédige, prend le temps qu'il faut pour que ce soit bien fait !), Benjamin et Damien (les deux collègues de bureau avec qui il est toujours bon de reformer le « bureau des sports » pour parler un peu de choses sérieuses...), David (qui quand il rentre chez lui depuis Nantes peut chanter une jolie chanson), Marc (qui a partagé son lit avec moi à San Francisco, faute de mieux), Delphine et Matthieu (bon courage pour l'éducation du petit poilu à 4 pattes), Franck (brillant collègue encadrant de TDs et le plus dépensier de l'équipe paraît-il), Justine (la seule fille - la pauvre - parmi les femtoboys), Julien, Aude et Igor. Et puis il y a ceux qui sont passés sans s'attarder malheureusement : Christoph (incarnation à lui tout seul de l'amitié franco-allemande et champion du monde de lancer de Scratch) et Yoann (qui parle déjà le laser femtoseconde - dialecte assez technique et très peu parlé - aussi bien que Fred). Merci à tous pour votre gentillesse, pour les différents coups de main, et pour la saine émulation que vous faites régner dans l'équipe !

Le groupe Biophotonique du LPPM

Je tiens à adresser mes plus sincères et chaleureux remerciements à Sandrine LEVEQUE-FORT qui m'a encadré pendant la thèse. Merci Sandrine de m'avoir encouragé, soutenu, et appris énormément de choses pendant ces trois années et demie. Si je me souviens bien, j'étais venu te voir un bel après-midi de décembre 2005, et tu m'avais présenté un sujet de thèse sur l'illumination structurée, en collaboration avec l'équipe ELSA ; tu m'avais convaincu de travailler sur ce projet... et trois ans plus tard nous avons développé un microscope TIRF ! Mais cette évolution illustre parfaitement la manière dont tu m'as encadré, ton souci permanent de ne pas m'emmener dans des culs de sacs, et aussi d'écouter mes aspirations. Merci aussi pour ton ouverture, que j'ai aperçue à travers toutes les discussions que nous avons eues, mais aussi les collaborations que tu as su développer et tous les gens que tu m'as fait rencontrer. J'ai vraiment beaucoup apprécié de travailler avec toi, et pas uniquement pour des raisons scientifiques... Bref, pour tout ça et pour tout le reste, MERCI !!!

Vient ensuite Viviane DEVAUGES qui a fait son stage de master avec nous et qui continue en thèse dans l'équipe. Merci Viviane pour ton aide précieuse sur les manips quand j'étais en phase de rédaction, et aussi pour ton enthousiasme et ta bonne humeur perpétuels (même en cas de trismus...) ! Quel plaisir de passer la main sur la manip à quelqu'un comme toi. Je pars tranquille, persuadé que le TIRFLIM est en de bonnes mains... Je te souhaite bon courage pour ta thèse, et je ne doute pas que tout se passera très bien pour toi !!!

Bien entendu, je remercie également tous les autres membres du groupe, avec qui au cours de ces 3 ans j'ai pu échanger sur des sujets plus ou moins scientifiques (ça fait aussi du bien de pouvoir parler d'autres choses que de sciences), notamment au cours des nombreux déjeuners. Je pense dans un premier temps aux permanentes : Karine STEENKESTE, Qing Li KOU et Marie-Pierre FONTAINE-AUPART. Mais bien entendu, je n'oublie pas mes co-thésards Ariane (qui m'a précédé, et qui a partagé son bureau, sa salle de manip et ses bonnes recettes avec moi !), Lama, Guillaume, Sébastien et Samia. Bon courage et bonne chance à vous tous pour la suite.

Dans ce chapitre LPPM, je tiens aussi à grandement remercier Christophe LEFUMEUX et Didier ROUX qui sont tous les deux pour beaucoup dans le développement et l'installation de notre dispositif de microscopie au CPBM.

Le CLUPS

Je remercie le plus sincèrement du monde Sandrine LECART, la biologiste de l'équipe. Merci de m'avoir appris tant de choses sur cet univers étrange qu'est la biologie. C'est grâce à toi que maintenant je sais, entre autre, élever et éduquer des petites cellules de manière totalement autonome (ou presque...). De travailler ensemble, et même de partager ton bureau a suscité de nombreux échanges, qui ont permis de notablement élargir ma vision de la biologie, et je crois (et j'espère...) en plus de t'apporter quelques éléments en optique ! D'un point de vue plus personnel, merci beaucoup de m'avoir accueilli à bras ouverts dans ton bureau, et de m'avoir permis aux moments opportuns, notamment pendant la rédaction, de parler d'autres choses que de sciences, ce qui m'a fait le plus grand bien. Pour terminer, je te souhaite bon courage avec tous ces physiciens et avec ton nouveau collègue de bureau, en espérant qu'il ne te refile pas la carte du Parti...

J'adresse aussi un énorme merci à Guillaume DUPUIS. Depuis mon arrivée au 106, tu as su me conseiller, me soutenir et m'encourager dans mon travail. Ton aide a été pour moi très précieuse, surtout dans la phase de rédaction du manuscrit. Sans compter tous les renseignements

inestimables que tu m'as fourni sur les dossiers, les concours et la carrière de maître de conférence... Pour ça et pour tout le reste, merci !

Concernant plus particulièrement le CPBM, je remercie également le docteur MONSEL, ou Antoine pour les intimes, qui a su nous mettre dans des états... inconscients. Des médecins comme lui, cela réconcilie avec la réanimation ! J'ai également une petite pensée pour Xavier et Céline qui sont venus faire un stage parmi nous...

Je voudrais également remercier tous les membres du serveur laser, l'autre facette du CLUPS. Merci à Michel BROQUIER, Christophe JOUVET, Pierre CARCABAL, Claude DEDONDER qui m'ont petit à petit adopté au sein du CLUPS, et à Iben et Shamik, postdocs que j'ai pu cotoyer durant ces 3 ans. Et j'adresse une dédicace spéciale (comme on dit) à Michel, spécialiste en wifi avec et sans fils !

Enfin, je n'oublierai sûrement pas Chantal JUCHA, la secrétaire du centre, qui par sa compétence sait faire oublier l'inertie inhérente à l'administration de l'Université et du CNRS pour passer des commandes ou faire des ordres de missions... Merci Chantal pour ta bonne humeur et tes nombreux coups de main, qui m'ont permis de gagner un temps précieux.

Les collègues de bureau

Je souhaite remercier les différents collègues de bureau que j'ai eu au cours de ces 3 ans et demie et qui ont su me supporter : Ariane (LPPM bat 210), Lama (LPPM bat 210), Iben (LPPM bat 210), Fred (LCFIO bat 503), Gaëlle (LCFIO bat 503), Emilie (LCFIO bat 503), Lolo (LCFIO bat 503), Christoph (LCFIO bat 503), Arnaud (LCFIO bat 503), Arnaud (IOGS Palaiseau), Ariane (CPBM bat 106), Karine (CPBM bat 106), Sandrine (CPBM bat 106), Julien M. (très sympathique collègue de l'équipe MACSYBIO, IOGS Palaiseau) et tous ceux qui voulaient bien m'accueillir à la fin (Fred, Marc H, Marc C, David, Benjamin, Damien, IOGS Palaiseau).

Et un grand merci à tous ceux (et ils sont nombreux !!) qui m'ont permis de circuler entre ces différents labos, ou bien en me véhiculant, ou bien en me prêtant leur voiture !

Les enseignements

Au cours de ces trois années, j'ai eu la chance de pouvoir faire un certain nombre d'heures d'enseignement sous forme de vacations.

Dès la première année, j'ai pu encadrer les TDs de Lasers à Supoptique. J'adresse un grand merci à François BALEMBOIS, le directeur des études de l'école qui m'a permis de faire ces TDs, ainsi qu'à Nicolas DUBREUIL. Tous deux ont su me faire profiter de leur expérience en terme de pédagogie et aussi de physique des lasers. Merci aussi aux collègues thésards David et Franck avec qui j'ai partagé ces enseignements.

J'ai également dispensé des cours au département des restaurateurs de l'Institut National du Patrimoine : je tiens à remercier la direction des études et l'administration de l'INP qui m'ont fait confiance. Et bien sur, je ne remercierai jamais assez Guillaume DUPUIS qui m'a proposé de partager cet enseignement avec lui.

La Maison des Sciences a elle aussi fait partie intégrante de ma thèse pendant trois ans. Cette association m'apporte vraiment beaucoup d'un point de vue scientifique mais également humain.

Mille mercis à Fabrice KROT et à tous les membres de l'association. Je remercie aussi Sébastien DE ROSSI et François BALEMBOIS qui ont permis aux étudiants de Supoptique de travailler de manière officielle et reconnue avec l'association. Et un grand merci aussi à Alain, qui a repris le flambeau à l'Institut d'Optique...

Enfin, je remercie ici aussi Sandrine LEVEQUE-FORT qui, grâce à son investissement dans différentes formations m'a permis d'encadrer un certain nombre de TPs.

Les rencontres professionnelles

Pendant ma thèse, j'ai pris part à différentes formations, et participé à quelques congrès et séminaires. Les rencontres ont été assez nombreuses et ont rythmé ces 3 ans.

Ainsi, j'ai une pensée pour toutes les personnes que j'ai pu côtoyer à l'Institut de Formation Supérieure BioMédicale. Il y a les autres thésards avec qui j'ai suivi des modules : Makrina, Matthias, Aurélien, Jérôme, Stéphanie, Miriam, Orestis, et tous les autres. Il y a aussi les responsables de cette formation : Claude MALVY, Marie-Claude LABASTIE, Luis VILLANUEVA, ainsi que ma tutrice : Alexandra FRAGOLA.

J'ai pu également rencontrer de nombreux scientifiques investis dans le GDR 2588 Microscopie Fonctionnelle et Biologie, et que j'ai croisés lors des différents événements auxquels j'ai pris part pendant ces 3 ans. Ces rencontres ont suscité de nombreuses discussions, plus intéressantes les unes que les autres et très instructives...

Les gens qui ne travaillent pas dans des laboratoires...

Une thèse dure trois ans, et il est primordial pour la mener à bien de trouver un équilibre entre travail et vie privée. Je tiens à remercier vivement mes amis qui, au cours de ces trois ans, m'ont permis de sortir de l'Univers des labos, de passer de merveilleuses soirées, week-ends, vacances... Merci à Jonathan, Fanny, Armelle, Myriam, Ben, Lydie, Vincent L., Aurélien, Eve, Yaco, Matt, Vincent A., Emile, Caro, Erina, Lydia, Guillaume, Jérôme, Mélanie, Carole, Nico, Vincent, Audrey, Eve, Eric et ceux que j'ai malheureusement oublié...

Je remercie aussi grandement ma famille qui m'a soutenu au fil des ces trois ans, et particulièrement mes parents et ma sœur.

Enfin, merci à Caroline... *Science, esprit, beauté, fortune, tout, ici-bas, est impuissant à donner le bonheur sans l'amour.* (Saintine, extrait de Picciola).

Table des matières

TABLE DES MATIERES	1
ABREVIATIONS	5
INTRODUCTION	7
CHAPITRE I : PRESENTATION DES CONCEPTS ET ETAT DE L'ART	9
I – HISTORIQUE	9
II – INTERACTIONS LUMIERE-MATIERE, LUMINESCENCE	12
III -LA MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	19
III.1 – LA FLUORESCENCE RESOLUE EN TEMPS	20
III.2 - ACQUISITION DANS LE DOMAINE TEMPOREL	21
III.3 - ACQUISITION DANS LE DOMAINE FREQUENTIEL	24
IV – LA RESOLUTION SPATIALE EN MICROSCOPIE	27
IV.1 - THEORIE	27
IV.2 – AMELIORATION DE LA RESOLUTION	29
IV.2.1 - Développement de l'instrumentation	30
IV.2.2 – Modification des processus d'absorption et d'émission	37
IV.2.3 – Traitement après acquisition	44
V – PRESENTATION DU PROJET	45
CHAPITRE II : ETUDE ET DEVELOPPEMENT D'UN DISPOSITIF D'EXCITATION DE LA FLUORESCENCE	47
I - INTRODUCTION	47
II – DEVELOPPEMENT D'UNE SOURCE LASER SOLIDE IMPULSIONNELLE POMPEE PAR DIODE	51
II.1 – LE MILIEU AMPLIFICATEUR : CRISTAUX DOPES AVEC DES IONS Nd^{3+}	51
II.2 – LE SYSTEME DE POMPAGE : LE POMPAGE PAR DIODE	54
II.3 – LA CAVITE LASER : TRAVAILLER EN REGIME IMPULSIONNEL	55
II.3.1 – Le verrouillage des modes en phase	55
II.3.2 – Le SESAM	58
II.4 – REALISATIONS EXPERIMENTALES	60
II.4.1 – La cavité	60
II.4.2 – Les performances	63
II.4.2.1 - Caractérisation spectrale	63
II.4.2.2 – Caractérisation temporelle	64
II.5 - CONCLUSION	65
II.6 – SOLUTION RETENUE, PRESENTATION DE LA SOURCE PICOSECONDE BASSE CADENCE	65
III – GENERATION DE NOUVELLES LONGUEURS D'ONDE PAR EFFETS NON LINEAIRES DANS LES FIBRES	67
III.1 – LES EFFETS NON LINEAIRES DANS LES FIBRES	68
III.2 – MONTAGE EXPERIMENTAL	72
III.3 – FIBRE MICROSTRUCTUREE DU XLIM	73

III.4 – ELARGISSEMENTS SPECTRAUX OBTENUS EXPERIMENTALEMENT	75
III.5 – CONCLUSION	80
IV – PRESENTATION ET CARACTERISATION DE LA SOURCE COMMERCIALE	81
IV.1 – PRESENTATION DE LA SOURCE	81
IV.2 – CARACTERISATION	83
V - CONCLUSION	89
ANNEXE 1 : FICHE TECHNIQUE DU MATERIEL UTILISE	91
ANNEXE 2: L'AUTOCORRELATION	93
ANNEXE 3 : ARTICLE [GERHARD 2006]	96
ANNEXE 4 : ELARGISSEMENT DU SPECTRE OBTENU AVEC DES FIBRES COMMERCIALES	103

CHAPITRE III : DEVELOPPEMENT ET CARACTERISATION D'UN MICROSCOPE BASE SUR UNE EXCITATION EN REFLEXION TOTALE INTERNE POUR LA MESURE DE TEMPS DE VIE DE FLUORESCENCE

I - PHYSIQUE DE LA REFLEXION TOTALE INTERNE ET EXPRESSION DU CHAMP EVANESCENT	108
II - UTILISATION EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	113
II.1 – CONFINEMENT DE L'EXCITATION ET MODIFICATION DE L'EMISSION A PROXIMITE DE L'INTERFACE	113
II.2 - APPLICATIONS	115
II.3 - GEOMETRIES	116
II.3.1 - Configurations avec prisme	117
II.3.2 - Configurations sans prisme avec un objectif à grande ouverture numérique	119
III – PRESENTATION DU MONTAGE EXPERIMENTAL	122
III.1 – EXCITATION DE LA FLUORESCENCE EN REFLEXION TOTALE INTERNE	123
III.1.1 - Mise en forme du faisceau excitateur	123
III.1.2 – Procédure d'alignement pour générer le champ évanescent	125
III.2 – DETECTION DU SIGNAL DE FLUORESCENCE	126
III.2.1 - Présentation du matériel de détection	126
III.2.2 - Utilisation des détecteurs sur le montage	129
III.2.3 - Interface pour l'acquisition et le traitement	130
IV – CARACTERISATION DU MONTAGE	132
IV.1 – RESOLUTION SPATIALE	132
IV.1.1 - Résolution latérale	132
IV.1.2 - Sectionnement optique et résolution axiale	133
IV.2 – INFLUENCE DES PARAMETRES D'ACQUISITION SUR LES TEMPS DE VIE MESURES	135
IV.3 - REPRODUCTIBILITE	137
IV.4 - COMPARAISON AVEC UN SYSTEME COMMERCIAL	139
V – PREMIERES MESURES SUR DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES	140
VI - CONCLUSIONS	144
ANNEXE 1 : FICHES TECHNIQUES DU MATERIEL UTILISE	147
ANNEXE 2 : INFLUENCE DES DIFFERENTS PARAMETRES D'ACQUISITION	153

CHAPITRE IV : APPLICATION EN NEUROBIOLOGIE

I – PRESENTATION DE L'APPLICATION	167
I.1– PROBLEMATIQUE BIOMEDICALE	167
I.2 – LE FRET	171
II – MESURES SUR DES ECHANTILLONS CELLULAIRES	175
II.1 – MODELE CELLULAIRE UTILISE : LIGNEE HEK-293 TRANSFECTEE	175
II.2 – PREMIERES MESURES SUR LA CFP	175
II.3 - MISE EN EVIDENCE DU PHOTOBLANCHIMENT DE LA CFP	180
II.4 - REDUCTION DU TEMPS D'ACQUISITION	181
II.4.1 - Algorithme développé au laboratoire	181

II.4.2 - Détermination rapide du temps de vie de fluorescence : RLD	184
II.5 - MESURES SUR UN TEMOIN DE FRET POSITIF	189
II.6 - MESURES SUR APP-CFP DANS LES NOUVELLES CONDITIONS	191
III – CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	193
 <u>CONCLUSION</u>	 <u>197</u>
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 <u>199</u>
 <u>COMMUNICATIONS</u>	 <u>219</u>

Abréviations

A β : peptide β -amyloïde

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique

AFM : Atomic Force Microscopy

APP : Amyloid Precursor Protein

ARN : Acide Ribo Nucléique

CARS : Coherent Anti-Stokes Raman Scattering

CB1R : Type 1 Cannabinoid Receptor

CCD : Charge Coupled Device

CFP : Cyan Fluorescent Protein

CW : Continuous Wave

DPFLIM : Double Pulse Fluorescent Lifetime Imaging Microscopy

EM-CCD : Electron Multiplier Charge Coupled Device

FCS : Fluorescence Correlation Spectroscopy

FTTC : Fluoresceine Iso Tio Cyanate

FLIM : Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy

FPALM : Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy

FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching

FRET : Förster Resonance Energy Transfer

FROG : Frequency Resolved Optical Gating

GFP : Green Fluorescent Protein

HEK : Human Embryonic Kidney

HRI : High Rate Imager

I²M : Image Interference Microscopy

I³M : Incoherent Interference Illumination Microscopy

KLM : Kerr Lens Mode Locking

LASER : Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation

ML : Mode Locked

ON : Ouverture Numérique

PALM : PhotoActivated Localization Microscopy

PALMIRA : PALM with Independently Running Acquisition

PCF : Photonic Crystal Fibre

PSF : Point Spread Function

RESOLFT : REversible Saturable Optical Fluorescent Transition

RLD : Rapid Lifetime Determination

SESAM : SEMiconductor Saturable Absorber Mirror

SHG : Second Harmonic Generation

SLM : Spatial Light Modulator

SNOM : Scanning Near-field Optical Microscope

STED : STimulated Emission Depletion

STM : Scanning Tunneling Microscopy

STORM : STochastic Optical Reconstruction Microscopy

TCSPC : Time Correlated Single Photon Counting

THG : Third Harmonic Generation

TIRF(M) : Total Internal Reflection Fluorescence (Microscopy)

YFP : Yellow Fluorescent Protein

Introduction

Dans ce manuscrit, figure l'essentiel des travaux réalisés durant les trois années (de septembre 2005 à septembre 2008) de ma thèse, intitulée « Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps ». Ce travail s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre l'Equipe Lasers Solides et Applications (ELSA) du Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique et le groupe de Biophotonique du Laboratoire de Photophysique Moléculaire. Ce partenariat entre, depuis trois ans maintenant, dans le cadre d'une collaboration plus vaste regroupant plusieurs équipes et laboratoires de l'Université Paris XI (Laboratoire Aimé Cotton, Hôpital du Kremlin Bicêtre, Institut Gustave Roussy...), collaboration qui a donné naissance au Centre de Photonique BioMédicale (CPBM), composante du Centre Laser de l'Université Paris Sud (CLUPS). Ainsi ce Centre de Photonique BioMédicale est un lieu de collaboration et d'échanges entre scientifiques de différents horizons aux compétences variées et complémentaires : laseristes, microscopistes, photophysiciens, biologistes ou encore médecins. La motivation de ce regroupement est de disposer d'outils optiques performants (dispositifs d'imagerie commerciaux ou développés par les chercheurs) pour l'observation et la compréhension du vivant.

Depuis une quinzaine d'années, l'utilisation des longueurs d'onde optiques pour l'observation du vivant (ce qu'on appelle la biophotonique) est en pleine effervescence. En effet, la relative innocuité de la lumière, ainsi que ses changements de propriétés physiques révélés par l'interaction avec la matière (réflexion, absorption, émission, diffusion, polarisation,...) en font un outil de choix. En particulier, en biologie cellulaire, l'utilisation de sondes fluorescentes (molécules qui absorbent un rayonnement et en émettent un autre) et l'étude de leur comportement avec un microscope peuvent permettre de visualiser les interactions protéiques dans des conditions de vie cellulaire.

Ainsi, c'est dans ce contexte très riche que s'insère notre projet, qui consiste en un développement complet d'un dispositif d'imagerie de fluorescence en réflexion totale interne et résolue en temps. Pour cela, nous avons travaillé sur les différents éléments constitutifs d'un tel dispositif, à savoir la source laser d'excitation de la fluorescence, le microscope pour permettre d'atteindre des résolutions spatiales compatibles avec l'observation de cellules, et la détection qui rend possible la mise en évidence de contraste par la mesure de temps de vie de fluorescence. Tout ce développement a été motivé par différentes problématiques biomédicales, qui nous ont permis de constamment faire évoluer notre dispositif et de valider tout le développement réalisé.

Dans ce manuscrit, la première partie introductive est dédiée à une présentation des différents concepts et à un état de l'art de la microscopie de fluorescence à travers ses performances temporelles et spatiales, ainsi qu'à une présentation plus précise du projet qui nous a orienté vers un tel développement.

La deuxième partie est consacrée aux travaux réalisés pour le développement d'une source laser impulsionnelle d'excitation dédiée à la fluorescence résolue en temps. Nous présentons les différentes contraintes temporelles (durée des impulsions, cadence) et spectrales (accordabilité sur une large gamme de longueurs d'ondes) auxquelles doit répondre cette source pour nous

permettre de mesurer les temps de vie de fluorescence de nombreux fluorophores excités par un photon visible. Puis nous détaillons la solution choisie, les résultats obtenus avant de terminer par une caractérisation complète de la source utilisée sur le montage de microscopie.

La troisième partie est dédiée au dispositif d'imagerie de durée de vie de fluorescence en réflexion totale interne. Nous présentons notre montage, qui permet de faire de l'imagerie de durée de vie de fluorescence en plein champ avec une résolution axiale sublongueur d'onde. Nous exposons les performances spatiales et temporelles obtenues, ainsi que les premiers résultats sur des échantillons cellulaires vivants.

Dans la quatrième partie, nous nous intéressons à une des applications que nous avons étudiée au cours de cette thèse : le rôle du cholestérol dans la maladie d'Alzheimer. Nous présentons donc brièvement cette maladie et ses mécanismes cellulaires, avant de nous attarder sur l'optimisation du montage qui a été nécessaire pour l'observation des échantillons, et sur les résultats expérimentaux obtenus avec notre dispositif.

Enfin, dans une dernière partie, une conclusion générale sur l'ensemble de cette thèse est rapportée.

Chapitre I : Présentation des concepts et état de l'art

Ce premier chapitre introductif présente les concepts essentiels utilisés en microscopie de fluorescence résolue en temps.

Après un rapide historique présentant l'évolution de la microscopie au fil des siècles, les principes de base de l'interaction lumière-matière sont rapportés, permettant ainsi de définir la fluorescence. Ensuite, une présentation de la mesure de temps de vie de fluorescence et de ses applications, ainsi que les différents moyens expérimentaux d'accéder à cette grandeur sont exposés. Cette technique d'imagerie étant couplée à des microscopes, les performances en résolution spatiale sont dictées par ces instruments. Nous proposons ensuite un état de l'art sur la résolution en microscopie, qui pose les limites théoriques et s'intéresse à différentes techniques permettant l'amélioration des performances. Enfin, à la lumière de toutes ces considérations, nous nous attardons sur l'intérêt et l'originalité du développement instrumental que nous nous proposons de réaliser.

I – Historique

« Je me représente la vaste enceinte des sciences, comme un grand terrain parsemé de places obscures et de places éclairées. Nos travaux doivent avoir pour but, ou d'étendre les limites des places éclairées, ou de multiplier sur le terrain les centres de lumière. L'un appartient au génie qui crée, l'autre à la sagacité qui perfectionne.

Nous avons trois moyens principaux ; l'observation de la nature, la réflexion et l'expérience. L'observation recueille les faits ; la réflexion les combine ; l'expérience vérifie le résultat de la combinaison. Il faut que l'observation de la nature soit assidue, que la réflexion soit profonde, et que l'expérience soit exacte. »

Denis DIDEROT, De l'interprétation de la nature, 1754.

Pendant longtemps, c'est notre œil et ses propriétés optiques en terme de résolution, de sensibilité qui ont limité notre champ d'observation : ainsi la vision humaine a défini les bornes supérieures et inférieures, au-delà desquelles les représentations mentales prenaient le dessus sur les représentations visuelles. Deux domaines étaient particulièrement restés en friche : celui de « l'infiniment grand », ou plutôt de « l'infiniment loin » et celui de « l'infiniment petit ».

Dès l'Antiquité, des savants remarquèrent que certains matériaux avaient la propriété, quand on regardait à travers, de modifier la vision. Ainsi, on retrouva sur le site de Pompéi ce qui peut être considéré comme la première lentille plan-convexe de l'histoire. Le philosophe romain Sénèque (4 av JC – 65 ap JC) fit remarquer dans ses écrits qu'un globe de verre rempli d'eau permet de grossir l'objet qui est derrière et découvrit ainsi ce qu'on pourrait appeler « l'effet loupe ».

Durant le Moyen Age, période assez sombre pour les Sciences, peu d'avancées notables furent faites. Roger Bacon (1214-1294), philosophe et alchimiste anglais, considéré comme le père de la méthode scientifique, proposa d'utiliser des verres pour corriger la vision. Il aurait également suggéré la possibilité de combiner des lentilles pour réaliser une lunette d'observation. On peut

également citer les travaux de Léonard de Vinci, à la fin de cette période et au début de la Renaissance qui, en inventant la chambre noire, mit au point ce qui semble être le premier système d'imagerie.

C'est au 17^{ème} siècle, en pleine période des Lumières que l'optique, et en particulier l'optique instrumentale, fit un grand pas en avant. Cette période vit l'apparition des premières lunettes d'observation et des premiers microscopes. Hans Lippershey (1570-1619), opticien lunetier hollandais est considéré par beaucoup d'historiens comme l'inventeur de la lunette d'observation. Il déposa un brevet pour cet instrument le 2 octobre 1608. Le physicien et astronome italien Galileo Galilei (1564-1642), sans doute inspiré par les travaux de Lippershey, construisit en 1609 son propre instrument qui lui permit en premier lieu d'observer la lune, puis de faire ses fameuses observations des phases de Vénus qui l'amènèrent à soutenir l'hypothèse héliocentrique.

Concernant le microscope, c'est un autre opticien hollandais, Zacharias Janssen (1580-1638) aidé par son père, qui est reconnu comme l'inventeur du premier microscope composé (figure 1-1).



Figure 1-1 : microscope de Janssen.

Cet instrument est formé de trois tubes couissants, avec une lentille à chaque extrémité. La lentille de l'oculaire est bi-convexe, et celle de l'objectif est plano-convexe, ce qui est remarquable pour l'époque. Ce microscope permettait d'obtenir des grossissements de 3 à 10 (lorsqu'elle était étendue au maximum)

Au niveau de la théorie, Johannes Kepler (1571-1630), dans *Dioptrice* publié en 1611 fut le premier à développer un formalisme pour le traitement de l'optique au premier ordre d'un système de lentilles minces. Il réussit ainsi à décrire de manière détaillée le fonctionnement de la lunette de Kepler (avec un oculaire convergent) et de la lunette de Galilée (oculaire divergent).

Grâce aux travaux de Willebrord Snell (1580-1626), René Descartes (1596-1650), Pierre de Fermat (1601-1665), Christiaan Huygens (1629-1695), pour ne citer qu'eux, de grandes avancées furent faites dans la compréhension du comportement de la lumière et de sa nature, même si un grand nombre de questions restaient encore en suspens.



Figure 1-2 : microscope de Van Leeuwenhoek.

L'échantillon est placé au bout d'une pointe qui, grâce à deux vis, peut être positionnée précisément par rapport à la lentille biconvexe. Ce dispositif permettait d'obtenir des grossissements de 70 à 270 grâce à l'étonnante qualité optique des lentilles utilisées. [Evenett 2005]

Antonie Van Leeuwenhoek (1632-1723), commerçant et savant néerlandais proposa, un peu avant 1668, un microscope de taille réduite (figure 1-2), qui tient dans la main, basée sur une unique lentille biconvexe. Grand illustrateur, ses découvertes ont traversé les siècles grâce aux dessins qu'il légua à la postérité. En observant des salissures relevées sur ses dents, il fut le premier à voir des bactéries, qu'il nomma d'ailleurs « animalcules » (figure 1-3). C'est aussi lui qui mit en évidence en premier les cellules sanguines ou encore les spermatozoïdes (figure 1-3).

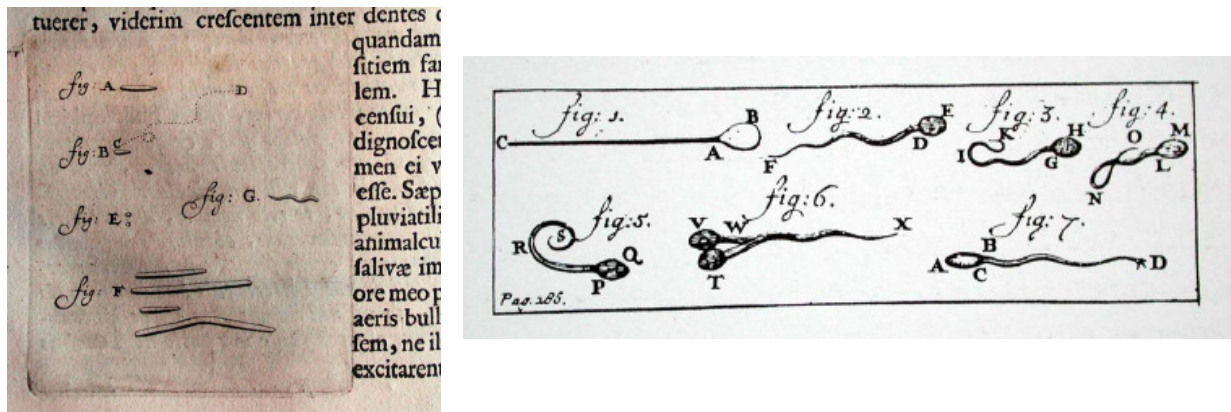


Figure 1-3 : dessins de Van Leeuwenhoek relatant ses observations. Le dessin de gauche représente les premières bactéries observées, que nous appelons aujourd'hui protozoaires. Ce dessin est tiré d'une lettre datée de septembre 1764. Le dessin de droite, qui est issu d'une lettre adressée à la Royal Society en 1677, est la première représentation de spermatozoïdes humains.

A la même période, Robert Hooke (1635-1703) fit lui aussi de nombreuses observations microscopiques qu'il consigna et publia. Ce brillant scientifique expérimentateur et théoricien britannique s'intéressa à la microscopie et à l'astronomie. Ce fut le premier à considérer sérieusement l'importance du pouvoir résolvant d'un équipement optique. Au niveau de la microscopie, il travailla au développement de microscopes, avec le fabricant Christophe Cock (figure 1-4). Dans *Micrographie* publié en 1665, il présente ses résultats aussi bien expérimentaux que théoriques, puisqu'une théorie d'optique ondulatoire figure dans ce livre. Il observa de nombreux échantillons : insectes, éponges, fossiles, bactéries, protozoaires. Grâce à ces travaux, il confirma d'ailleurs les observations de Van Leeuwenhoek.



Figure 1-4 : reconstitution du microscope de Hooke. Sur cette photographie, on peut apercevoir à gauche un exemplaire du livre *Micrographie*. Le microscope de Hooke ressemble à un télescope de l'époque. Il est composé de trois lentilles : une lentille biconvexe (objectif), un oculaire et une lentille de champ. Ces trois composants induisant un certain nombre d'aberrations, Hooke introduisit un diaphragme pour bloquer les rayons les plus paraxiaux. Une grande originalité de ce montage est l'illumination : la lumière générée par une lampe à huile, traverse une flasque de verre remplie d'eau pour diffuser la lumière et obtenir un éclairage plus intense et plus uniforme. C'est le premier condenseur...

Isaac Newton (1642-1727) apporta une contribution énorme aux avancées de l'optique. Nous retiendrons ici que c'est sans doute l'un des premiers qui essaya d'éliminer les aberrations chromatiques dans un système d'imagerie (en l'occurrence une lunette d'approche), mais malheureusement sans succès. C'est d'ailleurs pour cette raison qu'il proposa en 1668 de réaliser un télescope à réflexion, utilisant des miroirs plutôt que des lentilles. John Dollond (1706-1761), fabricant de télescope anglais refit les expériences de Newton sur les aberrations chromatiques, et réalisa un montage achromatique en associant du crown et du flint. Cependant il semble que ce soit un scientifique amateur, Chester Moor Hall (1703-1771) qui fabriqua le premier objectif achromatique.

Au cours du 19^{ème} siècle, de nombreux physiciens de haut rang apportèrent leur contribution à l'évolution de l'optique, notamment concernant la nature de la lumière. Nous pouvons citer les travaux de Young (1773-1829), Fresnel (1788-1827), Malus (1775-1812), Fizeau (1819-1926), Maxwell (1831-1879), Hertz (1857-1894), Airy (1801-1892) ou encore Michelson (1852-1931). A la même époque, Ernst Abbe (1840-1905), qui travailla avec Carl Zeiss (1816-1888) et Otto Schott (1851-1935), introduisit de nouveaux concepts et notamment, en 1872, celui de limite de résolution pour un système limité par la diffraction [Hecht 2002], [Molec Expr 2008], [Universalis 2005].

Dès lors, le but de nombreux physiciens a été de développer des systèmes d'imagerie optique performants pour se rapprocher le plus possible de cette limite de diffraction, barrière infranchissable.

Aujourd'hui, grâce au travail de ces nombreux et brillants précurseurs, les instruments optiques nous permettent d'aller sonder le fond de l'univers comme la structure cellulaire d'organismes vivants, en obtenant des images toujours plus fidèles, plus belles, plus fines.

II – Interactions lumière-matière, luminescence

Comme on l'a vu, l'observation du vivant a été un moteur tout au long du développement des microscopes pour accroître le pouvoir résolvant de l'instrumentation.

Parallèlement à ce développement instrumental, il a fallu répondre à de nouvelles questions : que voit-on grâce à un microscope ? En effet le microscope va permettre de collecter des photons qui ont interagi avec l'échantillon. Or, l'interaction entre la lumière et la matière peut fournir un grand nombre d'informations très variées et complémentaires. Le principe de base est à chaque fois le même, des photons à une certaine (ou plusieurs) longueur(s) d'onde sont envoyés sur l'échantillon et on collecte des photons provenant de l'échantillon, qui vont nous renseigner sur son interaction avec la lumière. Différents types de photons sont collectés :

- si l'échantillon n'est pas opaque, une certaine partie des photons envoyés va traverser l'échantillon. Certains vont passer au travers rapidement sans être déviés, d'autres vont changer de trajectoire, d'autres vont être retardés, d'autres encore vont voir leur polarisation changer. Ces photons transmis, s'ils sont collectés, vont permettre de remonter à des caractéristiques optiques de l'échantillon comme par exemple ses propriétés de diffusion, son indice optique, qui pourront ensuite être reliées à des caractéristiques biologiques.

- une certaine partie des photons envoyés va rebrousser chemin. Des phénomènes de réflexion aux interfaces de l'échantillon (aussi bien entre l'air et l'échantillon qu'à l'intérieur même de l'échantillon), ou de rétrodiffusion vont ainsi être mis en évidence et renseigner sur la nature de l'échantillon.
- enfin, en interagissant avec la lumière, l'échantillon va pouvoir sous certaines conditions permettre la génération de nouveaux photons de longueurs d'ondes différentes. C'est le cas, par exemple, de la luminescence (que nous allons détailler dans la suite), de la génération d'harmoniques supérieures qui va renseigner sur la structure et la propriété de symétrie de certaines entités (génération de second harmonique SHG, ou de troisième harmonique THG), de l'effet Raman stimulé qui permet de mettre en évidence des transitions vibrationnelles (CARS pour Coherent Anti-Stokes Raman Scattering).



Figure 1-5 : minéral fluorescent (Aragonite). A gauche, le minéral est observé en lumière blanche, au milieu dans l'ultra-violet lointain (250 nm), et à droite dans l'ultra-violet proche (370 nm) (www.calvin.edu).

Des phénomènes de luminescence sont connus depuis des milliers d'années : on en trouve des mentions dans différentes mythologies : les lucioles, les vers luisants, les luminescences des souches d'arbres, des roches (figure 1-5) ou d'autres luminescences naturelles ont toujours attiré la curiosité de l'homme. A la fin du 16^{ème} siècle, un cordonnier de Bologne, Vincencio Casiarolo, découvrit qu'en chauffant un minéral lourd, la barytine, celle-ci émettait de la lumière dans l'obscurité lorsqu'on l'exposait préalablement à la lumière solaire. Cette découverte fit sensation et la «pierre de Bologne» fut un objet vedette des salons d'érudits et des cabinets de curiosités. La luminescence venait d'être découverte [Gaft 2005]. La première observation de la fluorescence d'une solution à la lumière du soleil fut rapportée en 1845, par le scientifique et astronome britannique John Herschel (1792-1871). C'est en observant une solution de quinine, substance amère extraite d'un arbre tropical, à la lumière du soleil, que Herschel put mettre en évidence ce phénomène [Herschel 1845]. Quelques années plus tard, le physicien irlandais George Gabriel Stokes (1819-1903) retravailla sur cette découverte de Herschel, et révéla certaines caractéristiques importantes du fluorophore ; il remarqua en particulier qu'une longueur d'onde du spectre solaire était absorbée, alors qu'une autre, plus grande, était émise. Il proposa en 1852 les fameuses lois de Stokes, et introduisit la notion de décalage (qui aujourd'hui porte son nom) pour quantifier la différence de longueur d'onde entre absorption et émission [James 1983]. Alexandre Becquerel (1820-1891) fut également une autorité reconnue pour ce qui touchait à la luminescence. Il montra que la fluorescence découverte par Stokes n'était qu'un cas de luminescence. Grâce à un phosphoroscope de son invention, il découvrit la phosphorescence dans plusieurs substances [Becquerel 1859].

Cependant, il fallut attendre le 20^{ème} siècle et l'apparition et l'épanouissement de la physique quantique pour proposer des explications satisfaisantes à ces émissions de lumière.

Le 19 octobre 1900, le physicien allemand Max Planck (1858-1947) fit une déclaration à la société allemande de physique dans laquelle il présenta les débuts hésitants de ce qui allait devenir une grande révolution scientifique. Cette *mécanique quantique* concernait la physique de l'infiniment petit. Son travail sur l'émission du corps noir permit à Planck d'émettre l'hypothèse que les échanges d'énergie entre un rayonnement lumineux et la matière ne peuvent se faire que par

« paquets », appelés quanta. Le quantum est la quantité finie minimale d'échange d'énergie. En 1905, travaillant sur ces idées, Albert Einstein (1879-1955) proposa une nouvelle théorie corpusculaire dans laquelle il affirmait que la lumière était constituée de globules ou de « particules » d'énergie. Chacun de ces quanta d'énergie radiative ou photon, avait une énergie proportionnelle à sa fréquence ν : $E=h\nu$, où h est connu sous le nom de constante de Planck. Les postulats de Niels Bohr (1885-1962) énoncés en 1913 indiquaient que l'énergie totale d'un « atome » (terme générique que nous utiliserons pour parler d'un atome, d'une molécule, d'un ion, d'un semi-conducteur...) ne peut prendre que certaines valeurs discrètes, qu'elle ne peut changer que lors de « sauts quantiques » accompagnés, par exemple, de l'émission ou de l'absorption d'un photon. Einstein s'intéressa plus particulièrement à ce type de conversion d'énergie, ce qui l'amena à proposer sa fameuse théorie des interactions entre matière et rayonnement électromagnétique en 1917, théorie dont nous allons rappeler ici les grands principes.

En considérant un système à deux niveaux m et n d'énergie E_m et E_n , ($E_m < E_n$), on peut distinguer quatre processus principaux élémentaires de conversion d'énergie (figure 1-6) [Balembos 2003], [Delsart 2008] :

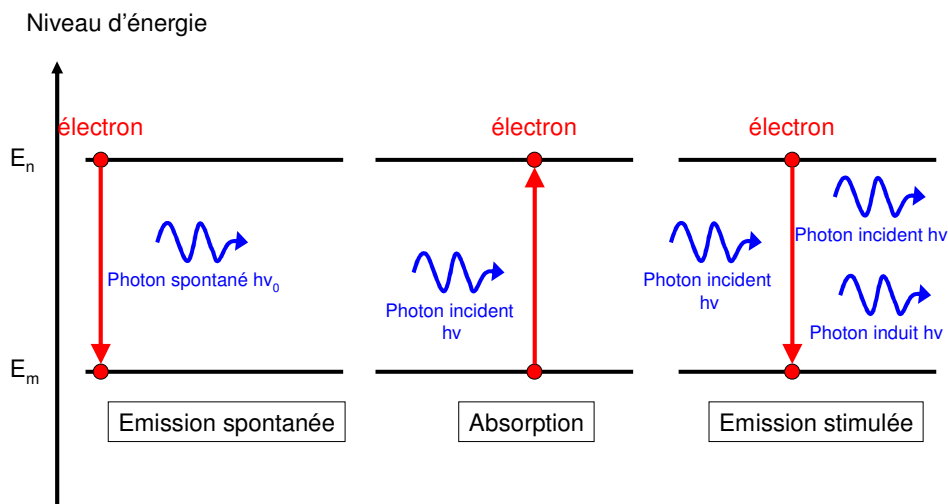


Figure 1-6 : processus de conversion d'énergie.

(a) L'atome se désexcite du niveau m au niveau n par **émission spontanée** d'un photon d'énergie $h\nu_0 = E_n - E_m$: cette émission à la fréquence de résonance ν_0 de la transition $n \rightarrow m$ rayonne dans tout l'espace ($4\pi\text{sr}$), de façon isotrope en général. Une fois le niveau n excité, l'instant du déclenchement du saut quantique est aléatoire, mais la probabilité d'émettre un photon suit une loi exponentiellement décroissante avec le temps. Cette instabilité du niveau n se traduit par un élargissement du profil d'émission centré à la fréquence de résonance ν_0 .

(b) L'atome initialement dans le niveau m , est excité vers le niveau n par **absorption** d'un photon d'énergie $h\nu$, où la fréquence ν du rayonnement exciteur incident est très voisine de la fréquence de résonance ν_0 de la transition $n \rightarrow m$. Le processus, pourvu qu'il soit quasi-résonant, est induit par le photon incident. A chaque processus, le rayonnement incident perd un photon : il est atténué ou absorbé après avoir subi de nombreux processus.

(c) L'atome initialement dans le niveau n , est désexcité vers le niveau m par **émission stimulée** d'un photon d'énergie $h\nu$ où la fréquence ν du rayonnement exciteur incident est très voisine de la fréquence de résonance ν_0 de la transition $n \rightarrow m$. Ce processus, qui est stimulé par le photon incident, est le processus inverse de l'absorption : à chaque processus, le rayonnement

incident gagne un photon qui a exactement les mêmes caractéristiques que le photon incident (fréquence, direction, polarisation,...)

(d) L'atome, initialement dans le niveau n , est désexcité vers le niveau m par **désexcitation non radiative**. Aucun photon n'est émis, et l'énergie excédentaire est transférée sous forme de vibrations, rotations ou translations à des molécules environnantes. Cette dégradation énergétique transforme complètement l'énergie d'excitation en agitation thermique de l'environnement.

Ces processus fondamentaux vont nous permettre d'expliquer la luminescence, mais aussi d'autres effets et notamment le laser.

Aujourd'hui, la luminescence est définie comme l'émission de tout rayonnement électromagnétique visible, ultraviolet ou infrarouge, qui n'est pas d'origine purement thermique. Elle s'observe dans les substances minérales, organiques ou biologiques. Elle peut être provoquée de différentes façons, notamment en irradiant le matériau considéré avec des photons. C'est la photoluminescence et c'est elle qui va nous intéresser. [Atkins 2004], [Lakowicz 1986], [Deniset-Besseau 2008]

Considérons une molécule dite « lumineuse ». Quand une telle molécule dans son état fondamental absorbe de l'énergie lumineuse, par exemple un photon d'énergie $h\nu$, des altérations dans les états électroniques, vibrationnels et rotationnels de la molécule peuvent se produire. Cette énergie peut permettre à un électron de passer d'un niveau fondamental S_0 à un état excité S_2 avec changement d'orbitale des électrons. Cette transition vers l'état excité se produit très rapidement (quelques femtosecondes). Cet état excité S_2 a une durée de vie très courte (de l'ordre de la nanoseconde). Des changements conformationnels et des interactions avec les molécules environnantes font passer les molécules de l'état excité S_2 à un état excité plus stable S_1 : c'est la conversion interne qui dure environ 10^{-12} s.

A partir de là, différents processus peuvent se produire :

- ou bien cet électron va passer de l'état S_1 à l'état S_0 en réémettant l'énergie sous forme d'un photon spontané d'énergie $h\nu'$ (à cause de la conversion interne, $h\nu' < h\nu$, donc la longueur d'onde d'émission est supérieure à celle d'absorption). C'est ce processus que l'on appelle la fluorescence et qui dure de 10^{-12} à 10^{-8} s. Durant ce processus, le spin de l'électron considéré ne change pas d'orientation.

- ou bien cet électron va passer de S_1 à S_0 en subissant une désexcitation non radiative.

- enfin cet électron peut passer, grâce à une conversion intersystème, de l'état singulet S_1 à un état triplet excité T_1 (cette transition $S_1 \rightarrow T_1$ a une probabilité de se produire bien inférieure à celle de la transition $S_1 \rightarrow S_0$). On assiste alors à une inversion du spin de l'électron. Cette inversion rend la désexcitation plus difficile, et l'émission d'un photon pour retourner à l'état S_0 sera alors bien plus lente : de 10^{-5} à 10^0 s. On parle alors de phosphorescence.

Nous allons dans la suite nous intéresser uniquement à la fluorescence. Un tel processus est plus facilement identifiable puisque l'émission spontanée se produit dans les nanosecondes qui suivent l'extinction de la radiation excitatrice. Il s'agit d'une conversion rapide du rayonnement absorbé en énergie réémise, sans stockage d'énergie.

Grâce aux travaux de Alexander Jablonski (1898-1980), physicien polonais qui travailla sur les différents moments de transition pour l'absorption et l'émission d'une espèce fluorescente, nous disposons d'un outil très pratique pour la compréhension des phénomènes de luminescence : le diagramme d'énergie de Jablonski (figure 1-7).

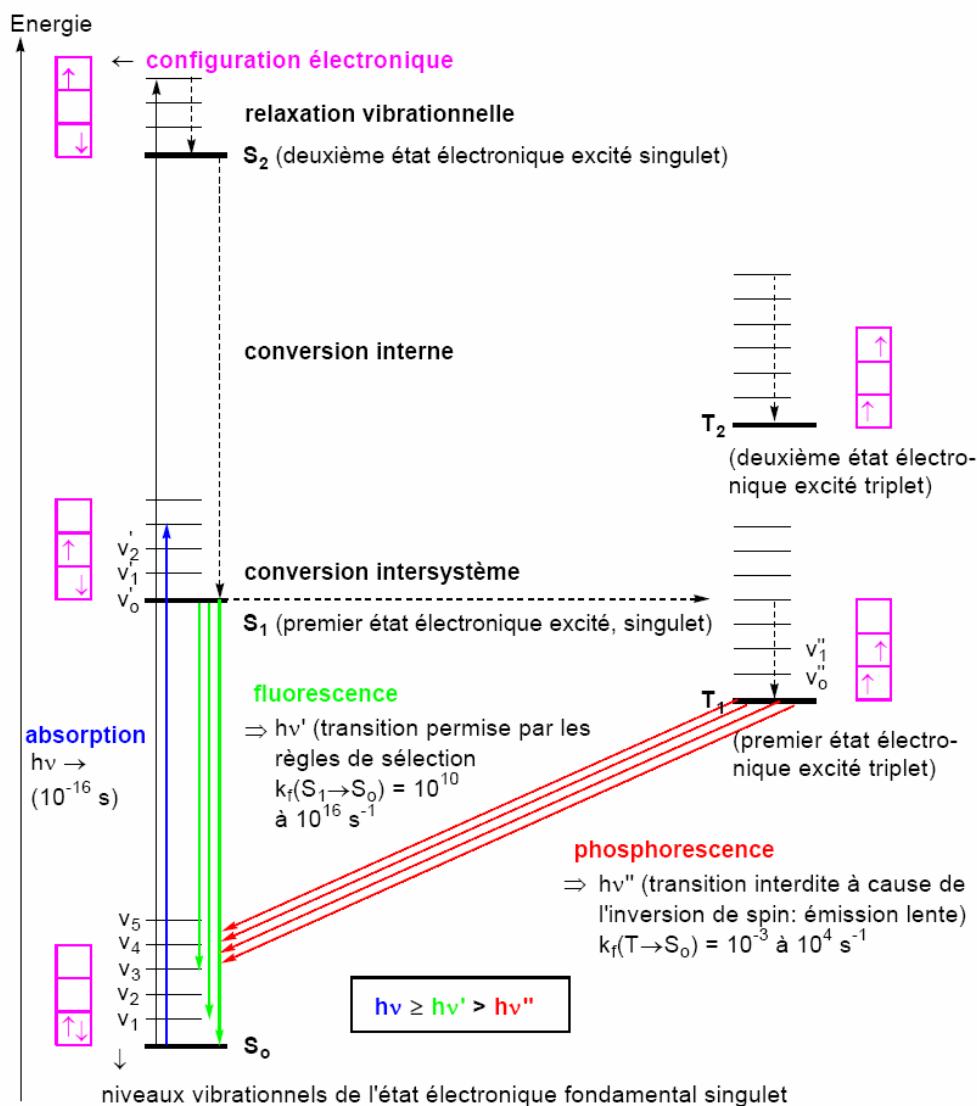


Figure 1-7 : diagramme de Jablonski expliquant la fluorescence.
(source : epfl.ch/load/cours_chim/pvogel_fro_partie-3.pdf)

Ce diagramme permet également d'appréhender les notions de spectre d'absorption et de spectre d'émission d'un fluorophore, qui sont caractéristiques de la structure énergétique de la molécule (figure 1-8). En effet, pour permettre le passage de l'état fondamental S_0 à l'état excité S_1 , il va falloir une énergie au moins égale à la différence d'énergie entre le sous-niveau le plus élevé du niveau fondamental et le sous-niveau le plus bas du niveau S_1 . Ceci explique qu'il y a une énergie en-dessous de laquelle on ne va pas pouvoir exciter le fluorophore, c'est-à-dire une longueur d'onde maximale. Par contre avec des longueurs d'onde plus courtes, il existera toujours une probabilité non nulle d'exciter le fluorophore. Et c'est l'inverse pour le spectre d'émission. On remarque aussi que les différents sous-niveaux, ainsi que l'instabilité du niveau excité, vont élargir le spectre d'émission autour de la fréquence de résonance de la transition considérée. Ceci permet d'expliquer l'allure étalée des spectres d'absorption et d'émission et notamment l'asymétrie de chacun des deux, mais également la symétrie, l'effet « miroir » entre les deux spectres pour les espèces les plus simples.

La différence entre la longueur d'onde où l'absorption est maximale et celle où l'émission est maximale est appelée le décalage de Stokes. Cette grandeur est très importante pour l'imagerie de fluorescence : il faut en effet travailler avec des espèces qui ont un décalage assez important pour qu'on puisse rejeter le rayonnement excitateur et ne collecter que le signal de fluorescence.

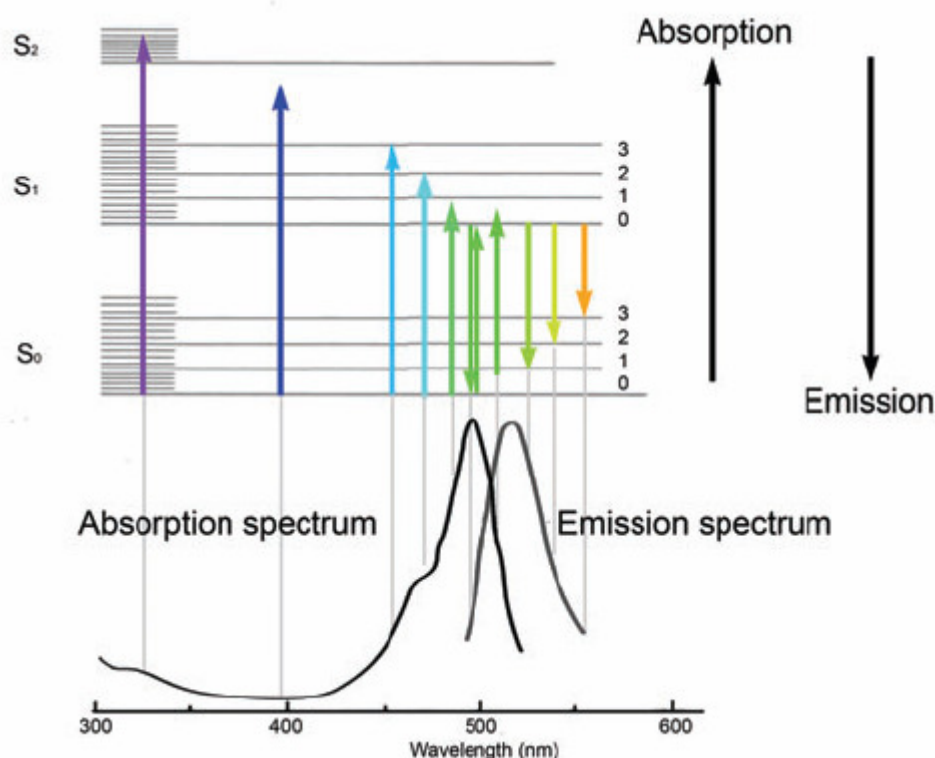


Figure 1-8 : diagramme de Jablonski et spectres d'absorption et d'émission du FITC. Les lignes grises relient la longueur d'onde du spectre à la transition énergétique correspondante [Lichtman 2005].

Un fluorophore est également caractérisé par deux grandeurs essentielles qui nous renseignent sur les propriétés physico-chimiques de cette molécule : le temps de vie de fluorescence et le rendement quantique [Lakowicz 1986], [Guiot 2001].

Pour les illustrer, nous allons considérer un diagramme de Jablonski simplifié, qui attire l'attention uniquement sur les processus responsables du retour à l'état fondamental S_0 (figure 1-9). En particulier, nous allons nous intéresser à la probabilité (notée k_f) de désexcitation par émission spontanée d'un photon de fluorescence d'énergie $h\nu'$, et à la probabilité de désexcitation non radiative, notée k_{nr} .

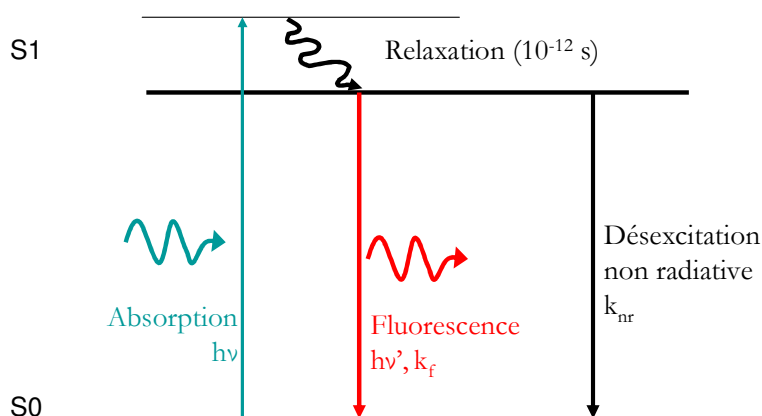


Figure 1-9 : diagramme de Jablonski simplifié.

Le rendement quantique de fluorescence est le quotient du nombre de photons émis sur le nombre de photons absorbés. En admettant que tous les photons absorbés permettent le passage à l'état excité S_1 , ce dernier va se dépeupler de deux manières : chaque photon absorbé va ou

bien permettre l'émission d'un photon de fluorescence, ou bien permettre une désexcitation non radiative. Par conséquent, le rendement quantique est donné par :

$$Q = \frac{k_f}{k_f + k_{nr}}$$

Ce rapport va donc se rapprocher de l'unité quand la désexcitation radiative va devenir prédominante par rapport à la désexcitation non radiative.

En introduisant N la population de molécules à l'état excité, on relie aisément la variation de N au cours du temps aux probabilités k_{nr} et k_f :

$$\frac{dN}{dt} = -(k_f + k_{nr})N$$

ce qui nous permet d'obtenir l'évolution de cette population au cours du temps :

$$N(t) = N_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

avec $\tau = \frac{1}{k_f + k_{nr}}$.

L'émission de fluorescence étant un processus aléatoire, cette grandeur τ caractérise le temps de vie moyen des molécules à l'état excité, et est appelée le temps de vie de fluorescence. Dans la majorité des cas, cette grandeur a une valeur comprise entre 1 et 10 ns. Avec un modèle de déclin monoexponentiel, c'est-à-dire en considérant que toutes les molécules présentes fluorescent de la même façon, on en déduit que 63% des molécules sont désexcitées à un temps égal à τ .

Enfin, il est primordial de garder à l'esprit que ces deux grandeurs sont influencées par les caractéristiques du milieu environnant (température, pH, polarité,...). Ainsi, si on peut accéder à leurs valeurs, on va pouvoir en déduire des propriétés physico-chimiques de l'environnement proche des fluorophores.

En travaillant avec des fluorophores organiques, certains artefacts sont incontournables et peuvent altérer les mesures [Lichtman 2005], [Guiot 2001]. En principe, un fluorophore peut effectuer un nombre illimité de cycles entre l'état fondamental et l'état excité. Mais après irradiation, la molécule à l'état excité est plus réactive et les conditions dans lesquelles ces fluorophores sont utilisés limitent le nombre de cycles. Généralement, on estime que les bons fluorophores peuvent effectuer entre 10 000 et 40 000 cycles avant de perdre définitivement leur caractère fluorescent. Le photoblanchiment (photobleaching en anglais) est le terme générique qui désigne tous les processus qui causent un déclin irréversible du signal de fluorescence. A l'échelle moléculaire, il existe plusieurs moyens de blanchiment et la photochimie n'est pas complètement cernée pour la plupart des fluorophores. De manière assez basique, il apparaît que ce blanchiment est la conséquence d'un transfert d'énergie entre l'état triplet du fluorophore et une molécule d'oxygène. La molécule d'oxygène ainsi excitée dans un état singulet est réactive et va participer à des réactions chimiques irréversibles avec les molécules organiques (polymérisation, oxydation, dissociation, isomérisation,...). Ces réactions peuvent altérer le fluorophore et inactiver sa capacité à fluorescer. Cet oxygène singulet peut aussi causer de la phototoxicité pour l'échantillon. Mais sagement utilisé, ce photoblanchiment peut également s'avérer être un outil. Citons en exemple le cas du FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), où un petit volume de l'échantillon est photoblanchi et en observant la manière dont la fluorescence réapparaît dans ce volume, on déduit certaines propriétés notamment de diffusion de l'échantillon étudié.

Il est également possible que le fluorophore, en interagissant de manière non covalente avec son milieu moléculaire perde, mais de manière réversible cette fois sa fluorescence. Cet « amortissement » de la fluorescence est appelé « quenching ». Cette propriété peut également être

utilisée pour apporter des informations complémentaires sur l'échantillon. Le FRET (Förster Resonance Energy Transfer [Jares-Erijman 2003]) est un exemple de quenching collisionnel ou dynamique du fluorophore à l'état excité (voir la partie Application en neurobiologie).

III -La microscopie de fluorescence

Un des objectifs principaux des améliorations techniques en microscopie au fil des années, a été d'augmenter la capacité à distinguer ce qui est intéressant (le signal) de ce qui ne l'est pas (le fond). Par son décalage en longueur d'onde entre l'excitation et l'émission, la fluorescence s'est affirmée comme un outil indispensable, notamment dans l'observation du vivant. En effet, en utilisant des outils de sélection spectrale appropriés, on va pouvoir collecter uniquement le signal de fluorescence, et donc avoir un contraste de très bonne qualité. Il existe différents types de fluorophores qui sont utilisés en microscopie de fluorescence suivant les échantillons observés et les processus et phénomènes étudiés.

Certains fluorophores, dits endogènes, sont synthétisés par les organismes vivants, et sont présents naturellement dans les échantillons biologiques. Ils sont responsables de l'auto fluorescence. Nous pouvons citer par exemple le tryptophane, qui est un des acides aminés entrant dans la composition de nombreuses protéines, la nicotinamide adénine dinucléotide (ou NADH sous sa forme de réducteur) et les flavines, qui sont des coenzymes d'oxydoréduction, ou encore la porphyrine, qui est une molécule impliquée dans le transport de l'oxygène. Malheureusement, ces fluorophores sont assez limités et leur utilisation n'est pas aisée. Ils ont en effet des propriétés spectroscopiques assez complexes, notamment avec des spectres d'absorption assez chahutés, qui se recouvrent, et dans des longueurs d'onde assez basses (dans l'ultraviolet).

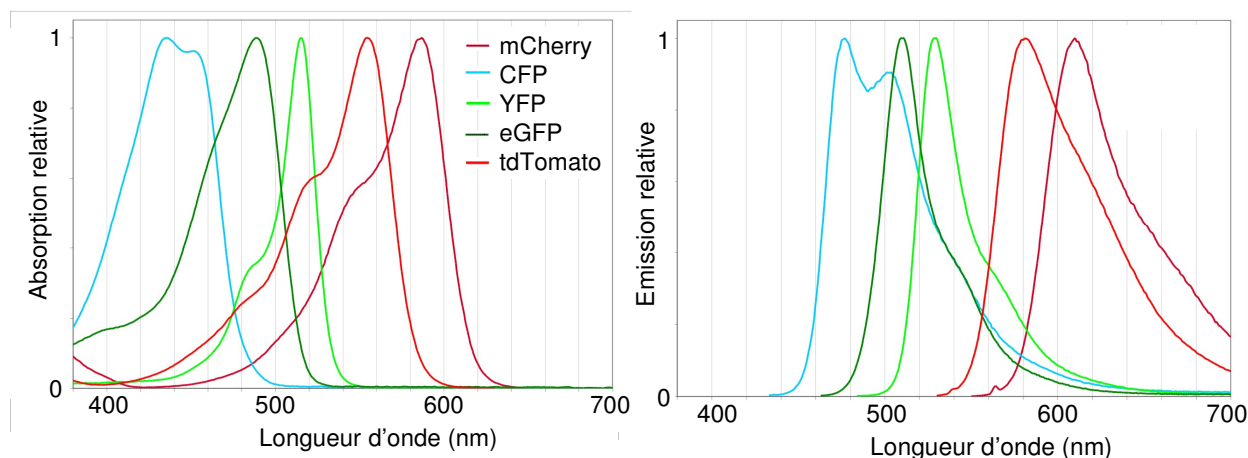


Figure 1-10 : spectres d'excitation (à gauche) et d'émission (à droite) de la GFP et de quelques dérivés (eGFP, CFP, YFP) ainsi que de mCherry, tdTomato.

Conscients du potentiel de la microscopie de fluorescence, de nombreux chimistes organiciens ont travaillé à la synthèse de plusieurs milliers de sondes fluorescentes de rendements quantiques élevés et compatibles avec le vivant. Grâce à ces développements, il est aujourd'hui envisageable de marquer n'importe quel aspect des systèmes biologiques [Invitrogen 2007]. La large gamme spectrale des fluorophores disponibles permet l'imagerie simultanée de plusieurs composants

cellulaires, sub-cellulaires ou moléculaires. La découverte en 1962 de la Green Fluorescent Protein (GFP) [Shimonura 1962] fut un véritable tournant. Cette protéine, synthétisée naturellement par la méduse *Aequorea Victoria* est un « produit » des gènes intrinsèquement fluorescent. Ainsi, quand une trentaine d'années plus tard, les biologistes moléculaires réussirent à séquencer les nucléotides puis à coder la séquence de la GFP dans des bactéries, cette protéine devint un marqueur puissant pour l'expression des gènes [Chalfie 1994]. Aujourd'hui, avec ses protéines dérivées produites par différentes mutations et qui couvrent des spectres différents (Cyan Fluorescent Protein CFP, Yellow Fluorescent Protein YFP,...), la GFP est devenue quasiment incontournable (figure 1-10).

Pour l'avenir, de nombreux espoirs sont fondés sur les boîtes quantiques colloïdales, appelés plus couramment sous leur désignation anglo-saxonne : les quantum dots [Bruchez 1998]. Ces nanocristaux inorganiques présentent de nombreux avantages : ils possèdent des rendements quantiques bien supérieurs à ceux des fluorophores organiques, ont des temps de vie de fluorescence plus longs, et surtout ne souffrent pas du photoblanchiment et des autres photodégradations. Mais actuellement, les difficultés liées à leur intégration au sein d'organismes vivants, ainsi que leur clignotement, réstreignent leur utilisation, même si des premiers résultats prometteurs ont été démontrés ces dernières années [Michalet 2005], [Mahler 2008].

Toute cette effervescence autour de la fluorescence est aussi due en grande partie à la découverte de l'effet laser et au développement des sources lasers, qui sont des outils quasiment indissociables de la microscopie de fluorescence. Les caractéristiques intrinsèques du rayonnement laser, à savoir sa monochromaticité, sa forte densité spectrale de puissance, son confinement spatial et sa capacité à fonctionner en régime impulsionnel ultracourt, permettent d'exciter sélectivement et efficacement les fluorophores.

Différents types de contrastes peuvent être mis en évidence grâce à la microscopie de fluorescence. Dans la suite, nous nous concentrons sur la mesure de temps de vie de fluorescence, qui est la technique que nous utilisons.

III.1 – La fluorescence résolue en temps

La fluorescence résolue en temps, autrement dit la mesure du temps de vie de fluorescence, peut s'avérer être un outil intéressant, car elle contient des informations complémentaires d'une mesure d'intensité. En particulier, elle renseigne sur les interactions du fluorophore avec son environnement. Des paramètres tels que la viscosité locale, le pH, l'indice de réfraction, l'interaction avec les autres molécules (collisions, transfert d'énergie) affectent le temps de vie de fluorescence [Valeur 2002].

Par rapport à la mesure d'intensité de fluorescence, la fluorescence résolue en temps est beaucoup moins tributaire de paramètres tels que la concentration en fluorophores ou le blanchiment. Or ces paramètres sont difficilement contrôlables lors d'observations microscopiques d'échantillons biologiques.

En couplant cette technique de mesure à un système d'imagerie comme un microscope, il est possible de mesurer des caractéristiques du déclin de fluorescence (amplitude et temps de vie) en chaque point spatialement résolu où on peut faire l'image de fluorescence de l'échantillon. Ainsi, une image révélant les contrastes de durée de vie de fluorescence de l'échantillon est obtenue. Par conséquent, une telle technique d'imagerie de fluorescence résolue en temps (FLIM pour

Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) permet, en complément des informations de localisation et de topologie apportées par la microscopie conventionnelle, une analyse dynamique de processus moléculaires et métaboliques au sein des cellules. Grâce aux nombreux développements technologiques, la technique FLIM jouit depuis une vingtaine d'années maintenant d'une popularité importante en biologie cellulaire, biophysique et sciences médicales comme on peut le constater dans la littérature [Wang 1992], [Periasamy 1995], [Morgan 1996], [Tadrous 2000], [Suhling 2005].

La microscopie de fluorescence résolue en temps permet par exemple d'évaluer le pH dans des cellules [Sanders 1995] ou dans la peau [Behne 2002], ou renseigne sur l'indice de réfraction du milieu [Suhling 2002]. Cette technique est également utilisée pour faire de l'imagerie calcique [Lakowicz 1992], [Sanders 1994], ou des mesures de concentration en oxygène [Gerritsen 1997]. Couplée à une détection résolue en polarisation, elle permet également de faire de l'imagerie d'anisotropie de fluorescence résolue en temps [Siegel 2003]. La mesure de temps de vie sur l'autofluorescence est pratiquée sur des tissus entiers [Cubeddu 1999] ou les dents [König 1999] pour mettre en évidence des contrastes particuliers. C'est aussi un outil dans l'étude de l'aggrégation de sensibilisateurs en thérapie photodynamique [Connelly 2001], [Rück 2002]. Enfin la technique FLIM est beaucoup utilisée pour voir les interactions entre des protéines, des lipides, des enzymes, de l'ADN, ou de l'ARN marqués avec différents fluorophores. Lorsque ces espèces vont interagir, elles vont être très proches, et un transfert non radiatif de type FRET va être possible entre les fluorophores de chacune des deux entités qui se traduit par une diminution du temps de vie de fluorescence du fluorophore qui va céder de l'énergie. Nous détaillerons ce processus et ces mesures dans la quatrième partie de ce manuscrit.

Pour réaliser ces mesures de temps de vie de fluorescence, on sépare usuellement les techniques en deux grandes catégories : les mesures dans le domaine temporel, et celles dans le domaine fréquentiel [Suhling 2005], [Herman 2003]. En principe, ces deux techniques sont équivalentes et donnent accès au même type d'informations : les deux sont reliées par une transformée de Fourier. Cependant, les techniques expérimentales utilisées et les données acquises ne sont pas de même nature. De plus, l'analyse est formellement différente, et chacune des deux techniques a ses avantages et ses inconvénients...

III.2 - Acquisition dans le domaine temporel

Cette méthode est basée sur l'excitation de l'échantillon par une impulsion lumineuse ultracourte (par rapport au temps de vie de fluorescence mesuré, c'est-à-dire sub-nanoseconde), puis par l'enregistrement du déclin de fluorescence consécutif à cette excitation. Dans le cas général, quand on excite un mélange de fluorophores ayant chacun un déclin exponentiel, l'intensité de fluorescence totale suit alors un déclin multiexponentiel, de la forme :

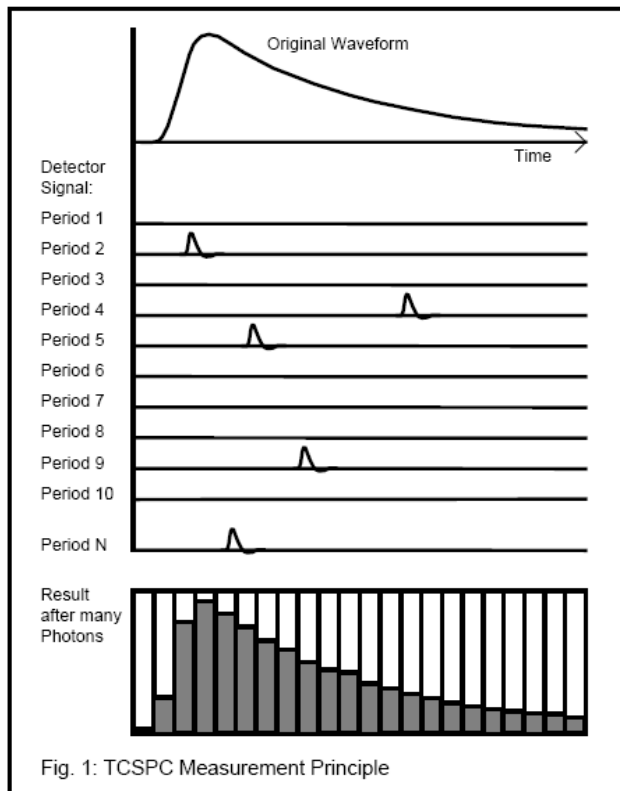
$$I(t) = \sum_i a_i \exp\left(-\frac{t}{\tau_i}\right)$$

avec τ_i le temps de vie de chaque espèce et a_i l'amplitude correspondante qui est reliée à l'intensité et à la concentration de chaque espèce. Différentes approches existent pour réaliser cette mesure. Certaines permettent d'obtenir des résolutions temporelles de l'ordre de la picoseconde et même moins. C'est le cas de la caméra à balayage de fente [Krishnan 2003], et des méthodes utilisant plusieurs impulsions, par exemple l'imagerie de temps de vie de fluorescence

par double impulsion (DPFLIM pour Double-Pulse Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) [Muller 1995], [Buist 1997].

En ce qui nous concerne, nous allons nous attarder ici sur les deux techniques les plus couramment utilisées dans les applications biomédicales pour mesurer des temps de vie de quelques nanosecondes.

La méthode sans doute la plus répandue aujourd'hui est le comptage de photon unique corrélé dans le temps, aussi appelée TCSPC pour Time-Correlated Single-Photon Counting. Cette technique est basée sur la mesure du temps écoulé entre l'excitation et le premier « évènement » d'émission (en l'occurrence d'émission d'un photon de fluorescence) détectée en un point. En répétant cette mesure suffisamment de fois, on obtient un histogramme du nombre de coups détectés en fonction du temps (figure 1-11). En balayant tout l'échantillon, nous avons ainsi accès à une carte des probabilités de l'évènement « désexcitation par émission de fluorescence », c'est-à-dire au déclin de fluorescence, qui permet d'évaluer le temps moyen de vie de l'état excité de l'espèce étudiée. [O'Connor 1984].



Une limitation importante de ce type de détection est le temps nécessaire pour obtenir un déclin représentatif. Détaillons un peu ce point : si l'intensité de fluorescence est importante, statistiquement il est fort probable qu'il y ait plusieurs évènements après excitation avec une seule impulsion (ou autrement dit entre deux impulsions). Or avec cette technique, on ne va retenir que le premier évènement après l'impulsion, et on va donc sous-estimer le temps de vie. Même s'il existe des astuces, notamment au niveau du traitement, pour se débarrasser de cette erreur, le meilleur moyen de s'en affranchir est de travailler avec un faible taux de comptage (environ 1 ou 2 coups pour 100 impulsions). Ensuite, lorsqu'on va vouloir faire une image à deux dimensions de l'échantillon, il va falloir en chaque point accumuler assez d'évènements pour avoir une bonne statistique, ce qui au final nécessite l'acquisition de plusieurs milliers de déclins... On peut espérer réduire cet inconvénient en multipliant les canaux de détection par exemple [Suhling 1996].

Malgré cette limitation, cette technique bénéficie d'une très bonne sensibilité, d'une excellente résolution temporelle et d'une large dynamique. Elle possède un très bon rapport signal à bruit, et une résolution temporelle de l'ordre de la ps. Toutes ces qualités, associées à une grande maîtrise des statistiques de Poisson utilisées confèrent à cette technique une remarquable reproductibilité. Elle est beaucoup utilisée, et notamment couplée à des dispositifs de microscopie confocale ou multiphotonique [Barzda 2001], [Böhmer 2001]. Aujourd'hui de nombreux laboratoires (dont le notre) possède des systèmes TCSPC commerciaux, vendus « clé en main » (Becker & Hickl, PicoQuant,...) couplés à des microscopes confocaux.

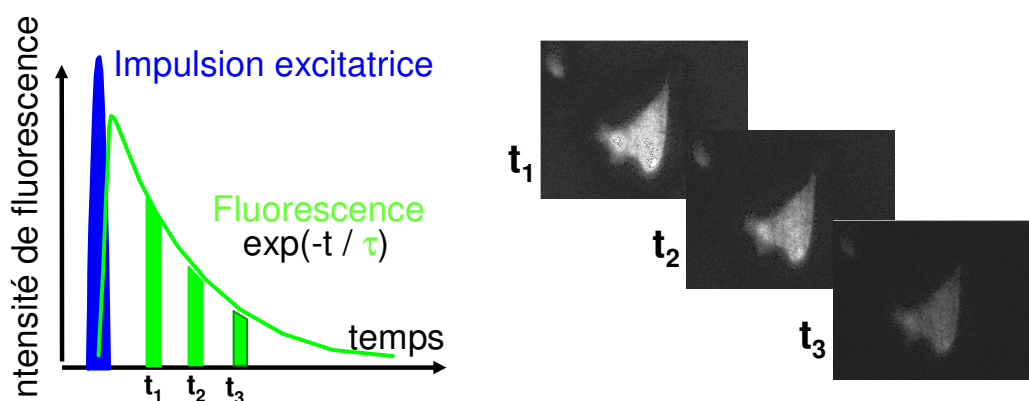


Figure 1-12 : principe de la technique FLIM dans le domaine temporel avec une détection à déclenchement contrôlé. Pour une première impulsion, un délai t_1 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition ; puis pour une seconde impulsion un délai t_2 est appliqué entre l'impulsion et l'acquisition,...

La deuxième technique repose sur des méthodes d'échantillonnage du signal de fluorescence, à l'aide d'une détection à déclenchement contrôlé. L'échantillon est toujours excité grâce à une source impulsionnelle, et le signal est enregistré avec un retard différent selon l'impulsion, ce qui va permettre ainsi de reconstruire le déclin de fluorescence (figure 1-12). Autrement dit, le détecteur est inactif pendant l'émission de fluorescence consécutive à l'impulsion excitatrice, sauf pour une période très brève de largeur Δt . Pour des impulsions successives, il va accumuler du signal sur la période $t + \Delta t$ jusqu'à l'obtention d'un rapport signal à bruit correct. Un tel processus est répété pour différents délais t jusqu'à ce que le déclin soit complètement échantillonné.

Expérimentalement, on réalise ces mesures grâce à des intensificateurs d'image à déclenchement, que nous appelons également « porte temporelle ». Brièvement, un intensificateur d'image est un dispositif d'imagerie qui amplifie la brillance d'un motif de lumière incident sur une photocathode, tout en préservant la figure. Avec un tel outil, toute l'image est échantillonnée en une seule fois, sans acquisition pixel par pixel ni balayage [Wang 1991], [Cubeddu 1993], [Dowling 1997]. Nous reviendrons plus en détail sur cette technique dans la troisième partie.

En comparaison avec les méthodes de comptage de photon unique, ces techniques à base d'intensificateurs possèdent une dynamique et une résolution temporelle inférieure (plusieurs dizaines de ps). Mais en revanche, des paramètres tels que la largeur des portes et le nombre de portes sont choisis par l'utilisateur, ce qui permet d'ajuster l'acquisition aux fluorophores étudiés et ainsi de réduire drastiquement les temps d'acquisition (de quelques minutes à quelques secondes). Avec ces méthodes, l'utilisation de sources basses cadences est également moins coûteuse en temps d'acquisition, mais il faut travailler avec des intensités de fluorescence relativement importantes : en terme de sensibilité, cette technique ne permet pas de faire du comptage de photons. Grâce aux outils d'échantillonnage, il est également envisageable de réaliser un filtrage temporel et ainsi de supprimer le bruit « rapide » (réflexion, diffusion, fluorescence d'espèces plus courtes) lorsqu'on travaille avec des fluorophores qui ont des temps de vie plus longs.

Pour des temps de vie de luminescence (fluorescence mais aussi phosphorescence) supérieurs à la centaine de ns, on peut également travailler avec des caméras déclenchées directement, sans utiliser un intensificateur intermédiaire. [Reich 1993], [Liebsch 2000].

III.3 - Acquisition dans le domaine fréquentiel

Historiquement, c'est dans le domaine fréquentiel qu'ont été réalisées les premières mesures de temps de vie de fluorescence, bien avant l'apparition des sources impulsionnelles ultrabrèves, puisque l'utilisation de sources lumineuses modulées a été maîtrisée bien plus tôt [Gaviola 1926].

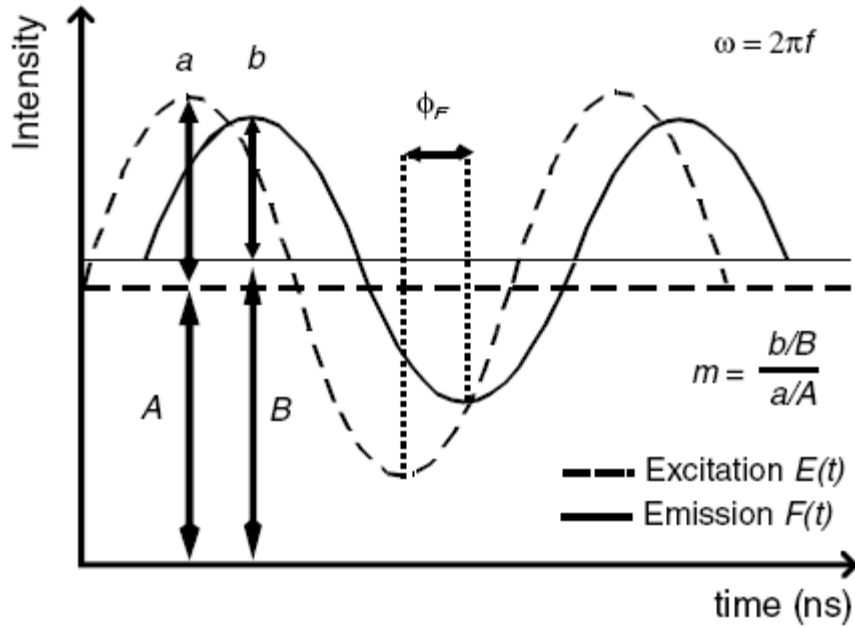


Figure 1-13 : principe de la mesure du temps de vie de fluorescence dans le domaine fréquentiel ; introduction des notations [Herman 2003].

Le principe est décrit sur la figure 1-13 pour un point unique d'une image.

L'échantillon étudié est exposé à une lumière excitatrice $E(t)$ modulée sinusoïdalement à une fréquence angulaire $\omega = 2\pi f$, avec un degré de modulation $m_E = \frac{a}{A}$:

$$E(t) = E_0 [1 + m_E \sin(\omega t)]$$

en considérant une phase d'excitation nulle par rapport à la détection (ce qui peut être réalisé en utilisant par exemple une ligne à retard).

Suite à cette excitation modulée, le fluorophore va émettre un signal de fluorescence $F(t)$ lui aussi modulé à la fréquence ω . A cause de la valeur finie du temps de vie de fluorescence, cette émission va être temporellement décalée, ce qui va se traduire par un retard de phase $\Phi_F(r)$, qui

dépend de la position r d'où provient l'émission observée, et par une modulation $m_F(r) = \frac{b}{B}$ diminuée :

$$F(r, t) = F_0(r) [1 + m_F(r) \sin(\omega t - \Phi_F(r))]$$

Il a été démontré [Lakowicz 1984] dans le cas général que le retard de phase de la fluorescence $\Phi_F(r)$ et le rapport de démodulation $m(r) = \frac{m_F(r)}{m_E(r)}$ dépendent des composantes du temps de vie de l'émission :

$$\Phi_F(\omega, r) = \arctan \frac{N(\omega, r)}{D(\omega, r)}$$

$$m(\omega, r) = \sqrt{N^2(\omega, r) + D^2(\omega, r)}$$

$$\text{avec } N(\omega, r) = \left[\sum_i \frac{a_i(r) \omega \tau_i^2(r)}{1 + \omega^2 \tau_i^2(r)} \right] \cdot \frac{1}{\sum_i a_i(r) \tau_i(r)}$$

$$\text{et } D(\omega, r) = \left[\sum_i \frac{a_i(r) \tau_i(r)}{1 + \omega^2 \tau_i^2(r)} \right] \cdot \frac{1}{\sum_i a_i(r) \tau_i(r)}$$

avec τ_i le temps de vie de chaque espèce et a_i l'amplitude correspondante qui est reliée à l'intensité et à la concentration de chaque espèce.

Dans le cas particulier le plus simple d'un déclin monoexponentiel, le temps de vie de fluorescence $\tau(r)$ peut être calculé directement :

$$\tau(r) = \tau_\Phi(r) = \frac{1}{\omega} \arctan(\Phi_F(r)) = \tau_m(r) = \frac{1}{\omega} \sqrt{\frac{1}{m^2(r)} - 1}$$

Avec un déclin multiexponentiel, le « temps de vie de phase » est plus court que le temps de vie de modulation : $\tau_\Phi < \tau < \tau_r$ [Lakowicz 1986].

Comme pour la mesure dans le domaine temporel, la détection peut ensuite se faire point par point, ou sur tout le champ. Nous allons ici présenter une méthode de détection en champ large avec un intensificateur d'image, mais le principe de base est le même avec un détecteur ponctuel : il faut moduler le gain du détecteur. Le signal de fluorescence $F(r, t)$ émis par l'échantillon est projeté sur la photocathode de l'intensificateur d'image de gain $G(t)$ modulé à la fréquence $\omega + \Delta\omega$:

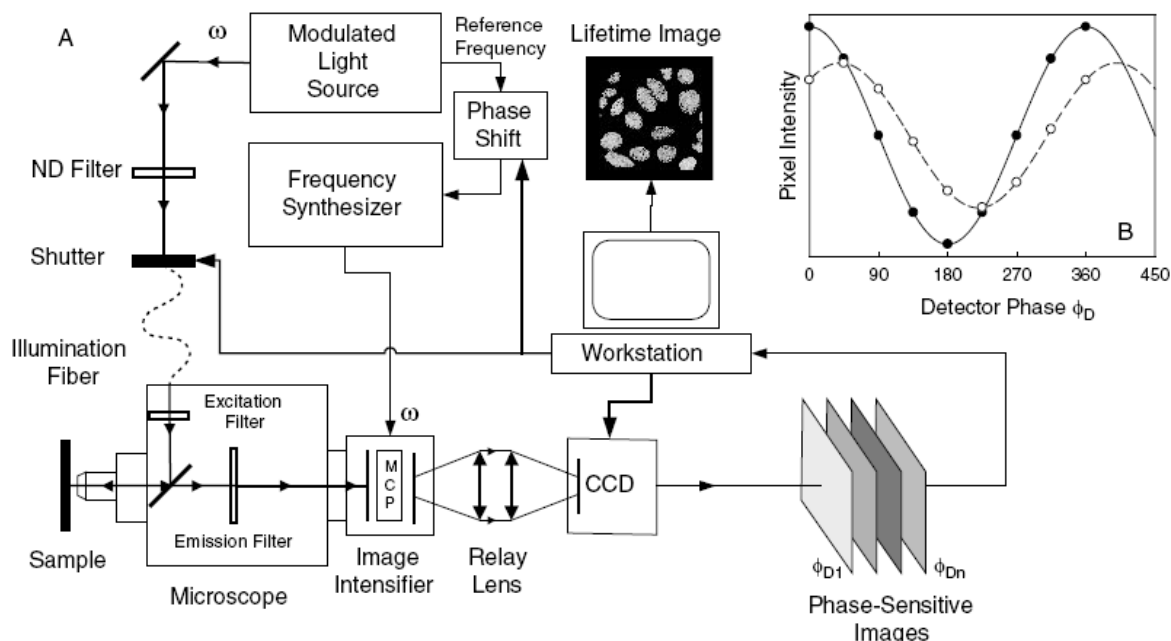
$$G(t) = G_0 [1 + m_D \sin[(\omega + \Delta\omega)t - \Phi_D(r)]]$$

Ainsi, au niveau de la détection, dans l'intensificateur, il va se produire un mélange de fréquence entre le photocourant à ω et la gain à $\omega + \Delta\omega$. A cause du temps de vie long du phosphore, la « fréquence somme » qui est élevée, est moyennée et nous avons juste accès au signal lentement modulé à la « fréquence différence » :

$$I(r, t) = I_0(r) \left[1 + \frac{m_D m_F(r)}{2} \cos(\Delta\omega t - \Delta\Phi(r)) \right]$$

avec $\Delta\Phi(r) = \Phi_F(r) - \Phi_D(r)$.

Grâce à ces deux équations, et en faisant varier Φ_D sur 2π , on extrait m_F et Φ_F . Dans le cas d'une détection homodyne (i.e. $\Delta\omega = 0$), un schéma de montage est rapporté figure 1-14.



D'une manière générale, ces techniques dans le domaine fréquentiel nécessitent un traitement des données plus lourd. Mais elles possèdent aussi des qualités certaines : les sources utilisées sont beaucoup plus simples que celles utilisées dans le domaine temporel (on n'a pas besoin ici de sources impulsionnelles ps ou fs, et les contraintes sur la fréquence de la source sont moins strictes), et nous ne sommes pas gênés dans ce cas par une éventuelle réponse impulsionnelle de la détection.

En conclusion, il existe un certain nombre de techniques pour réaliser ces mesures de temps de vie de fluorescence, toutes avec leurs avantages et leurs inconvénients. Il existe aussi plusieurs modes d'acquisition : ou bien les mesures se font point par point avec une seule voie de détection dans un mode de balayage séquentiel, ou bien les déclins sont enregistrés simultanément sur tout le champ de vue grâce à un détecteur à deux dimensions (caméra, photomultiplicateur avec multianode,...) [Cubeddu 2002]. Ces techniques en champ large reposent essentiellement sur l'utilisation d'intensificateurs d'images, appareils qui, à cause de la taille des pixels de l'écran à phosphore, ont une fâcheuse tendance à dégrader la résolution spatiale du système d'imagerie. De plus ce type de détection est sensible aux mouvements de l'échantillon et aux fluctuations d'intensité (blanchiment ou instabilité de l'excitation). L'utilisateur choisira l'une ou l'autre suivant les phénomènes qu'il veut mettre en évidence, et aussi suivant la technique de microscopie qu'il va utiliser. Par exemple, les méthodes de détection point par point sont couplées à des dispositifs de microscopie à balayage, les mesures de temps de vie dans le domaine temporel sont indissociables des sources impulsionnelles et sont donc utilisées notamment pour la microscopie multiphotonique (qui requiert impérativement de telles sources)... De plus, les « performances temporelles » obtenues grâce à ces modes de détection, sont associées aux « performances spatiales » des microscopes utilisés. C'est pourquoi nous allons maintenant nous intéresser aux performances en terme de résolution spatiale des différents microscopes optiques.

IV – La résolution spatiale en microscopie

IV.1 - Théorie

A cause du caractère ondulatoire de la lumière, et sa propension à être diffractée, la microscopie optique est limitée en résolution spatiale.

Cette notion de « taille limite » est apparue au 19^{ème} siècle. Tout d'abord, l'astronome britannique George Biddell Airy (1801-1892) mit en évidence, en observant des étoiles, la fameuse tâche qui porte aujourd'hui son nom. Quelques années plus tard, en 1893, Ernst Abbe (1840-1905) étudia la formation des images en microscopie. Ses travaux permirent de comprendre le rôle du contenu des fréquences spatiales d'un objet sur la formation des images. Abbe observait des réseaux en créneaux éclairés en onde plane sous un microscope et en s'intéressant aux nombres d'ordres diffractés qui pénétraient dans l'objectif, il émit l'hypothèse que pour résoudre un objet, il fallait au moins collecter deux ordres consécutifs. Ainsi on obtenait, dans le plan image, une sinusoïde, limite en-dessous de laquelle on ne peut plus observer la fréquence du réseau. En appliquant cette condition à la fameuse formule des réseaux dans un milieu d'indice n :

$$\sin(\theta) = p \times \frac{\lambda}{nD}$$

avec θ l'angle d'inclinaison du p ème ordre diffracté par rapport à la normale au réseau, et D le pas du réseau, il arrive à la conclusion que les plus fins détails que l'on peut résoudre dans un échantillon ont une taille r définie par :

$$r = \frac{\lambda}{2n \sin(\alpha)} = \frac{\lambda}{2 \times ON}$$

où $ON = n \sin(\alpha)$ est l'ouverture numérique de l'objectif [Spring 2006] (figure 1-15).



Figure 1-15 : photo du mémorial en l'honneur de Ernst Abbe à Jena (Allemagne), devant le Physiologisches Institut [Evenett 2006].

L'optique de Fourier ou optique cohérente paraxiale qui utilise l'approximation scalaire des ondes électromagnétiques, permet de retrouver ces propriétés d'imagerie du microscope [Wilson 1984], [Born 1975], [Goodman 1996], [Taboury 2003].

En effet, en considérant une onde sphérique divergente diffractée par une lentille mince circulaire dans le modèle de Fraunhofer, et en se plaçant dans le cadre de l'approximation de Fresnel, on peut calculer le profil d'intensité après la lentille. Cette grandeur, qui donne la réponse du système optique pour un point source est appelée réponse percutuelle du système ou PSF (pour Point Spread Function traduit littéralement par fonction d'étalement du point). Ainsi on démontre que l'intensité dans le plan de focalisation I est proportionnelle à :

$$I \propto \left[\frac{2J_1(\nu)}{\nu} \right]^2$$

où J_1 est la fonction de Bessel du premier ordre, et ν la coordonnée optique normalisée définie par $\nu = \frac{2\pi}{\lambda} r_2 n \sin(\alpha) = \frac{2\pi}{\lambda} r_2 ON$, avec r_2 le rayon dans le plan focal et ON l'ouverture numérique. En calculant le premier zéro de cette fonction, qui vaut environ 3,832, nous pouvons en déduire le rayon de la tâche image d'un point :

$$\frac{2\pi r_2 ON}{\lambda} = 3,832$$

$$r_2 = \frac{3,832 \times \lambda}{2\pi ON} = 0,61 \frac{\lambda}{ON}$$

Cette grandeur permet aussi de définir des critères de résolution du système. Par exemple, le critère de Rayleigh stipule que pour que deux points soient résolus dans le plan image, il faut qu'ils soient séparés d'une distance égale au rayon r_2 calculé dans le plan objet.

Ce développement permet aussi d'évaluer l'effet de la défocalisation sur l'intensité. En se plaçant sur l'axe optique (i.e. $r_2 = 0$) et dans l'approximation où la défocalisation z , c'est-à-dire la distance au plan de focalisation, est très faible devant la distance entre la lentille et le plan de focalisation, on trouve que l'intensité I est proportionnelle à :

$$I \propto \left(\frac{\sin\left(\frac{u}{4}\right)}{\frac{u}{4}} \right)^2$$

avec u la coordonnée optique normalisée définie par $u = \frac{2\pi}{\lambda} z \frac{ON^2}{n}$ où z est la distance au plan de focalisation. De même que précédemment, on trouve les zéros de cette fonction. Ainsi l'intensité sera nulle le long de l'axe optique pour :

$$\frac{2\pi \times ON^2}{\lambda n} z = 4\pi$$

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

ce qui définit de même la demie longueur de la tâche centrale dans la direction de l'axe optique. La distribution d'intensité dans toute la région de focalisation peut être évaluée numériquement et tout le long de l'axe optique, sans se cantonner à proximité du plan de focalisation (figure 1-16).

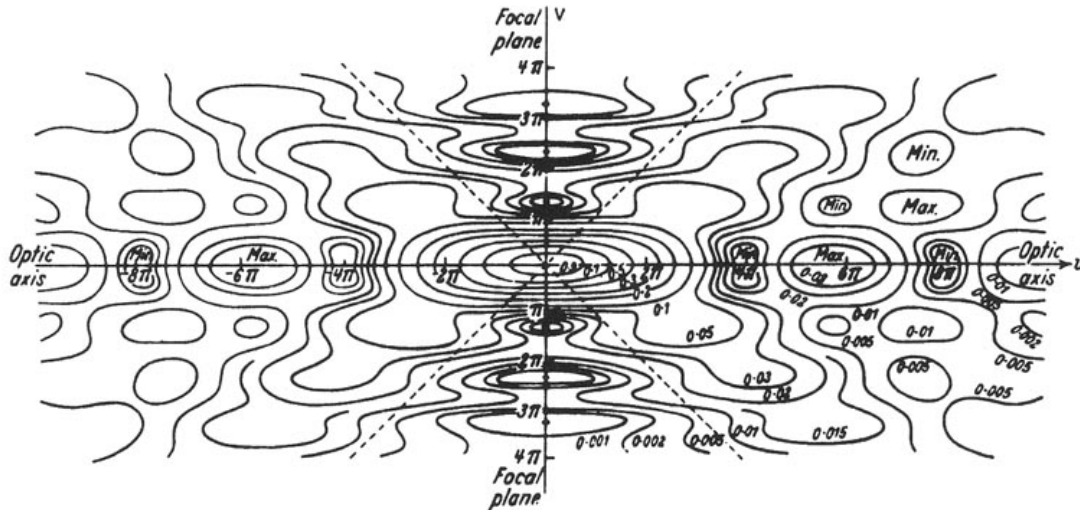


Figure 1-16 : lignes de contour d'égale intensité $I(u,v)$ dans un plan méridien près du plan de focalisation d'une onde sphérique convergente diffractée par une ouverture circulaire [Born 1975].

Enfin, l'optique de Fourier montre que d'une manière générale, l'amplitude dans le plan image du champ diffracté par un système optique est la convolution du champ dans le plan objet et de la réponse percussionnelle du système optique.

Cette théorie est présentée pour une lentille mince, c'est-à-dire pour un système qui n'introduit aucune aberration. Dans ces conditions, les limitations en terme de résolution évoquées sont dues uniquement à la diffraction. Pour des associations plus complexes de lentilles, et plus particulièrement en ce qui nous concerne pour des objectifs de microscope, les limites de résolution seront au mieux égales aux valeurs précédemment citées, et ceci dans le cas d'un objectif corrigé des aberrations ou, autrement dit, limité par la diffraction [Maréchal 1970].

IV.2 – Amélioration de la résolution

A la vue de ces quelques notions d'optique diffractive sous-jacente à la formation des images, il apparaît effectivement qu'un dispositif de microscopie optique est limité en résolution dans les trois directions : l'image d'un point n'est pas un point mais une tâche en forme de « ballon de rugby », plus allongée le long de l'axe optique que latéralement. Dans l'observation d'échantillons biologiques, cette limitation est pénalisante. Cependant, ces lois limitantes dépendent d'hypothèses fortes que de nombreux scientifiques essaient de contourner. Le but des recherches est à la fois d'améliorer la résolution latérale, pour distinguer des structures subcellulaires plus fines, mais aussi d'améliorer la résolution axiale pour localiser plus précisément le plan de provenance du signal collecté. Nous allons dans ce paragraphe présenter les méthodes les plus usuellement utilisées pour augmenter la résolution [Haeberlé 2006], [Gustafsson 1999], [Egner 2005], [Garini 2005], [Heintzmann 2006], [Hell 2007].

Nous les avons classées en trois catégories :

- celles basées sur un développement de l'instrumentation
- celles basées sur des modifications des processus d'absorption et d'émission des fluorophores
- celles basées sur un traitement après acquisition

IV.2.1 - Développement de l'instrumentation

Les limitations axiale $z = \frac{2\lambda n}{ON^2}$ et latérale $r = 0,61 \frac{\lambda}{ON}$ sont valables lorsque l'imagerie est réalisée dans une géométrie de microscope « conventionnelle », où la lumière n'est collectée que par un seul objectif et pour une excitation uniforme sur la partie de l'échantillon imagée. Nous voyons dès lors deux voies d'investigation pour améliorer la résolution : exciter avec un éclairage inhomogène, qui va varier suivant la position, et travailler avec des systèmes de collection plus évolués avec plusieurs objectifs.

Un des premiers dispositifs qui a permis une amélioration de l'imagerie est le microscope confocal, qui est aujourd'hui un outil de référence dans le domaine de l'imagerie cellulaire [Conchello 2005], [Wilson 2003].

Ce dispositif a été inventé par l'américain Marvin Minsky, spécialiste des sciences cognitives à la fin des années 50 [Minsky 1988]. Observant des appareils de Golgi colorés dans des blocs épais de cerveaux, dans l'espoir de voir des connections nerveuses, il proposa cette méthode pour améliorer l'imagerie en éliminant la lumière provenant des plans hors focalisation de l'échantillon. Mais il fallut attendre les années 1980 et le développement des sources lasers et de systèmes de balayage et de détection efficaces pour que s'affirme cette technique.

En microscopie confocale, l'échantillon est excité « ponctuellement » par un faisceau laser focalisé aussi petit que possible dans le plan d'observation. La fluorescence émise est détectée à travers un diaphragme, placé en position confocale par rapport à la tâche d'illumination. Ceci signifie que le diaphragme est dans le plan conjugué de l'excitation, ce qui permet au détecteur de voir uniquement la zone de focalisation du faisceau exciteur. Ainsi la fluorescence provenant d'autres plans de l'échantillon est coupée par le diaphragme, ce qui améliore la résolution axiale. Pour obtenir une image à deux dimensions, il faut balayer le point d'excitation dans le plan focal, l'acquisition étant réalisée point par point (figure 1-17).

Autrement dit, nous avons dans ce dispositif un double filtrage spatial : d'abord à l'excitation où la plus petite tâche possible va exciter une petite zone de l'échantillon, puis à la détection où le diaphragme ne va laisser passer que la fluorescence provenant du centre de la tâche. Par conséquent la réponse percussionnelle d'un tel dispositif est le produit de la réponse percussionnelle à l'excitation et de la réponse percussionnelle à la détection. Les performances de ce système sont directement reliées à la taille du diaphragme de détection.

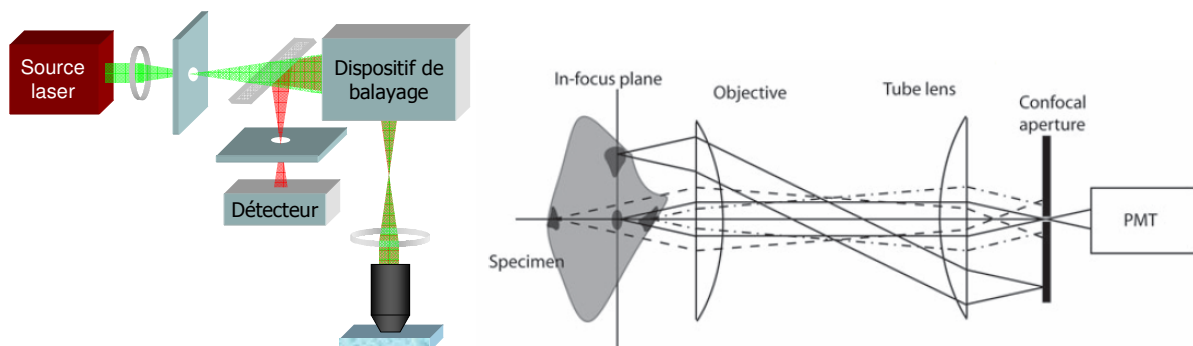


Figure 1-17 : principe de la microscopie confocale. A gauche, schéma d'un dispositif confocal : le diaphragme à l'excitation, le point de focalisation dans l'échantillon, et le trou de filtrage à la détection sont tous des points conjugués. A droite, rejet de la lumière provenant de zones de l'échantillon autres que la zone de focalisation. [Conchello 2005].

Cette technique permet tout d'abord d'améliorer le contraste, en éliminant la diffusion provenant du plan de focalisation (une partie de la lumière excitatrice est diffusée pour exciter la fluorescence en dehors de la tâche centrale) et des plans supérieurs (une partie du signal de fluorescence du plan focal est diffusée dans l'échantillon lors du trajet vers le détecteur ce qui va donner une image altérée de l'échantillon), et en éliminant la contribution des plans supérieurs et inférieurs, responsable d'un fond diffus.

Bien entendu, l'efficacité du diaphragme est liée à sa taille. Mais si le diaphragme est trop petit, il y a une perte de signal et par conséquent une dégradation du rapport signal sur bruit.

En terme de résolution, ce dispositif possède une résolution axiale micrométrique, meilleure qu'un microscope plein champ « classique ». Si le principe et les schémas permettent de le comprendre simplement, l'évaluation de la résolution axiale est plus complexe. En effet un certain nombre de paramètres entrent en jeu dont bien entendu la taille du diaphragme [Török 1997]. Le microscope confocal permet aussi d'améliorer la résolution latérale, bien entendu à condition que le diaphragme ait une taille plus petite que la tâche d'Airy centrale dans le plan conjugué de celui d'observation [Sandison 1995], [Cox 2004]. Théoriquement, une augmentation de la résolution d'un facteur $\sqrt{2}$ peut être atteinte. Mais pratiquement, lorsqu'on observe la fluorescence d'échantillons biologiques, la résolution latérale est rarement améliorée : le faible nombre de photons émis et le relativement mauvais rendement quantique des détecteurs utilisés (tubes photomultiplicateurs qui détectent au mieux 10% de la fluorescence qui passe à travers le diaphragme) ne permettent pas de travailler avec des diaphragmes trop petits. Le plus souvent ces images sont réalisées avec des diaphragmes qui ont pour taille une unité d'Airy (c'est-à-dire la taille de l'image projetée d'un point limitée par la diffraction).

Comme toutes les techniques à balayage, la microscopie confocale souffre d'un manque de rapidité dans l'acquisition. Il faut également travailler avec des objectifs bien corrigés notamment de la coma (pour les angles les plus importants lors du balayage), de la courbure de champ et de l'astigmatisme (pour focaliser toujours dans le même plan). De plus l'excitation avec des faisceaux focalisés peut induire des dommages pour l'échantillon.

Les nombreux avantages de cette technique et sa grande maîtrise technologique en font actuellement l'outil de référence en imagerie cellulaire, utilisé en routine sur les plates-formes d'imagerie.

Une autre technique avec des performances très proches en terme de résolution de celles obtenues en microscopie confocale est la microscopie sous illumination structurée [Neil 1997], [Webb 2003], [Karadaglic 2008]. Cette technique est une technique plein champ, qui ne nécessite donc pas de balayage.

Le principe est d'introduire une fréquence porteuse dans le microscope plein champ par une modulation spatiale de la lumière incidente, par exemple en imageant un réseau sur l'échantillon. En multipliant la fréquence du réseau par les fréquences spatiales élevées de l'échantillon, on va créer des franges de Moiré à la fréquence différence qui sera plus basse. A condition que ces franges et que la modulation de l'excitation soient résolues par le détecteur, le contenu en haute fréquence de l'objet peut être extrait par traitement du signal modulé.

Si la lumière d'excitation a la forme sinusoïdale spatiale :

$$s(x, y) = 1 + m \cos(2\pi \nu x + \Phi_0)$$

avec m la profondeur de modulation, ν la fréquence spatiale dans le plan d'excitation, Φ_0 une phase spatial arbitraire, le signal de fluorescence de l'image résultante aura la forme :

$$I(x, y) = I_c + I_s \cos(2\pi \nu x + \Phi_0)$$

le premier terme représentant l'intensité du fond, « continue » qui va s'atténuer lentement avec la défocalisation, et le deuxième terme portant l'information de modulation.

Comme le réseau n'est imagé efficacement que dans la partie de l'échantillon où il est focalisé, I_s est l'image d'une fine section et I_c est l'image conventionnelle qui serait obtenue sans sectionnement optique.

Pour remonter à ces deux termes, il faut décaler la phase pour obtenir au moins deux images. Il apparaît que l'algorithme le plus efficace, c'est-à-dire le meilleur compromis entre robustesse et vitesse d'acquisition, utilise 3 images, obtenues en décalant à chaque fois le réseau d'un tiers d'interfrange. Ainsi, on obtient les deux termes souhaités :

$$I_s = \frac{\sqrt{2}}{3} \left[\left(I_0 - I_{\frac{2\pi}{3}} \right)^2 + \left(I_0 - I_{\frac{4\pi}{3}} \right)^2 + \left(I_{\frac{2\pi}{3}} - I_{\frac{4\pi}{3}} \right)^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

$$I_c = \frac{I_0 + I_{\frac{2\pi}{3}} + I_{\frac{4\pi}{3}}}{3}$$

D'une part, cette technique permet de faire du sectionnement optique. En effet, un objectif de microscope peut être considéré comme un filtre passe-bas : dès qu'on va défocaliser (donc travailler en dehors du plan de mise au point de modulation), on va perdre des fréquences spatiales, et les premières perdues sont les plus élevées. Ainsi, dès que le plan d'imagerie ne sera plus celui du réseau, la fluorescence ne sera plus modulée et donc le signal mesuré fera partie du fond, de l'intensité continue et non plus de l'intensité de la section. On peut exprimer l'intensité de la section en fonction du déplacement axial z par :

$$I_s \propto \left| 2 \frac{J_1 \left[2uv \left(1 - \frac{v}{2} \right) \right]}{2uv \left(1 - \frac{v}{2} \right)} \right|$$

avec $u = \frac{8\pi}{\lambda} z \sin^2(\alpha/2)$

où α est l'ouverture de l'objectif [Neil 1997]. En choisissant proprement la fréquence de modulation, il est donc possible d'obtenir des performances de sectionnement optique tout à fait comparables à celles obtenues avec un microscope confocal (figure 1-18).

Cette technique devient difficilement applicable pour des plans plus profonds ou des échantillons diffusants puisque dans ces conditions, il est difficile de conserver la structure de l'illumination. Il peut persister des modulations résiduelles dans l'image sectionnée [Cole 2001], [Schaefer 2004] si le réseau n'a pas été déplacé exactement d'un tiers de période, ou si il y a des fluctuations d'intensités : pour remédier à cela, il est possible de faire du traitement après l'acquisition.

Il est également possible de choisir le motif de l'illumination : pour la projection de réseau, des réseaux sinusoidaux ou en créneaux (de type Ronchi) sont utilisés [Webb 2002]. Des modulateurs de lumière de type SLM (Spatial Light Modulator) sont également employés pour générer les motifs [Gardeazábal Rodríguez 2008]. Certains projettent même des structures toutes autres, comme par exemple des grains de speckle [Ventalon 2007].

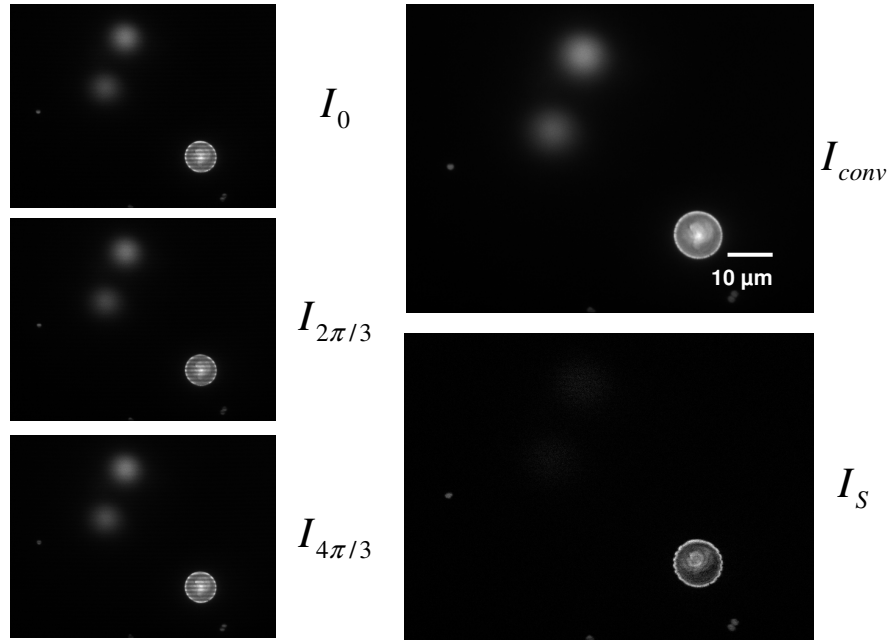


Figure 1-18 : validation expérimentale du sectionnement optique obtenu avec notre dispositif d'illumination structurée. Observation de billes de 10 μm . Utilisation d'un réseau Ronchi de 10 l/mm avec un objectif 100x ouvert à 1,3. A gauche, images obtenues pour 3 positions du réseau décalé d'un tiers d'interfrange. En haut à droite, somme des trois images, en bas à droite image de la section.

D'autre part, avec cette technique il est également possible d'augmenter la résolution latérale d'un facteur deux [Gustafsson 2000]. En effet, grâce à la fréquence de la porteuse, on va « décaler » le contenu fréquentiel observable grâce au microscope autour de cette porteuse, ce qui va avoir pour conséquence de faire entrer dans la région observable des fréquences qui en étaient initialement exclues. En choisissant une fréquence de porteuse à la limite de la coupure, définie par $f_c = \frac{2ON}{\lambda}$, et en prenant des images dans trois directions, il sera possible d'augmenter la résolution d'un facteur deux. L'utilisation de l'illumination structurée pour améliorer la résolution latérale nécessite de réaliser neuf acquisitions pour reconstruire une image (figure 1-19).

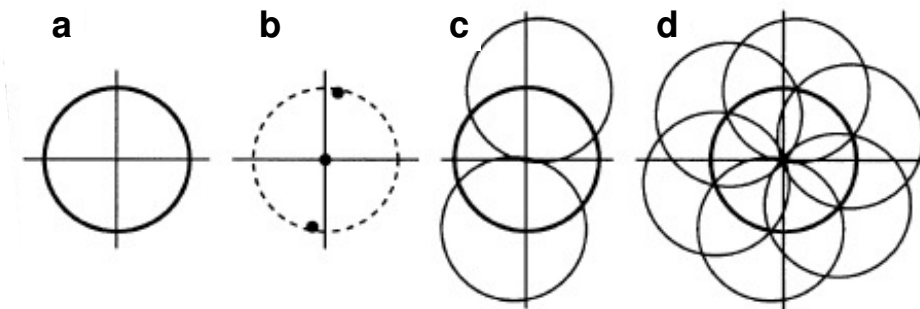


Figure 1-19 : concept de l'amélioration de la résolution par l'illumination structurée. [Gustafsson 2000]. (a) L'ensemble des fréquences spatiales qu'un objectif transmet (pour l'excitation et pour la détection) forme un cercle dans l'espace réciproque. (b) Un motif d'illumination sinusoïdale à 3 composantes de Fourier. Les deux composantes latérales doivent être contenues dans le cercle. (c) L'information de l'échantillon est modulée par la porteuse, ce qui décale les fréquences spatiales autour des composantes de Fourier de l'excitation. (d) En faisant varier convenablement l'orientation et la phase du motif d'illumination, on peut introduire dans le cercle des fréquences deux fois plus importantes, c'est-à-dire augmenter la résolution d'un facteur 2.

La microscopie confocale 4Pi propose quant à elle une amélioration de la résolution axiale de la microscopie confocale traditionnelle. Le principe de cette technique repose sur le constat que la tache focale diminue avec l'ouverture de l'objectif, autrement dit que cette tache varie avec la taille du front d'onde produit par la lentille. [Hell 1992], [Schrader 1998], [Hell 1994], [Hell 2008]. Ceci s'explique par le fait qu'au foyer d'un objectif utilisé dans une configuration classique, il y a uniquement une faible portion du front d'onde sphérique provenant d'une seule direction, ce qui se traduit par une anisotropie de cette tâche qui est plus longue que large. Si le front d'onde incident était complètement sphérique, la tâche serait un point et il y aurait une amélioration de la résolution axiale.

L'idée proposée par Stefan Hell est de se rapprocher le plus possible de cette situation idéale en utilisant deux objectifs opposés illuminés de manière cohérente, pour que les deux fronts d'onde s'ajoutent en amplitude au foyer commun des deux objectifs (figure 1-20). Une figure d'interférence est alors obtenue et la résolution axiale est égale à la taille de la frange centrale lumineuse, fruit de l'interférence constructive entre les deux faisceaux. La tâche d'excitation obtenue est ainsi trois à quatre fois plus fine axialement qu'en microscopie classique et confocale. Ce principe d'illumination définit la microscopie 4Pi (A) (figure 1-21).

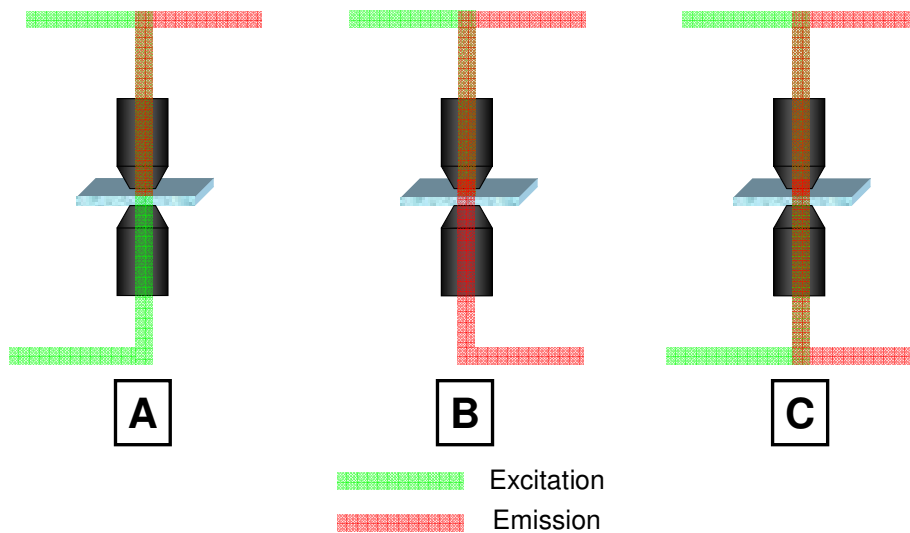


Figure 1-20 : Principe de la microscopie 4 Pi, avec (A) : une illumination interférométrique et une détection confocale (microscopie 4Pi A) ; (B) : une illumination confocale et une détection interférométrique (microscopie 4Pi B) ; (C) : une illumination et une détection interférométriques (microscopie 4Pi C).

Une amélioration comparable peut être obtenue pour la détection si, après collection du signal de fluorescence des deux côtés, les objectifs permettent d'ajouter les fronts d'onde sur le diaphragme commun du détecteur (figure 1-20). Ce principe de détection définit la microscopie confocale 4Pi (B), et permet d'avoir une résolution axiale quatre fois supérieure à celle obtenue en microscopie confocale (figure 1-21).

Enfin, utiliser le signal provenant des deux objectifs pour l'excitation et pour la détection, c'est-à-dire associer les deux techniques précédentes, permet d'obtenir une amélioration de la résolution axiale d'un facteur cinq à un facteur sept toujours par rapport au confocal classique : on parle alors de microscopie confocale 4Pi (C) (figure 1-22).

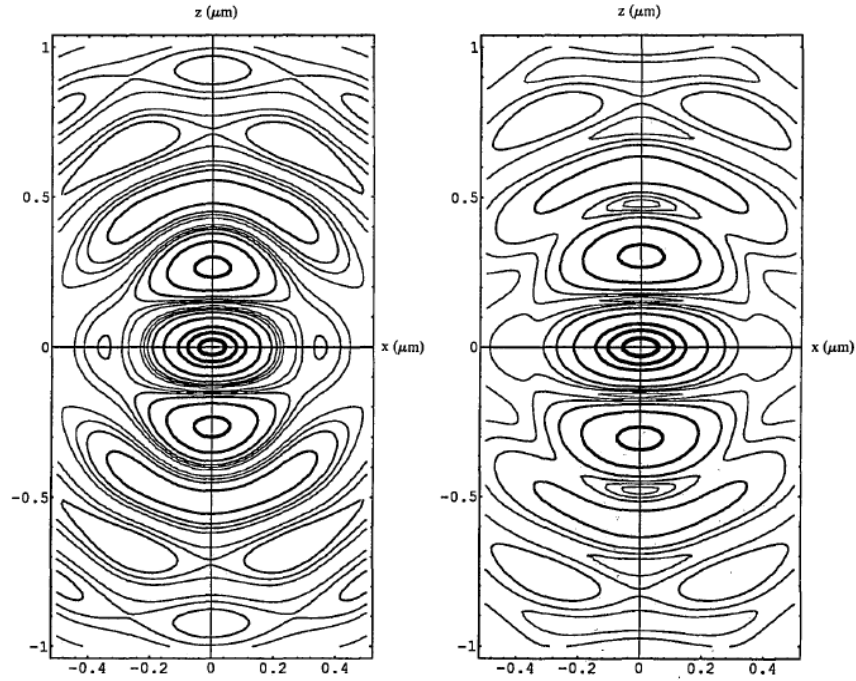


Figure 1-21 : dessins des contours de réponses percussionnelles tirés de [Hell 1992]. A gauche, réponse percussionnelle de l'illumination dans un microscope confocal 4Pi (A), avec deux objectifs d'ouverture numérique 1,4 et un faisceau à 633nm polarisé linéairement. A droite, réponse percussionnelle de la détection dans un microscope confocal 4Pi (B), avec deux objectifs d'ouverture numérique 1,4 et un signal d'émission à 725nm.

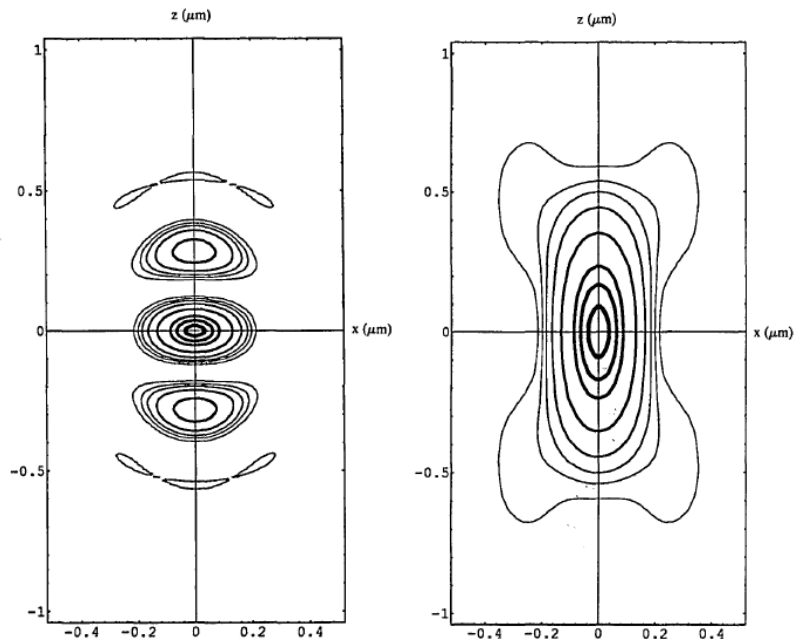


Figure 1-22 : dessins des contours de réponses percussionnelles tirés de [Hell 1992]. A gauche, réponse percussionnelle d'un microscope confocal 4Pi (C), dans les mêmes conditions que précédemment. Cette réponse percussionnelle est le produit des réponses percussionnelles d'excitation et de détection précédentes. A droite, réponse percussionnelle d'un microscope confocal classique dans exactement les mêmes conditions.

Avec cette technique, comme l'amplitude d'excitation est séparée suivant deux voies, chacune des voies ne doit amener que la moitié de l'amplitude, ce qui entraîne une exposition moins importante de l'échantillon au rayonnement. Et de même, le signal de fluorescence étant collecté dans deux directions, il a une amplitude plus importante.

Cependant, la nécessité d'imprimer des franges d'interférences au milieu de l'échantillon impose des conditions à ce dernier : des problèmes d'hétérogénéité de l'indice de réfraction ou de trop grande diffusion de l'échantillon peuvent décaler la figure d'interférence et même l'altérer, ce qui dégradera par conséquent les performances. Et bien entendu l'échantillon devant être maintenu entre deux lamelles, certains spécimens notamment épais ne sont pas observables. De plus, comme on le voit sur la réponse percussionnelle, la tâche centrale est certes plus fine, mais il persiste deux lobes secondaires, qui vont générer des artefacts dans l'image : un filtrage mathématique est indispensable.

D'un point de vue expérimental, la superposition des deux faisceaux à l'excitation et à la détection est critique, et l'alignement doit donc être réalisé minutieusement. La longueur de cohérence de la fluorescence étant faible, la longueur des deux bras d'interférences pour le signal de fluorescence doit être égale à $20\mu\text{m}$ près. Et bien entendu, une telle technique nécessite un balayage. Les difficultés techniques font que peu de plates-formes d'imagerie disposent d'un tel dispositif, même si une solution commerciale est disponible (Leica TCS 4Pi).

Une autre méthode, équivalente à la microscopie 4Pi en terme de résolution et basée sur les mêmes concepts, est la microscopie IⁿM, technique introduite par Gustafsson [Gustafsson 1995], [Gustafsson 1996], [Gustafsson 1999]. Tout comme en microscopie 4Pi, l'idée est d'associer deux objectifs opposés par rapport à l'échantillon et d'utiliser des phénomènes d'interférences mais cette fois en travaillant en plein champ.

Ainsi, en collectant avec deux objectifs opposés le signal de fluorescence provenant de l'échantillon en plein champ, il est possible d'augmenter la résolution axiale. Les deux faisceaux sont ensuite recombinaisonnés de manière cohérente sur la même caméra CCD. Cette technique s'appelle la microscopie I²M pour Image Interference Microscopy, et est l'équivalent de la microscopie confocale 4Pi(B) mais en plein champ.

De même, l'idée de faire interférer l'excitation permet d'aboutir à la microscopie I³M (pour Incoherent Interference Illumination Microscopy), équivalent du 4Pi(A). Mais comme cette technique fait de l'imagerie plein champ, la figure d'interférence est obtenue différemment : une source incohérente est utilisée (lampe à arc), et les faisceaux sont focalisés dans les plans focaux arrières des objectifs. Ainsi ce sont deux ondes planes qui vont interférer, et l'incohérence de la source garantit une dégradation très rapide de la figure d'interférence.

Enfin, l'association de ces deux techniques s'appelle la microscopie I⁵M, équivalent de la microscopie confocale 4Pi(C) (figure 1-23).

Comme en microscopie confocale 4Pi(C), la présence de lobes secondaires rend indispensable un traitement mathématique pour avoir une image sans artefacts. Mais en plus, dans ce cas, des lobes éloignés de la frange centrale vont également gêner puisque la lumière loin du plan focal n'est pas éliminée par un diaphragme. Et les mêmes limitations quant à la nature de l'échantillon apparaissent. La longueur des deux bras d'interférences de la détection doit aussi être finement contrôlée.

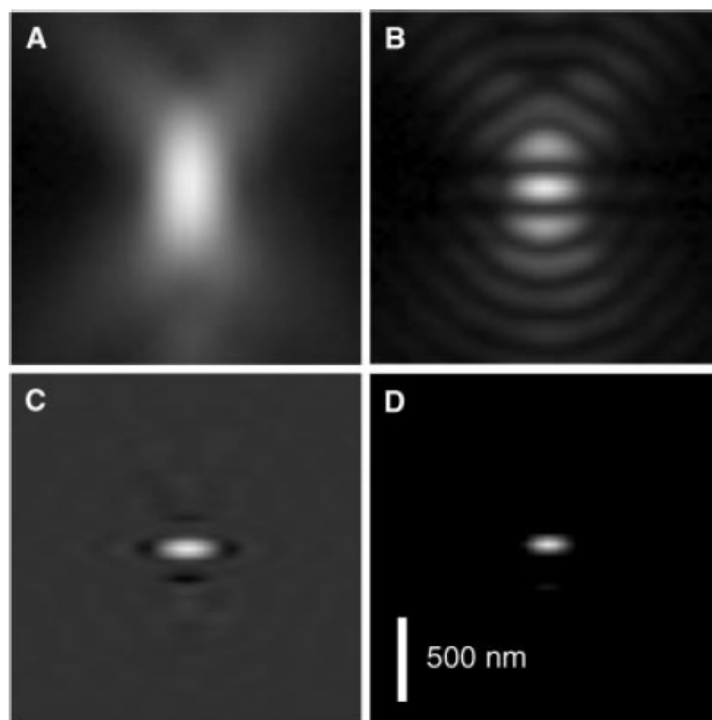


Figure 1-23 : image dans le plan XZ d'une bille fluorescente de 50 nm [Gustafsson 1999] (A) en microscopie plein champ conventionnelle, (B) en microscopie I5M sans traitement après l'acquisition, (C) en microscopie I5M avec filtrage linéaire inverse, (D) en microscopie I5M avec un filtrage inverse linéaire suivi d'une déconvolution itérative.

Il existe également des techniques de surface qui permettent d'améliorer la résolution axiale. La microscopie en réflexion totale interne (TIRF pour Total Internal Reflection Fluorescence), qui sera détaillée dans la partie 3, utilise un champ évanescent créé à l'interface entre la lamelle et l'échantillon biologique pour exciter ce dernier. Les propriétés physiques du champ évanescent permettent d'avoir de manière simple une résolution axiale inférieure à 200 nm en plein champ et sans traitement. Mais cette technique ne permet pas de faire de l'imagerie en profondeur.

IV.2.2 – Modification des processus d'absorption et d'émission

Une amélioration de la résolution spatiale est également rendue possible par d'autres techniques tirant partie des processus d'absorption et d'émission photoniques.

La première d'entre elles est la microscopie multiphotonique. Elle utilise des interactions lumière-matière d'ordres supérieurs, qui permettent des excitations non linéaires très localisées. Différentes techniques existent, notamment les microscopies SHG [Freund 1986], THG [Barad 1997], CARS [Duncan 1982], mais nous ne parlerons ici que de la fluorescence.

Tout commença en 1931 lorsque Maria Göppert-Mayer introduisit le concept d'absorption non linéaire [Göppert-Mayer 1931]. Elle montra que la combinaison simultanée de photons d'énergie plus basse (que celle a priori nécessaire pour l'excitation) pouvait provoquer l'excitation d'une molécule, cette excitation étant normalement produite par l'absorption d'un seul photon de haute énergie. Il fallut attendre plusieurs décennies et le développement des lasers femtoseconde pour que cette découverte soit utilisée en microscopie de fluorescence. Les premiers résultats obtenus

par microscopie de fluorescence par absorption à deux photons furent présentés en 1990 [Denk 1990], et ceux obtenus par microscopie de fluorescence par absorption à trois photons furent présentés en 1996 [Hell 1996].

La microscopie de fluorescence par absorption à deux photons est aujourd'hui un outil très largement utilisé, puisque c'est la seule technique qui permet de faire de l'imagerie avec une bonne résolution dans les échantillons épais ou fortement diffusants [Zipfel 2003]. Dans cette technique, deux photons de même énergie (provenant du même laser) interagissent avec une molécule, produisant ainsi une excitation équivalente à l'absorption d'un seul photon d'énergie double. Si cette espèce est fluorescente, elle se désexcitera de la même manière en émettant un photon de même longueur d'onde que dans le cas d'une absorption à un photon. La probabilité de cette absorption est faible, bien plus faible qu'en régime linéaire. L'efficacité de cette transition dépend des propriétés physiques de la molécule, et notamment de sa section efficace d'absorption multiphotonique, et aussi de l'interaction simultanée (sur une durée de l'ordre de 10^{-16} seconde) de deux photons d'excitation. Par conséquent, ce processus a une dépendance quadratique en intensité. Ainsi, pour permettre cette excitation, il est nécessaire de focaliser le faisceau exciteur pour augmenter l'intensité locale. En dehors du volume focal, la probabilité d'absorption chute rapidement, et il n'y a pas d'émission de fluorescence dans d'autres zones de l'échantillon. Cependant, focaliser fortement ne suffit pas ; l'utilisation de lasers impulsifs est indispensable pour augmenter la probabilité que deux photons interagissent en même temps, tout en conservant une puissance moyenne d'excitation relativement basse pour préserver l'échantillon (figure 1-24).

Les performances en termes de résolution de cette technique sont uniquement dues au confinement spatial de l'excitation, puisque aucun « filtrage » n'est réalisé à la détection.

Etant donnée la dépendance quadratique du processus d'absorption, la réponse percussive effective d'un tel dispositif de microscopie est égale au carré de la réponse percussive de l'illumination [Helmchen 2005].

Or comme l'illumination se fait à une longueur d'onde deux fois plus importante, au final le gain en résolution n'est pas énorme. Théoriquement, la réponse percussive est plus large qu'en confocal, mais au final les résolutions sont tout à fait comparables car, comme on l'a vu, le diaphragme à la détection du microscope confocal ne peut être infiniment petit. La différence est qu'en microscopie biphotonique, on peut atteindre la résolution théorique prédite, à la seule condition de couvrir toute la pupille de l'objectif à l'excitation [Cox 2004].

De plus, un tel dispositif a de nombreux avantages. Tout d'abord, la plus grande séparation entre longueur d'onde d'excitation et longueur d'onde d'émission permet un filtrage bien plus facile de ces deux signaux. Ensuite, la résolution étant dictée par l'excitation, il n'y a pas besoin de diaphragme pour la détection, ce qui est un avantage notable lorsqu'on travaille avec des échantillons diffusants. L'excitation étant localisée, tous les photons de fluorescence collectés proviennent du même endroit : le but est donc ici de collecter le plus de photons possibles. De plus, les longueurs d'onde infrarouges sont moins phototoxiques, moins absorbées et moins diffusées dans la plupart des tissus.

Ceci explique que cette technique soit très utilisée pour faire de l'imagerie dans les échantillons fortement diffusants, et en profondeur jusqu'à plusieurs centaines de μm (les dispositifs de microscopie de fluorescence par absorption à un photon ne permettent pas d'atteindre des profondeurs supérieures à $100\mu\text{m}$).

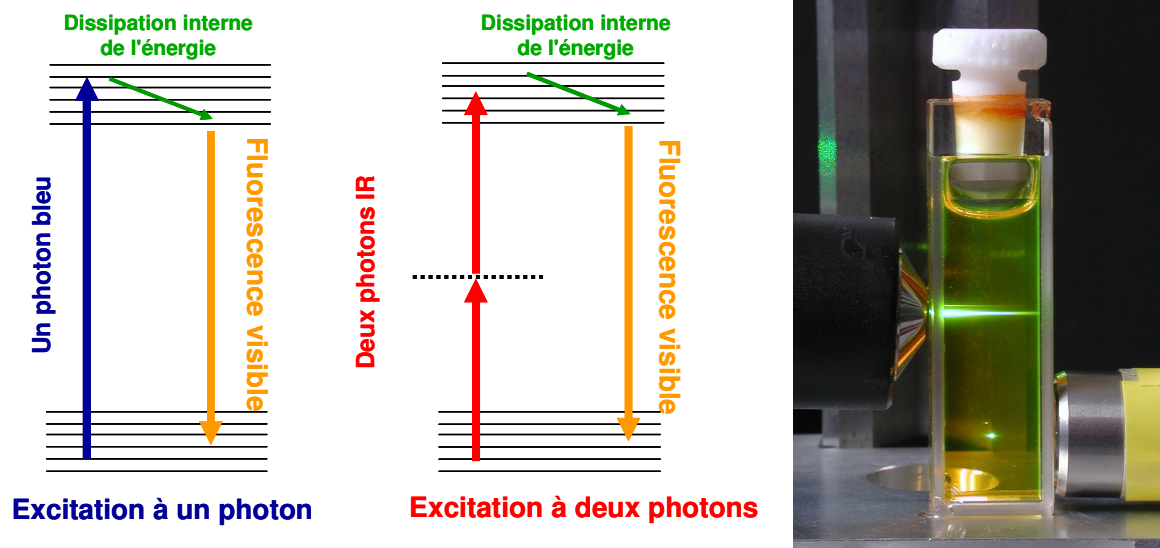


Figure 1-24 : principe de la fluorescence par absorption à un et deux photons, et illustration dans une cuve de fluorescéine (un photon en haut, deux photons en bas).

Une forte effervescence existe aujourd'hui autour de la microscopie STED (STimulated Emission Depletion), autre technique très récemment développée commercialement (Leica TCS STED). Cette technique de microscopie optique est celle qui présente à l'heure actuelle les meilleurs résultats en termes de résolution. Elle a été proposée par Hell qui, partant de la constatation qu'une excitation ponctuelle ne pouvait descendre spatialement sous une certaine limite, proposa d'inhiber la fluorescence sur la partie périphérique du volume d'excitation [Hell 1994], [Klar 2000], [Hell 2004], [Willig 2006], [Hell 2008]. Cette idée lui permit de dégager un concept, la microscopie RESOLFT (pour REversible Saturable Optical Fluorescent Transition) qu'il mit en application pour développer la microscopie STED, cas particulier dans lequel l'inhibition de la fluorescence se fait par émission stimulée [Rittweger 2007].

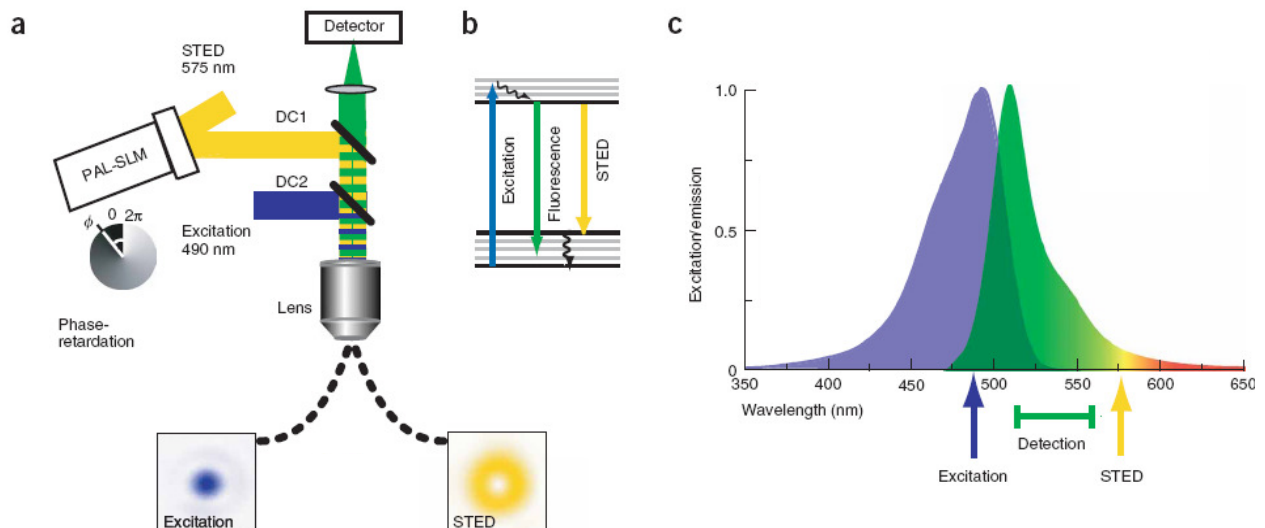


Figure 1-25 : principe du STED pour imager de la GFP [Willig 2006]. (a) Schéma du montage. Le donut de déplétion jaune, créé grâce au modulateur de front d'onde (PAL-SLM), et le disque d'Airy de l'excitation bleue sont superposés dans le plan d'observation. La progression linéaire de la phase de 0 à 2π de manière radiale assure que les rayons provenant de parties opposées de la pupille interfèrent destructivement sur l'axe optique. (b,c) Excitation, fluorescence et émission stimulée dans le diagramme d'énergie (b) en relation avec les spectres d'excitation et d'émission de la GFP (c).

Cette technique est basée sur l'utilisation de deux lasers impulsionnels synchronisés et profite de la non instantanéité de la fluorescence : un premier faisceau laser, le faisceau excitateur, est focalisé par l'objectif et excite un volume (de taille au mieux limitée par la diffraction) de l'échantillon. La longueur d'onde de ce laser est sélectionnée pour se situer dans la bande d'absorption du fluorophore. L'impulsion excitatrice est immédiatement suivie par l'impulsion de déplétion, l'impulsion STED, qui est décalée vers les plus grandes longueurs d'onde. Cette impulsion va permettre aux molécules préalablement excitées de se désexciter par émission stimulée : en arrangeant spatialement cette impulsion en forme de donut, uniquement les molécules se situant à la périphérie du volume excité vont se désexciter de cette manière. Ainsi seules les molécules du centre du donut vont émettre de la fluorescence. Ce donut est obtenu de différentes manières avec des lames de phase ou des modulateurs, le but étant d'avoir une figure d'interférence avec une interférence destructive au centre [Keller 2007]. Suivant la figure projetée, la résolution axiale peut également être améliorée avec un tel dispositif (figure 1-25).

En utilisant des équations de population des différents niveaux d'énergie, il apparaît que la population N_1 de l'état excité S_1 de ces molécules va évoluer comme :

$$N_1 \propto \exp\left(-\frac{I_{STED}}{I_{sat}}\right) = \exp(-\Phi_{STED} \times \sigma_{stim})$$

L'objectif est donc d'utiliser des intensités I_{STED} suffisamment importantes devant l'intensité de saturation I_{sat} pour saturer la déplétion dans la zone périphérique, et par conséquent supprimer complètement l'émission de fluorescence dans cette région.

C'est cette intensité I_{STED} qui va également définir la résolution spatiale du dispositif. En effet, la résolution obtenue varie linéairement en fonction de l'inverse de $\sqrt{\frac{I_{STED}}{I_{sat}}}$. Ceci est assez intuitif

car, sous la condition qu'on arrive à dessiner un donut (ou une autre figure) qui s'annule bien en son centre, plus I_{STED} va être important devant I_{sat} et plus on va pouvoir obtenir une déplétion des molécules qui sont proches du centre (l'amplitude de ce faisceau de déplétion étant continue). Plus précisément, la taille de la tâche centrale d'où de la fluorescence sera émise est donnée par [Westphal 2005] :

$$\Delta r \approx 0,45 \times \frac{\lambda}{ON \sqrt{1 + \frac{I_{STED}}{I_{sat}}}}$$

Dès lors, théoriquement cette technique bénéficie d'une résolution illimitée et pourrait permettre de détecter les marqueurs de manière individuelle, à condition d'augmenter I_{STED} .

Pour les fluorophores les plus souvent utilisés, I_{sat} vaut plusieurs dizaines de mégawatts par centimètre carré, ce qui signifie que pour augmenter la résolution, il faut travailler avec des intensités I_{STED} de l'ordre de plusieurs centaines de mégawatts par centimètre carré, ce qui concrètement implique des puissances moyennes incidentes de l'ordre de quelques dizaines de milliwatts.

On en déduit immédiatement une première limitation de cette technique, car ces puissances incidentes importantes peuvent endommager les échantillons observés, et l'augmentation de la résolution se fera au détriment de cette considération.

Ensuite I_{STED} doit impérativement être proche de zéro au centre du donut, puisqu'une intensité de déplétion même minime réduirait le flux de photons de fluorescence. Concrètement, l'intensité du faisceau dépléteur au centre ne doit pas dépasser 5% de sa valeur crête. De même,

l'application de cette technique dans les milieux diffusants va dépendre de la capacité de l'expérimentateur à maintenir l'annulation au centre.

Le choix du fluorophore est également délicat : il faut déjà travailler avec des molécules dont le temps de vie de fluorescence est supérieure à 0,8 ns pour s'assurer que l'émission stimulée sera plus rapide que l'émission spontanée. Ces fluorophores doivent aussi permettre de trouver une longueur d'onde qui sera absorbée pour exciter le fluorophore, et une longueur d'onde qui ne soit pas absorbée, et qui soit distincte du maximum d'émission de fluorescence pour dépleter le fluorophore, tout en permettant de séparer spectralement l'émission stimulée de la fluorescence. Et bien entendu, il faut les sources lasers impulsionsnelles qui conviennent, avec des longueurs d'onde qui ne sont pas susceptibles d'exciter des fluorophores endogènes de la cellule ou même des entités qui absorbent et qui ne fluorescent pas, pour éviter les problèmes de détérioration de l'échantillon par échauffement.

Enfin, expérimentalement, cette technique nécessite un alignement précis des deux faisceaux pour que l'excitation et le donut se recouvrent, et une synchronisation assez fine des impulsions.

Cette technique a également été démontrée avec des lasers continus, et une puissance moyenne pour la déplétion de quelques centaines de milliwatts, ceci pour permettre à la désexcitation stimulée d'être bien plus probable que la fluorescence [Willig 2007]. Cependant une exposition continue d'un échantillon biologique à ces puissances moyennes est assez problématique.

Une autre technique, l'illumination structurée saturée [Gustafsson 2005], part d'une constatation similaire à celle faite pour le STED. La taille des motifs d'illumination est limitée par le système optique. En illumination structurée, tout est basé sur l'inscription d'un réseau dans le plan d'excitation. Le produit de cette excitation avec le signal de fluorescence de l'échantillon va générer un signal à la fréquence différence entre la fréquence de la porteuse et les fréquences spatiales de l'échantillon. Ce signal peut être collecté à condition que la différence de fréquence soit plus faible que la fréquence de coupure de l'objectif, définie par :

$$f_c = \frac{2ON}{\lambda}$$

Cette fréquence de coupure impose aussi la fréquence spatiale maximale de l'illumination structurée que l'on peut projeter. Tout ceci explique pourquoi de manière conventionnelle, l'illumination structurée permet une augmentation de la résolution au mieux d'un facteur deux.

En structurant le champ exciteur avec des fréquences spatiales supérieures à cette limite, on va pouvoir mesurer également des fréquences spatiales plus élevées dans l'échantillon, tant que la différence entre ces deux fréquences reste inférieure à f_c .

L'idée de Gustafsson est ici de saturer la fluorescence : une fois que l'illumination est assez intense pour passer la plupart des fluorophores dans l'état excité (c'est-à-dire supérieure à l'intensité de saturation I_{sat}), une augmentation additionnelle de l'intensité excitatrice ne va pas entraîner une augmentation proportionnelle de la fluorescence (voir figure 1-26). Si l'échantillon est éclairé par une sinusoïde dont l'intensité crête est supérieure à l'intensité de saturation, l'émission sera structurée avec des franges distordues, qui vont avoir pour conséquence d'introduire des harmoniques avec des fréquences plus élevées. Ainsi si on arrive à décomposer la « structuration » de l'émission en série de Taylor sous la somme de m harmoniques, il faudra m acquisitions pour reconstruire l'image avec m phases différentes réparties sur l'intervalle $[0, 2\pi]$. Même si théoriquement, on devrait obtenir une résolution illimitée avec cette technique (on peut introduire un nombre infini d'harmoniques), les harmoniques élevés vont être assez rapidement noyés dans le bruit. Expérimentalement, la meilleure résolution obtenue est légèrement inférieure à 50 nm.

L'avantage de cette technique réside toujours dans son caractère « plein champ ». Cependant, l'amélioration de la résolution ici va se faire au prix d'un traitement des images lourd. De plus le

nombre d'harmoniques introduits va augmenter avec la puissance excitatrice. Ainsi les puissances élevées nécessaires pour saturer la fluorescence et augmenter la résolution vont avoir la même conséquence qu'en microscopie STED.

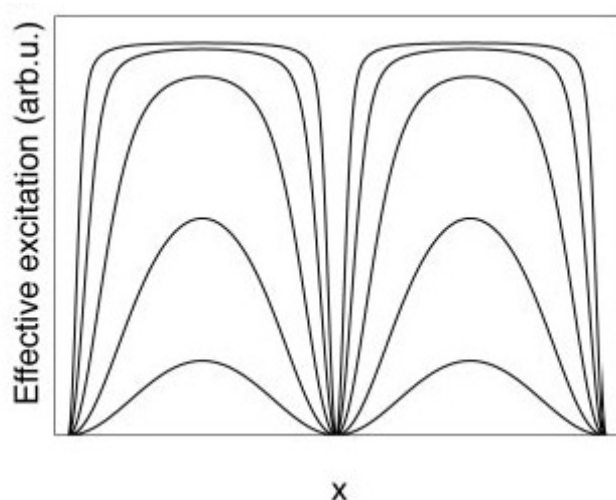


Figure 1-26: illumination structurée saturée [Gustafsson 2005]. En saturant la fluorescence, le motif de l'excitation n'est plus sinusoïdal mais se rapproche de créneaux. Ainsi on introduit des nouvelles fréquences spatiales plus élevées.

Enfin, pour terminer cet aperçu des techniques qui permettent d'améliorer la résolution, nous allons nous intéresser aux microscopies basées sur l'utilisation d'un signal de fluorescence photocommutable. Suivant les laboratoires, cette technique s'appelle STORM (STochastic Optical Reconstruction Microscopy), PALM (PhotoActivated Localization Microscopy), ou encore FPALM (Fluorescence PhotoActivation Localization Microscopy) [Hess 2006], [Geisler 2007], [Rust 2006].

Le principe est d'utiliser des fluorophores photoactivables, pour permettre l'émission d'une faible fraction des fluorophores et ainsi distinguer des signaux individuels et les localiser précisément. Concrètement, l'échantillon est éclairé de manière continue à la longueur d'onde d'absorption du fluorophore, et à une puissance moyenne permettant l'émission de fluorescence (quelques milliwatts). Ensuite, une longue impulsion (de l'ordre de la dizaine de secondes) à la longueur d'onde de photoactivation, avec une intensité faible (quelques centaines de microwatts), va permettre de transférer quelques molécules, réparties aléatoirement, dans leur état luminescent, de telle sorte que chacun des fluorophores actifs peut être résolu du reste. Dès lors, c'est la précision avec laquelle la position de ces molécules en faible nombre est localisée qui permet d'améliorer la résolution. Ce cycle se termine par le photoblanchiment ou la désactivation (par la longueur d'onde d'excitation de la fluorescence) des molécules qui ont fluorescé, et un nouveau cycle va permettre de localiser d'autres molécules individuelles.

Pour pouvoir distinguer ces molécules fluorescentes photoactivées individuellement, il faut qu'elles soient séparées spatialement en moyenne d'une distance plusieurs fois égale au critère de résolution classique (Rayleigh) du dispositif. La position de la molécule, calculée par un ajustement gaussien de l'intensité mesurée, est basée sur cette hypothèse forte. La précision sur cette localisation augmente avec le nombre de photons collectés. Et c'est cette précision sur la localisation (quelques nanomètres) associée à l'écart type de cette mesure qui donne la résolution spatiale du dispositif (quelques dizaines de nanomètres) (figure 1-27).

Comparée à la microscopie STED, cette technique peut être réalisée en plein champ, et les puissances lasers utilisées sont nettement plus faibles. La précision obtenue sur la localisation se dégrade quand la densité de fluorophores est trop élevée. Les molécules utilisées doivent avoir des rendements convenables et des temps de photoblanchiment assez longs pour que le nombre de photons collectés confère une bonne résolution.

La microscopie de fluorescence photocommutable connaît un problème de fluorescence de fond, générée par la forme inactive de la molécule. Une autre de ses limitations est le temps

d'acquisition nécessaire pour faire une image. Ce temps dépend à la fois de la densité de fluorophores, mais aussi de la résolution souhaitée. Pour obtenir des résolutions de l'ordre de la vingtaine de nanomètres, plusieurs heures d'acquisition sont nécessaires. Pour réduire ce temps d'acquisition, il est possible de travailler avec des molécules qui passent à l'état activé rapidement, et un éclairage continu à une seule longueur d'onde : avec une telle illumination, un équilibre est trouvé entre les états actifs et inactifs de la molécule qui permet de voir le signal de fluorescence d'environ 20% des molécules. Cette association permet de réduire le temps d'acquisition à 2 minutes et demie dans le cas du PALMIRA (PALM with Independently Running Acquisition) qui donne une résolution de 40nm [Egner 2007].

Très récemment, une équipe a même proposé d'associer le STORM à une technique basée sur l'utilisation de l'astigmatisme pour obtenir une résolution axiale du même ordre de grandeur dans les trois dimensions [Huang 2008].

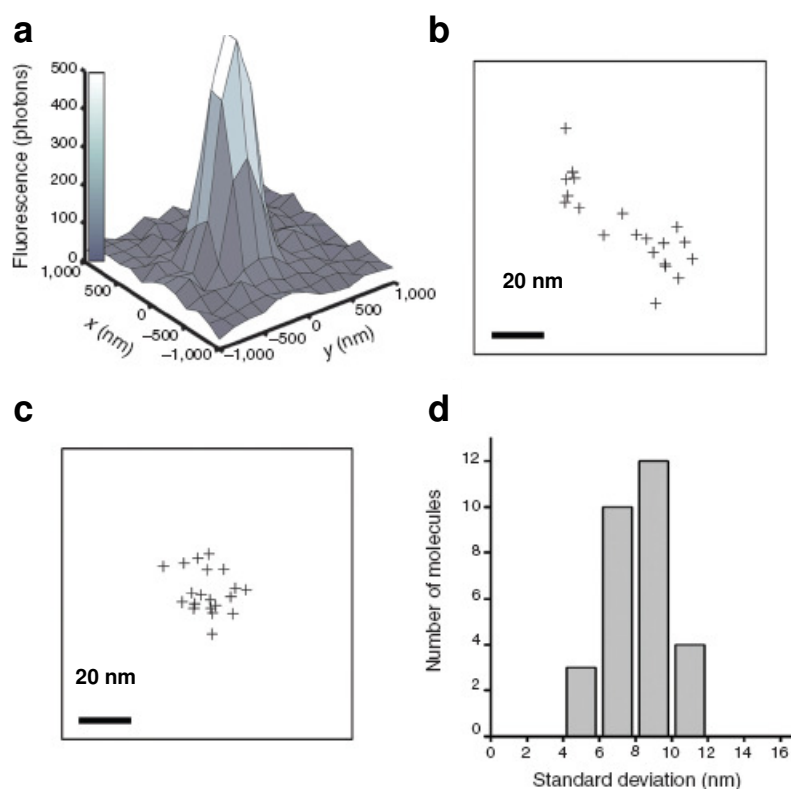


Figure 1-27 : la grande précision de la localisation d'événements individuels lors de chaque cycle de commutation définit la résolution intrinsèque du STORM (ou PALM) [Rust 2006].

(a) PSF d'un émetteur unique lors d'un cycle de commutation. L'ajustement de la PSF avec une double gaussienne donne la position du maximum. (b,c) Détermination du maximum pour un même émetteur unique pour 20 cycles successifs avant (b) et après (c) correction de la dérive de l'échantillon. (d) Histogramme de l'écart type des positions des maxima.

Et bien entendu, il est possible d'associer deux techniques pour bénéficier de la résolution latérale de l'une et de la résolution axiale de l'autre : citons en exemple l'association de la microscopie 4-Pi avec l'absorption à deux photons [Egner 2004], le couplage des microscopies STED et 4Pi [Dyba 2002], ou encore celui des microscopies TIRF et PALM [Betzig 2006].

En parallèle de tous ces développements sont aussi apparus des techniques multifocales dédiées aux microscopies à balayage. Le principe est de balayer plusieurs points simultanément sur l'échantillon, ce qui permet de gagner du temps. Ceci est réalisé ou bien par des méthodes de

division du front d'onde, comme par exemple des disques de microlentilles [Bewersdorf 1998], ou bien par des méthodes de division de l'amplitude qui permettent de créer des lignes ou des matrices de points [Nielsen 2001], [Lévêque-Fort 2004], [Deniset-Besseau 2007]. Ces méthodes ont été essentiellement couplées à la microscopie multiphotonique, permettant ainsi d'obtenir une bonne résolution (intrinsèque à l'excitation non linéaire) tout en travaillant avec des détecteurs de type caméra sur l'intégralité du champ.

IV.2.3 – Traitement après acquisition

Il est également possible d'améliorer la qualité des images en effectuant des traitements post-acquisition des images obtenues par le microscope, en utilisant des algorithmes de filtrages, de déconvolution.

L'amplitude du champ image obtenu par un système d'imagerie est la convolution de la réponse percussionnelle de l'instrument optique et du champ dans le plan objet. Ainsi la formation des images peut être interprétée à travers cette réponse percussionnelle : chaque point source est vu comme une tâche d'Airy, et l'image dans son ensemble est une collection de réponses percussionnelles. Dès lors, si on est capable de déconvoluer l'image par la réponse percussionnelle du dispositif, on pourra remonter à l'objet : un tel procédé est appelé une résolution du problème inverse. Pour déconvoluer, un modèle correct de formation des images, une bonne connaissance des paramètres d'acquisition ainsi qu'une connaissance a priori du spécimen sont nécessaires. Et bien entendu, le choix d'un algorithme de déconvolution adapté est primordial. [McNally 1999], [Haeberlé 2006].

Un tel type de traitement permet d'améliorer très nettement le contraste en se débarrassant du bruit de fond, et permet également d'améliorer grandement la résolution dans les trois dimensions (d'un facteur au moins supérieur à 2 suivant les algorithmes utilisés).

Nous n'avons présenté dans ce paragraphe que des techniques de microscopie optique de champ lointain. Il y a d'autres types de microscopies, qui ont été développés au cours du 20^{ème} siècle pour dépasser la limitation imposée par la diffraction des ondes « optiques ». En utilisant un faisceau d'électrons accélérés, particules qui ont des longueurs d'ondes plus courtes (de l'ordre de 10^{-3} nm), le microscope électronique (inventé en 1931 par Ruska) permet d'atteindre une résolution sub-nanométrique. Dans les années 80, le développement des microscopies à sondes locales permettent également d'atteindre l'échelle atomique : la microscopie à effet tunnel (STM : Scanning Tunneling Microscopy, 1981) et la microscopie à force atomique (AFM : Atomic Force Microscopy 1984). Pour revenir à l'optique, un autre type de microscopie à sonde locale a été développé : la microscopie optique de champ proche (SNOM pour Scanning Near-field Optical Microscope). Pour toutes ces microscopies, la résolution spatiale subnanométrique est obtenue par une mesure précise du positionnement de la sonde. De telles techniques sont limitées par la présence physique de cette sonde, qui impose de faire de l'imagerie de surface et ne permet pas de mesurer des changements de relief importants. De plus, ces techniques d'imagerie sont malheureusement difficilement compatibles avec l'observation d'échantillons dans des conditions « biologiques ». [Fragola 2003].

V – Présentation du projet

A la lumière de ce chapitre, nous allons présenter plus précisément le travail effectué dans la cadre de ma thèse. Dans certains domaines de la recherche biomédicale, l'imagerie des échantillons exige des résolutions spatiale et temporelle élevées, tout en travaillant dans des conditions physiologiques pour les spécimens observés. Aussi seules des techniques de microscopie optique innovantes permettent d'atteindre de telles performances. En particulier, la microscopie de fluorescence résolue en temps a un intérêt certain, puisqu'elle permet, en complément des informations de localisation et de topologie apportées par la microscopie conventionnelle, une analyse dynamique de processus moléculaires et métaboliques au sein des cellules. C'est pour cela que nous avons décidé de développer un dispositif original de microscopie pour mesurer le temps de vie de fluorescence dans le domaine temporel. L'intérêt et l'originalité de ce dispositif reposent sur l'association de plusieurs éléments (figure 1-28).

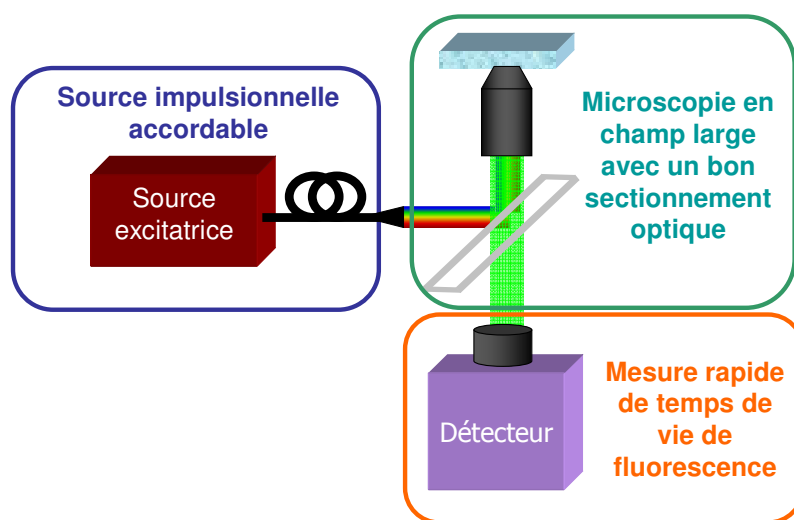


Figure 1-28 : schéma du dispositif proposé.

- Tout d'abord, le dispositif d'excitation de la fluorescence. Nous souhaitons développer un montage permettant d'accéder au temps de vie de fluorescence de nombreux fluorophores, ayant des spectres d'absorption variés et des temps de vie de fluorescence différents. Dès lors cette source doit d'une part vérifier les contraintes imposées par la mesure de temps de vie dans le domaine temporel (elle doit délivrer des impulsions ultrabrèves), tout en satisfaisant ce souci d'accordabilité (accordabilité en longueur d'onde, et également cadence de répétition suffisamment basse pour pouvoir aussi observer les temps de vie plus longs).
- Ensuite, la technique de microscopie. Notre motivation est de disposer d'un outil qui permette de faire des mesures avec un sectionnement optique intéressant, tout en conservant certains avantages de la microscopie en épifluorescence classique, à savoir une excitation et une détection en plein champ, ce qui évite d'avoir recours à des dispositifs à balayage (qui nécessitent des temps d'acquisition et de traitement plus longs).
- Enfin, la méthode de détection. Nous souhaitons mesurer des temps de vie de fluorescence en réalisant une détection en champ large. Ces mesures doivent être réalisées le plus rapidement possible pour ne pas perturber les échantillons vivants observés.

De cette association résulte notre montage de microscopie de fluorescence plein champ en réflexion totale interne et résolue en temps, basé sur une source laser supercontinuum. La suite de ce manuscrit présente les travaux que nous avons réalisés pour arriver à ce résultat (chapitre II : Etude et développement d'un dispositif d'excitation de la fluorescence ; chapitre III : Développement et caractérisation d'un microscope basé sur une excitation en réflexion totale interne pour la mesure de temps de vie de fluorescence), et les premières applications de notre dispositif (chapitre IV : Application en neurobiologie).

Chapitre II : Etude et développement d'un dispositif d'excitation de la fluorescence

Dans ce second chapitre, nous nous intéressons au dispositif d'excitation de la fluorescence. La mesure de durée de vie de fluorescence dans le domaine temporel impose un certain nombre de contraintes à la source excitatrice. Nous commençons par rapporter ces différentes contraintes et les principaux systèmes utilisés pour réaliser les mesures de temps de vie dans le domaine temporel, puis nous présentons la solution que nous proposons d'étudier et de réaliser. Ensuite, nous nous intéressons aux différentes parties constitutives de l'architecture que nous développons : tout d'abord l'oscillateur laser solide impulsif émettant dans l'infrarouge et pompé par diode, puis les fibres optiques permettant d'élargir le spectre d'émission. Nous présentons pour chacune de ces parties quelques éléments théoriques, les montages réalisés et les résultats expérimentaux. Enfin, après une analyse critique des résultats obtenus, nous présentons et caractérisons la source commerciale utilisée au final sur le dispositif de microscopie, et nous expliquons les raisons de ce choix.

I - Introduction

La mesure de temps de vie de fluorescence dans le domaine temporel impose un certain nombre de contraintes au dispositif d'excitation. Tout d'abord, pour réaliser ce type de mesures, il faut exciter la fluorescence avec une source impulsionnelle. Deux paramètres temporels principaux doivent alors être maîtrisés : la durée des impulsions et leur cadence. De manière générale, la durée de l'impulsion doit être bien plus courte que le phénomène que l'on doit observer. Ainsi l'excitation est ponctuelle et l'apparition temporelle du phénomène en est bien distincte. Pour les mesures de durée de vie de fluorescence, on souhaite donc des impulsions de l'ordre de quelques picosecondes ou moins. Quant à la durée entre deux impulsions consécutives, elle doit être plus longue (3 à 10 fois plus longue) que le phénomène observé pour laisser le temps au système de se relaxer, de se désexciter. Ainsi si on souhaite pouvoir observer des temps de fluorescence plus longs, il faut une cadence plus basse. Cette dernière ne doit cependant pas être trop faible pour ne pas engendrer des temps d'acquisition interminables. Ainsi des cadences comprises entre 1 et 100 MHz sont désirées. Enfin, spectralement, la source utilisée doit permettre d'exciter le (ou les) fluorophore(s) étudié(s).

L'apparition et le développement des sources laser ont joué un rôle prépondérant dans la place importante qu'occupe aujourd'hui la microscopie de fluorescence dans l'imagerie du vivant. En effet, avec de telles sources, il est possible de travailler avec des longueurs d'ondes très diverses, couvrant un spectre de l'ultraviolet à l'infrarouge, et de générer des impulsions ultracourtes. La forte densité spectrale et la qualité spatiale des faisceaux laser permettent d'exciter efficacement un grand nombre de fluorophores. De plus, la maîtrise théorique et technologique de ce type de

sources permet actuellement de façonner les trains d'impulsions à façon. C'est donc tout naturellement que ces sources lasers sont à la base de la plupart des systèmes d'excitation de la fluorescence. Pour faire de l'imagerie de temps de vie de fluorescence dans le domaine temporel, différentes sources laser impulsionnelles sont utilisées dans la littérature.

La référence absolue depuis plus de 10 ans est le laser à saphir dopé au titane (ou Ti:saphir) à verrouillage de modes en phase par effet Kerr. Comme son nom l'indique, le milieu amplificateur de ce laser est une matrice de saphir (Al_2O_3) dopée avec des ions titane (Ti^{3+}). Les caractéristiques spectroscopiques de cet ion permettent non seulement d'avoir des impulsions courtes (d'une dizaine de fs à quelques ps), mais également d'avoir une accordabilité en longueur d'onde (de 680 à 1020 nm en routine et jusqu'à 1080 nm pour les dernières générations). Ce cristal est pompé optiquement à 532 nm, dans la plupart des cas avec un laser néodyme (Nd:YAG ou Nd:YVO_4) doublé en fréquence.

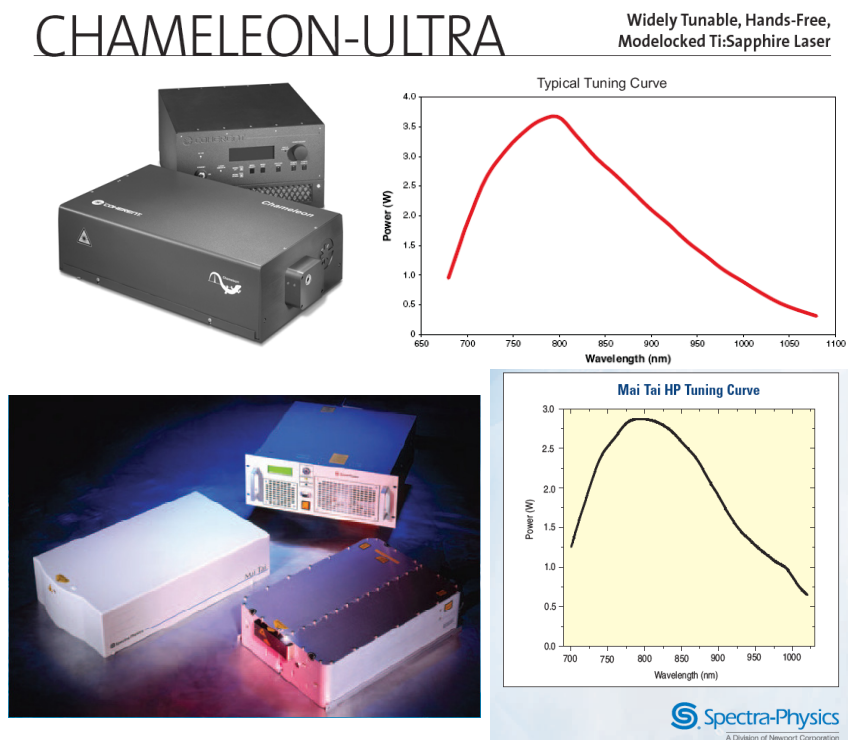


Figure 2-1 : photographies et spectres de lasers Ti:saphir commerciaux. En haut, laser Chameleon Ultra II de la société Coherent. En bas, laser Mai Tai de la société Spectra Physics.

Des efforts technologiques importants ont permis à ces lasers Ti:saphir d'atteindre des niveaux de fiabilité et de simplicité d'utilisation importants, et ainsi d'envahir les plates-formes d'imagerie. Aujourd'hui, les principaux fabricants de lasers (essentiellement Spectra Physics et Coherent) proposent ces sources, vendues clés en mains, extrêmement simples d'utilisation, robustes et qui nécessitent très peu d'entretien (figure 2-1). Ces systèmes délivrent des trains d'impulsions fs à des cadences comprises entre 75 MHz et 100 MHz, avec une accordabilité dans le rouge et le proche infrarouge. Pour certaines applications, notamment sur des dispositifs à balayage, les lasers Ti:saphir sont utilisés tels quels pour faire de la fluorescence par excitation à deux photons [Soper 1994], [Pelet 2006], [Kumar 2007], [Deniset-Besseau 2007]. En imagerie plein champ, la fluorescence est usuellement excitée par des processus d'absorption à un photon : dans ces conditions, le faisceau du laser est étendu spatialement et doublé en fréquence grâce à des cristaux non linéaires pour atteindre des longueurs d'ondes visibles [Elangovan 2002]. Les lasers Ti:saphir commerciaux ont des cadences relativement élevées (de 75 à 100 MHz), ce qui limite les temps de vie de fluorescence mesurables. Aussi pour augmenter la période des impulsions (et donc diminuer la fréquence), des modulateurs acousto-optiques ou électro-optiques sont utilisés

(pulse-pickers). Etant synchronisés sur la cadence du laser, ils permettent de sélectionner une impulsion sur n (n étant un nombre entier défini par l'utilisateur), ce qui permet de réduire la fréquence d'un facteur n et d'atteindre des fréquences jusqu'à quelques kHz. Ainsi dans la pratique un grand nombre d'expérimentateurs utilisent ces techniques en cascade : le faisceau de sortie du laser Ti:saphir passe dans un modulateur pour réduire la cadence, puis un cristal non linéaire est utilisé pour atteindre des longueurs d'onde visibles [Tramier 2006], [Nair 2006], [Agronskaia 2003], [Dahan 2001], [Smith 2005], [Bruno 2008], [Mattheyses 2004]... On peut également noter l'utilisation des lasers Ti:saphir pour la génération de spectres larges en injectant le faisceau dans des fibres optiques microstructurées [Grant 2005], [Aukorius 2008].

Pour l'imagerie de fluorescence résolue en temps sur des fluorophores s'excitant dans le proche ultraviolet, l'utilisation de lasers à cristaux dopés aux ions néodyme est assez répandue. Le faisceau laser à 1064 nm est triplé en fréquence grâce à des cristaux non linéaires pour atteindre la longueur d'onde de 355 nm [Munro 2005], [Schneckenburger 2003]. Remarquons aussi que pour ces longueurs d'onde, quelques lasers impulsionnels à gaz sont utilisés mais de manière marginale : laser à azote (ou nitrogène) [Chan 2001], laser à argon [Schneckenburger 2004].

Quelques équipes utilisent aussi des diodes laser impulsionnelles commerciales [Dahan 2001], [Elson 2002], [Ruck 2003]. Ces diodes avec des impulsions de quelques dizaines de ps, couvrent de manière discrète un spectre de 375 à 1550 nm [Picoquant 2008]. Actuellement, pour les longueurs d'onde les plus basses, les puissances sont encore relativement faibles (jusqu'à 1W en puissance crête pour des impulsions de 70 ps à une cadence de 80 MHz), mais les progrès constants de cette technologie incitent de plus en plus de groupes à utiliser ces diodes impulsionnelles.

En résumé, pour faire de la fluorescence résolue en temps en champ large, c'est-à-dire en utilisant des processus d'absorption à un photon, le dispositif de référence actuel est composé d'une (ou plusieurs) diode(s) laser de pompe, d'un laser Nd:YAG, d'un premier cristal doubleur, d'un laser Ti:saphir, d'un modulateur pour diminuer la cadence et d'un second cristal doubleur pour atteindre des longueurs d'onde visible et pouvoir exciter les échantillons (figure 2-2).

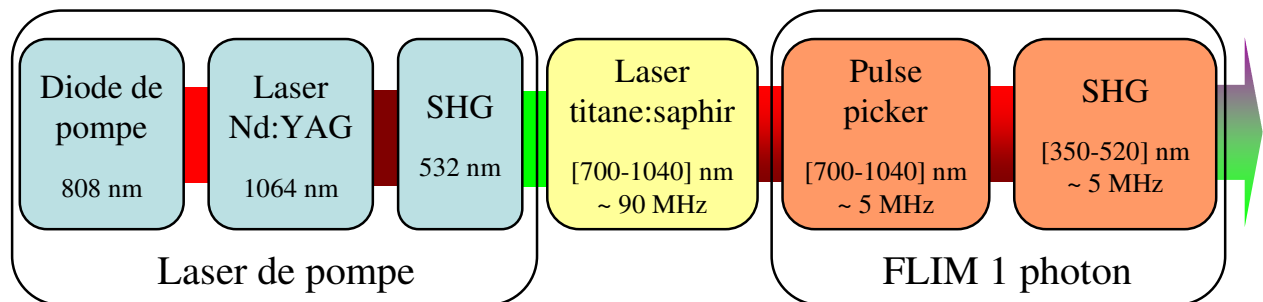


Figure 2-2 : dispositif de référence pour faire de la fluorescence résolue en temps par absorption à un photon.

On voit tout de suite les limitations d'un tel dispositif d'excitation :

- sa complexité. Même si tous les éléments sont des produits commerciaux, il y a un certain nombre de réglages précis à réaliser (obtention de l'accord de phase dans les cristaux non linéaires, synchronisation précise du modulateur sur la cavité laser).
- son encombrement.
- son faible rendement. Si on évalue le rendement entre la puissance optique à la sortie de la chaîne et la puissance électrique consommée, on trouve une valeur extrêmement faible.
- son prix. Surtout que, pour mesurer des temps de vie de fluorescence par excitation à un photon, l'utilisation d'un laser femtoseconde onéreux n'est pas indispensable...

- sa rigidité. En effet, à chaque instant, une seule longueur d'onde est accessible à la sortie de cette chaîne. Et même si l'accordabilité du laser Ti:saphir permet d'avoir une certaine gamme de longueurs d'onde en sortie, la partie du spectre couverte est limitée, et le cristal non linéaire à l'extrémité de la chaîne doit être réglée pour chaque changement de longueur d'onde.

C'est pourquoi nous avons cherché à développer une solution alternative, plus simple, moins onéreuse et avec des performances vraiment ciblées pour la microscopie de fluorescence résolue en temps par absorption à un photon (figure 2-3).

Cette solution repose sur le développement d'un oscillateur laser impulsif basse cadence pompé par diode émettant dans l'infrarouge. Le principe d'une telle source, basée sur l'utilisation d'une cavité multipassage a déjà été validé à une longueur d'onde de 1064 nm [Papadopoulos 2003]. Des cadences de quelques MHz pour des durées d'impulsion de quelques ps ont été obtenues avec une telle cavité, sans utilisation de modulateurs acousto-optiques, éléments difficiles à synchroniser et qui induisent des pertes conséquentes. D'un point de vue spectral, nous souhaitons développer une source qui permette d'exciter un grand nombre de fluorophores, avec le moins d'ajustements nécessaires. Pour cela, l'utilisation des effets non linéaires dans les fibres semble très attractive : en élargissant de la sorte le spectre, de nombreuses longueurs d'onde seront disponibles simultanément à la sortie de la chaîne d'excitation, et il suffira de choisir le bon filtre pour exciter le fluorophore souhaité.

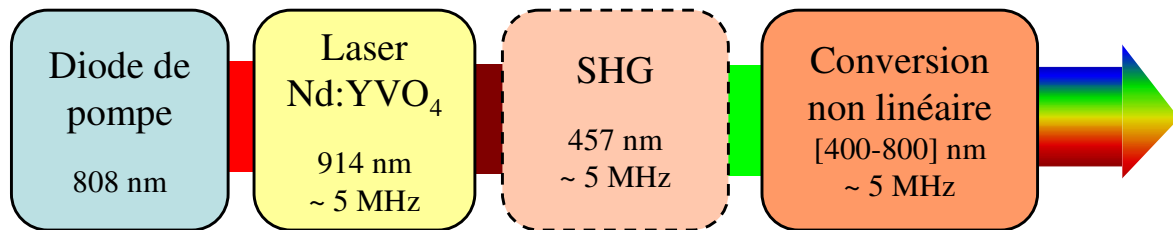


Figure 2-3 : solution alternative que nous voulons développer.

Notre programme de travail pour le développement de ce dispositif d'excitation de la fluorescence est donc le suivant :

Dans un premier temps, nous travaillons sur la réalisation d'un oscillateur pompé par diode, émettant dans l'infrarouge, délivrant des impulsions picoseconde à basse cadence (sur le modèle de la source citée juste au-dessus). Le faisceau émis doit par la suite être injecté dans une fibre pour élargir le spectre, or avec les effets non linéaires, il est relativement aisé d'obtenir des longueurs d'onde plus grandes que celle d'injection. Le problème est d'atteindre les longueurs d'onde plus courtes. C'est pourquoi nous décidons de travailler avec une transition plus énergétique de l'ion néodyme pour diminuer la longueur d'onde d'émission autour de 900 nm. Ainsi nous pourrons observer l'élargissement spectral obtenu en injectant dans la fibre le faisceau doublé en fréquence (longueur d'onde vers 450 nm, et dans ce cas, l'élargissement spectral dans le visible est obtenu essentiellement par effet Raman en cascade), ou le fondamental (et alors la génération de longueurs d'ondes visibles est réalisée par des processus non linéaires nécessitant des accords de phase, comme le mélange à quatre ondes). Bien entendu, l'énergie par impulsion (à 450 nm ou à 900 nm) doit être suffisante pour obtenir dans la fibre un élargissement du spectre.

Dans un second temps, une fois l'oscillateur obtenu, nous étudions les effets non linéaires dans les fibres optiques et réalisons les expériences d'élargissement spectral. Pour cela, nous utilisons des fibres microstructurées originales, ayant des propriétés de guidage particulières favorisant l'apparition de nouvelles longueurs d'onde par mélange à quatre ondes.

II – Développement d'une source laser solide impulsionnelle pompée par diode

Commençons par rappeler ici brièvement le principe de fonctionnement d'une source laser. Les sources « laser » tiennent leur nom de l'effet physique qu'elles exploitent. Le mot « laser » est l'acronyme de Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation, ce qui signifie en français amplification de lumière par émission stimulée.

Comme on l'a vu en introduction (p 13), l'émission stimulée, est la désexcitation d'un atome - préalablement situé dans un niveau d'énergie supérieur - par une excitation extérieure. Cette désexcitation est provoquée par un photon (dit photon incident), et elle s'accompagne de l'émission d'un nouveau photon en tout point identique au premier. L'amplification de lumière par émission stimulée va donc consister en une cascade d'émissions de photons tous identiques entre eux. Le faisceau émis par le laser sera, par conséquent, très peu divergent, monochromatique et cohérent.

A l'équilibre thermodynamique, dans le milieu à gain, beaucoup plus d'atomes se situent dans leur niveau fondamental que dans le niveau excité. Or pour amplifier, il faut une inversion de population, i.e. plus d'atomes dans le niveau excité que dans le niveau fondamental. Il faut donc réaliser un « pompage » pour que cette émission stimulée soit prépondérante par rapport à l'émission spontanée. Ensuite un confinement de ces photons émis dans une cavité, pour leur permettre de passer plusieurs fois dans le milieu amplificateur est nécessaire.

Ainsi, un laser est constitué de trois éléments fondamentaux :

- ✓ le milieu amplificateur
- ✓ le système de pompage
- ✓ le résonateur optique ou la cavité laser

Il existe différents types de lasers suivant la nature du milieu amplificateur (gaz, solide, liquide), le mode de pompage (électrique, optique, chimique,...), le domaine de longueur d'onde d'émission (de 100 nm à 500 μm), et le mode de fonctionnement (continu impulsionnel). Et ce sont en général les applications qui dictent le choix du laser. Notre but est de développer un laser compact, émettant des impulsions ps à une cadence de quelques MHz et à une longueur d'onde située autour de 900 nm. Nous présentons donc dans la suite, les différents choix technologiques que nous avons fait pour atteindre cet objectif.

II.1 – Le milieu amplificateur : cristaux dopés avec des ions Nd^{3+}

Pour réaliser ce laser, nous avons choisi une technologie dite « solide », c'est-à-dire que nous utilisons un cristal dopé comme milieu amplificateur. En effet, les cristaux sont plus facilement manipulables que les gaz ou les colorants. De plus, nous désirons obtenir un laser impulsionnel, or ces lasers à cristal permettent un stockage d'énergie important, favorisant des impulsions courtes et énergétiques. Enfin, ces lasers ont des faisceaux d'excellente qualité spatiale, et émettent dans l'infrarouge proche (800 -1500nm). Notre but est de trouver un matériau laser avec lequel nous pouvons travailler à des longueurs d'onde relativement courtes vers 900-950 nm, ce qui permet également, en utilisant un cristal non linéaire doubleur de fréquence, de descendre vers 450 nm.

Les systèmes basés sur des matériaux dopés au néodyme utilisent en général la transition ${}^4F_{3/2}$ - ${}^4I_{11/2}$ de cet ion, émettant vers $1\ \mu\text{m}$, bien connue pour son extrême efficacité. Ces systèmes sont, de plus, simples et très robustes. Cependant, l'arrivée sur le marché de nouvelles diodes laser, de plus en plus performantes, permet d'envisager le développement de lasers utilisant des raies moins efficaces du néodyme comme par exemple la transition ${}^4F_{3/2}$ - ${}^4I_{9/2}$ qui varie entre 900 et 950 nm selon la matrice hôte. L'idée est donc de transposer les systèmes à $1\ \mu\text{m}$ dans la gamme de longueurs d'ondes 900 -950 nm, tout en conservant leurs avantages [Herault 2007]. Le développement de sources lasers infrarouges à des longueurs d'ondes autour de 900-950 nm est un axe de recherche important de l'équipe ELSA, le but étant de construire un laser bleu. Pour ces transitions lasers étudiées, le milieu à gain se comporte comme un système trois niveaux ou quasi trois niveaux, ce qui impose des contraintes assez fortes sur l'oscillateur [Herault 2006], [Castaing 2007]. Pour générer un rayonnement bleu, des géométries de cavités assez complexes, avec notamment de la somme de fréquences intracavité avec des cristaux non linéaires ont été développées [Herault 2005]. Ces travaux continuent actuellement notamment grâce à de nouveaux cristaux [Castaing 2008].

Pour notre étude nous choisissons des cristaux standards de Nd:YVO_4 , largement utilisés pour des systèmes à $1\ \mu\text{m}$. La transition qui nous intéresse se trouve à 914 nm (figure 2-4).

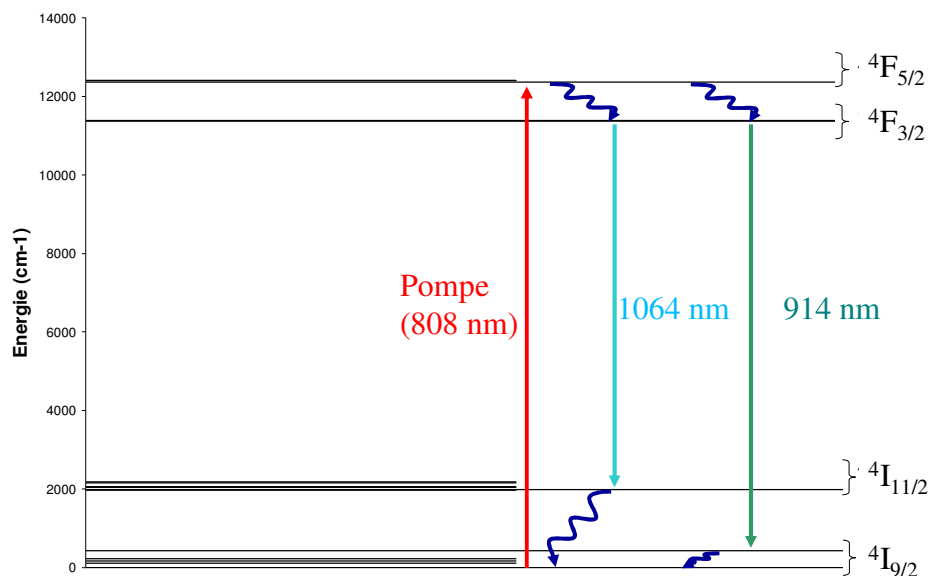


Figure 2-4 : spectroscopie (simplifiée) de l'ion Nd^{3+} dans la matrice de vanadate. Nous avons seulement indiqué ici les niveaux qui vont nous intéresser, à savoir le niveau ${}^4F_{5/2}$ que l'on va peupler grâce au pompage optique à 808 nm ; les atomes se désexcitent non radiativement vers le niveau ${}^4F_{3/2}$ puis à partir de ce niveau là, nous assisterons à une désexcitation radiative vers le niveau ${}^4I_{11/2}$ avec émission d'un photon à 1064 nm, ou bien à une désexcitation vers le niveau ${}^4I_{9/2}$ avec émission d'un photon à 914 nm. C'est cette dernière qui nous intéresse et que nous allons devoir privilégier.

Autour de cette transition, l'ion néodyme se comporte comme un système quasi trois niveaux. En effet, le niveau ${}^4I_{9/2}$ est très près du niveau fondamental. Par conséquent, ce niveau est peuplé à température ambiante, réduisant ainsi l'inversion de population. Cette population thermique de l'état bas de la transition conduit aussi à des phénomènes de réabsorption (figure 2-5) qui peuvent induire des fortes pertes sur le faisceau laser (toute partie non pompée du cristal sera en effet absorbante). Pour obtenir un effet laser efficace, un pompage efficace est donc nécessaire pour augmenter l'inversion de population [Zeller 2000], [Schlatter 2005]. Utiliser des cristaux standards comme le Nd:YVO_4 est très intéressant car cela permet de travailler avec des diodes standards émettant à 808 nm (où se situe un des pics d'absorption du néodyme figure 2-5) pour réaliser le pompage optique et ainsi de profiter des derniers développements technologiques sur ces diodes.

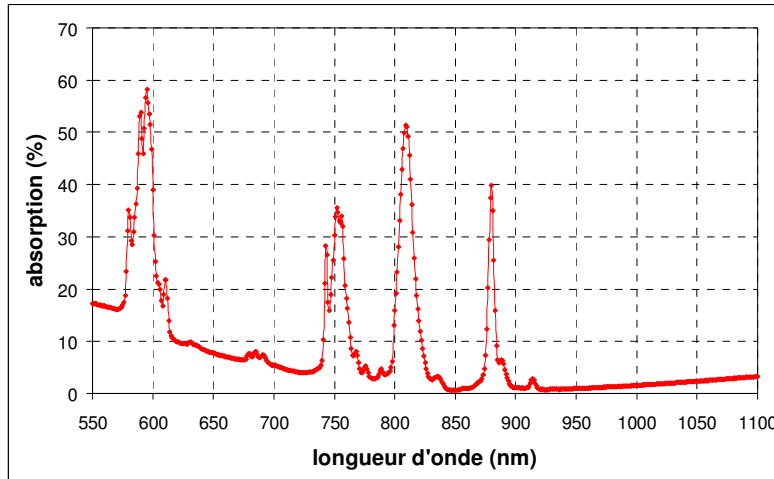


Figure 2-5 : spectre d'absorption d'un cristal de Nd:YVO₄ obtenu expérimentalement. Avec une diode de pompe émettant à 808 nm, on est dans une fenêtre d'absorption conséquente, et on peut alors réaliser l'inversion de population souhaitée. On remarque sur ce spectre un petit pic de réabsorption vers 914 nm. [Herault 2007]

En comparant (tableau 2-1) les caractéristiques des cristaux de Nd:YVO₄ et de Nd:YAG, on s'aperçoit que le Nd:YVO₄ a des meilleures sections efficaces d'absorption et d'émission, et une longueur d'onde laser plus basse [Czeranowsky 2002]. Ainsi, on pourra descendre plus bas en longueur d'onde, ce qui répond mieux à nos attentes. De plus, le cristal de Nd:YVO₄ étant biréfringent, l'émission est polarisée, ce qui facilitera ce doublage de fréquence.

	Nd:YVO ₄		Nd:YAG
	π	σ	
polarisation			
temps de vie du niveau excité [μs]	97		250
longueur d'onde de pompe [nm]	808		808
section efficace d'absorption [10e-20 cm ²]	60,1	12	7,9
longueur d'onde laser [nm]	914	915	946
section efficace d'émission [10e-20 cm ²]	4,8	4,3	3,7
énergie du niveau bas de la transition laser [cm ⁻¹]	433		857
population de ce niveau à 20°C [%]	4,8		0,7
à 100°C [%]	6,8		1,5
Rapport des sections efficaces d'émission à 1064nm et autour de 900nm	0,04		0,09

Tableau 2-1 : Comparaison Nd:YVO₄, Nd:YAG.

Cependant le cristal de Nd:YVO₄ présente plusieurs inconvénients : son niveau bas de la transition laser a une énergie de 433 cm⁻¹ (contre 857 cm⁻¹ pour le Nd:YAG), ce qui signifie une population thermique de ce niveau plus importante et donc plus de pertes par réabsorption [Kaminskii 1990]. De plus, ses propriétés thermiques sont bien inférieures à celles du Nd:YAG (conductivité thermique de 5,1 W/m.K pour le YVO₄ non dopé contre 10,3 W/m.K pour le YAG non dopé). En outre, le rapport des sections efficaces d'émission à 914 nm et 1064 nm vaut 0,04 (contre 0,09 pour le YAG), ce qui est très faible. La section efficace d'émission à 1064 nm vaut 114.10⁻²⁰ cm², elle est plus de 28 fois plus importante que celle à 914 nm. Nous allons donc être plus gênés par la forte concurrence de l'émission à 1064 nm (figure 2-6) dans le Nd:YVO₄ que dans le Nd:YAG.

La section efficace d'émission à 914 nm est faible (4.10⁻²⁰ cm²) et conduit à un seuil laser élevé qui nécessite une intensité de pompe importante. Cependant, si l'on pompe trop fort, on va avoir de l'absorption à partir du niveau excité vers les niveaux parasites. S'en suivra une désexcitation non radiative importante, qui va se traduire par un échauffement de notre cristal.

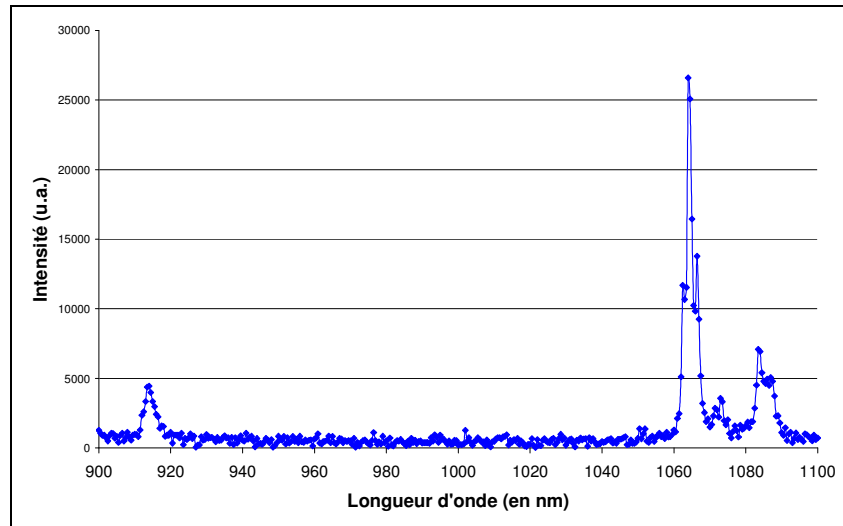


Figure 2-6 : spectre d'émission d'un cristal de Nd:YVO4 obtenu expérimentalement. On voit bien ici que l'émission à 914 nm est bien moins importante que celle à 1064 nm [Herault 2007].

Comme on vient de le voir à plusieurs reprises, le choix de ce cristal de Nd:YVO₄ impose un certain nombre de contraintes sur le système de pompage, que nous allons maintenant détailler.

II.2 – Le système de pompage : le pompage par diode

Pour permettre l'amplification de lumière par émission stimulée, c'est-à-dire pour obtenir l'effet laser, une inversion de population est indispensable. En 1950, Alfred Kastler démontre théoriquement que le pompage optique permet d'obtenir l'inversion de population [Kastler 1950], ce qu'il réalisa expérimentalement avec son équipe deux ans plus tard [Brossel 1952]. C'est ce type de pompage qu'utilisa Ted Maiman en 1960 [Maiman 1960], lorsqu'il réalisa expérimentalement le premier laser à rubis impulsif (693 nm). A cette époque, le pompage optique était réalisé par des lampes hélicoïdales à flash. Depuis, la découverte et l'amélioration de moyens de pompage optique ont permis des avancées majeures dans la réalisation des sources laser. Petit à petit, ces lampes furent remplacées par des lampes linéaires à flash, puis par des lampes à décharge. Par la suite, le développement et l'utilisation des diodes laser comme moyen de pompage optique fut une véritable révolution. Le premier laser solide pompé par diodes (5 diodes en GaAs en l'occurrence) fut réalisé en 1964 [Keyes 1964]. Dans le courant des années 70-80, de gros efforts furent faits pour réaliser des diodes de puissance fonctionnant à température ambiante. Ainsi l'utilisation pratique de ce procédé ne remonte qu'à une vingtaine d'années, une fois les diodes devenues assez puissantes et fiables à température ambiante pour envisager leur utilisation pour le pompage optique.

Les avantages du pompage par diodes laser sont nombreux : ce type de pompage augmente le rendement global : en effet, le rendement électrique-optique de la diode laser est très bon et avoisine les 50% (on peut par exemple comparer au rendement électrique optique de laser à gaz du type argon ionisé ou krypton ionisé, qui ont des rendements globaux de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-4}). Les diodes sont petites, légères et fonctionnent avec une alimentation de taille réduite : elles vont donc permettre de réaliser des systèmes plus compacts. Elles sont également fiables, robustes (durée de vie > 10000 heures) et nécessitent peu d'entretien.

De plus leur spectre d'émission est étroit (quelques nm) : toute la puissance est concentrée sur une plage de longueurs d'onde réduite. Si cette plage correspond aux pics d'absorption du matériau laser qui nous intéresse, une efficacité accrue est obtenue avec moins de problèmes thermiques. Mais il y a également des inconvénients : tout d'abord les diodes doivent être stabilisées en température, ce qui pratiquement nécessite un refroidissement, par exemple à l'aide d'un module à effet Peltier dans nos expériences. De plus, le choix des diodes de puissance est limité : comme on l'a vu précédemment, ces diodes ont une faible largeur spectrale : le choix en longueur d'onde est imposé par la nature du semi-conducteur (AlGaAs à 808 nm, soit InGaAs à 940/980 nm). Or actuellement, le marché des diodes de puissance est centré sur 808 nm pour les matériaux dopés Nd et 940-980 nm pour les matériaux dopés Yb. Ce point est important car cela est un frein à l'utilisation en pompage par diode direct de certains matériaux laser performants mais ayant des longueurs d'onde d'absorption différentes de 808 et 900-940 nm (comme le saphir dopé au titane par exemple qui nécessiterait des diodes de puissance émettant dans le bleu/vert et qui n'existent malheureusement pas actuellement). Pour le développement de la source que nous proposons, le pompage par diode apporte une avancée importante, puisque les sources lasers impulsionnelles à ces longueurs d'onde déjà développées utilisent jusqu'à présent un pompage par laser Ti:Saphir, avec un rendement global plus faible et un encombrement bien supérieur [Schlatter 2005].

II.3 – La cavité laser : travailler en régime impulsionnel

II.3.1 – Le verrouillage des modes en phase

Etant donné que nous développons un dispositif pour faire de l'imagerie de temps de vie de fluorescence dans le domaine temporel, nous devons construire un oscillateur laser impulsionnel. Intéressons nous donc maintenant aux différents régimes permettant ce type de fonctionnement. Ils sont au nombre de trois (figure 2-7) :

- ✓ le régime déclenché simple (ou « Q-switch »), constitué d'un voire quelques modes longitudinaux. Dans ce régime, on obtient des impulsions qui se forment à chaque fois en démarrant sur du bruit. Ces impulsions se construisent sur plusieurs allers et retours dans la cavité, et arrêtent d'osciller lorsque le milieu à gain est dépeuplé. La cadence des impulsions (généralement kHz) dépend ici du taux de pompage et les durées (de l'ordre de la ns) du temps de vie moyen du photon dans la cavité laser.
- ✓ le régime à verrouillage de modes en phase (ou ML pour « Mode-Locked »). Tous les modes se propagent en phase, chacun d'entre eux oscillant en régime continu. L'enveloppe du champ électrique est un peigne d'impulsions à la cadence $c/2L$ (généralement autour de 100 MHz), avec L longueur optique de la cavité. La durée des impulsions (fs-ps) dépend ici du nombre de modes mis en jeu.
- ✓ le régime déclenché à verrouillage de modes en phase (ou QML pour « Q-switch Mode-Locked »). Comme son nom l'indique ce régime constitue la superposition des deux précédents : plusieurs modes se propagent en phase dans un régime déclenché. On observe alors un peigne d'impulsions de cadence $c/2L$ modulé par le régime déclenché. Cette modulation entraîne de fortes variations de l'amplitude.

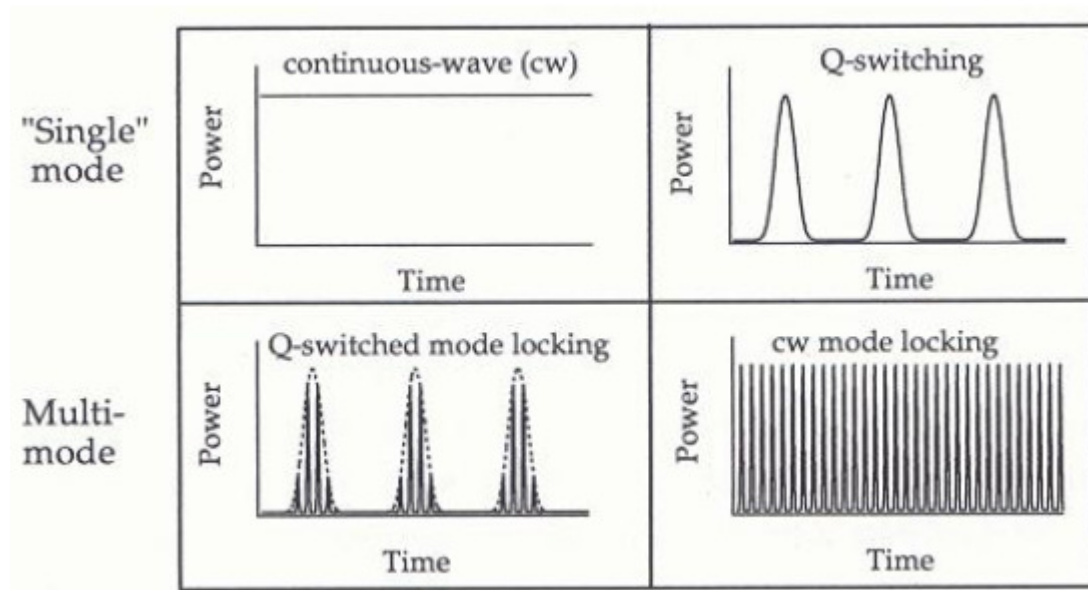


Figure 2-7 : les différents régimes de fonctionnement temporel d'un laser : continu, déclenché simple, déclenché à verrouillage de modes en phase, à verrouillage de modes en phase. [Keller 1996]

Pour notre application, nous souhaitons obtenir des impulsions courtes (sous la centaine de ps) avec une amplitude constante. Le régime de verrouillage des modes en phase (cw ML) semble par conséquent le plus adapté, et nous allons donc nous attarder sur lui. Lorsque plusieurs modes oscillent en phase, l'enveloppe de l'intensité du champ électrique total (somme du champ électrique des différents modes) forme des impulsions, à une cadence $c/2L$, avec L la longueur optique de la cavité (figure 2-8). La durée des impulsions dépend du nombre de modes en phase : plus ce nombre est important (i.e. plus le spectre est large), plus les impulsions sont courtes (figure 2-9). On peut noter que si les modes ne sont pas en phase, le signal obtenu est de type continu très bruité.

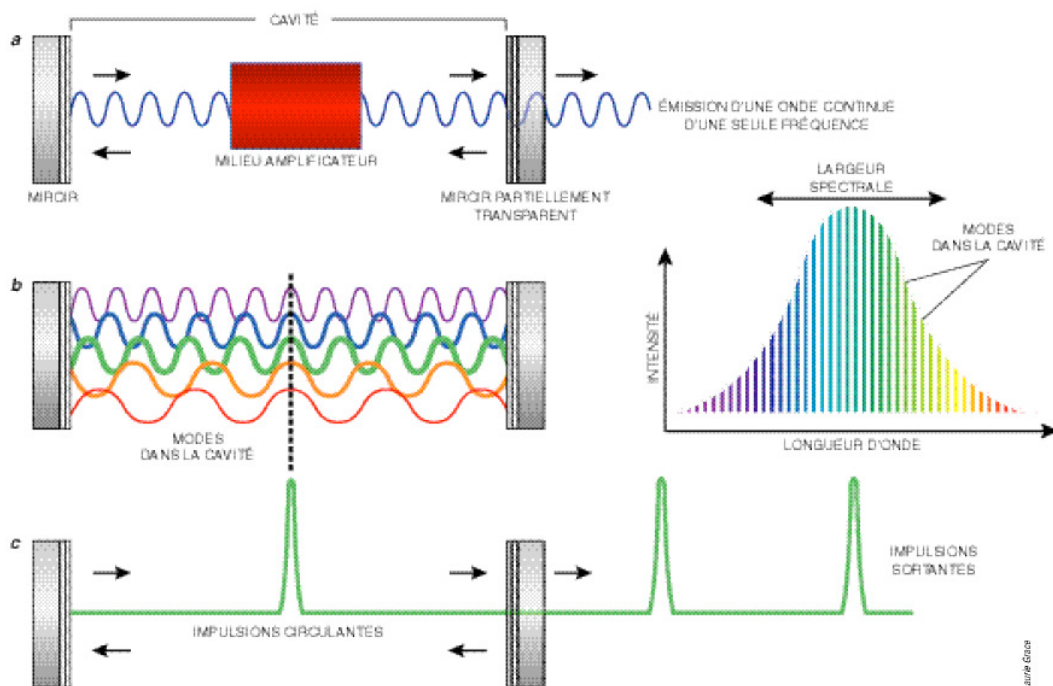


Figure 2-8 : explication du principe de verrouillage des modes en phase [Hopkins 2000].

Pour réaliser ce verrouillage des modes en phase, il faut utiliser un élément dans la cavité qui permette de synchroniser tous les modes en phase. Cet élément fait office de porte temporelle très rapide et favorise le train d'impulsions courtes vis-à-vis du régime continu. Pour obtenir ce régime, des techniques de verrouillage de modes dites actives ou passives sont utilisées. Le verrouillage de modes actif est obtenu en modulant les pertes ou le gain par une source externe contrôlée, soit par modulation d'amplitude, soit par modulation de fréquence ou de phase. Le verrouillage de modes passif est produit classiquement soit par un absorbant saturable bien choisi (en général à base de semi-conducteur), soit par l'effet Kerr optique (qui peut aussi être considéré comme un type d'absorbant saturable). Ces techniques de verrouillage de modes passif sont préférées pour la génération de trains d'impulsions ultracourtes essentiellement à cause de leur plus grande simplicité et fiabilité [Druon 2001], [Georges 2004], [Delsart 2008].

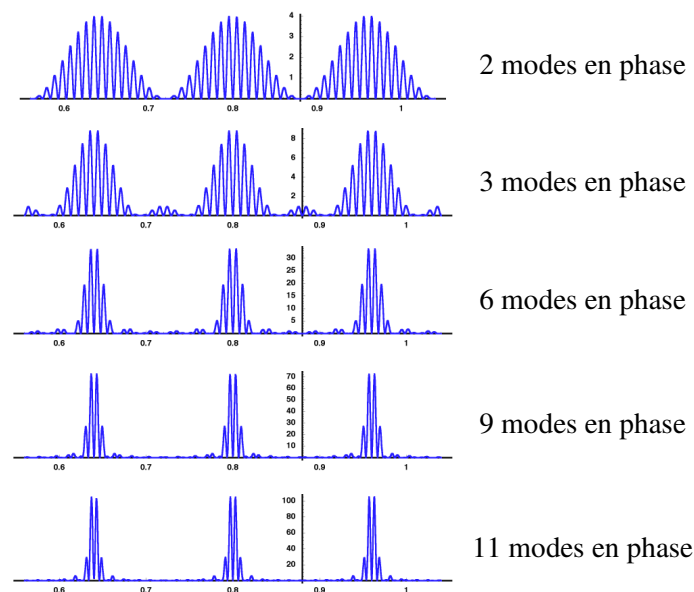


Figure 2-9 : enveloppe du champ électrique suivant le nombre de modes en phase.

Intéressons nous plus précisément au verrouillage de modes passif. Un tel verrouillage introduit de fortes pertes aux basses intensités et de faibles pertes aux hautes intensités (ce qui correspond à une mise en phase d'un certain nombre de modes). Il existe plusieurs méthodes de mise en phase des modes de manière passive [Hönninger 1999] : par exemple le verrouillage des modes par effet Kerr, basé sur une augmentation locale de l'indice de réfraction d'un matériau diélectrique avec les fortes intensités [Spence 1991], technique utilisée pour obtenir des impulsions fs dans les lasers basés sur des cristaux de saphir dopés au titane. Dans notre cas, nous souhaitons obtenir des impulsions ps, et pour cela, l'emploi d'autres techniques est nécessaire. Nous pouvons citer par exemple celle basée sur l'utilisation d'un cristal non linéaire doubleur. Dans cette méthode, les hautes intensités vont permettre une génération efficace de nouvelles longueurs d'onde dans le cristal non linéaire contrairement au régime continu. L'utilisation d'un miroir dichroïque [Stankov 1988], d'un polariseur [Couderc 1998] ou d'un processus de cascade [Zavelani-Rossi 1998] permet alors de réaliser la fonction d'absorbant saturable. Ainsi un tel processus induit de fortes pertes aux basses intensités et de faibles pertes aux hautes intensités et permet d'obtenir un verrouillage de modes en phase. Pour notre oscillateur, nous avons privilégié la technique de verrouillage de modes en phase par absorbant saturable rapide. Ce régime permet l'obtention d'impulsions picoseconde non limitées par la transformée de Fourier. Pour atteindre ce résultat, nous utilisons un miroir absorbant saturable à semi-conducteur (SESAM=Semiconductor Saturable Absorber Mirror) comme absorbant saturable rapide.

II.3.2 – Le SESAM

Un SESAM est un dispositif contenant un absorbant saturable à semi-conducteur inséré entre deux miroirs. Le miroir de fond est un miroir de Bragg hautement réfléchissant alors que le miroir d'entrée n'est généralement constitué que par la réflectivité de Fresnel à l'interface air-semiconducteur (figure 2-10). Les SESAMs exhibent deux types de régimes suivant la fluence (qui quantifie l'énergie incidente par unité de surface) :

- en régime de fortes fluences laser (environ 10 fois la fluence de saturation du semi-conducteur, ce qui correspond au régime impulsif), l'absorbant va être saturé. La majeure partie de l'énergie de la cavité verra alors un absorbant blanchi et sera réfléchi dans la cavité par le miroir de Bragg, sans quasiment être absorbée,
- aux faibles fluences (inférieures à la fluence de saturation, ce qui correspond au régime continu), l'absorbant n'est pas saturé et absorbe plus d'énergie incidente, provoquant de la sorte plus de pertes.

Les SESAM ont cependant d'autres spécificités avantageuses. Les semi-conducteurs possèdent en effet des temps de recombinaison rapides et peuvent être élaborés en très fines couches facilement saturables. Ce sont de bons candidats pour postuler au rôle d'absorbants saturables rapides. De plus, l'utilisation de SESAM pour verrouiller les modes en phase possède d'autres avantages : en effet, le verrouillage de modes en phase est passif, il y a auto-initialisation du train d'impulsion et un alignement critique de la cavité n'est en général pas nécessaire [Keller 1996].

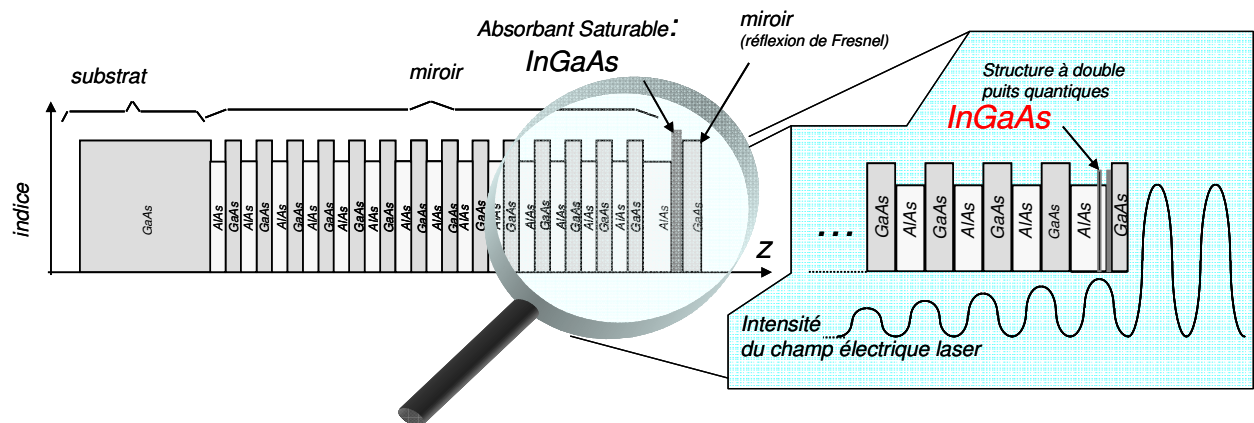


Figure 2-10: schéma d'un SESAM. On distingue les différents éléments : le substrat sur lequel on dépose les couches de semi-conducteur (AlAs/GaAs) du miroir de Bragg, l'absorbant saturable en InGaAs, et la couche de GaAs qui va permettre une réflexion de Fresnel [Druon 2001].

Physiquement, la lumière incidente va exciter les électrons de la bande de valence et les faire passer dans la bande de conduction (flèche bleue de la figure 2-11). A cause du principe d'exclusion de Pauli, quand tous les états de la bande de conduction seront occupés par des porteurs, notre absorbant sera « blanchi », c'est-à-dire que les photons qui arriveront alors traverseront le semi-conducteur sans être absorbés. La réponse temporelle du SESAM est ainsi définie par la dynamique des porteurs dans l'absorbant. On peut observer une première thermalisation des porteurs due à la diffusion électron-électron i.e. thermalisation intra-bande. Cela mène à une contribution rapide (environ 100 fs) dans la réponse temporelle (figure 2-11). Une seconde contribution plus longue (de l'ordre de la picoseconde à la nanoseconde) est aussi observée et est due aux recombinaisons inter-bandes. Elle peut se réaliser par l'intermédiaire d'une émission spontanée ou via des pièges et des défauts du matériau. Ainsi elle peut être accélérée en introduisant des impuretés dans la structure ce qui a pour conséquence de créer des

pièges entre la bande de conduction et la bande de valence [Keller 2006]. La réponse bi-temporelle de l'absorption est représentée sur la figure 2-11.

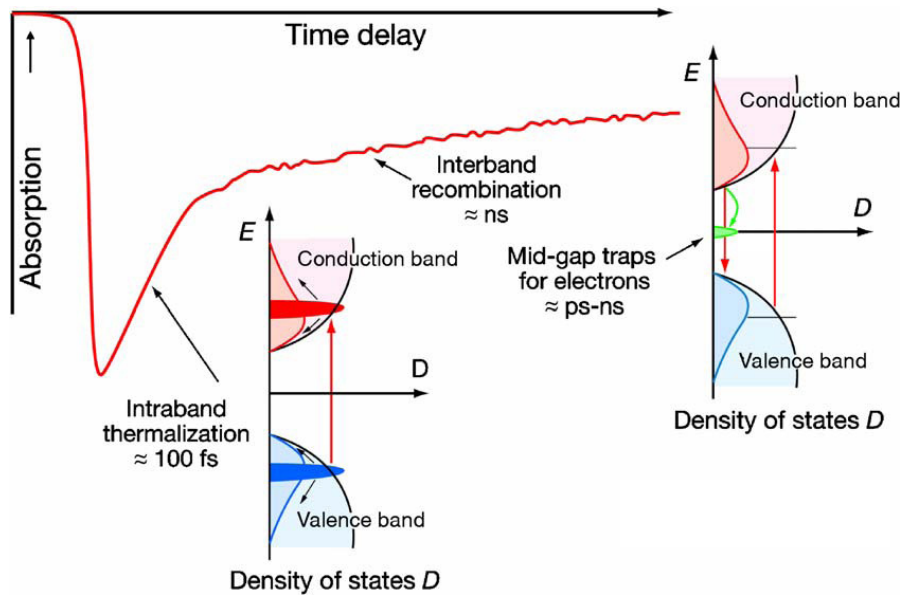


Figure 2-11 : réponse temporelle d'un SESAM. On distingue la thermalisation intra-bande rapide et la recombinaison inter-bandes, plus longue [Keller 2006].

Pour favoriser le régime verrouillé vis-à-vis du régime déclenché, il faut que notre absorbant saturable soit rapide : il doit être caractérisé par un temps de recouvrement de la saturation nettement inférieur au temps d'un aller et retour de l'impulsion dans la cavité. Comme nous voulons travailler à une cadence de quelques MHz (inférieure à 100 MHz), le temps d'un aller et retour de l'impulsion dans la cavité sera supérieur à 10 ns. Ainsi, nous pourrions utiliser un SESAM comme absorbant saturable rapide. Il est par ailleurs possible d'en ajuster les différents paramètres tels que : l'énergie de gap du semi-conducteur (un photon ne pourra être absorbé que si son énergie est supérieure au gap du matériau), la profondeur de modulation en variant l'épaisseur de l'absorbant ou le nombre de puits quantiques, et le temps de recombinaison inter-bandes en variant la température de croissance du matériau.

On caractérise les SESAMs en regardant la réflectivité en fonction de l'intensité de l'impulsion incidente. Ceci va nous révéler la fluence (ou intensité ou densité d'énergie) de saturation, la profondeur de modulation, et les pertes non-saturables (figure 2-12).

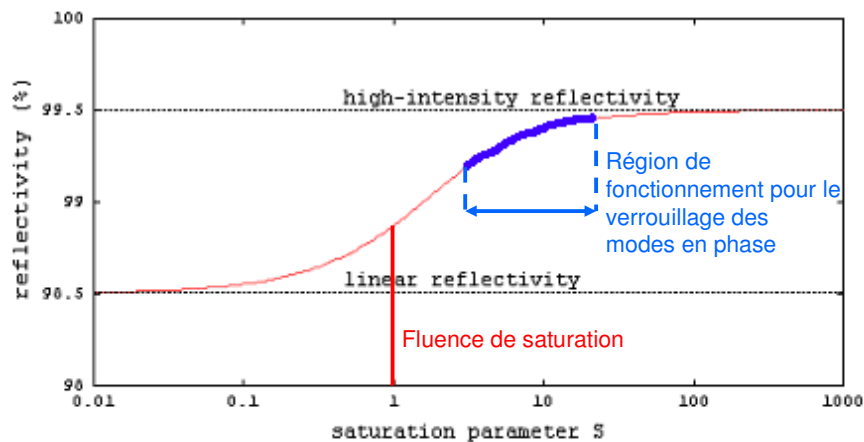


Figure 2-12 : exemple de réponse d'un absorbant saturable ayant une profondeur de modulation de 1% et des pertes non saturables de 0.5%. Le paramètre de saturation est normalisé à 1 pour la fluence de saturation du SESAM.

La profondeur de modulation mesure le changement maximum de réflectivité du dispositif. La fluence de saturation correspond à la fluence de l'impulsion nécessaire pour blanchir l'absorbant saturable à $1/e$ de la profondeur de modulation. On voit sur la figure 2-12 que le régime optimum d'utilisation d'un SESAM se situe pour une fluence par impulsion de l'ordre de 10 fois celle de saturation du SESAM [Keller 1996]. Les pertes non-saturables incluent les pertes par diffusion à la surface de l'échantillon, les phénomènes d'absorptions résiduelles dans le semi-conducteur, et la transmission et l'absorption du miroir de Bragg.

Le miroir de Bragg sur lequel se trouve l'absorbant saturable est constitué d'un empilement d'une vingtaine de paires de couches d'AlAs/GaAs d'épaisseur optique $\lambda/2$. Les pertes par transmission au niveau du miroir décroissent avec un nombre croissant de couches. Ainsi pour un empilement de 25 paires de AlAs/GaAs, les pertes par transmission à la longueur d'onde λ sont inférieures à 0,1%. L'absorption dans les couches est également inférieure à 0,1%. Ce miroir de Bragg et le miroir d'entrée (qui peut être juste une interface air-semi-conducteur, une couche de GaAs par exemple ; le GaAs ayant un indice de 3,5, la réflexion de Fresnel vaut alors 30%), forment une cavité Fabry-Perot qui est ajustée à la condition d'anti-résonance pour la longueur d'onde de travail. Cette cavité va permettre à notre dispositif d'être large bande et d'avoir une faible dispersion (ces deux points sont importants en régime femtoseconde, mais beaucoup moins en régime picoseconde).

Après avoir présenté d'une manière théorique les éléments principaux qui constituent notre cavité et qui permettent de générer des impulsions picoseconde, penchons nous maintenant sur la réalisation expérimentale de notre oscillateur laser.

II.4 – Réalisations expérimentales

II.4.1 – La cavité

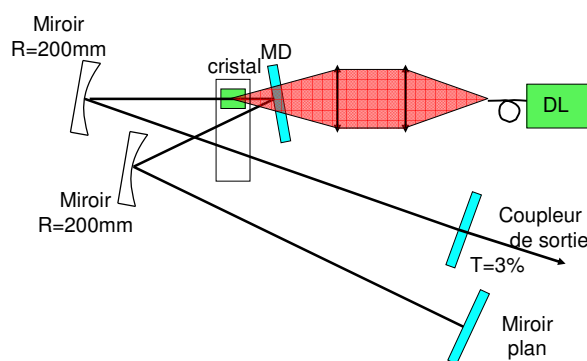


Figure 2-13: cavité impulsionnelle testée en continu. Ainsi le coupleur est à une extrémité et le miroir plan à l'autre extrémité. MD est le miroir dichroïque (HR à 914 nm, HT à 808 nm), DL est la diode laser.

La diode utilisée est une diode fibrée de puissance de la compagnie LIMO, vendue pour délivrer une puissance de 10 W à 808 nm en sortie de fibre. La fibre, quant à elle, a un diamètre de cœur de 100 μm , et une ouverture numérique de 0,22 ce qui correspond à un M^2 de 43 (ce facteur M^2 caractérise, pour une direction donnée l'écart de divergence entre faisceau réel et faisceau gaussien de même taille au col mais limité par la diffraction. Une valeur de 1 correspond à un faisceau gaussien). Par le calcul, nous estimons alors la brillance à 840 $\text{kW}/\text{cm}^2/\text{sr}$, ce qui est une valeur suffisante pour saturer l'absorption. En sortie de la fibre, le faisceau n'est pas polarisé.

Pour focaliser notre faisceau sur le cristal, nous utilisons deux doublets de focales respectives 50 mm et 80 mm et de diamètre 30 mm : ainsi, on va avoir un rayon de col (ou « waist ») de pompe sur le cristal de diamètre 160 μm . On peut également évaluer la distance de Rayleigh :

$2z_0 = \frac{2\pi w_0^2}{\lambda M^2} = 1,2 \text{ mm}$. Ainsi ces optiques vont nous permettre de focaliser proprement dans le cristal.

Le cristal de Nd:YVO₄ fourni par CASIX est dopé à 0,2% (ceci signifie que 0,2% des ions Y³⁺ de la matrice cristalline sont remplacés par des ions Nd³⁺). Notre cristal a une longueur de 4 mm. Il est placé dans une monture en cuivre refroidie par eau. Ce refroidissement est indispensable pour diminuer la population thermique du niveau ⁴I_{9/2} et ainsi réduire la réabsorption dans le cristal.

Nous optimisons l'absorption dans le cristal en réglant la température de refroidissement de la diode et le courant d'alimentation. A 17°C et avec un courant de 25 A, le cristal absorbe 3,8 W sur les 6,7 W de puissance de pompe incidente.

Attardons nous ici sur un point essentiel de la réalisation de ce laser : le choix des miroirs. Comme nous l'avons vu précédemment, nous allons être fortement gênés par l'émission laser à 1064nm. Il va donc falloir nous débarrasser complètement de cette émission. Pour cela, on va utiliser des miroirs spécialement traités pour transmettre à 1064 nm et pour réfléchir à 914 nm. Ces miroirs nous sont fournis par la société Laseroptik. Pour le miroir dichroïque (MD), ils nous garantissent une transmission à 808 nm (pour la pompe) supérieure à 90% et une réflexion à 914 nm supérieure à 99,9%. Pour les différents miroirs concaves utilisés dans nos différentes cavités, ils assurent une transmission à 1064 nm supérieure à 74% et une réflexion à 914 nm supérieure à 99,9%.

La première étape consiste à construire une cavité laser à double bras collimaté. En effet, le problème est que le SESAM et le coupleur de sortie doivent être chacun en fond de cavité. On réalise une telle cavité laser, et on l'optimise en régime continu (figure 2-13). Au niveau des distances, on a la même distance entre le cristal et chacun des deux miroirs concaves (107 mm). Entre le deuxième miroir concave et le miroir plan, on a environ 500 mm. A une puissance de pompe incidente de 6,7 W, nous obtenons une puissance de sortie supérieure à 650 mW. Pour obtenir le régime impulsif, nous devons utiliser un miroir concave pour focaliser sur le SESAM, et ainsi augmenter la fluence incidente. La dernière étape de réglage du laser en continu consiste à remplacer le miroir plan de fond de la cavité précédente par un miroir concave qui focalise sur un miroir plan, qui se situe en lieu et place du SESAM. La puissance en sortie est légèrement supérieure à 600 mW. On est donc prêt à passer en régime impulsif...

D'un point de vue pratique, on va placer le miroir plan de la cavité précédente dans une monture « flip-flap », ou escamotable. Ainsi l'alignement de la sous-cavité composée du miroir concave et du SESAM pourra se faire à l'aide du faisceau laser de la cavité continue. La cavité ainsi obtenue est représentée figure 2-14.

Nous disposons de deux SESAMs commerciaux (Batop GmbH) ayant des absorptions de 4% et 2% à 940 nm. Ce sont les seuls SESAMs commercialisés à l'heure actuelle dans cette gamme de longueurs d'onde, mais en travaillant à 914 nm, nous sommes en bord de bande.

Les pertes induites par le SESAM à cette longueur d'onde étant assez importantes, nous ne réussissons à obtenir un régime de verrouillage des modes en phase stable avec une puissance convenable en sortie qu'avec le SESAM avec une absorption de 2% (voir annexe 1) et le miroir de focale 100 mm. La puissance moyenne obtenue est alors de 86 mW. Dans ces conditions, nous estimons (grâce au logiciel PARAXIA de simulation de faisceau laser dans une cavité) que le faisceau laser sur le SESAM a un rayon de 30 μm , ce qui correspond à une fluence de 1,08 mJ/cm², soit 15 fois la fluence de saturation du SESAM.

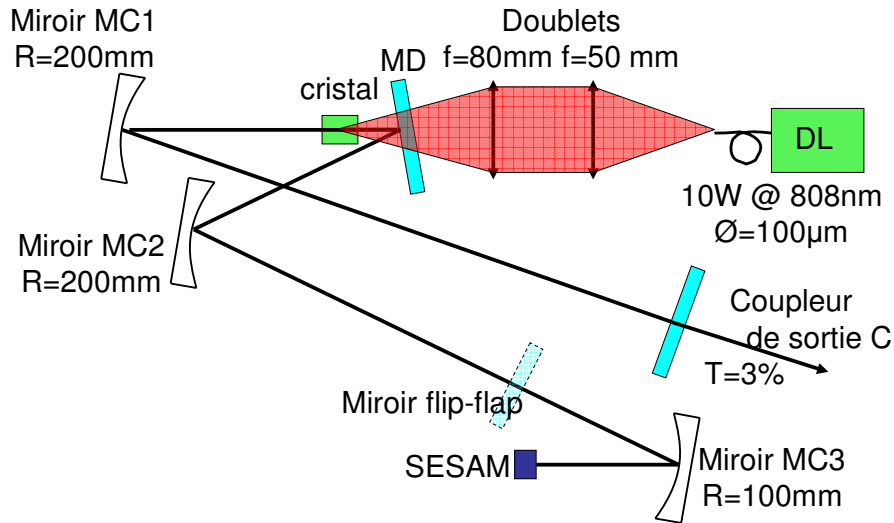


Figure 2-14 : schéma de la cavité en régime impulsif. Distances : C-MC1=600mm, MC1-cristal=105mm, Cristal-MD=20mm, MD-MC2=85mm, MC2-MC3=700mm. Dans notre cavité « optimale », MC3 a un rayon de courbure de 100mm, donc le SESAM est placé à 50mm du miroir.

Nous obtenons le verrouillage uniquement pour une puissance de sortie comprise entre 85 et 87 mW. Ainsi, si on augmente la puissance de pompe absorbée par le cristal laser, on perd le verrouillage. En re-réglant la cavité, on peut à nouveau l'obtenir, mais avec une puissance de sortie qui sera la même que précédemment. Par contre, lorsque l'on va diminuer la puissance en pompant moins, on va passer en régime déclenché à verrouillage de modes en phase et perdre définitivement le régime à verrouillage des modes en phase pur. Mais une fois obtenu, le « mode-locked » régime est stable : le verrouillage tient largement plusieurs heures. Il n'est pas parasité par un régime déclenché, comme on peut l'observer sur la figure 2-15.

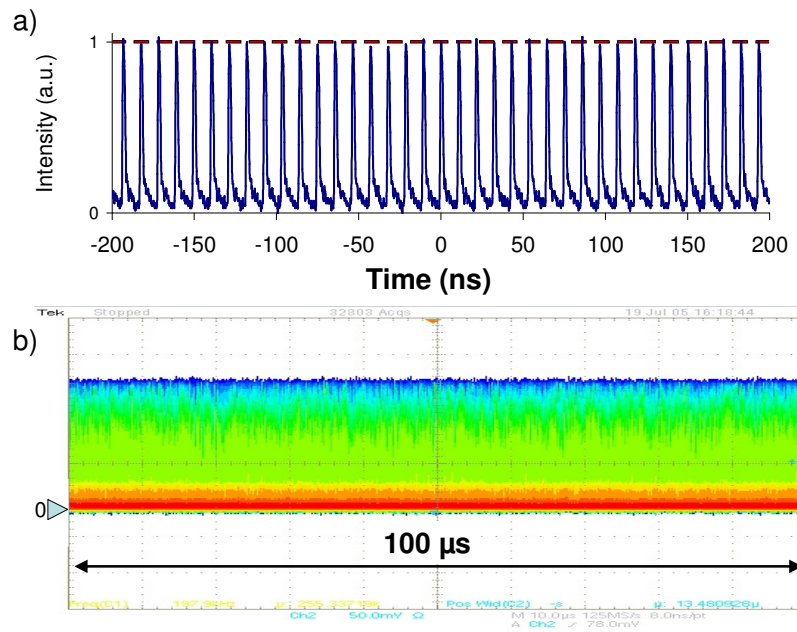


Figure 2-15: train d'impulsions observé avec deux échelles de temps différentes : 400 ns pour a) et 100µs pour b). On voit bien que sur une échelle de temps assez grande de 100µs ($>>10$ ps), notre train d'impulsion n'est absolument pas modulé par un régime déclenché ; il est stable. On remarque également qu'il n'y a pas de composante continue.

II.4.2 – Les performances

II.4.2.1 – Caractérisation spectrale

Grâce à un analyseur de spectre optique, nous enregistrons le spectre, pour obtenir précisément la longueur d'onde d'émission, la largeur spectrale des impulsions et également pour vérifier que l'on s'affranchit bien de l'effet laser à 1064 nm.

Nous avons dans un premier temps réalisé un spectrogramme sur une large gamme afin d'observer le spectre de 900 à 1100 nm (figure 2-16). On remarque que le seul pic laser que nous obtenons se situe aux alentours de 914 nm. On a donc bien réussi à supprimer l'effet laser à 1064 nm.

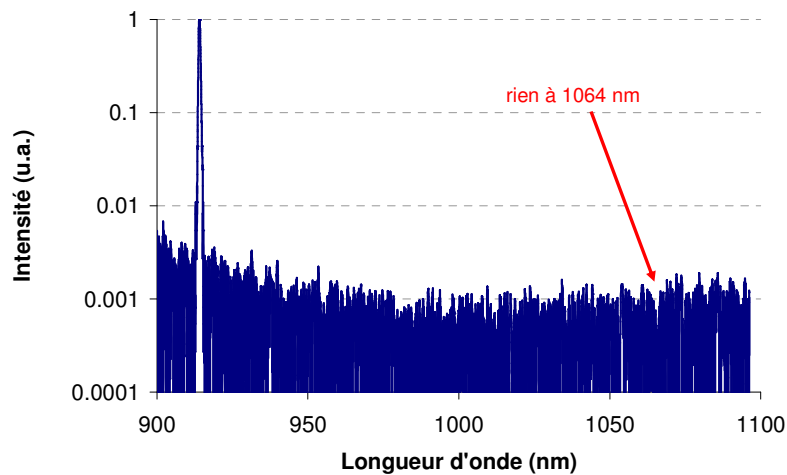


Figure 2-16 : Spectre élargi qui témoigne de l'absence d'effet laser à 1064 nm.

Ensuite nous avons réduit la gamme spectrale pour observer plus en détail la raie à 914 nm (la résolution de l'analyseur de spectre optique est de 0,07 nm). Comme le montre la figure 2-17, nous avons un spectre qui fait 0,26 nm de large et qui est centré à 913,8 nm. Pour comparaison on a aussi tracé le spectre en régime continu.

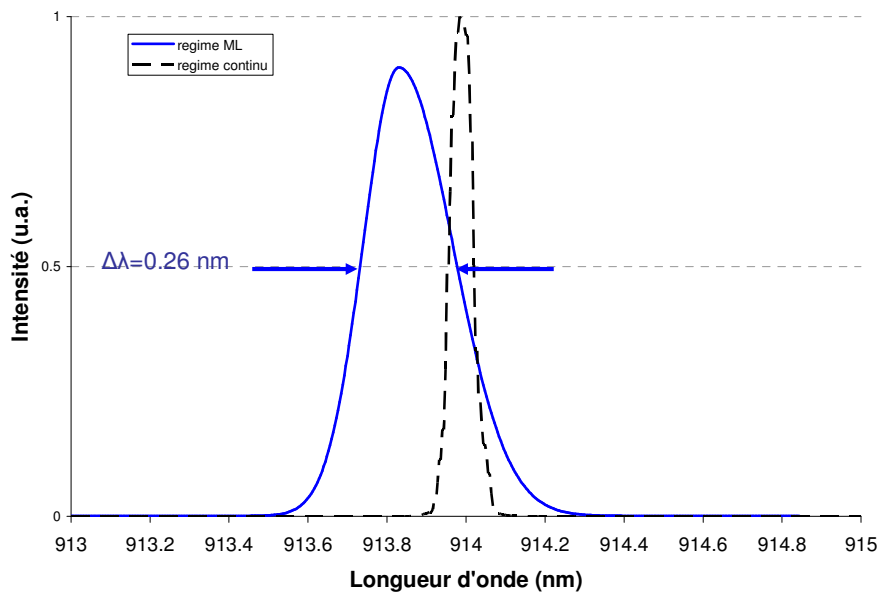


Figure 2-17 : Spectre optique des impulsions à 913,8 nm (courbe bleue) et spectre du régime continu naturel à 914 nm (courbe en pointillés).

On notera deux choses : en régime impulsionnel, la largeur spectrale est plus importante : en effet c'est cet élargissement qui nous permet d'atteindre le régime picoseconde. On remarque également un léger décalage de la longueur d'onde centrale, sans pouvoir cependant apporter d'explication pertinente.

En supposant que les impulsions présentent un profil temporel en sécante hyperbolique au carré, comme c'est le cas usuellement pour des impulsions ultra-courtes, on obtient un produit [durée d'impulsion]×[largeur spectrale] qui vaut 0,315 lorsque l'on est limité par la transformée de Fourier. Si c'était le cas ici, vu la largeur spectrale des impulsions, on s'attendrait à avoir des durées d'impulsions de 3,3 ps. Regardons ce qu'il en est réellement.

II.4.2.2 – Caractérisation temporelle

Pour les caractéristiques sur une grande échelle temporelle on a utilisé une photodiode et un oscilloscope rapide (l'ensemble avait une bande passante de 3 GHz). Nous avons mesuré une cadence de 94 MHz pour un train en régime de verrouillage des modes en phase stable et sans composante continue (figure 2-15).

Pour la mesure de la durée des impulsions notre photodiode et l'oscilloscope rapide sont trop lents (réponse percutielle ≈ 200 ps). Il faut donc utiliser un autocorrélateur optique pour les mesurer. Nous avons donc réalisé une autocorrélation optique en intensité (par génération de second harmonique) (voir annexe 2). Cette mesure est simple, mais elle ne fournit pas d'informations sur la phase des impulsions (distorsions, disymétries des impulsions, dérive de fréquence). Pour obtenir plus d'informations, il faudrait faire par exemple une autocorrélation croisée avec une autre impulsion très courte à même cadence ou encore mieux, disposer de techniques plus performantes comme la technique FROG (Frequency Resolved Optical Gating) [Trebino 1993].

En ajustant l'autocorrélation pour une impulsion de forme sécante hyperbolique carrée (et en tenant compte du facteur correctif 1,54 qui intervient pour un tel ajustement), nous obtenons des impulsions de durées égales à 8,8 ps (figure 2-18).

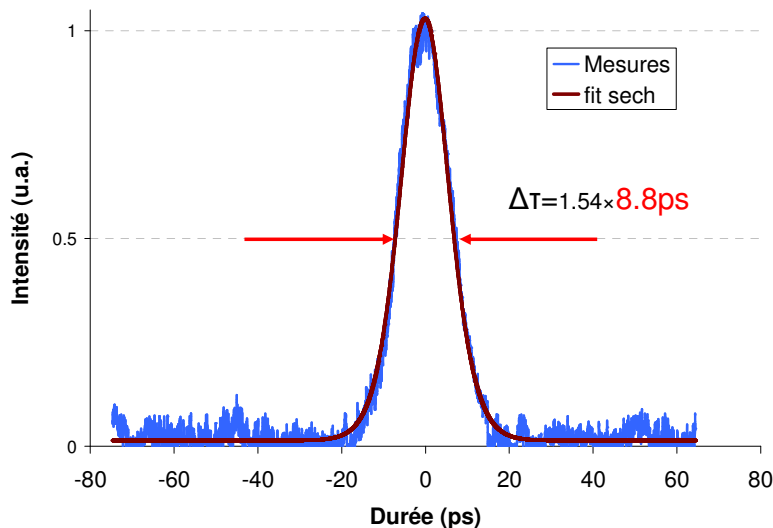


Figure 2-18 : signal d'autocorrélation des impulsions obtenu. En utilisant un ajustement par une sécante hyperbolique au carré, nous obtenons une durée de 8.8ps.

Ayant la durée des impulsions et la largeur du spectre, nous pouvons calculer le produit durée d'impulsion-largeur spectrale expérimentalement obtenu, qui nous donne une valeur de 0,82, ce

qui est 2,6 fois la limite de la transformée de Fourier pour une sécante hyperbolique au carré (qui vaut alors 0,315). Nous ne sommes pas étonnés d'avoir une valeur plus de 2 fois supérieure puisque nous n'avons nullement cherché à compenser la dispersion de vitesse de groupe dans notre cavité.

II.5 - Conclusion

Pour commencer, le laser obtenu nous satisfait quant aux exigences formulées. En effet, nous avons des impulsions de 8.8 ps à une longueur d'onde de 913.8 nm comme souhaité. La cadence est légèrement haute avec 94 MHz, mais ceci n'apparaît pas comme un problème essentiel : en effet, nous savons que pour obtenir une cadence plus basse, il faut augmenter la longueur optique de la cavité. Ainsi, nous avons réalisé le premier laser impulsionnel à verrouillage de modes en phase passif obtenu grâce à un SESAM à 914 nm, ce qui nous a permis de publier ces résultats [Blandin 2006]. Nous pouvons toutefois noter que le réglage de notre cavité est très critique. En effet, notre système est stable, mais uniquement une fois réglé. Il est nécessaire de réajuster l'alignement à chaque allumage et notre laser passe en régime déclenché à la moindre légère perte de puissance due au désalignement du laser. (On pense que ces problèmes sont dus principalement aux SESAMs utilisés, qui sont d'une qualité moyenne et spécifiés pour travailler plutôt à 940 nm). De plus, la puissance moyenne obtenue 85 mW est assez décevante.

Ceci étant, en tant que premier élément du dispositif d'excitation de la fluorescence, cette source connaît certaines limitations rhédibitoires. Les problèmes majeurs résident dans la petite zone de stabilité de la cavité et dans la puissance de sortie qui est relativement faible. Dans ces conditions, augmenter la longueur de la cavité, et par conséquent augmenter les pertes, pour diminuer la cadence paraît plus que délicat. De plus, comme nous voulons exploiter le faisceau en sortie du laser pour générer de nouvelles longueurs d'ondes par effets non linéaires une puissance proche de 1W semble un minimum. Il nous faudrait donc gagner un facteur au moins 10 sur la puissance, ce qui est compliqué...

II.6 – Solution retenue, présentation de la source picoseconde basse cadence

Ces considérations nous amènent à revoir la solution que nous avons initialement choisie. L'utilisation d'une source impulsionnelle pompée par diode émettant autour de 900-950 nm ne présente pas les garanties escomptées, et le travail nécessaire pour atteindre les performances souhaitées semble considérable. Aussi, nous avons décidé d'utiliser une source laser (développée et améliorée durant ces dernières années au laboratoire) émettant à 1064 nm et qui a déjà été confrontée avec succès à la mesure de durée de vie de fluorescence. Nous la présentons ci-dessous.

Comme tous les lasers développés dans l'équipe, ce laser possède un milieu à gain solide (un cristal de Nd:YVO_4) et est pompé par diode. Le verrouillage des modes en phase était initialement obtenu grâce à un SESAM. La particularité de cet oscillateur est son faible taux de répétition. En effet, en développant une cavité multi-passage de 2m, dans laquelle le faisceau réalisait une cinquantaine d'allers et retours, mes prédécesseurs [Papadopoulos 2003] obtinrent une cadence extrêmement basse de 1,2 MHz, ce qui correspond à une longueur totale de cavité de 121 m. Les impulsions à 1064 nm avaient une largeur à mi-hauteur de 16,3 ps, et la puissance moyenne obtenue était de 470 mW. Ce laser fut utilisé à une cadence un peu plus élevée et plus optimale de 3,7 MHz (en réalisant moins d'allers et retours dans la cavité) pour mesurer des temps de vie de fluorescence pouvant aller jusqu'à 80 ns [Lévêque-Fort 2005]. Plus récemment, ce laser a encore été amélioré pour gagner en stabilité. Une technique originale de double verrouillage des modes en phase, basée sur l'utilisation à la fois d'un SESAM, mais aussi de la rotation de polarisation quadratique grâce à un cristal non linéaire [Couderc 1998], lui a conféré une stabilité encore plus grande [Gerhard 2006] (figure 2-19). Le lecteur intéressé pourra se reporter à l'article présentant précisément la source en annexe 3. Nous allons nous contenter ici de rapporter les principales caractéristiques de l'oscillateur.

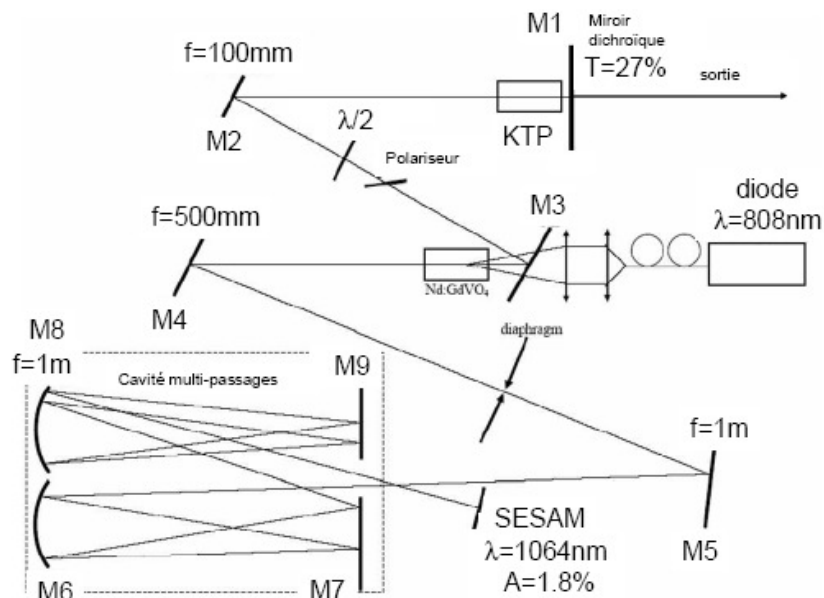


Figure 2-19 : schéma de la source ps basse cadence [Gerhard 2006].

Pour nos expériences, la source est utilisée avec un cristal Nd:YVO_4 de 10 mm de long dopé à 0,1% qui émet à 1064 nm. Le pompage optique est réalisé grâce à une diode fibrée de 400 μm de cœur, émettant une puissance de 30 W à 808 nm. Cet oscillateur délivre des trains d'impulsions de 15 ps à une cadence de 4 MHz. La puissance moyenne en sortie d'oscillateur est de 1,5 W, ce qui correspond à une énergie de 0,38 μJ par impulsion. Un amplificateur basé également sur un cristal de Nd:YVO_4 a été ajouté pour avoir accès à des énergies plus importantes. Il est constitué d'un cristal de 10 mm de long dopé à 0,1%, et pompé par une diode fibrée avec un cœur de 400 μm et délivrant une puissance pouvant atteindre 30 W (figure 2-20).

A la sortie de l'amplificateur, la puissance moyenne du faisceau infrarouge est de 4,5 W, correspondant à une puissance crête de 75 kW (soit 1,13 μJ par impulsion), avec une bonne qualité spatiale ($M^2 = 1,3$).

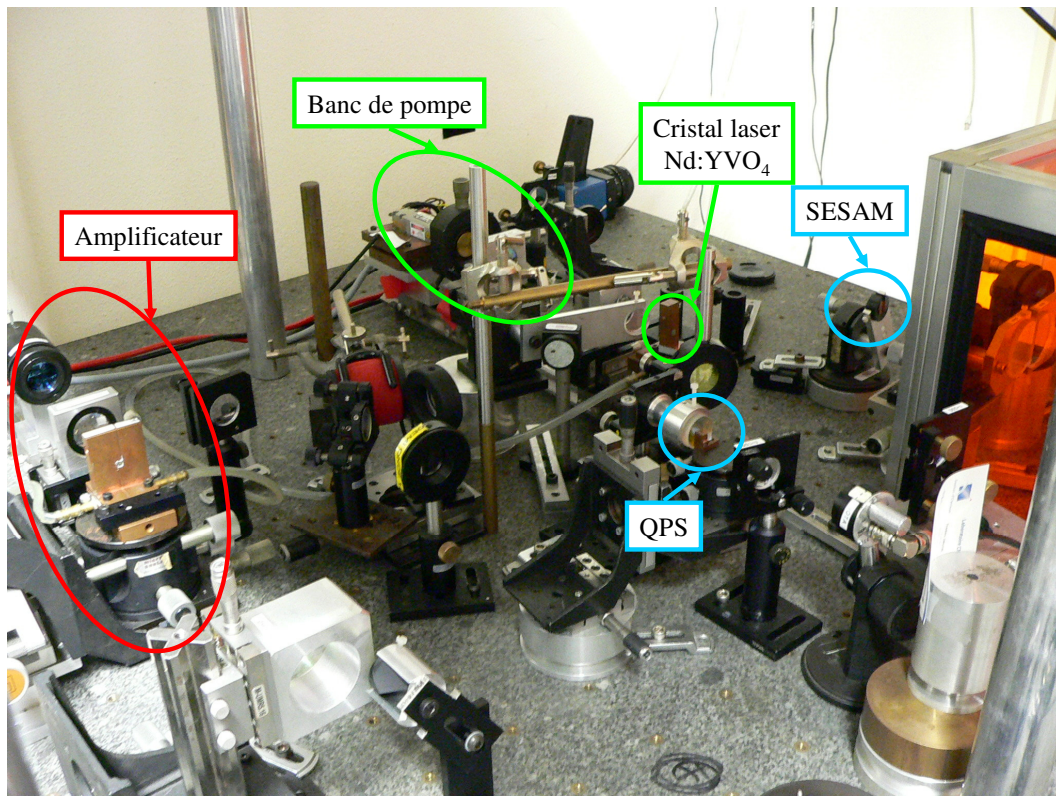


Figure 2-20: photographie du montage (laser et amplificateur). Dans la « cage » en plastique orange se trouve la cavité multi-passe. QPS (Quadratic Polarisation Switching) est l'association du cristal non linéaire et du miroir dichroïque pour réaliser le verrouillage de modes en phase.

Au final, cette source présente les caractéristiques temporelles que nous souhaitons (impulsions de 15 ps à une cadence de 4 MHz), en accord avec notre application. La puissance moyenne de sortie de l'oscillateur (1,5 W) est suffisante pour tenter d'élargir le spectre avec des effets non linéaires, sachant en plus que nous disposons d'un amplificateur, qui nous permet d'atteindre des puissances moyennes jusqu'à 4,5 W. Bien entendu, la longueur d'onde est plus élevée (1064 nm à la sortie, 532 nm après un éventuel doublage en fréquence), et par conséquent, il sera encore plus difficile d'atteindre les longueurs d'ondes les plus courtes du spectre visible. Mais la puissance disponible et la grande stabilité de cette source en font un candidat très intéressant pour étudier la génération de nouvelles longueurs d'onde dans les fibres optiques.

III – Génération de nouvelles longueurs d'onde par effets non linéaires dans les fibres

Nous nous sommes ensuite intéressés aux processus de création de nouvelles composantes spectrales dans les fibres optiques en silice pour élargir nettement le spectre de notre source. En utilisant le faisceau généré par la source ps basse cadence présentée ci-dessus comme faisceau de pompe, nous avons étudié l'élargissement spectral pour différentes fibres optiques et différentes longueurs d'onde d'injection. Nous rapportons dans ce chapitre les résultats les plus intéressants, obtenus avec des fibres microstructurées.

III.1 – Les effets non linéaires dans les fibres

La réponse de n'importe quel diélectrique à la lumière devient non linéaire pour des champs électromagnétiques intenses, et les fibres en silice ne font pas exception. D'un point de vue fondamental, l'origine de la réponse non linéaire est reliée au mouvement anharmonique des électrons liés sous l'influence du champ appliqué [Agrawal 1995].

Les fibres optiques sont très intéressantes pour générer de tels effets car, en confinant la lumière dans le cœur de la fibre, elles permettent de maintenir des intensités optiques importantes sur de grandes distances, ce qui entraîne une augmentation des effets non linéaires. D'une manière générale, ce qu'on appelle la génération de supercontinuum est l'élargissement spectral subie par une impulsion incidente de bande étroite pour produire une impulsion de sortie avec un spectre extrêmement large et continu.

De tels supercontinua ont été générés au cours de nombreuses expériences avec des conditions expérimentales très différentes (type de fibres, durée et énergie des impulsions, longueur d'onde d'injection,...). Aussi, il est difficile d'isoler la contribution des différents effets non linéaires (automodulation de phase, modulation de phase croisée, mélange à quatre ondes, instabilité de modulation, fission soliton, génération d'ondes dispersives, diffusion Raman), même si individuellement tous ces effets sont bien connus. Il existe effectivement une théorie solide basée sur les équations de propagation du champ (équation de Schrödinger non linéaire) qui est largement développée dans la littérature et qui permet d'étudier ces différents effets en détail [Agrawal 1995], [Banerjee 2004].

Notre propos ici n'est pas de nous lancer dans une analyse complexe et longue des différents effets non linéaires présents dans la fibre. Nous allons juste présenter de manière simple les principaux effets non linéaires responsables des premières étapes de l'élargissement spectral dans le régime ps qui nous intéresse, pour donner des pistes dans la compréhension des phénomènes observés lors des expériences que nous avons réalisées.

Dans une fibre optique « classique », la différence d'indice cœur-gaine relative est $\Delta = \frac{(n - n_g)}{n}$

avec n l'indice du cœur et n_g l'indice de la gaine. Classiquement, le cœur et la gaine sont deux cylindres de verre concentriques, et le guidage se fait par réflexion totale (voir chapitre 3) à l'interface cœur gaine. L'apparition des premières fibres microstructurées à la fin des années 1990 a ouvert de nouvelles perspectives [Knight 1996-97]. En introduisant des trous dans certaines parties de la fibre (cœur, gaine), il est possible de modifier considérablement les propriétés de guidage (figure 2-21).

Il existe différents types de fibres microstructurées,[Russell 2003] mais ce sont uniquement celles à cœur solide entouré d'une région de trous qui sont utilisées pour la génération de supercontinuum. Dans ce cas, l'indice effectif de la région centrale « pleine » est supérieur à celui de la région avec les trous, ce qui provoque un guidage par réflexion totale interne comme dans les fibres classiques (d'autres fibres PCF avec des cœurs creux par exemple ont un guidage qui se fait par bande photonique interdite). Les degrés de liberté offerts par la modification des trous (taille, pas) permettent, en modifiant Δ et la taille du cœur de créer des propriétés de guidage particulières.

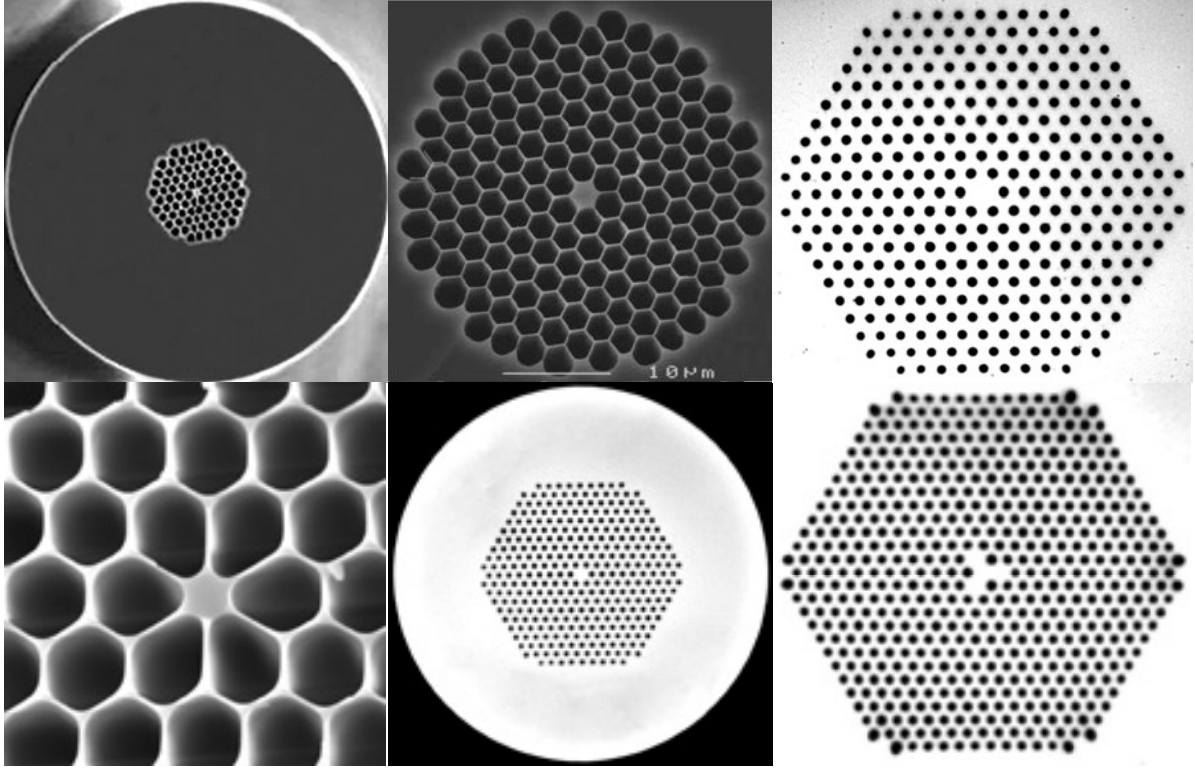


Figure 2- 21 : Photographies en microscopie électronique à balayage de fibres microstructurées utilisées pour la génération de supercontinuum [Crystal Fibre 2008].

Un paramètre essentiel dans la génération de supercontinuum par effets non linéaire est la dispersion. Ce paramètre D , relié à la dérivée seconde β_2 de la constante de propagation du mode par $D = \beta_2 \times \left(-\frac{2\pi c}{\lambda^2} \right)$ avec c la vitesse de propagation de la lumière dans le vide et λ la

longueur d'onde, et associé à la dispersion de vitesse de groupe, détermine les différences de temps de groupe des paquets de fréquences. En effet, ces derniers ne vont pas se propager à la même vitesse dans la fibre, l'indice effectif variant selon la longueur d'onde. Les propriétés du guidage vont être différentes suivant que la longueur d'onde étudiée est supérieure ou inférieure à λ_D , longueur d'onde de zéro dispersion pour laquelle $D = 0$. Nous allons nous intéresser ici au cas le plus simple d'une fibre avec une seule longueur d'onde d'annulation de la dispersion. Lorsque la longueur d'onde est inférieure à la longueur d'onde de zéro dispersion, la dispersion est négative, et nous nous situons dans un régime de dispersion normale. Dans ce régime, les fréquences les plus hautes (dites bleues) de l'impulsion voyagent plus lentement que les composantes de fréquences plus basses (dites rouges). Et c'est l'inverse dans le régime de dispersion anormale, pour lequel la longueur d'onde étudiée est supérieure à celle de zéro dispersion ; et dans ce cas la dispersion est positive. Ce dernier régime est d'un intérêt considérable pour l'étude des effets non linéaires puisqu'en dispersion anormale, les effets dispersifs et non linéaires peuvent se compenser, ce qui permet la propagation de solitons, qui sont des impulsions dont les enveloppes temporelle et spectrale ne sont pas modifiées au cours de la propagation [Agrawal 1995].

Dès lors, en modifiant la géométrie des trous, il est possible de changer la dispersion et de diminuer la longueur d'onde de zéro dispersion [Mogilevtsev 1998]. En travaillant sur la taille et la répartition des trous, l'aire effective du mode peut être réduite, et le rapport air/silice peut être considérablement augmenté. Ainsi, on peut améliorer le confinement et augmenter les non

linéarités de type Kerr [Broderick 1999]. Pendant la fabrication, il est également possible de créer de la biréfringence. Avec des fibres hautement biréfringentes, l'état de polarisation est préservé, ce qui augmente les interactions non linéaires, de telle sorte qu'une puissance plus faible est nécessaire pour élargir le spectre [Lehtonen 2003]. Mais l'influence de paramètres tels que la biréfringence ou le maintien de polarisation sur l'élargissement spectral est pour l'heure rarement étudiée. Ils compliquent encore plus les processus non linéaires, et dans ce cas il est impossible d'utiliser un modèle de propagation scalaire [Zhu 2004].

Les processus responsables des premières étapes de l'élargissement spectral sont très différents suivant le régime de dispersion (normale ou anormale) et la durée des impulsions [Dudley 2006], [Schreiber 2003].

Beaucoup de travaux ont été réalisés avec des impulsions femtosecondes. Avec de telles durées d'impulsion, en régime de dispersion normale l'élargissement est dominé par l'automodulation de phase, et en régime de dispersion anormale, la fission solitonique et les processus reliés jouent un rôle prépondérant [Coen 2001], [Coen 2002], [Dudley 2006]. L'automodulation de phase fait référence au décalage de phase auto-induit pendant la propagation à cause des modifications de l'indice provoquées par les puissances crêtes très importantes des impulsions femtosecondes (non linéarités Kerr). L'automodulation de phase est responsable, entre autres, de l'élargissement spectral symétrique des impulsions et de l'existence de solitons optiques dans le régime de dispersion anormale [Agrawal 1995].

Lorsque l'on travaille avec des impulsions plus longues (ps, ns,...), le spectre initial de chaque impulsion est beaucoup moins large, et par conséquent l'automodulation de phase apporte une contribution très faible à l'élargissement spectral global. Dans ces conditions, le supercontinuum résulte essentiellement de la génération directe de nouvelles composantes provenant de mélanges à quatre ondes ou de diffusions Raman stimulées, ainsi que d'un élargissement et d'une réunion de ces composantes spectrales [Coen 2001], [Seefeldt 2003], [Rulkov 2005], [Dudley 2006]. En effet, avec des impulsions ps, la fission solitonique (cassage de l'impulsion dans le domaine temporel en un train d'impulsions solitons fs) possède une longueur caractéristique bien plus grande que les deux processus précités, qui dominent donc les étapes initiales.

Le mélange à quatre ondes se manifeste lorsque deux photons de pompe de forte intensité sont couplés par la susceptibilité du troisième ordre $\chi^{(3)}$ pour générer un photon Stokes, et un photon anti-Stokes. Cet effet non linéaire est élastique, c'est-à-dire qu'aucune énergie n'est échangée entre le champ électromagnétique et le milieu diélectrique. Il fait partie des effets non linéaires de plus bas ordre (car c'est $\chi^{(3)}$ qui en est responsable, comme pour les phénomènes de réfraction non linéaire tels que l'auto modulation de phase ou la modulation de phase croisée) [Agrawal 1995].

Les décalages de fréquence du mélange à quatre ondes sont déterminés par des conditions d'accord de phase et de gain qui dépendent du profil de dispersion et donc de la géométrie optique de la fibre [Baldeck 1987]. En régime de dispersion anormale, la bande de gain est plus large (figure 2-22). Si le décalage en fréquence entre les ondes est trop important, une différence conséquente de vitesses de groupe (« walkoff ») des ondes amplifiées va rapidement apparaître à cause de la dispersion. Dès lors il n'y a plus de recouvrement temporel des différentes impulsions et donc pas de transfert d'énergie possible. Cependant, ce problème peut en partie être résolu en privilégiant des processus d'accord de phase multimodaux [Dudley 2002].

Dans le cas du mélange à quatre ondes qui va nous intéresser par la suite, les deux ondes de pompe ont la même fréquence, qui est celle du laser d'injection (cas dégénéré). Cette pompe est convertie en une paire de bandes latérales paramétriques, l'une décalée vers les plus grandes

longueurs d'ondes (Stokes) et l'autre vers les plus courtes (anti-Stokes). Le grossissement de ces bandes latérales se fait pour des fréquences satisfaisant la condition d'accord de phase et démarre sur du bruit généré par l'instabilité de modulation de la source.

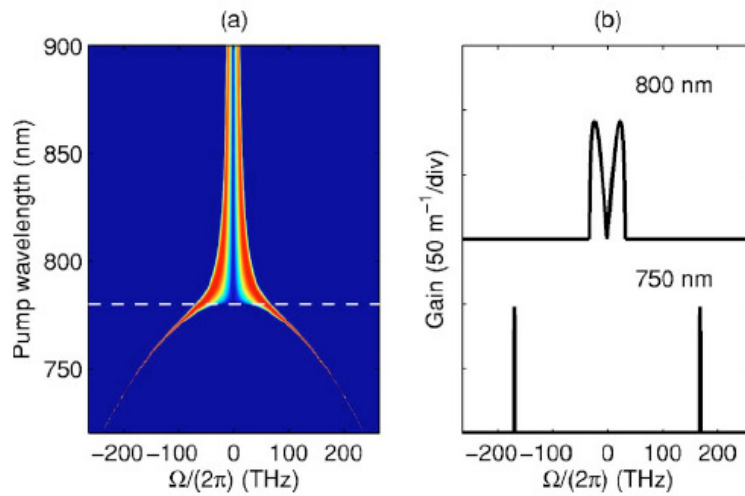


Figure 2-22 : Exemple de gain paramétrique du mélange à quatre ondes en fonction du décalage en fréquence $\Omega/(2\pi)$ par rapport à la fréquence de pompe pour une fibre donnée [Dudley 2006]. (a) Représentation linéaire pour différentes longueurs d'onde de pompe. (b) Courbes du gain pour deux longueurs d'onde particulières. La courbe pointillée représente la longueur d'onde de zéro dispersion de la fibre (780 nm), et les calculs supposent une puissance crête de pompe de 500W.

L'effet Raman quant à lui est un phénomène de diffusion inélastique stimulée : le champ optique transfère une partie de son énergie au milieu. Nous pouvons tenter d'expliquer cet effet de manière simple : un photon incident est annihilé pour créer un photon Stokes et un phonon avec une énergie et un moment correct pour qu'il y ait conservation globale de l'énergie et du moment. Bien sur, un photon de plus haute énergie à la fréquence anti-Stokes peut aussi être créé si un phonon avec la bonne énergie et le bon moment est disponible. Le décalage entre le photon incident et le photon créé dépend du matériau siège de ce processus. Dans le cas de la silice, ce décalage est de 13 THz [Agrawal 1995].

L'effet Raman se manifeste concrètement par une amplification de bandes latérales à partir du bruit. L'onde Stokes créée est amplifiée en se copropageant avec la pompe, puis ensuite, à condition que les intensités atteignent le seuil imposé par ce processus, il peut y avoir un effet cascade. Il est important de noter que le gain Raman est fortement asymétrique et crée très majoritairement des fréquences Stokes.

Si on compare le rôle de ces deux effets dans la génération d'un supercontinuum en régime picoseconde, on s'aperçoit que le gain Raman maximal est plus petit que le gain pour le mélange à quatre ondes. Ainsi on peut observer la signature d'une cascade Raman discrète uniquement quand l'efficacité du mélange à quatre ondes est réduite. Ceci est illustré sur la figure 2-23. Le gain paramétrique de la fibre étudiée est celui de la figure 2-22. A une longueur d'onde de pompe de 700 nm, le gain du mélange à quatre ondes est faible et le décalage en fréquences des ondes vérifiant l'accord de phase est trop important pour avoir un effet efficace. Par conséquent on aperçoit un élargissement spectral obtenu par cascade Raman. Pour une longueur d'onde de pompe de 750 nm, le gain du mélange à quatre ondes est supérieur au gain Raman, et donc les premières étapes de l'élargissement spectral sont dominées par le mélange à quatre ondes.

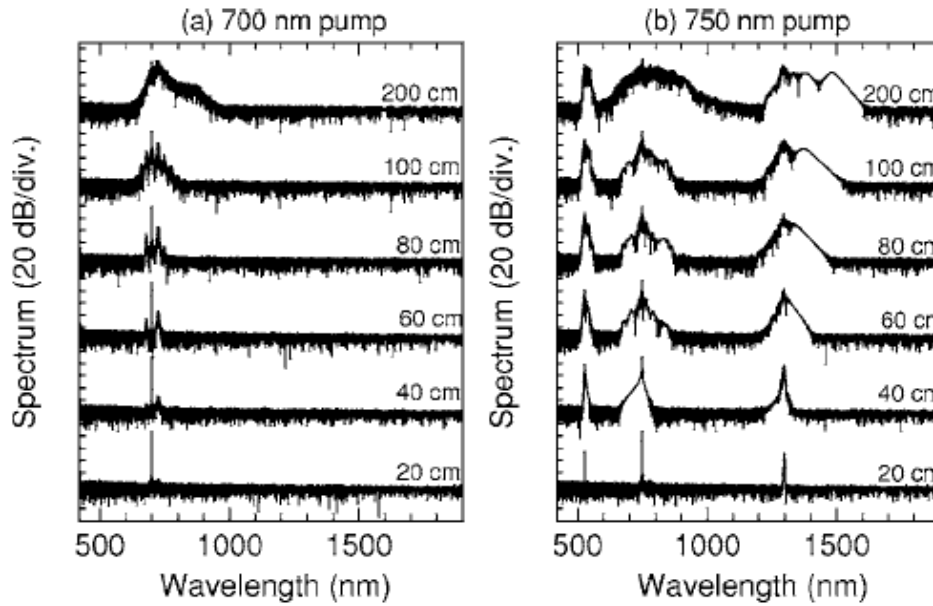


Figure 2-23: résultats de simulations numériques montrant l'évolution spectrale à différentes distances de propagation pour différentes longueurs d'onde de pompe [Dudley 2006]. La fibre utilisée est la même que dans la figure précédente. L'impulsion incidente a une puissance de 500 W et une durée de 20 ps.

III.2 – Montage expérimental

Pour cette étude, nous utilisons le laser qui a été présenté à la fin du paragraphe II. Rappelons juste que cet oscillateur délivre des trains d'impulsions de 15 ps à une cadence de 4 MHz et à une longueur d'onde de 1064 nm. En utilisant l'amplificateur, nous disposons au final d'une puissance moyenne de 4,5 W en sortie de cette source.

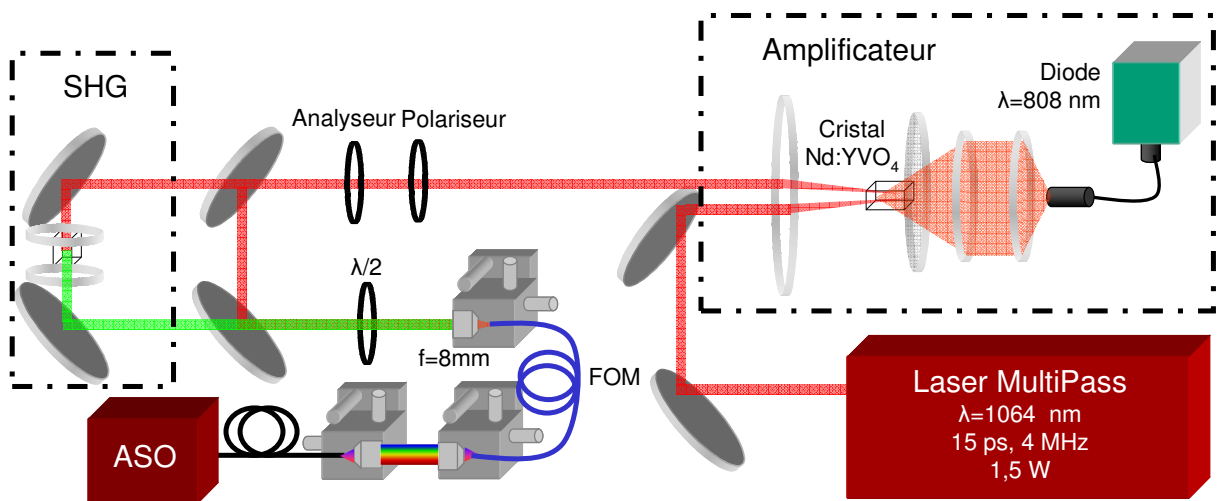


Figure 2-24: schéma du montage. FOM représente la fibre optique, ASO l'analyseur de spectre optique. SHG est le module de génération de seconde harmonique. Une lentille permet de focaliser dans le cristal non linéaire (KTP) le faisceau à 1064 nm, et une seconde lentille permet de focaliser le faisceau doublé à 532 nm.

Nous ajustons la puissance focalisée sur l'entrée de la fibre en changeant l'orientation relative d'un polariseur et d'un analyseur placés dans le trajet optique. De plus, nous avons placé pour certaines expériences un cristal non linéaire de KTP pour faire de la génération de seconde harmonique et ainsi injecter dans la fibre un faisceau à 532 nm. Une lame demi-onde est utilisée juste avant l'injection dans la fibre pour contrôler l'état de polarisation du faisceau incident. L'injection dans la fibre est réalisée grâce à une lentille asphérique de focale 8 mm et à l'aide d'un bloc d'injection (la lentille est fixée sur le bloc et trois translations fines nous permettent de placer précisément la face d'entrée de la fibre au point de focalisation). Un analyseur de spectre optique est utilisé pour mesurer le spectre en sortie de la fibre. Cet analyseur a une précision de 1 nm et travaille sur la gamme spectrale 350-1750 nm (montage schématisé figure 2-24 et photographié figure 2-25).

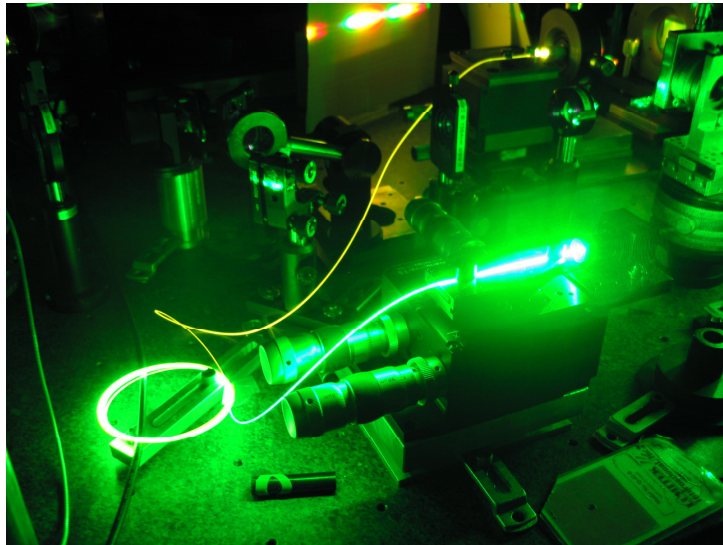
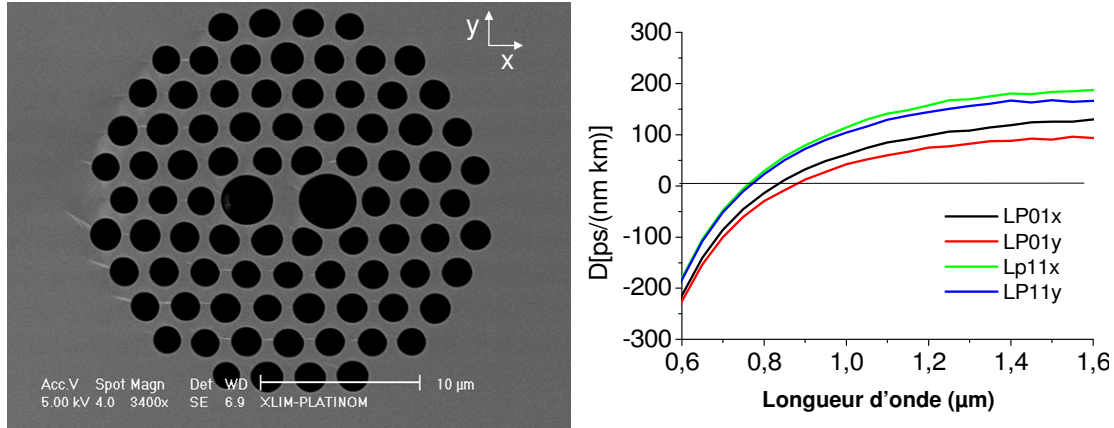


Figure 2-25 : photographie du montage pour une injection à 532 nm.

III.3 – Fibre microstructurée du XLim

Après des essais décevants avec des fibres commerciales (« classique » et microstructurée, voir annexe 4), nous avons décidé d'utiliser des fibres plus originales hautement non linéaires, susceptibles d'élargir spectralement de manière très importante les impulsions délivrées par notre source. C'est pourquoi, nous avons travaillé avec Christelle Lesvigne, Philippe Leproux, Alessandro Tonello et Vincent Couderc du département Photonique du laboratoire XLIM de Limoges. Cette équipe, spécialiste des fibres microstructurées, travaille sur la conception de fibre avec des géométries de cœur particulières. Ces géométries doivent permettre de comprendre les mécanismes responsables de l'élargissement spectral dans les différents régimes de dispersion (normale ou anormale) et les différents régimes temporels (ns, ps, fs), en favorisant certains effets non linéaires. En effet, le haut degré de liberté dont disposent les concepteurs dans la géométrie des trous permet une ingénierie du profil de dispersion. Ainsi, en dessinant de manière adéquate la structure air/silice du cœur de la fibre, il est possible de modifier les conditions d'accords de phase de certains processus (comme le mélange à quatre ondes). Les fibres, conçues par cette équipe, étaient testées en régime nanoseconde à Limoges, et nous les testons pour la première fois en régime picoseconde, avec la source présentée précédemment adaptée à la microscopie de fluorescence résolue en temps.

Dans la plupart des expériences de génération de supercontinuum, le but est d'obtenir le spectre le plus large et le plus plat possible en sortie. Dans cette étude, la philosophie est différente : il s'agit d'utiliser un processus non linéaire particulier (le mélange à quatre ondes intermodal) dans une fibre optique microstructurée hautement biréfringente. Cette fibre va permettre de dessiner différemment les contours spectraux du supercontinuum tout en conservant une polarisation linéaire. Le mélange à quatre ondes intermodal va générer un pic à une certaine longueur d'onde visible (définie par la condition d'accord de phase imposée par la géométrie de la fibre, et donc par le concepteur), puis la combinaison des différents effets non linéaires va permettre d'élargir ce pic en une bande spectrale plus large autour de cette longueur d'onde d'intérêt.



La fibre microstructurée utilisée pour nos expériences a été entièrement caractérisée à Limoges, et nous rapportons ici ses principaux paramètres. Une image en microscopie électronique à balayage de la structure transverse de cette fibre est présentée figure 2-26. La gaine est composée d'une structure triangulaire de trous avec un diamètre moyen $d=1,85 \mu\text{m}$ et un pas $\Lambda=2,6 \mu\text{m}$, ce qui correspond à un taux de remplissage d'air de $d/\Lambda=0,71$. Le cœur solide est encadré par deux grands trous de diamètres $3,3 \mu\text{m}$ et $3,6 \mu\text{m}$. Ces trous cassent la symétrie de la fibre et induisent une forte biréfringence. Pour le mode fondamental à 1064 nm , les biréfringences de phase (définie par $B_\phi = n_x - n_y$) et de groupe (définie par $B_G = n_{gx} - n_{gy}$, où n_{gx} et n_{gy} sont les indices de groupe suivant les deux polarisations x et y) valent respectivement $B_\phi = 2 \times 10^{-3}$ et $B_G = -3 \times 10^{-3}$. A cette longueur d'onde, l'aire effective du mode fondamental est estimée à $5,3 \mu\text{m}^2$ et seuls quatre modes de cœur distincts et linéairement polarisés (modes LP_{01x} , LP_{01y} , LP_{11x} , LP_{11y}) peuvent être guidés. Une simulation numérique a été réalisée pour obtenir les coefficients de dispersion des modes guidés (figure 2-26 à droite). Les longueurs d'onde de zéro dispersion du mode LP_{01} sont égales à 827 nm pour une polarisation suivant l'axe x, et à 866 nm pour une polarisation suivant l'axe y. Les zéros dispersion des modes LP_{11x} et LP_{11y} se situent respectivement à 757 nm et 764 nm . Par conséquent, tous les modes guidés à une longueur d'onde de pompe de 1064 nm se propagent dans un régime de dispersion largement anormale.

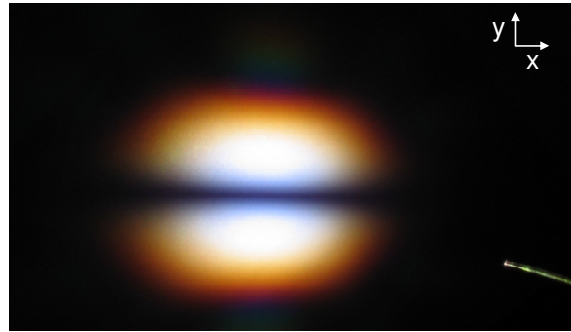


Figure 2-27 : photographie du faisceau en sortie de la fibre.

III.4 – Elargissements spectraux obtenus expérimentalement

Nous réalisons une première série d'expériences avec une longueur de fibre de 1,4 m. Une telle longueur a un double intérêt : d'une part elle n'est pas trop longue, pour nous permettre de bien identifier les pics correspondants aux nouvelles composantes spectrales générées par le mélange à quatre ondes. D'autre part, sa longueur est suffisante pour aussi nous permettre de voir évoluer ces pics fins en spectres larges autour des pics du mélange à quatre ondes. Pour identifier clairement les phénomènes non linéaires responsables de cet élargissement, nous étudions les spectres générés dans cette fibre suivant différentes polarisations incidentes et puissances d'injection.

Tous les résultats sont obtenus avec une efficacité de couplage entre 8% et 10%, ce qui est faible mais représentatif de l'efficacité que l'on peut espérer obtenir avec cette fibre microstructurée. Dans les meilleures conditions de couplage, une puissance crête maximale de 2,15 kW peut être injectée dans la fibre.

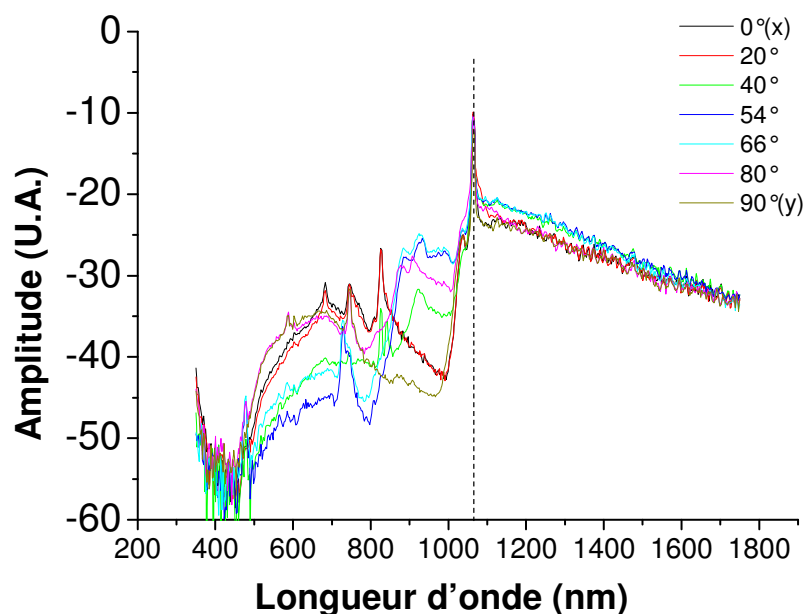


Figure 2-28 : spectres (en dB) générés dans la fibre de 1,4 m en fonction de la polarisation incidente pour une puissance moyenne couplée de 120 mW (le trait vertical en pointillés signale la longueur d'onde de pompe). (La remontée en-dessous de 400 nm correspond à un artefact de mesure.)

Comme on peut le voir sur le spectre de la figure 2-28, la partie infrarouge (1100-1800 nm) du supercontinuum ne semble pas particulièrement influencée par l'état de polarisation du faisceau incident. Pour des puissances couplées dans la fibre supérieures à 50 mW, un continuum plat et lisse couvrant un spectre de 1 μm à plus de 1,75 μm est généré. Puisque cette génération est indépendante de la polarisation, ce résultat peut être interprété en termes de fission solitonique d'ordre supérieur associé à de la diffusion Raman en régime de dispersion anormale. Ces processus ne nécessitent pas d'accord de phase.

Par contre, la partie visible (400-1064 nm) du supercontinuum dépend fortement de la polarisation. Ceci est également mis en évidence sur la figure 2-29, où les modes fuyants de la gaine ont des longueurs d'onde très différentes suivant la polarisation. On peut remarquer que le nombre de pics dans le spectre et leur longueur d'onde change d'une polarisation à l'autre. Les spectres ainsi obtenus sont nettement différents de ceux obtenus avec cette même fibre en régime nanoseconde [Lesvigne 2007].

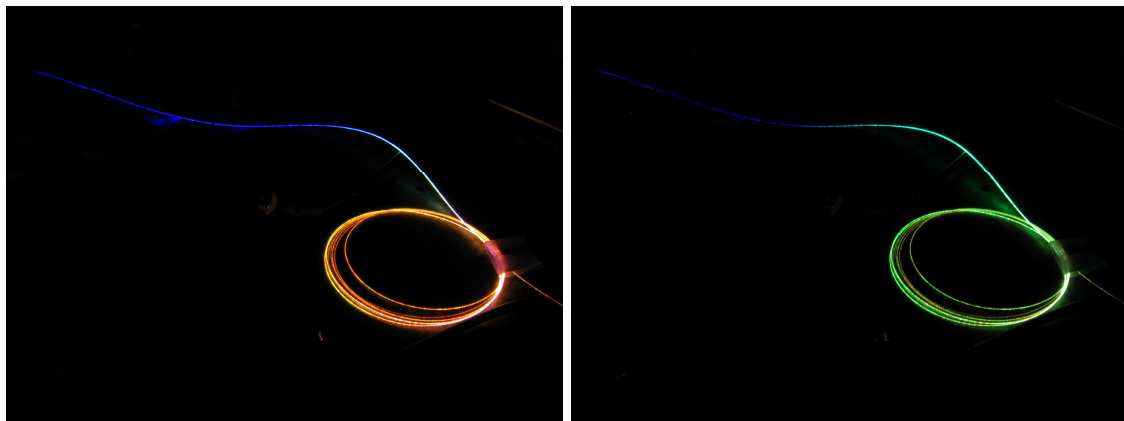


Figure 2-29 : photographie de la fibre pour deux polarisations incidentes différentes (injection à 1064 nm). Les pertes dans la gaine ne sont pas forcément représentatives du spectre final obtenu, mais les variations de couleurs témoignent bien des différences de processus suivant la polarisation.

Pour analyser les processus responsables de l'élargissement spectral et l'ordre d'apparition des différentes composantes, nous avons observé les spectres générés pour des polarisations du faisceau incident suivant les axes x et y en fonction de la puissance couplée. Avec un état de polarisation parallèle à l'axe y de la fibre, (figure 2-30, à gauche), un premier pic à 746 nm apparaît pour une puissance couplée de 90 mW. Cette bande latérale correspond à la radiation anti-Stokes générée par un processus de mélange à quatre ondes avec une pompe divisée en deux modes guidées et polarisées suivant l'axe y [Lesvigne 2007]. La radiation Stokes correspondante devrait se situer à 1854 nm, mais nous ne pouvons pas la détecter avec notre analyseur de spectre.

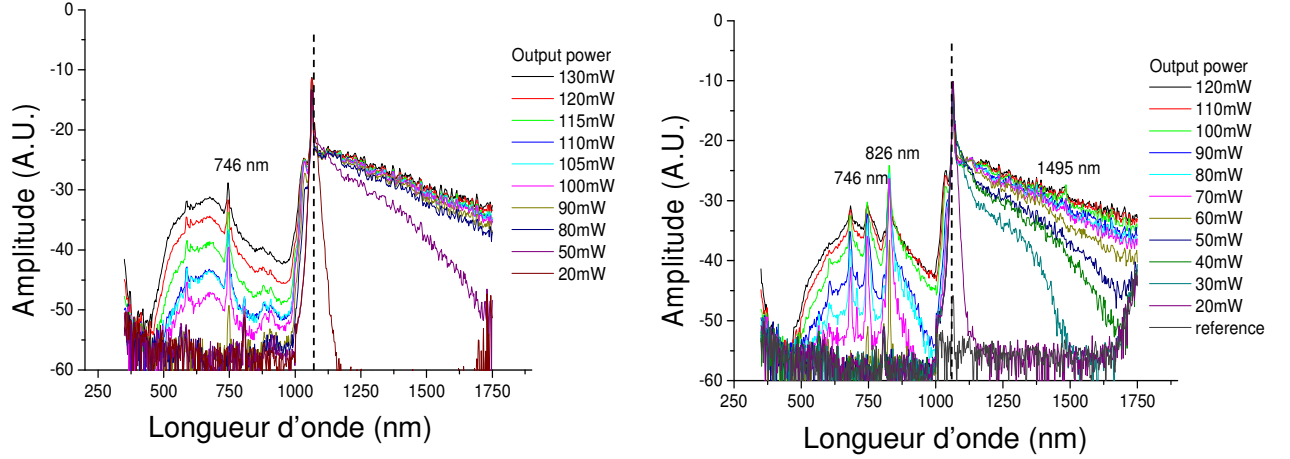


Figure 2-30 : spectres (en dB) générés dans la fibre microstructurée de 1,4 m en fonction de la puissance moyenne couplée pour une polarisation suivant l'axe y (à gauche) et suivant l'axe x (à droite).

Nous vérifions aussi expérimentalement que, comme le prévoit la condition d'accord de phase pour ce processus ($k_{P,01} + k_{P,11} - k_{S,01} - k_{A,11} = 0$ où P identifie le vecteur d'onde de pompe, S le vecteur d'onde Stokes et A le vecteur d'onde anti-Stokes), les longueurs d'onde visibles se propagent dans le mode LP_{11} et la partie infrarouge dans le mode LP_{01} . Pour ce faire, nous plaçons une fente étroite parallèlement à la direction y en sortie de la fibre, et un réseau diffractif, puis nous imageons la figure de diffraction sur une caméra. Cette figure nous informe sur la répartition spatiale pour chaque longueur d'onde (figure 2-31). Nous voyons nettement que dans la partie visible, le faisceau est monomode LP_{11} et que dans la partie infrarouge (IR), le faisceau est également monomode mais cette fois LP_{01} .

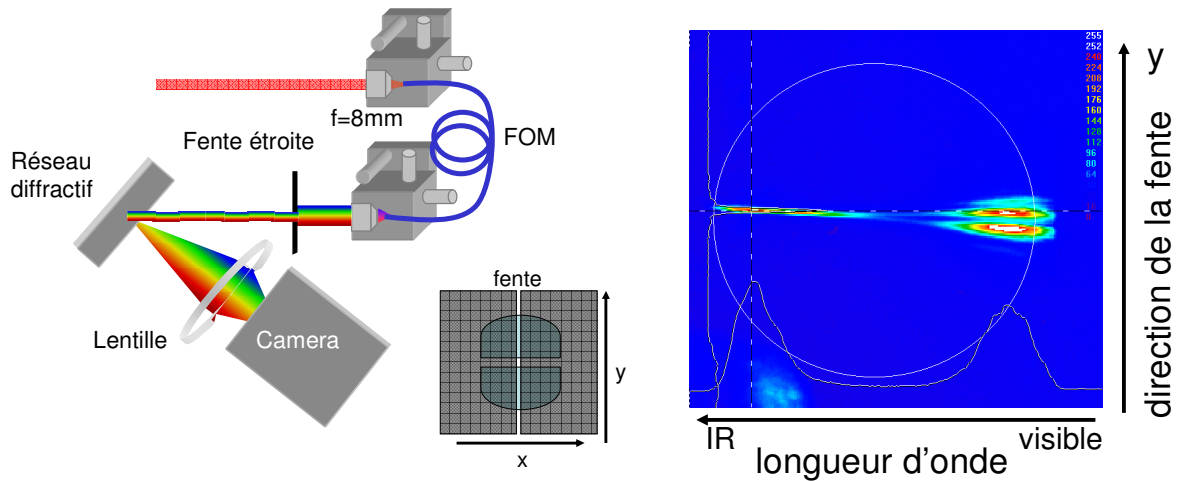


Figure 2-31 : à gauche, schéma du montage, représentant l'orientation de la fente par rapport au faisceau de sortie de la fibre ; la lentille permet d'imager la fente dans le plan du détecteur ; à droite, figure de diffraction par le réseau obtenue sur la caméra.

Pour des puissances plus importantes, le pic à 746 nm s'élargit, et d'autres composantes spectrales deviennent prépondérantes, qui correspondent sans doute à des interactions plus complexes comme une combinaison de mélange à quatre ondes modal, de mélanges à quatre ondes vectoriel et de modulation de phase croisée.

Un tel spectre chahuté avec de nombreux pics est encore plus clairement visible dans le cas d'un faisceau de pompe polarisé suivant l'axe x de la fibre (figure 2-30 à droite). Un pic important à 826 nm et un plus petit à 746 nm apparaissent à partir d'une puissance moyenne couplée de 60

mW. Le pic à 826 nm correspond à l'onde anti-Stokes du mélange à quatre ondes bimodal suivant l'axe x. Dans ce cas, nous pouvons distinguer le pic Stokes correspondant à une longueur d'onde de 1495 nm.

Avec cette même fibre, nous injectons le rayonnement à 532 nm (et uniquement cette longueur d'onde) après doublage en fréquence du faisceau à 1064 nm. Nous voulons regarder deux choses : d'une part si on peut générer des longueurs d'ondes plus courtes que 532 nm (par décalage anti-Stokes), et d'autre part si, par des décalages Raman successifs, il est possible d'atteindre le régime de dispersion anormale et observer ainsi d'autres phénomènes non linéaires. Pour une polarisation incidente suivant x, les spectres obtenus sont rapportés figure 2-32. L'efficacité de couplage à cette longueur d'onde est plus faible (environ 3%), et nous couplons au mieux une puissance moyenne de 50 mW.

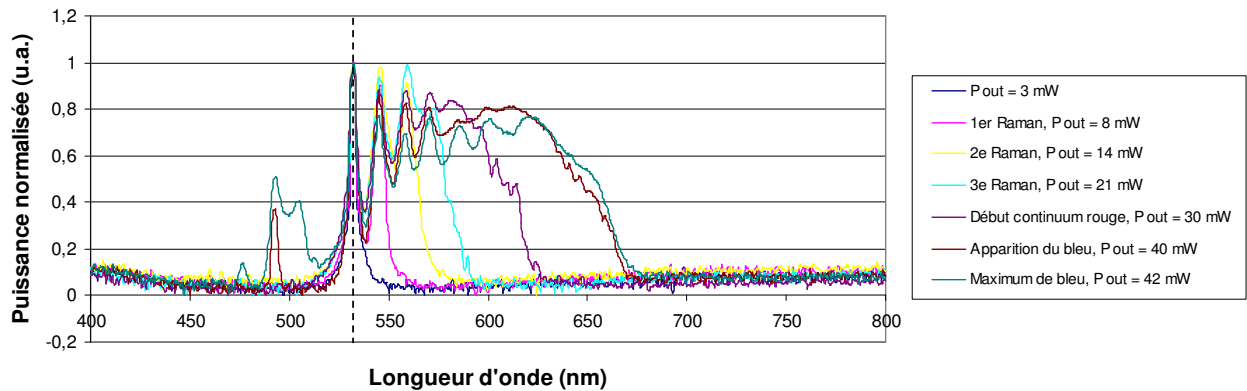


Figure 2-32 : spectres (en dB) obtenus en injectant le faisceau à 532 nm. Chacun des spectres rapportés correspond à un évènement non linéaire significatif qui élargit le spectre.

En suivant l'élargissement spectral en fonction de la puissance incidente, nous voyons apparaître les différents pics dus à l'effet Raman, mais malheureusement, nous n'atteignons pas les régimes de dispersion anormale et il y a très peu de conversion vers les longueurs d'ondes plus basses. Le travail à cette longueur d'onde avec cette fibre n'est pas concluant. Dans la suite, nous nous focalisons donc sur un faisceau de pompe à 1064 nm.

Pour tenter d'élargir le supercontinuum vers les longueurs d'onde plus courtes et de lisser le spectre, nous utilisons une fibre avec la même structure mais plus longue : 4 m. La figure 2-33 représente les spectres polarisés suivant les axes de la fibre x et y pour une puissance moyenne couplée de 350 mW à 1064 nm. Lorsque la polarisation est suivant l'axe y, le spectre visible est, comme prévu, plus plat et descend jusqu'à 470 nm. On peut également apercevoir sur le spectre le pic anti-Stokes à 746 nm. Dans ce cas, le spectre apparaît plat (en dB) de 600 nm à 1000 nm. Pour une polarisation suivant l'axe x, le spectre présente toujours plus de pics (le pic anti-Stokes à 826 nm, mais aussi des pics secondaires à 924 et 746 nm) et est moins intense dans les plus courtes longueurs d'ondes.

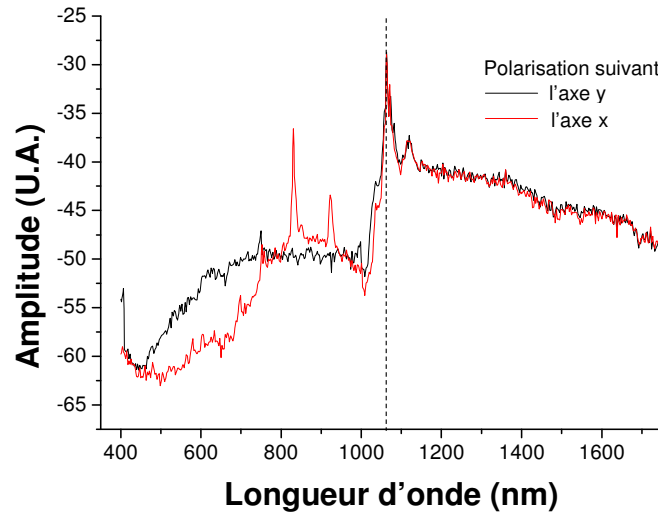


Figure 2-33 : spectres générés dans la fibre microstructurée de 4 m pour les deux polarisations orthogonales.

Dans tous les résultats présentés précédemment, la partie visible du continuum se trouve dans un mode LP_{11} . Mais en jouant sur le couplage et en excitant simultanément les modes LP_{01} et LP_{11} à 1064 nm, nous avons montré qu'il est possible pour certaines polarisations d'obtenir un supercontinuum visible uniquement sur le mode LP_{01} (figure 2-34).

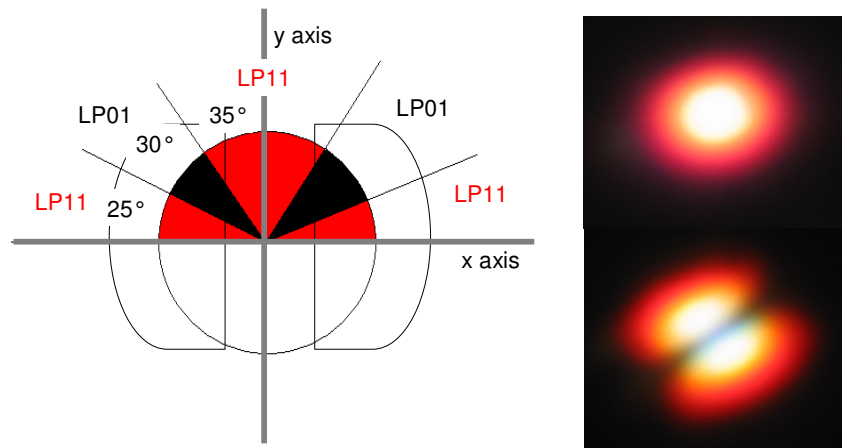


Figure 2-34 : schéma indiquant le mode de la partie visible du spectre suivant la polarisation incidente et photographies du faisceau de sortie de la fibre pour deux polarisations incidentes différentes.

Quand la polarisation incidente est suivant un des deux axes principaux de la fibre, la partie visible est toujours dans le mode LP_{11} . Mais avec une polarisation proche de 45° par rapport aux axes principaux, nous obtenons un continuum sur le mode LP_{01} , avec des densités spectrales de puissances très diverses (figure 2-35). De plus, nous avons distinctement observé que ce mode de génération de supercontinuum visible dépend fortement des conditions d'injection et qu'il est possible de passer d'un mode à l'autre en modifiant spatialement l'injection dans la fibre, par une petite translation dans le plan de focalisation de la lentille qui sert à injecter (le diamètre du mode à mi-hauteur en intensité est égal à $2,1 \mu\text{m}$ pour cette fibre).

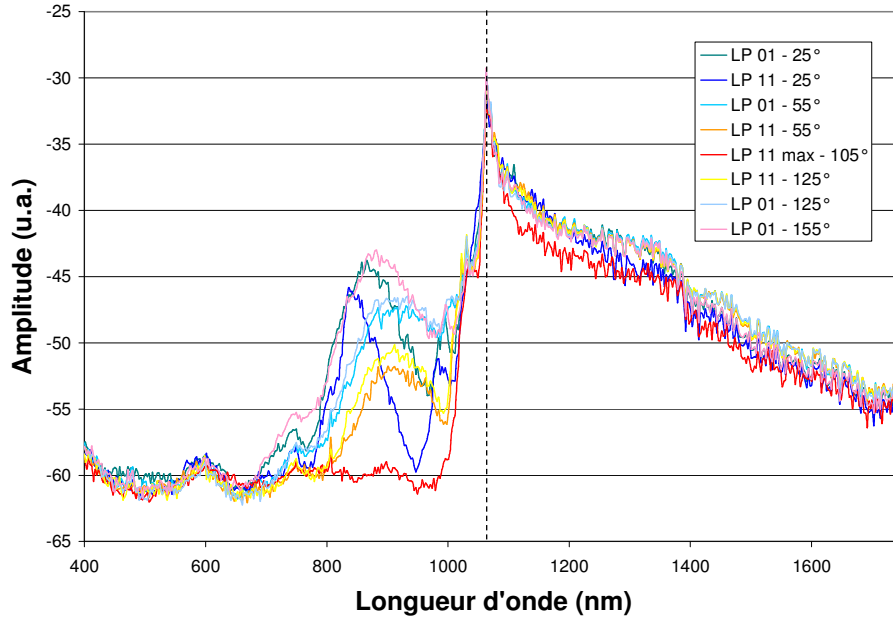


Figure 2-35 : spectres obtenus pour différentes polarisations incidentes. Le mode de la partie visible du supercontinuum et l'angle de la polarisation incidente figurent dans la légende.

Il semble par conséquent possible de générer un continuum visible dans le mode LP01, en couplant les deux polarisations (injection à 45° des axes principaux) et les deux modes (LP01 et LP11). Mais dans ces conditions, il est encore plus difficile d'appréhender la contribution respective des différents effets non linéaires et notamment des mélanges à quatre ondes modal et vectoriel.

III.5 – Conclusion

Ces expériences montrent clairement qu'avec ce type de fibres fortement biréfringentes il est possible de générer des supercontinua visibles extrêmement intéressants. Néanmoins, le spectre, la polarisation incidente et le profil spatial du supercontinuum sont fortement corrélés, ce qui semble être une limitation pour l'utilisation d'une telle source en microscopie. L'élargissement spectral observé en régime ps est commandé par les longueurs d'onde générées par le processus de mélange à quatre ondes avec dépendance modale. Ces longueurs d'ondes dépendent seulement des conditions d'accord de phase consécutive à la géométrie de la fibre. Ainsi, par une ingénierie précise de la fibre, il serait possible, en principe, de générer de manière sélective des longueurs d'ondes particulières, correspondant, par exemple, spécifiquement à des bandes d'absorption de fluorophores. Et s'il était possible de faire correspondre le pic anti-Stokes avec la longueur d'onde de zéro dispersion, l'élargissement spectral autour de ce pic serait amplifié et nous aurions accès à une bande large et plate dans la région désirée.

Les résultats obtenus sont donc très encourageants, mais on s'aperçoit de la grande complexité de ces élargissements spectraux causés par les processus non linéaires. Les travaux présentés dans cette partie du manuscrit apportent une avancée intéressante dans la compréhension de la génération de supercontinua en régime ps dans les fibres hautement biréfringentes, ce qui a permis de les publier [Blandin 2008]. Nous tenons d'ailleurs ici à remercier Vincent Couderc et toute son équipe, qui nous ont non seulement fourni les fibres pour les expériences, mais avec

qui nous avons aussi eu beaucoup de discussions fructueuses sur les processus en jeu dans la génération des supercontinua.

Cependant, même si nous avons beaucoup progressé sur la compréhension des supercontinua dans ces fibres très biréfringentes, le travail pour obtenir une source utilisable en microscopie, (c'est-à-dire stable, avec des spectres adaptés aux fluorophores et un profil LP_{01}), reste particulièrement conséquent. Ici encore nous sommes obligés de nous interroger sur l'orientation à suivre pour poursuivre notre développement.

Un aperçu de l'état de l'art confirme que la génération de spectre large couvrant une grande partie du domaine visible est un sujet de recherche brûlant et d'un intérêt considérable pour de nombreuses applications, notamment en biophotonique. Nous avons d'ailleurs découvert qu'à la même période, une société spécialisée dans les technologies laser à fibre (la société Fianium) a développé un produit commercial, basé sur une architecture comparable à celle que nous proposons. Cette source est composée d'un laser délivrant des impulsions ps à relativement basse cadence émettant dans l'infrarouge, qui est injecté dans une fibre microstructurée pour élargir le spectre. Les performances annoncées (impulsions ps à 20 MHz, couvrant un spectre de 460 nm à 2500 nm) sont intéressantes, et surtout une telle source est vendue clés en mains et garantie, ce qui nous assure (normalement) un fonctionnement performant. Or le but de ce travail de thèse n'étant pas l'étude de la génération de supercontinuum en soi, mais le développement instrumental pour faire de la microscopie de fluorescence résolue en temps, nous avons décidé d'acheter une telle source pour pouvoir avancer le développement du microscope TIRF résolu en temps, et nous intéresser de près aux applications biomédicales.

IV – Présentation et caractérisation de la source commerciale

Cette source supercontinuum commerciale a été acquise pour être utilisée sur le montage de microscopie pour faire de l'imagerie de fluorescence résolue en temps. Par conséquent, il est pour nous essentiel de bien connaître le fonctionnement de cette source et ses performances effectives. D'un point de vue spectral, nous devons vérifier que le spectre est bien large, et qu'en utilisant juste un filtre pour sélectionner la gamme de longueurs d'onde pour l'excitation, nous disposons bien d'une puissance suffisante pour exciter des fluorophores. D'un point de vue temporel, nous devons nous assurer que le train d'impulsions délivré permet de réaliser la mesure de temps de vie de fluorescence. Cette partie est donc consacrée à la présentation et à la caractérisation de cette source.

IV.1 – Présentation de la source

La source Fianium SC 450 est composée d'un oscillateur à fibre émettant des impulsions ps dans l'infrarouge, suivi d'un amplificateur à fibre dopée, puis d'une fibre hautement non linéaire qui permet de générer le supercontinuum (figure 2-36).

L'oscillateur « maître » est un laser à fibre à verrouillage des modes en phase passif, basé sur une fibre dopée avec des ions ytterbium. Ce laser délivre des impulsions d'approximativement 4 ps à une cadence de 15 MHz (20 MHz dans le catalogue mais nous avons demandé la cadence la plus basse possible) et à 1064 nm. L'amplificateur haute puissance est également basé sur une fibre dopée aux ions ytterbium, mais cette fois avec une géométrie double gaine. Le pompage est réalisé par un module de diode laser de pompe multi-émetteur. La génération du supercontinuum est ensuite réalisée grâce à une fibre optique hautement non-linéaire, dont les caractéristiques (longueur, dispersion,...) sont adaptées à la source fibrée picoseconde haute puissance, mais sont gardées secrètes par Fianium. Nous retrouvons bien ici une architecture comparable à celle que nous avons imaginée.

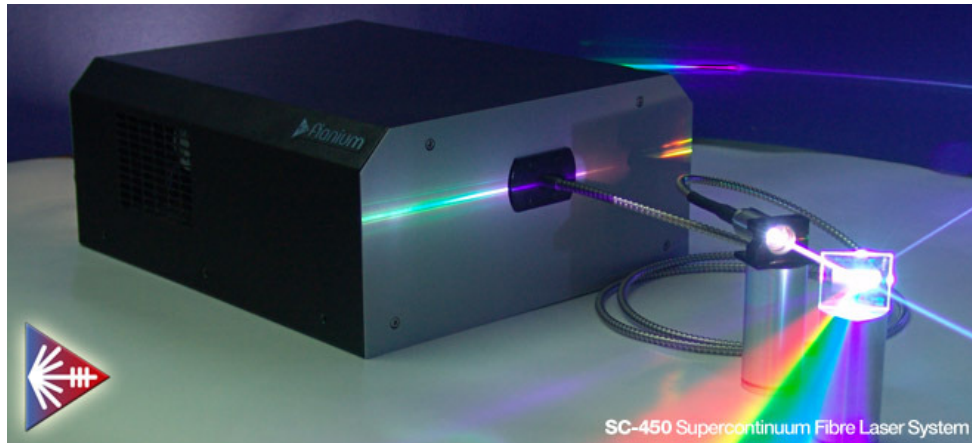


Figure 2-36 : photographie de la source Fianium SC 450 [Fianium 2008].

Peu de réglages sont accessibles sur cette source : l'utilisateur peut mettre en route l'oscillateur, et le potentiomètre lui permet d'ajuster la puissance des diodes de pompe de l'amplificateur. A la mise en route de l'oscillateur, un faisceau infrarouge de faible puissance sort de la fibre, puis lorsque l'on augmente la puissance des diodes de pompe, l'énergie des impulsions augmente progressivement. Ceci se traduit visuellement par une arrivée progressive des différentes composantes spectrales du supercontinuum. Le faisceau devient rouge, puis le jaune apparaît, le vert, et pour les puissances les plus élevées, le bleu donne un aspect vraiment blanc au faisceau de sortie.

Les caractéristiques de cette source fournies par le constructeur figurent dans le tableau 2-2 :

Bien entendu, nous ne pouvons nous satisfaire de ces données, et il est indispensable de vérifier plusieurs choses :

- spectralement, le constructeur garantit une bande de 460 nm à 2500 nm. Comme nous voulons travailler avec le plus de fluorophores possibles, il est important de savoir à partir de quelle longueur d'ondes assez de puissance est disponible pour exciter ces fluorophores.
- temporellement, la documentation nous donne la largeur des impulsions de l'oscillateur, et non pas la largeur des impulsions en sortie de la source après génération de continuum. Nous allons donc vérifier que ces impulsions ne sont pas trop longues, et qu'il n'y a pas de problèmes de rebond, ou de double impulsion.
- la stabilité de cette source. Les oscillateurs à fibre sont des technologies qui peuvent connaître certaines instabilités. Comme l'efficacité des effets non linéaires dépend de l'énergie des impulsions, la moindre variation de durée, ou de puissance crête va se répercuter sur la génération des composantes spectrales les plus bleues, éloignées du

fondamental. Concrètement, cela peut se traduire par des variations importantes de la puissance dans certaines bandes spectrales.

Parameters	Unit	SC450-2	SC450-4	SC450-6
Spectral bandwidth	nm	460-2500	460-2500	460-2500
Spectral flatness	dB	< 6		
Master source pulsewidth	ps	5		
Repetition rate	MHz	20	40	50
Average power	W	2	4	6
Spectral density	mW/nm	> 1	> 2	> 3
Power consumption, max	W	< 100		< 200
Dimensions (W x L x D)	mm	300 x 250 x 120		
Weight	kg	4.5		

Tableau 2-2 : performances d'après la documentation fournie par le constructeur [Fianium]. La source dont nous disposons est une évolution de la source SC450-2 puisque sa cadence est un peu plus faible (15 MHz au lieu de 20 MHz).

IV.2 – Caractérisation

Etant donné que nous n'avons aucun repère sur le potentiomètre qui pilote la puissance de pompe de l'amplificateur, et pour assurer le plus possible la stabilité de la source, nous travaillons tout le temps avec la puissance de pompe maximale pour l'amplificateur. Dans ces conditions, le spectre généré est le plus large possible et il suffit de sélectionner avec un filtre adapté la bande spectrale souhaitée.

Lorsqu'on travaille avec une telle source avec un amplificateur intégré, il est primordial de s'assurer qu'aucune réflexion du fondamental (c'est-à-dire ici à 1064nm), même minime (réflexion sur une lentille, un filtre,...) ne puisse être réinjectée dans la fibre. Si tel était le cas, ce signal réfléchi serait intensifié par l'amplificateur, et pourrait détruire l'oscillateur.

Etant donné que nous allons employer cette source pour exciter la fluorescence à un photon, seule la partie visible du spectre délivré par la source nous intéresse. Nous utilisons des miroirs de renvoi qui réfléchissent le rayonnement visible et transmettent les longueurs d'onde infrarouges (surtout la longueur d'onde 1064 nm). Le traitement diélectrique E02 des miroirs Thorlabs a les caractéristiques souhaitées (figure 2-37).

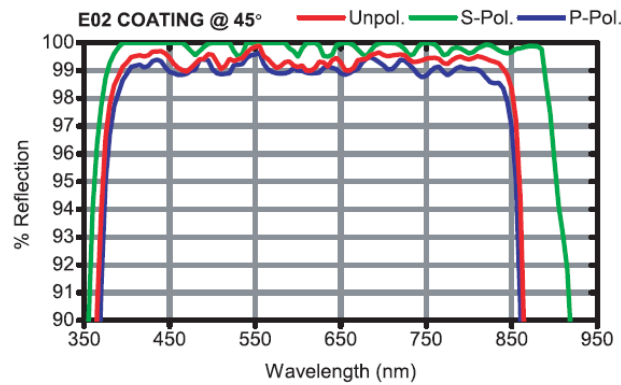


Figure 2-37 : réflexion des miroirs utilisés en fonction de la longueur d'onde pour différentes polarisations. Ces miroirs réfléchissent dans le visible et transmettent l'infrarouge [Thorlabs 2008].

Etudions le spectre en sortie de la source, et après deux miroirs de renvoi avec les caractéristiques fournies. Pour cela, nous utilisons le même analyseur de spectre optique que précédemment (figure 2-38). En regardant le spectre sur toute la gamme de sensibilité du détecteur, nous constatons que le rayonnement à 1064 nm est bien supprimé et que nous pouvons travailler en toute tranquillité avec les deux miroirs de renvoi.

En s'intéressant plus précisément à la partie visible du spectre, on remarque un plateau lisse (attention, les mesures sont réalisées en dB donc « lisse » est tout relatif...) de 470 nm à 800 nm (le petit décrochage à 650 nm correspond à un changement de détecteur dans l'analyseur de spectre). Pour les longueurs d'onde plus courtes, il subsiste une certaine densité spectrale, avec notamment un pic vers 430 nm. Comme l'apport de quelques centaines de μW sur l'échantillon biologique suffit à exciter les fluorophores, il semble possible d'utiliser ces longueurs d'onde plus basses pour exciter des fluorophores comme la CFP. Par contre, nous n'avons pas accès à des longueurs d'ondes plus courtes que 430 nm (le front descendant de 350 à 400 nm visible sur le spectre est un artefact de mesure).

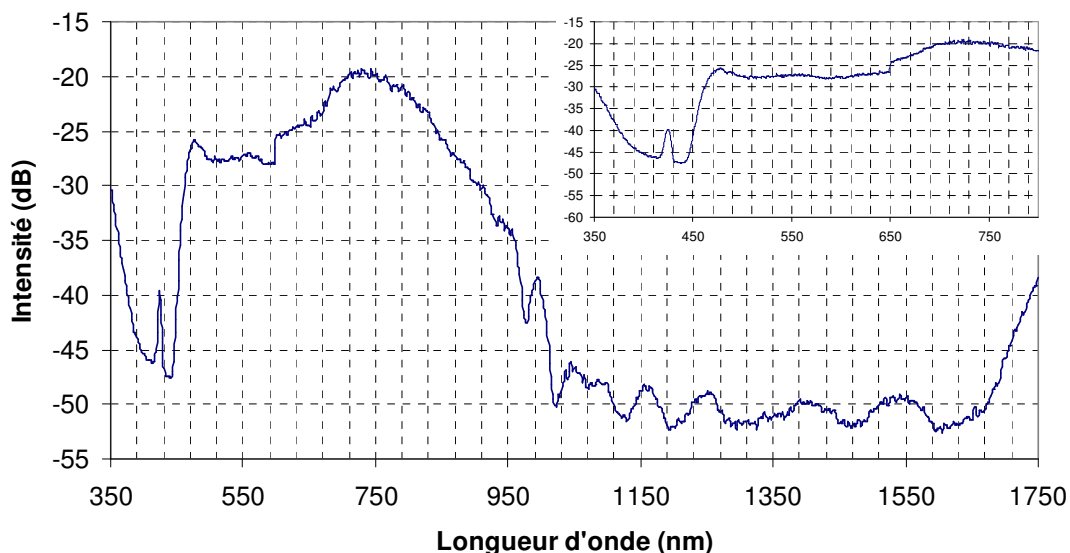


Figure 2-38 : spectre de la source après les deux miroirs de renvoi. Le premier spectre couvre toute la bande de sensibilité de l'analyseur de spectre alors que le second (dans le coin en haut) est centré sur le visible.

Nous utilisons également ce banc de caractérisation pour étudier la réponse de quelques filtres passe bande de la société Semrock dont nous allons nous servir sur notre montage de microscopie pour exciter les fluorophores et détecter leur signal de fluorescence (figure 2-39). Ces

filtres ont une excellente transmission sur la bande spectrale spécifiée et rejettent de manière satisfaisante le reste du spectre.

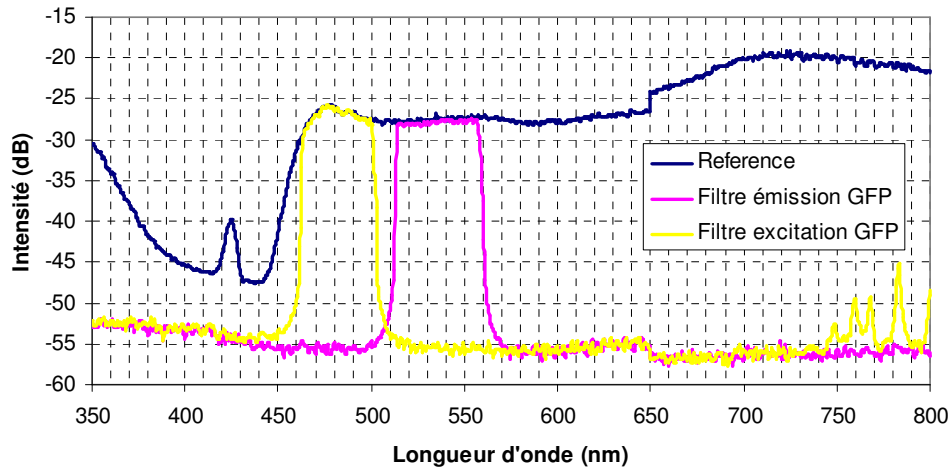


Figure 2-39 : spectres de la source sur la partie visible sans filtre (référence), avec un filtre d'excitation pour la GFP, et un filtre d'émission pour la GFP.

Intéressons nous dorénavant au comportement temporel de notre source.

Dans un premier temps nous vérifions rapidement, grâce à un oscilloscope et une photodiode traditionnels que la cadence effective de la source correspond bien à nos attentes (15 MHz) (figure 2-40). Nous mesurons une fréquence de 15,22 MHz.

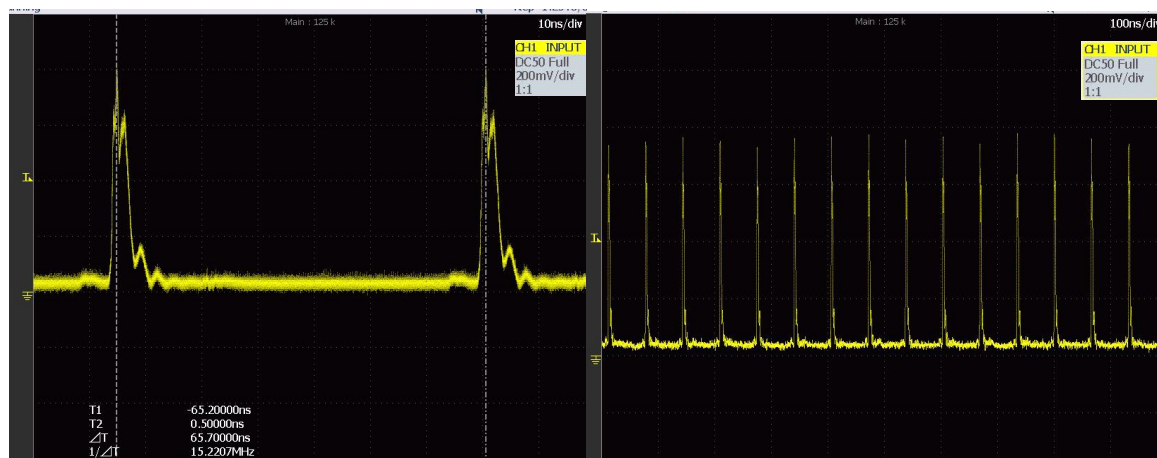


Figure 2-40 : oscillogrammes du train d'impulsions obtenus avec deux échelles de temps différentes : à gauche, 10 ns par division, à droite, 100 ns par division.

Ensuite, nous cherchons à mesurer la largeur de ces impulsions. Cette mesure est délicate, puisque vue la largeur spectrale de cette source, il n'est pas envisageable de réaliser la mesure par autocorrélation. On pourrait le faire pour la longueur d'onde fondamentale à 1064 nm, mais ceci ne nous renseignerait pas sur la largeur des impulsions dans le visible, vue la longueur de fibre non linéaire utilisée pour élargir le spectre. Nous décidons donc d'utiliser un oscilloscope (60 GHz) et une photodiode (30 GHz) rapide. Ce matériel a été mis à notre disposition par Juliette Mangeney de l'équipe Nanophotonique et Electronique Ultra-rapide de l'Institut d'Electronique Fondamentale d'Orsay.

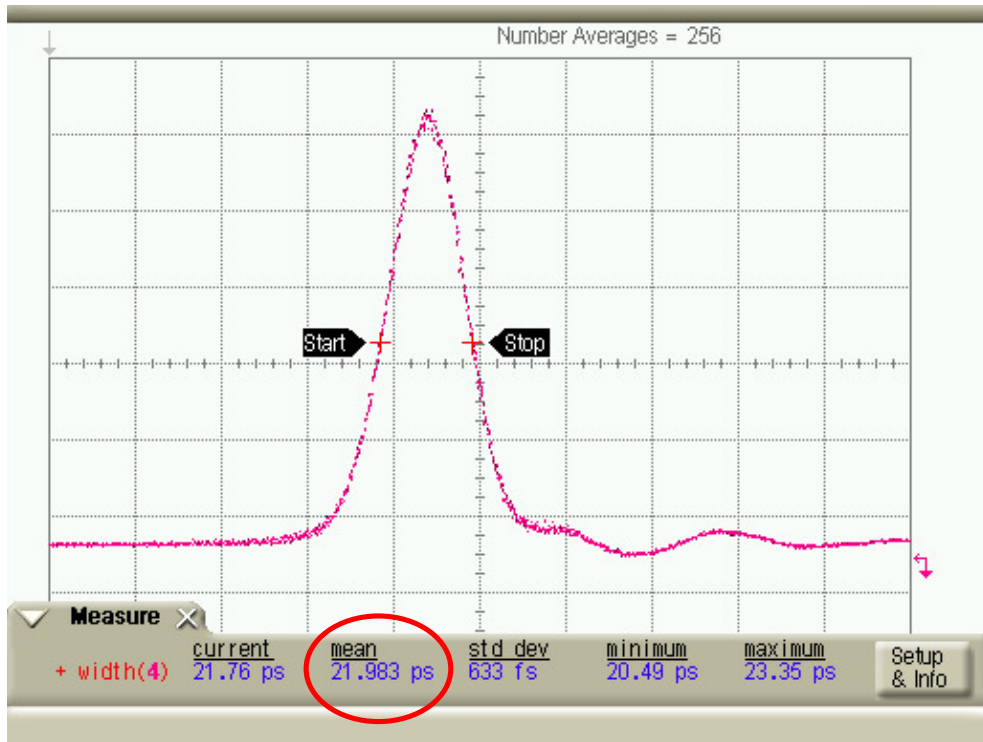


Figure 2-41 : profil temporel d'une impulsion obtenu avec un oscilloscope et une photodiode rapides.

Il semble que nous mesurons ici la réponse percussionnelle de l'ensemble photodiode plus oscilloscope, et non la largeur des impulsions (figure 2-41). Mais pour notre application, cette mesure nous convient parfaitement puisque cela signifie que nous avons en sortie de source des impulsions plus courtes que 22 ps. Observons la réponse sur une échelle de temps plus grande, pour nous assurer qu'il n'y a pas de rebonds significatifs ou de double impulsion (figure 2-42).

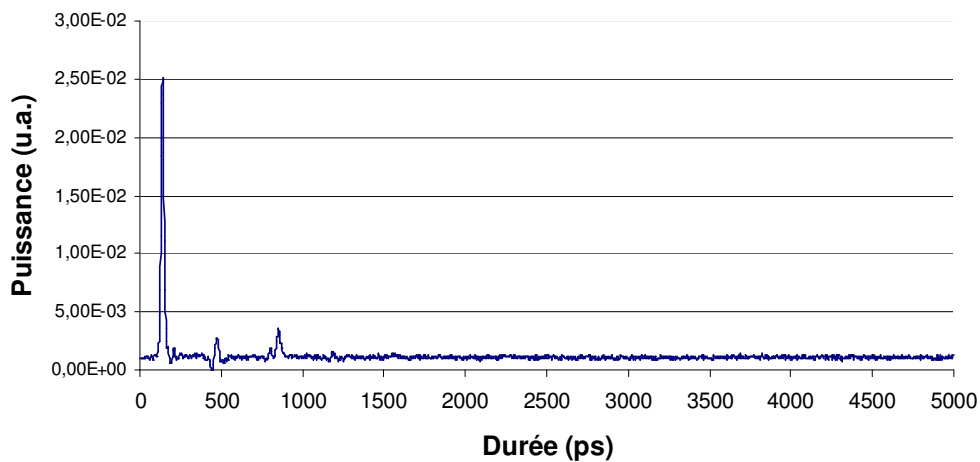


Figure 2-42 : profil temporel sur une échelle de temps plus longue (5 ns).

Nous observons uniquement deux petits rebonds respectivement 500 ps et 800 ps après l'impulsion, qui correspondent à des rebonds dans les câbles électriques.

Enfin, avec cet oscilloscope, nous observons une petite gigue temporelle qui n'apparaît pas significative. En effet, elle est du même ordre de grandeur que la résolution de l'appareil pour cette mesure (écart type de 3 ps sur la position du front montant).

Pour terminer cette caractérisation, intéressons-nous à la stabilité de cette source au cours du temps. La puissance totale délivrée par la source pour tout le spectre vaut environ 2,35W. Une

fois que la source est stable (une demi-heure après l'allumage), cette puissance reste constante, nous n'observons aucune variation significative.

Ensuite, nous observons la partie visible du spectre à différents instants après l'allumage de la source (figure 2-43). Sur ces spectres, nous remarquons des variations d'intensité assez significatives (jusqu'à plus de 5 dB sur certaines gammes).

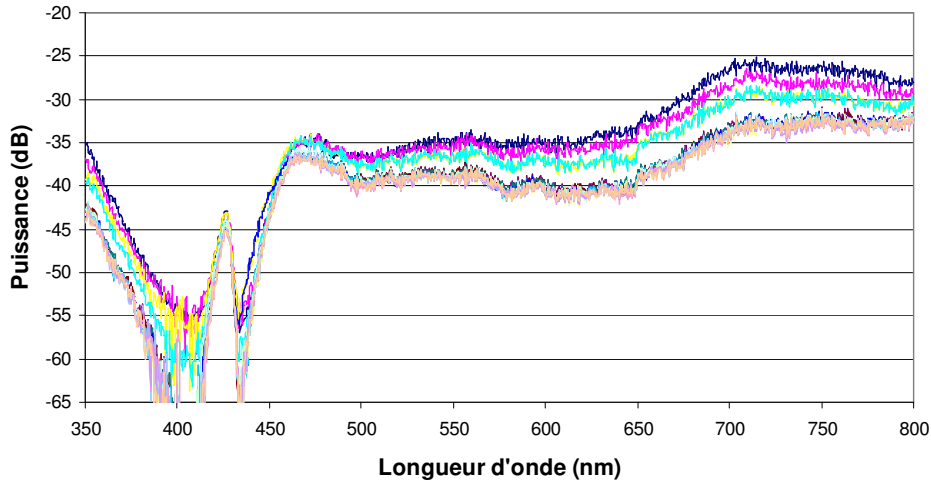


Figure 2-43 : acquisition de 15 spectres successifs dans le visible (acquisitions de 30s avec une résolution de 0,1 nm réalisées toutes les 10 minutes).

Pour évaluer plus précisément cette instabilité, et les conséquences directes qu'elle va avoir pour nos expériences en fluorescence, nous avons mesuré la puissance incidente sur les échantillons, lorsque la source est placée dans le montage expérimental défini dans le second chapitre.

Dans un premier temps, nous avons regardé la densité spectrale de puissance après l'objectif pour trois filtres différents : un dans le bleu (centré à 438 nm avec une largeur de 24 nm), un dans le vert (centré à 472 nm avec une largeur de 30 nm) et un dans le rouge (centré à 607 nm avec une largeur de 36 nm) (figure 2-44). Il est intéressant de remarquer plusieurs choses : tout d'abord, les variations se font sur des échelles de temps assez longues (plusieurs minutes), ce qui veut dire que pour une mesure de temps de vie de fluorescence (moins d'une minute), nous ne serons pas gênés par ces fluctuations. Ensuite, des augmentations de la densité spectrale de puissance dans le bleu et dans le vert correspondent à des diminutions de densité spectrale de puissance dans le rouge : plus les effets non linéaires dans la fibre sont efficaces, et mieux le « rouge » est converti en « bleu »...

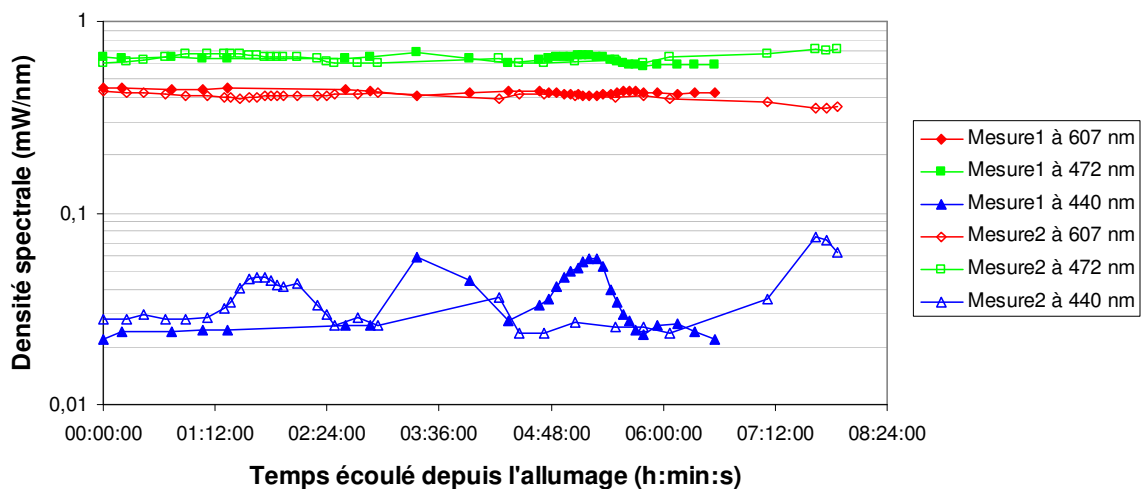


Figure 2-44 : évolution des densités spectrales de puissance au cours du temps pour différentes gammes de longueurs d'onde.

En faisant quelques expériences avec de la CFP, fluorophore s'excitant à 440 nm et qui photoblanchit rapidement, nous avons été notablement gênés par les variations d'intensité incidentes. Nous nous sommes donc plus précisément intéressés à la puissance totale incidente sur la gamme spectrale délimitée par le filtre à 440 nm (centré à 440 nm avec une largeur de 40 nm). Nous avons retrouvé les variations lentes d'intensité, mais avec des proportions différentes suivant les jours. Parfois, comme c'est le cas du jour 1 dans la série de mesures de la figure 2-45, nous avons des variations d'un facteur 5 sur la puissance incidente, ce qui est problématique quand on travaille avec des échantillons fragiles.

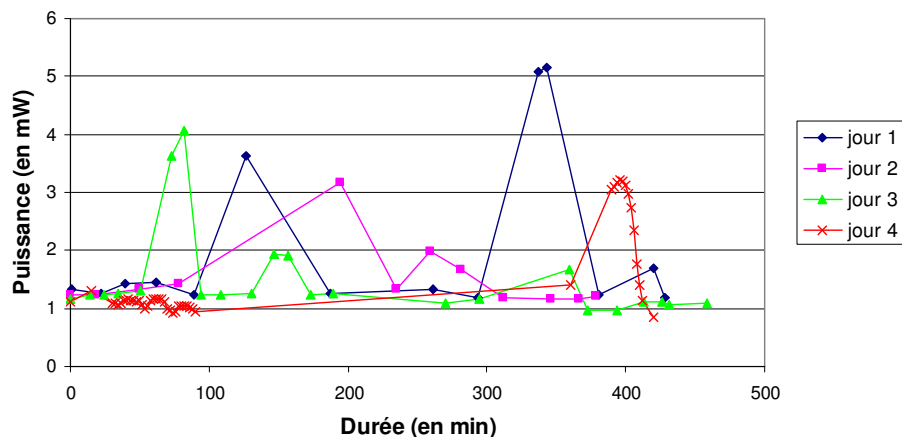


Figure 2-45 : puissance après l'objectif de microscope en fonction du temps pour différents jours d'expérimentation.

Pour nous affranchir de ces variations, la solution que nous avons choisie est de mesurer la puissance incidente avant le microscope mais après le filtre d'excitation (voir montage expérimental du chapitre 2), et de placer une densité optique ajustable sur le trajet optique du faisceau exciteur. Ainsi, après une mesure de calibration qui nous donne la puissance après l'objectif en fonction de celle mesurée, nous connaissons précisément la valeur de la puissance à laquelle sont exposés nos échantillons. Comme nous venons de le voir, ces vérifications s'imposent surtout lorsque l'on travaille avec des longueurs d'onde qui sont égales ou inférieures à la limite basse spécifiée par le constructeur (460 nm).

Moyennant quelques précautions, cette source est un outil précieux avec des performances vraiment intéressantes pour notre application : elle délivre des trains d'impulsions plus courtes que 20 ps à une cadence relativement basse de 15 MHz, et couvre un spectre de 450 nm à plus de 1750 nm. Et nous ne sommes pas les seuls à avoir été convaincus, puisque plusieurs équipes, avec des problématiques diverses utilisent cette source [Frank 2007], [Soloviev 2007], [Muskens 2008], [Guillon 2008].

Notons que l'état de l'art de ces sources visibles est en constante évolution. Depuis que nous nous la sommes procurée, des progrès ont été faits par la société Fianium qui aujourd'hui vend une source qui descend à 400 nm et dont la cadence est ajustable de 100 kHz à 40 MHz (SC-400-pp) [Fianium 2008].

V - Conclusion

La mesure de temps de vie de fluorescence requiert l'utilisation de sources d'excitation particulières. En effet, cette dernière doit délivrer des impulsions courtes (ps) devant la durée du déclin de fluorescence que l'on souhaite mettre en évidence, et à une cadence relativement basse (quelques MHz) pour permettre de travailler même avec des fluorophores ayant des temps de vie assez longs. De plus, nous souhaitons disposer d'une source qui ne nous limite pas dans le choix des fluorophores, qui couvre, sans réajustement, une large partie du spectre visible, domaine spectral dans lequel s'excitent la majorité des fluorophores utilisés en biologie. Dès lors, le seul réglage nécessaire pour changer de longueur d'onde d'excitation est un changement de filtres.

Pour atteindre ces objectifs, nous nous sommes orientés vers une architecture originale, basée sur une source impulsionnelle infrarouge, et l'utilisation de fibres optiques non linéaires pour élargir le spectre.

Ainsi nous avons tout d'abord développé une source laser impulsionnelle solide pompée par diode émettant à une longueur d'onde alternative de 914 nm. Malheureusement, la faible puissance en sortie de cet oscillateur ne nous a pas permis de l'utiliser pour réaliser l'injection dans les fibres.

Nous nous sommes ensuite concentrés sur l'élargissement du spectre par les effets non linéaires dans des fibres microstructurées, en utilisant une source de pompe basse cadence à 1064 nm. Ici encore, les résultats obtenus sont très intéressants et prometteurs, mais la complexité des phénomènes mis en jeu dans l'élargissement spectral et dans le profil spatial du faisceau en sortie de fibre ne nous a pas permis d'utiliser cette source sur le montage de microscopie.

Enfin, une source commerciale avec des caractéristiques répondant aux attentes de notre application étant apparue, pendant notre étude, sur le marché, nous l'avons acquise. Nous avons caractérisé cette source temporellement et spectralement, ce qui nous permet maintenant de l'utiliser sur notre montage de microscopie, en connaissant précisément son comportement. Ainsi cette source est le dispositif d'excitation de la fluorescence de notre montage décrit dans la partie suivante.

Concernant la génération de supercontinua dans les fibres, il reste encore beaucoup de choses à comprendre dans le rôle respectif des différents mécanismes responsables de l'élargissement spectral. La stratégie, développée en collaboration avec les chercheurs du XLim de Limoges, basée sur l'utilisation d'un effet non linéaire particulier pour générer des pics, et sur l'élargissement spectral induit par les autres effets non linéaires, offre des perspectives intéressantes. Avec l'ingénierie de la fibre, et les impulsions injectées, on détermine les longueurs d'onde autour desquelles va s'élargir le spectre. Une telle technique pourrait trouver des applications par exemple en microscopie STED, ou en microscopie CARS, pour lesquelles « l'excitation » de l'échantillon nécessite plusieurs longueurs d'onde (bien entendu à condition de pouvoir maîtriser le délai entre les différentes composantes spectrales).

Pour terminer, comme nous l'avons évoqué à plusieurs reprises, les performances de la source commerciale Fianium sont très intéressantes, mais des améliorations peuvent être envisagées, notamment concernant la largeur spectrale disponible en sortie. Les longueurs d'ondes visibles les plus courtes et l'ultra violet ne sont pas accessibles avec la source en l'état. Pour remédier à cela, Fianium propose depuis peu un nouveau modèle permettant de descendre jusqu'à 400 nm [Fianium 2008], basée sans doute sur l'utilisation d'une nouvelle génération de fibres non linéaires. Etant donné que la majeure partie du rayonnement est émise dans l'infrarouge, partie du spectre qui ne nous intéresse pas pour faire de la microscopie de fluorescence par absorption à un

photon, on pourrait envisager de récupérer ces longueurs d'ondes pour faire de la génération de second ou de troisième harmonique, et de la sorte élargir le spectre vers l'ultra violet.

Annexe 1 : Fiche technique du matériel utilisé

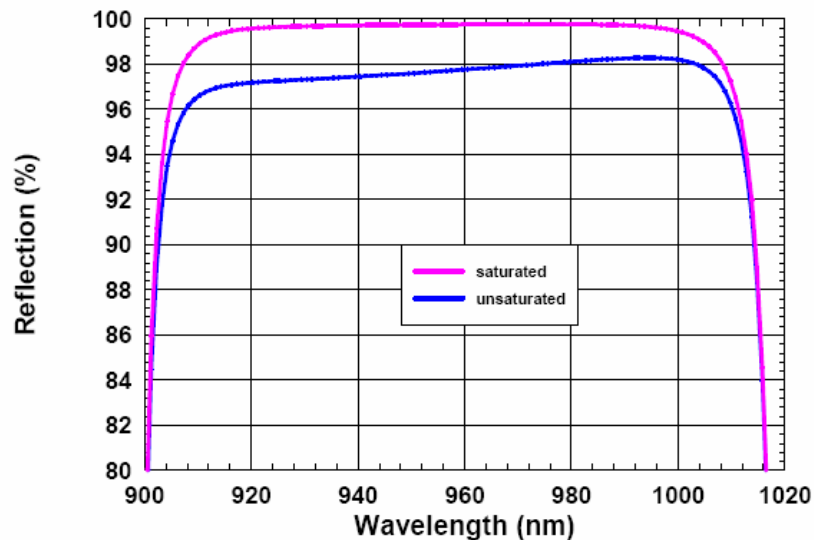
Caractéristiques du SESAM utilisé



SAM[®] data sheet SAM-940-2-x, $\lambda = 940$ nm

Laser wavelength	$\lambda = 940$ nm
High reflection band (R > 99%)	$\lambda = 920 \dots 990$ nm
Saturable absorptance	$A_0 = 2$ %
Saturation fluence	$\Phi_{\text{sat}} = 70 \mu\text{J}/\text{cm}^2$
Relaxation time constant	$\tau \leq 10$ ps
Non-saturable loss	$A_{\text{ns}} < 0.3$ %
Chip area	4mm x 4mm; other dimensions on request
Chip thickness	400 μm ; optional: 100 μm on request
Protection	the SAM is protected with a dielectric front layer
Mounting of SAM-940-2-x	denotes the type of mounting as follows:
x = 0	unmounted
x = 12.7 g	glued on a gold plated Cu-cylinder with 12.7 mm \varnothing
x = 25.4 g	glued on a gold plated Cu-cylinder with 25.4 mm \varnothing
x = 12.7 s	soldered on a gold plated Cu-cylinder with 12.7 mm \varnothing
x = 25.4 s	soldered on a gold plated Cu-cylinder with 25.4 mm \varnothing
x = FC	mounted on a 2 m monomode fiber cable with FC connector

Spectral reflectance



Director:
Dr. Wolfgang Richter

BATOP GmbH
Theodor-Körner-Str. 4
D-99425 Weimar
Germany

Tel: +49 172 352 00 29
Fax: +49 3643 51 04 51
E-mail: richter@batop.de

Deutsche Bank Jena
Bank Code: 82070024
Account No: 3922655
IBAN: DE49 8207 0024 0392 2655 00

VAT Reg. No: DE 813698804
Tax Acc. No: 151/106/09261
Local Court Erfurt HRB 12769.

Annexe 2: L'autocorrélation

Le principe de l'autocorrélation est de transformer une information temporelle rapide (durée de l'impulsion) en une information temporelle lente (déplacement d'un miroir) accessible à l'oscilloscope. Le principe de l'autocorrélateur optique est basé sur la détection de l'onde de second harmonique générée suite à la superposition (temporelle et spatiale), dans un cristal doubleur de fréquences, de deux impulsions identiques [Sala 1980].

Pratiquement, l'autocorrélateur est composé d'un interféromètre de Michelson (figure 2-A2-1) avec sur l'un des bras un coin de cube monté sur un pot vibrant, suivi d'un cristal doubleur où l'on focalise les deux faisceaux. Nous avons dû modifier le dispositif initial, puisque l'autocorrélateur dont nous disposions était destiné à la mesure d'impulsions femtoseconde à 1064 nm. Il nous a fallu remplacer le cristal en place par un cristal de LBO pour atteindre l'accord de phase à 914 nm. De plus, il a fallu augmenter la course des miroirs pour pouvoir mesurer des impulsions picosecondes.

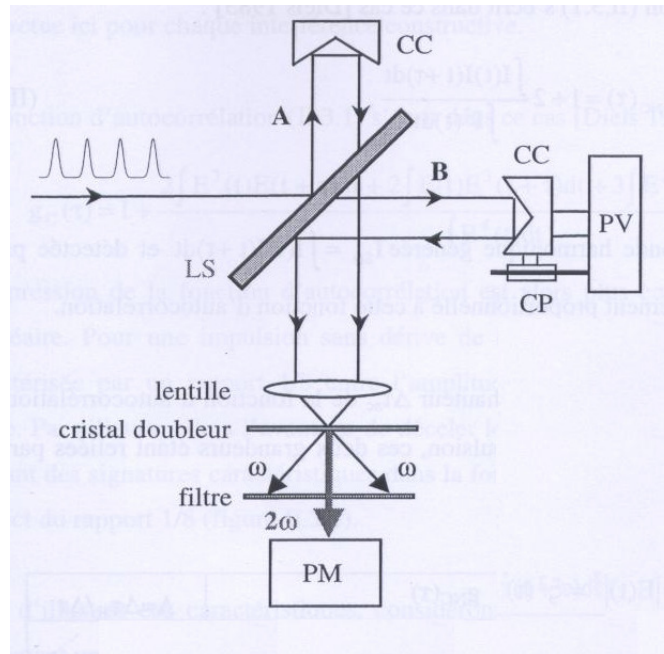


Figure 2-A2-1: dispositif pour mesurer l'autocorrélation en intensité. LS est la lame semi-réfléchissante, CC est un coin de cube, PV est le pot vibrant, CP est le capteur de position du coin de cube monté sur le pot vibrant, PM est le photomultiplicateur [Guiot 2001].

Chaque impulsion est divisée en deux impulsions d'égale intensité par une lame semi-réfléchissante. Une impulsion est réfléchiée sur le coin de cube fixe, l'autre sur celui monté sur le pot vibrant. Ceci va nous permettre de faire varier le décalage temporel entre les impulsions, et de mesurer ce décalage temporel (grâce au capteur de position, on mesure le déplacement du miroir, ce qui nous permet de remonter au décalage temporel que ce déplacement a induit). On s'arrange pour avoir en sortie les deux faisceaux parallèles non superposés pour réaliser une mesure d'autocorrélation en intensité.

Une lentille nous permet de focaliser les deux faisceaux dans le cristal doubleur. Ainsi l'onde second harmonique est générée uniquement quand les deux impulsions sont superposées spatialement et temporellement, et bien entendu quand le cristal est orienté de sorte que ces deux faisceaux vérifient l'accord de phase.

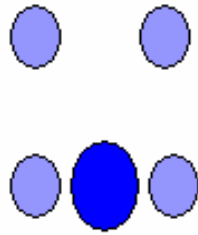


Figure 2-A2-2: allure des taches après le cristal doubleur.
En haut : chaque tache correspond au doublement de fréquence réalisé sur chaque bras
En bas : la tache centrale est celle de l'autocorrélation

Ce réglage de la position du cristal est assez minutieux car nos impulsions sont de faible énergie : il nous faut optimiser le doublement de fréquence et nous affranchir du bruit. Tout d'abord on oriente le cristal de façon à observer derrière deux tâches bleues distinctes d'intensités assez faibles (figure 2-A2-2). Ces deux tâches correspondent au doublement de fréquence réalisé sur chacun des deux bras et témoignent de la bonne orientation du cristal à l'accord de phase. L'intensité est assez faible car seuls les photons d'un seul faisceau et qui arrivent simultanément dans le cristal vont permettre ce doublement.

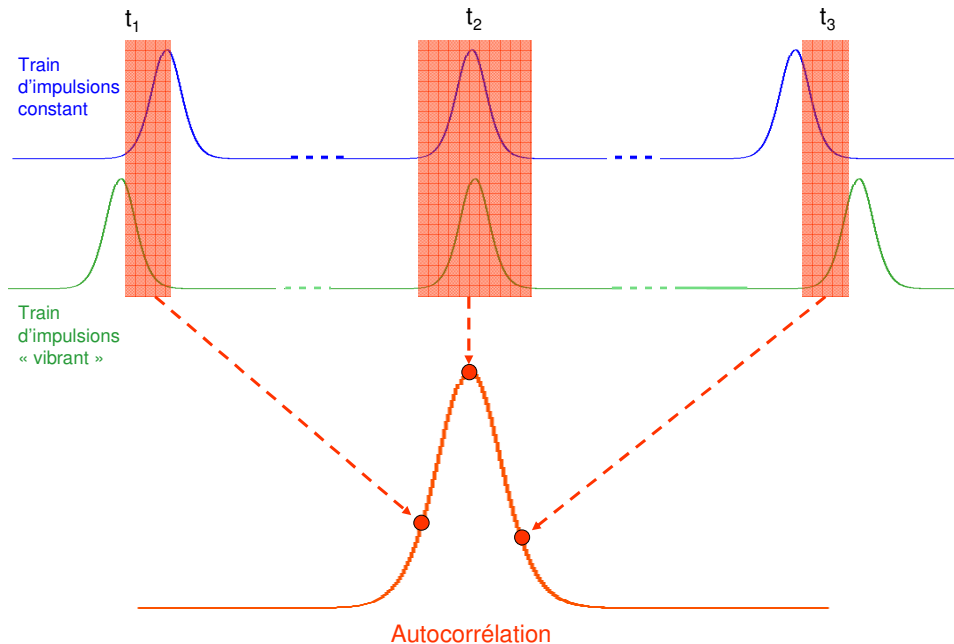


Figure 2-A2-3 : principe de l'autocorrélation. Le train d'impulsions « stable » (le bleu) est celui réfléchi sur le coin de cube qui reste fixe. Le train « vibrant » (le vert) est celui réfléchi sur le pot vibrant. Dans la séquence représentée ci-dessus, le pot vibrant recule (la durée entre les impulsions vertes augmente). A chaque instant, le photomultiplicateur va déceler une intensité dépendant du nombre de photons de l'impulsion bleue et de celui de l'impulsion verte qui arrivent simultanément dans le cristal (puisque pour avoir un photon « second harmonique », il faut qu'arrivent simultanément un photon d'une impulsion bleue, et un photon d'une impulsion verte). Ainsi pour chaque position du pot vibrant, on aura une valeur d'intensité « second harmonique », et l'autocorrélation est la courbe composée de l'ensemble de ces valeurs.

N.B. : le pot vibre à une fréquence très petite (quelques dizaines de Hz) devant la cadence des impulsions, donc en réalité, il y a de nombreuses impulsions entre t_1 et t_2 .

On règle la position des coins de cube pour que ces deux tâches soient suffisamment séparées pour réduire le bruit de mesure. Ensuite, on translate le coin de cube « fixe » en guettant l'apparition d'une troisième tâche bleue au centre plus intense. Cette tâche résulte de la superposition temporelle de deux moitiés d'impulsion provenant chacune d'un bras, et apparaît lorsque les deux bras sont à l'équilibre. C'est la mesure d'intensité de cette tâche qui nous fournit

le signal d'autocorrélation attendu. L'intensité de cette onde harmonique va varier quand le coin de cube sur pot vibrant va se déplacer (figure 2-A2-3).

En branchant le photomultiplicateur et le capteur de position sur le même oscilloscope, on va donc avoir l'intensité de l'onde de seconde harmonique en fonction de la position du pot vibrant.

On réalise alors l'étalonnage : on acquiert deux autocorrélations pour deux positions du coin de cube fixe différentes. En mesurant précisément le déplacement de ce coin de cube, on obtient le décalage temporel, ou retard, entre ces deux autocorrélations (puisque l'on déclenche sur le capteur de position), et on peut par conséquent disposer d'une « échelle » temporelle pour notre oscillogramme.

Annexe 3 : article [Gerhard 2006]

Stable mode-locked operation of a low repetition rate diode-pumped Nd:GdVO₄ laser by combining quadratic polarisation switching and a semiconductor saturable absorber mirror

Christoph Gerhard, Frédéric Druon, Patrick Georges

Laboratoire Charles Fabry de l'Institut d'Optique du CNRS et de l'Université Paris-Sud, Centre Universitaire,
Bat 503, 91403 Orsay Cedex, France Phone: (33) 1 69 35 88 52, Fax: (33) 1 69 35 88 07,
christoph.gerhard@iota.u-psud.fr, frederic.druon@iota.u-psud.fr

Vincent Couderc, Philippe Leproux

Department of Photonics, XLIM
Université de Limoges, 123 avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France

Abstract: In this paper, we present the mode-locked operation of an ultra-robustly stabilised Nd:GdVO₄ laser with low repetition rate by combining quadratic polarisation switching and a semiconductor saturable absorber mirror (SESAM). In addition, similar experiment was also done with Nd:YVO₄. For Nd:GdVO₄, 16-ps pulses at 1063nm with a repetition rate of 3.95MHz have been obtained for a laser average output power of 1.4W. For Nd:YVO₄, the performance was 2.5W of average power for 15-ps pulses at 1064nm. Moreover, we demonstrate experimentally the advantage of combining these two passive mode locking techniques in terms of stability ranges. We show how the dual mode-locking technique is crucial to obtain a stable and long-term mode-locked regime in our case of a diode-pumped Nd:GdVO₄ laser operating at low repetition rate and more generally how this dual mode-locking technique improves the stability range of the mode-locked operation giving more flexibility on different parameters.

©2006 Optical Society of America

OCIS codes: (140.3580) Lasers, solid-state; (140.4050) Mode-locked lasers.

References and links

1. S. Lévêque-Fort, D.N. Papadopoulos, S. Forget, F. Balembois, P. Georges: "Fluorescence lifetime imaging with low-repetition-rate passively mode-locked diode-pumped Nd:YVO₄ oscillator," *Opt. Lett.* **30**, 2 (2005).
2. F. Dausinger, H. Hügel, V. Konov: "Micro-machining with ultra-short laser pulses, from basic understanding to technical application," International Conference on Advanced Laser Technologies 2002, ALT-02, September 15-20, 2002, Adelboden, Switzerland
3. Y. Sato, N. Pavel, T. Taira: "Comparative study of GdVO₄ and Nd:YVO₄: laser oscillation under 808-nm and 879-nm pumping," Optical Society of America, CThJJ7 (2003)
4. Y. Sato, N. Pavel, T. Taira: "Near quantum limit laser oscillation and spectroscopic properties of Nd:GdVO₄ single crystal," Optical Society of America, WB5 (2003)
5. M. Schmidt, E. Heumann, C. Czeranowsky, G. Huber, S. Kutovoi, Y. Zavartsev: "Continuous wave diode pumped Nd:GdVO₄ laser at 912nm and intracavity doubling to the blue spectral range," *OSA Tops Vol.* **50**, (2001)
6. V. Lupei, N. Pavel, Y. Sato, T. Taira: "Highly efficient 1063-nm continuous-wave laser emission in Nd:GdVO₄," *Opt. Lett.* **28** (2003) 23
7. L.J. Qin, X.L. Meng, Ch.L. Du, L. Zhu, B.Ch. Xu, H.Zh. Xu, F.Y. Jiang, Z.Sh. Shao: "A diode-pumped passively Q-switched Nd:GdVO₄ laser with a GaAs saturable absorption," *Opt. & Laser Techn.* **36**, 47-50 (2004).
8. J. Kong, D.Y. Tang, S.P. Ng, B. Zhao, L.J. Qin, X.L. Meng: "Diode-pumped passively mode-locked Nd:GdVO₄ laser with a GaAs saturable absorber mirror," *Appl. Phys. B* **79**, 203-206 (2004).
9. S. J. Holmgren, V. Pasiskevicius, F. Laurell: "Generation of 2.8 ps pulses by mode-locking a Nd:GdVO₄ laser with defocusing cascaded Kerr lensing in periodically poled KTP," *Opt. Express* **13**, 5270 (2005).

10. U. Keller, K.J. Weingarten, F.X. Kärtner, D. Kopf, B. Braun, I.D. Jung, R. Fluck, C. Hönninger, N. Matuschek, J. Aus der Au: "Semiconductor Saturable Absorber Mirrors (SESAM's) for Femtosecond to Nanosecond Pulse Generation in Solid-State Lasers," *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **2**, 453 (1999).
11. V. Couderc, O. Guy, E. Roisse, A. Bartélémy: "Modelocking of CW Nd:YAG laser using nonlinear polarisation evolution in type II frequency doubling crystal," *Electron. Lett.* **34**, 672 (1998).
12. V. Couderc, A. Albert, A. Barthélémy: "Low repetition rate of a mode locked Nd:YAG laser using quadratic polarization switching," *Opt. Commun.* **220**, 413-417 (2003).
13. V. Couderc, A. Bartélémy, F. Louradour: "2.8ps pulses from a mode-locked diode pumped Nd:YVO₄ laser using quadratic polarization switching," *Opt. Commun.* **166**, 103 (1999).
14. D.N. Papadopoulos, S. Forget, M. Delaigue, F. Druon, F. Balembois, P. Georges: "Passively mode-locked diode-pumped Nd:YVO₄ oscillator operating at an ultralow repetition rate," *Opt. Lett.* **28** 19 (2003).
15. K. Stankov: "Methods of passive and active mode locking using intracavity optical frequency mixing," *Opt. Lett.* **14**, 51-53 (1989)

1. Introduction

Nowadays, mode-locked (ML) picosecond lasers, producing large peak power are key instruments for a lot of biological applications such as in fluorescence measurements, ultra-fast spectroscopy and microscopy [1]. Furthermore these lasers have been demonstrated to be also suitable for micromachining, in particular for the treatment of temperature-sensitive materials with an ablation process based on multi-photon-ionisation [2]. For this last application it seems very interesting to develop a very robust, highly-efficient system based on diode-pumped solid-state lasers (DPSSL). And, for picosecond DPSSLs, Neodymium-doped crystals (in particular Nd-doped vanadates) are particularly suitable because of their high gain [3]. In this point of view, the Neodymium-doped Gadolinium Orthovanadate crystal (Nd:GdVO₄) seems to appear an interesting alternative to the well-established Neodymium-doped Yttrium Orthovanadate crystal (Nd:YVO₄) [3,4,5]. Even though they have a reduced emission cross section, it was already demonstrated that Nd:GdVO₄ crystals have similar performances in terms of power compared to Nd:YVO₄ crystals. Nevertheless, it has extra advantages such as a broader absorption bandwidth at 808nm (which allows the pumping by high-power laser diodes as also possible with Nd:YVO₄), a higher thermal conductivity and a higher damage limit value [3,6,7]. Due to these properties it has been interesting to explore the performances of such crystals for the development of high power Nd:GdVO₄ picosecond lasers operating at a low repetition rate.

In fact, mode-locked operation with Nd:GdVO₄ in the range of some hundreds of MHz has already been achieved [8,9]. We are demonstrating in this paper the first (to our best knowledge) very low repetition rate mode-locked operation with a Nd:GdVO₄ crystal. As we will see, this realisation is more difficult than with Nd:YVO₄. That is the reason why we developed a dual ML technique in order to achieve ultra-stable ML regime. The principle consists in combining two different techniques of mode-locking, on the one hand a Semiconductor Saturable Absorber Mirror (SESAM) [10] and on the other hand the quadratic polarisation switching (QPS) using a nonlinear crystal [11,12,13]. We will see that this technique allows us to demonstrate a very stable and robust low repetition rate system.

2. The dual ML technique: quadratic polarisation switching and SESAM

The quadratic polarisation switching (QPS) is a mode-locking technique based on the non-linear polarisation rotation in a type II nonlinear crystal (NLC). In such a NLC the wave of least initial amplitude gets completely decreased if the NLC is well orientated for second harmonic generation (SHG) and if the incoming wave is fragmented in two orthogonal components. In this case and after a round trip in the NLC, the orientation of the intracavity linear polarisation beam depends on the intensity. By introducing a polariser between the amplifying medium and the NLC, a device with an intensity dependent transmission can be realised as demonstrated by V. Couderc et al. [11-13]. Just by changing the orientation of the NLC versus the intracavity polarisation this technique is adjustable for any range of output power which is increasing the versatility of a laser cavity. Thus we demonstrated a stable ML

Nd:YVO₄ laser with an output power of 2W at 4MHz repetition rate by using QPS technique. Nevertheless, this mode-locked source required tricky polarisation realignment at the starting of the laser which means that the tolerance of the axial rotation of the half-wavelength plate was in the range of less than 1° and had to be adjusted very accurately. Furthermore we observed experimentally that this technique is not applicable straightforwardly to Nd:GdVO₄. After every polarisation and crystal-orientation realignment we achieved ML for only a few seconds. This short time ML operation could be explained by a very limited parameter range for stable ML operation. In fact, when alignment allows ML, small slow varying perturbations (such as variations of thermal loads between ML and Q-switching) could disrupt the laser performance and then stop the ML.

In order to take advantage of QPS, we tried the dual ML technique adding a SESAM. To obtain the effect of passive mode-locking, i.e. ps pulse generation, the SESAM can be used in a wide range of laser cavities by replacing the total reflector mirror of the cavity by such a saturable absorber. In this vein, mode-locked pulses of 10's of picoseconds and even femtoseconds can be produced. One of the main advantages of a SESAM is the self-starting of the mode-locked operation. Nowadays, the absorption wavelength, the saturation energy and the recovery time of SESAMs are well-definable parameters [10] and these components are reliable and easy to use. However, SESAMs are sensitive to burning damage. In fact it is well known that some parameters (focus spot on SESAM [10], intracavity power, etc) are very critical and damage problems can be observed when these parameters are not correctly adjusted or when perturbations occur. This is particularly crucial in the case of very low repetition rate ML. Our aim was then to use a SESAM in a relatively low risk setup configuration, using a dual mode-locking technique (here QPS) to extend the critical parameters of the cavity. But, in order to be sure that the increase of the stable ML range was not only due to the SESAM (independently of the QPS) we tried the mode-locking of our cavity with SESAM alone. The ML stability was only for short term, in the range of ten's of seconds. This experiment was tried with different SESAMs with saturable absorptions from 1 to 4% and no significant stability change was observed in our experiment.

Our experimental conclusion is that the quadratic polarisation switching works relatively well with Nd:YVO₄ but not in the case of Nd:GdVO₄. To overcome this problem, we explored the alternative way by combining both techniques, QPS and SESAM. In fact, low repetition rate ML with Nd:GdVO₄ lasers is more difficult to obtain than with Nd:YVO₄. This could be explained by the fact that Nd:GdVO₄ has a lower emission cross section (subsequently a lower gain) than Nd:YVO₄ [3]. We will see how the use of this dual ML technique allowed obtaining stable ML for Nd:GdVO₄. We also applied it to Nd:YVO₄ to see whether it also improves the overall stability of the laser.

3. Experimental setup

The performed experiment is a diode pumped solid state laser using a 10-mm long, 0.1%-doped Nd:GdVO₄ crystal (a-cut, from Castech) and accordingly a 10-mm long, 0.1%-doped Nd:YVO₄ crystal (a-cut, from Castech) as the amplifying medium. To pump these crystals, we used a laser diode at 808 nm (from LIMO, HLU30F400-808) with a maximum output power of 30W corresponding to 27W incident power on the crystals. The laser cavity length is increased with a multiple pass cavity (MPC) [14]. In order to obtain a low repetition rate, we realised a cavity length of 38 m corresponding to a repetition rate of nearly 4 MHz. As shown in fig. 1, the end mirror of the MPC has been replaced by a SESAM (BATOP 234-II-3; $\lambda=1064$ nm; saturable absorption = 1.8 %). Thanks to the dual-ML technique, the focus spot is not so critical and no concave mirror has been used to focus the laser on the SESAM. The focus spot on the SESAM is then in the millimetre range in diameter (waist of 0.73 mm according to ABCD-matrix simulation) and the SESAM is operating in a safe condition of power density. At the other end of the cavity we used a plane output coupler mirror ($T=27$ % at 1064 nm) combined with a type II Potassium Titanyl Phosphate (KTP) crystal with a length of 8 mm to perform the quadratic polarisation switching (QPS). Between the actual amplifying crystal and the KTP crystal a polariser and a half-wavelength plate have been

placed for the purpose of obtaining QPS by setting up the saturable reflection of this non-linear mirror. The QPS is optimised for the half-wave plate angle of 5° from one of the neutral axis of the non-linear crystal (corresponding to an angle Θ of 10° for the incident laser polarisation). The typical order of nonlinear transmission is (for small Θ) $\Delta t \approx 1 - \cos\Theta$ leading in our case to 1.5 %. One can notice the large difference to the Stankov ML technique [15] where the optimum polarisation orientation is close to one given the maximum SHG efficiency. One of the advantages of the QPS over the Stankov ML technique is then to operate close to the SHG extinction which thus limited the power lost in the green beam. Moreover no critical phase condition is required between the fundamental and the second harmonic waves which leads to easier adjustment of the nonlinear mirror.

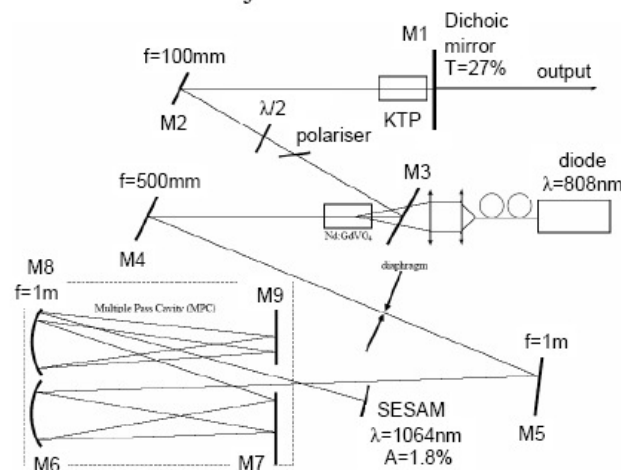


Fig. 1. Experimental setup of the laser cavity; the distances are: M1-M2: 60mm, M2-lasing crystal: 290mm, lasing crystal-M4: 300mm, M4-M6: 2310mm, M6 and M8-M7 and M9: 1050mm, M8-SESAM: 1190mm

4. Results

By applying the combination of a SESAM and the QPS mode-locking technique we observed a stable mode-locked operation with a repetition rate of 3.95 MHz and an average output power of 1.4 W corresponding to an energy per pulse of 350 nJ for the Nd:GdVO₄ laser. For comparison, with the Nd:YVO₄ laser, we observed an average output power of 2.5 W (for the same repetition rate) corresponding to an energy per pulse of 638 nJ.

With an homemade long-arm autocorrelator, we measured a pulse duration of 16.5 ps for the Nd:GdVO₄ laser assuming an ideal sech^2 temporal pulse shape. Figure 2 shows the corresponding intensity autocorrelation trace. For comparison, a similar pulse duration of 14.8 ps has been obtained with the Nd:YVO₄ laser (also assuming an ideal sech^2 temporal pulse shape).

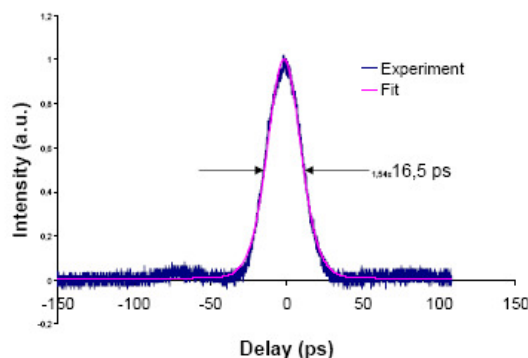


Fig. 2. Autocorrelation trace of 16.5ps pulses for the Nd:GdVO₄ laser using the dual ML technique

In order to demonstrate the stability of the laser we measured the pulse train with a photodiode every 30 minutes over a period of few hours. Figure 3 shows one pulse of each pulse train put on the same graph for comparison.

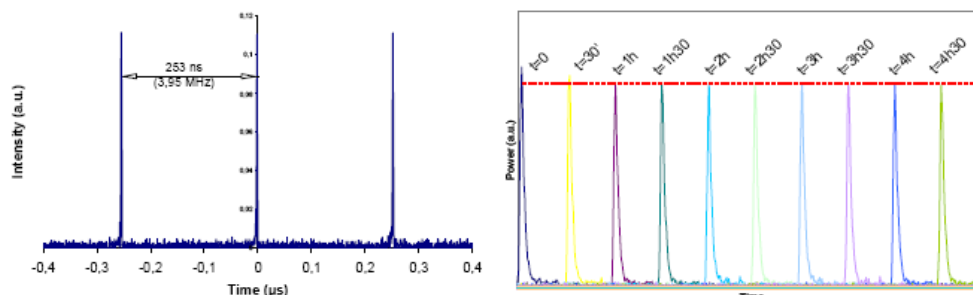


Fig. 3. Left : Pulse train. Right : Comparison of pulses taken every 30 minutes demonstrating the stable long-term mode-locked operation

In addition, we measured the spectrum (Fig. 4) using an optical spectrum analyser with a resolution of 0.07 nm. The central wavelength is 1063 nm with a bandwidth of 0.132 nm which leads to a time bandwidth product of 0.57 for Nd:GdVO₄. For Nd:YVO₄, the central wave-length is 1064.2 nm with a bandwidth of 0.14 nm which leads to a time bandwidth product of 0.56.

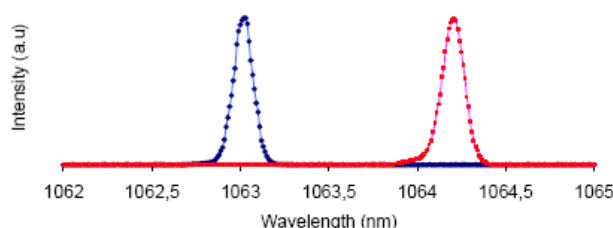


Fig. 4. Spectrum of the generated laser pulses (nm) vs. intensity (a.u.), Nd:GdVO₄ (blue trace at 1063.0 nm) and Nd:YVO₄ (red trace at 1064.2 nm)

The dual mode-locking technique combining SESAM and QPS appeared to be very interesting in terms of reliability, low-sensitivity, robustness and high stability of the mode-locked regime. Firstly, we experimentally observed that for a very long cavity using Nd:GdVO₄ the use of only one of these techniques leads to bad stability mode-locked operation in terms of long-term range (i.e. under the minute range). On the contrary, a significant increase of then long-term stability is obtained by applying this dual-technique. Moreover, we observed also a robustness of the system for weeks: the laser did not require any realignment when switched on. Secondly, the dual-mode-locking technique allows reducing the risk of damage of the SESAM. Actually, one could use a high-transmission output coupler both with a large spot on the SESAM which limits the peak power on the SESAM and without altering the stability of the mode-locking.

To quantify the stability, we first measured the range on which a long-term-stable mode-locked operation versus the pump power can be observed. The result of the combination of SESAM and QPS allowed mode-locked operation of the Nd:GdVO₄ laser ranging from 19 W to 26.1 W of pump power although the average output power is increased by a factor of two. With only a SESAM or a QPS for mode locking and without changing any parameters in the cavity, such a broad range of output power was not possible to be achieved. Out of this range, Q-switching or short term ML were observed for the Nd:GdVO₄.

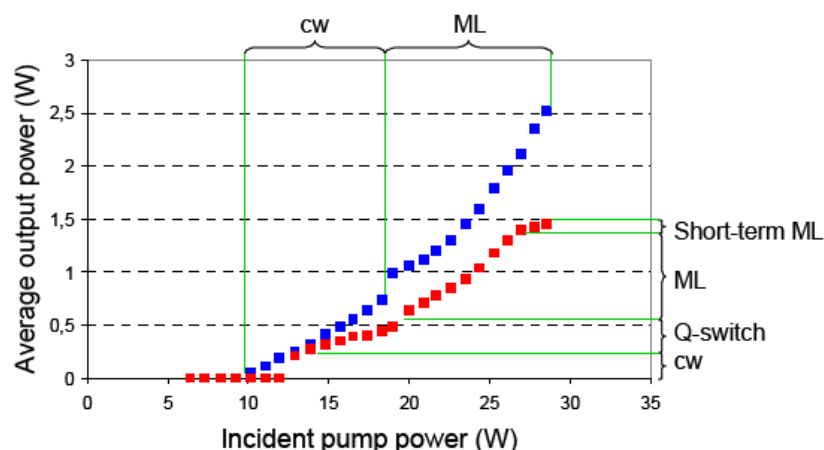


Fig. 5. Ranges of the different lasing operations for Nd:GdVO₄ (red curve) and Nd:YVO₄ (blue curve), output power (W) versus diode pump power (W)

Moreover, we also quantified the increase of the stability by measuring the half-wave plate tolerance. This parameter is interesting because we experimentally observed (with Nd:GdVO₄ and with Nd:YVO₄) for pure QPS mode-locking and for very long-cavities that it was a very critical parameter to adjust ($\sim 1^\circ$ of tolerance for Nd:YVO₄). In the case of dual mode-locking technique, stable picosecond emission was observed for a rotation of the half wave plate between 3° and 17° . The average output power stayed almost constant (1.5 %) in this range of rotation. Afterwards, the mode-locked operation collapsed in a few seconds. Hence we demonstrated that the combination of both mode-locking techniques enlarges the stable and robust long-term mode-locked operation of a Nd:GdVO₄ laser.

5. Conclusion

We demonstrated the first low repetition rate picosecond mode-locked Nd:GdVO₄ laser. The combination of both a semiconductor saturable absorber mirror and the quadratic polarisation switching technique was demonstrated to be crucial in our case to obtain a self-starting, stable and long-term mode-locked operation with Nd:GdVO₄. The stability was very strong for hours and did not require any alignment for starting. Moreover, relaxing the tolerance of the pulse fluence on the SESAM, the dual technique seems to be very suitable to reduce the risk of damage of the SESAM. In fact, it allows mode-locked operation with a focused spot on the SESAM excluding any damaging of it. This technique also improves the ML range compared to already published simple-ML-technique Nd:YVO₄ lasers. It seems then to be of very strong interest to robust industrial applications such as micro-machining. Moreover, such a robust low repetition rate picosecond laser system could be also applied typically for biological applications, especially for fluorescence lifetime measurements. Because the fluorescence lifetime of certain molecules is in the range of ten's of nanoseconds, short pulses of several tenths of picoseconds with a repetition rate of around 4 MHz are well adapted for such applications [14].

Acknowledgment

This work has been partially supported by the Conseil Général de l'Essonne under the ASTRE program and the research program Pôle Laser from the Contrat Plan Etat Région (2000–2006) (French State and Conseil Général de l'Essonne).

Annexe 4 : élargissement du spectre obtenu avec des fibres commerciales

Les premières expériences d'élargissement spectral ont été réalisées avec deux fibres commerciales.

La première fibre est une fibre « classique » en silice vendue par la société Nufern (modèle HP 460, voir ci-dessous). Cette fibre a un diamètre de mode de $3,5 \mu\text{m}$ à 515 nm . Nous travaillons avec une longueur de fibre de 50 m . Cette fibre a été choisie pour nous permettre de voir quel élargissement spectral pouvait être obtenu avec une injection à 532 nm dans une fibre classique. Les caractéristiques de cette fibre laissent présager un élargissement en régime de dispersion anormale uniquement du à l'effet Raman.

Nous avons donc regardé l'élargissement spectral en fonction de la puissance moyenne couplée. Les spectres obtenus sont rapportés figure 2-A4-1.

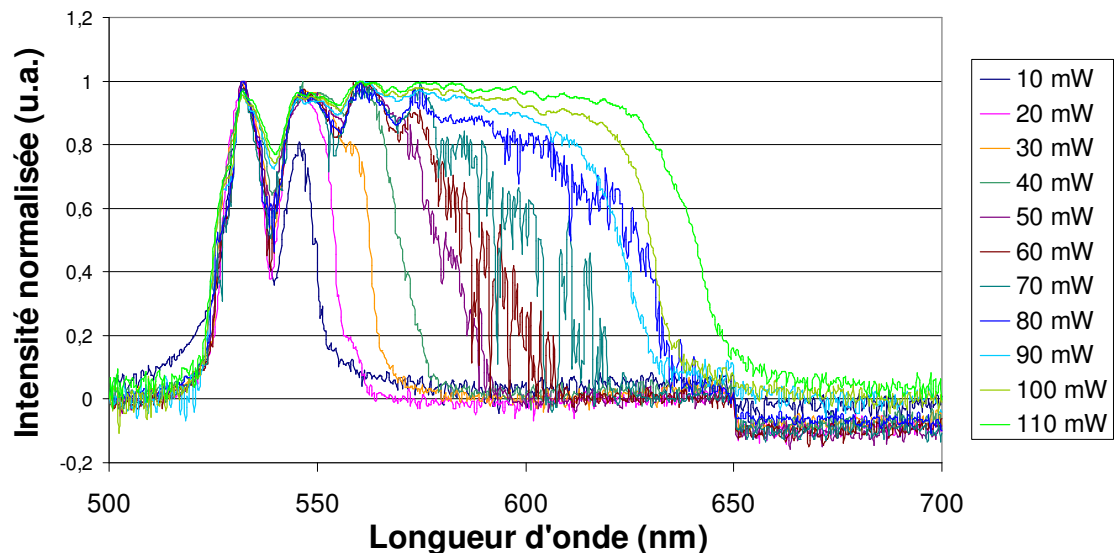


Figure 2-A4-1 : spectres obtenus en fonction de la puissance moyenne incidente injectée dans la fibre Nufern.

Nous observons nettement les différents pics Raman Stokes (décalés les uns par rapport aux autres des 13 THz caractéristiques de l'effet Raman dans la silice) qui apparaissent au fur et à mesure que la puissance couplée augmente. Pour une puissance de 110 mW , nous obtenons un spectre assez large de 532 à 650 nm avec un plateau de 560 à 630 nm .

Mais avec cette fibre, même en augmentant encore l'énergie en diminuant la cadence de la source, nous n'observons jamais de pic anti-Stokes, et concrètement, nous ne pouvons pas générer des longueurs d'onde plus courtes que 532 nm (figure 2-A4-1). Cette fibre ne répond donc pas à nos attentes.

La seconde fibre (Blaze Photonics NL-1,7-670nm, voir ci-dessous) a des caractéristiques plus originales. En effet, c'est une fibre microstructurée (figure 2-A4-2) qui a été dessinée pour avoir un diamètre de champ du mode plus petit ($1,1 \mu\text{m}$) et surtout un zéro dispersion décalé à 670 nm . Ainsi en injectant à 1064 nm , nous nous trouvons dans le régime de dispersion anormale de la

fibre, ce qui devrait provoquer une contribution des différents effets non linéaires pour l'élargissement spectral. De plus, en injectant à 532 nm, on devrait grâce aux décalages Raman successifs atteindre assez rapidement les 670 nm et déplacer ainsi une partie de l'énergie dans le régime de dispersion anormale. Nous travaillons avec une longueur de fibre de 5m.

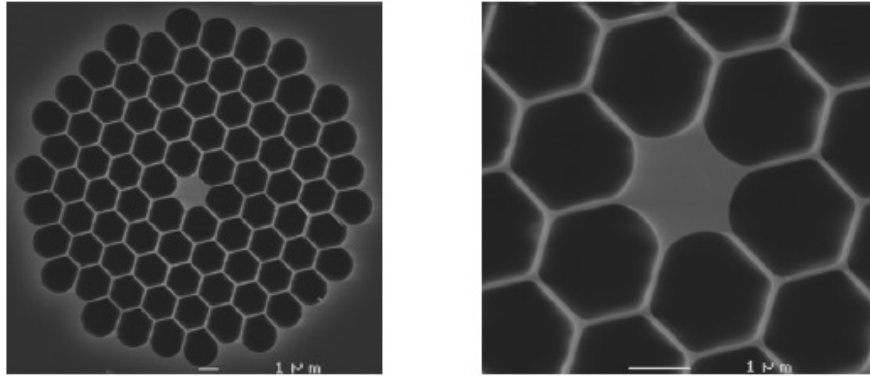


Figure 2-A4-2 : image de la face d'entrée de la fibre (Blaze Photonics NL-1,7-670nm) par microscopie électronique à balayage.

Les résultats obtenus sont très décevants. Quelle que soit la longueur d'onde d'injection, nous ne générons pas de longueurs d'onde inférieures au fondamental, si ce n'est juste un ou deux petits pics anti-Stokes. Il semble que pour des impulsions picosecondes comme les nôtres, une telle fibre ne soit pas adaptée : les effets non linéaires ne sont pas très importants et en tout cas ne nous permettent pas de générer des longueurs d'onde plus courtes que 500 nm. De plus, lorsque nous augmentons la puissance injectée au-delà de 12 W crête ou 200 mW moyen, la face d'entrée de la fibre se détériore limitant ainsi les effets non-linéaires. Donc, la fragilité de cette fibre et son prix ne nous ont pas incité à continuer dans cette voie...

Caractéristiques de la première fibre commerciale



Visible Wavelength Select Cutoff Single-Mode Fibers

Nufern visible wavelength fibers are optimized for use from 400 up to 900 nm. The high-performance fibers were developed for applications such as RGB components requiring generation of couplers, diode pigtailed and unique delivery needs. These fibers feature greater proof test levels and a higher second mode cutoff tolerance than standard fibers, resulting in higher strength, increased component reliability, better production yields and reduced costs for component manufacturers.

Typical Applications

- Diode Pigtailed
- Compact UV sources
- RGB components
- Couplers

Features & Benefits

- Superior fiber geometrical tolerances — Improved connectorization and coupling performance
- Extremely tight second mode cutoff tolerance — Enhanced component reproducibility
- Higher proof test level — Greater reliability for tight bend applications

Optical Specifications

Operating Wavelength (nominal)
Mode Field Diameter (1/e² fit - near field)
Second Mode Cutoff
Attenuation
Numerical Aperture (nominal)
Bend Loss for 100 turns @ LTBR (nominal)
Bend Radius for 0.05 dB per 100 turns (nominal)

405-HP

400– 550 nm
3.5 ± 0.5 μm @ 515 nm
370 ± 20 nm
30 dB/km @ 515 nm (nominal)
0.13
<0.001 dB @ 405 nm
Much less than LTBR @ 405 nm

460-HP

450 – 600 nm
3.5 ± 0.5 μm @ 515 nm
430 ± 20 nm
30 dB/km @ 515 nm (nominal)
0.13
<0.001 dB @ 460 nm
Much less than LTBR @ 460 nm

630-HP

600 - 770 nm
4.0 ± 0.5 μm @ 630 nm
570 ± 30 nm
≤12 dB/km @ 630 nm
0.13
<0.001 dB @ 630 nm
Much less than LTBR @ 630 nm

Geometrical & Mechanical Specifications

Clad Diameter
Coating Diameter
Core-Clad Concentricity
Coating/Clad Offset
Coating Material
Operating Temperature
Short-Term Bend Radius
Long-Term Bend Radius
Proof Test Level

125 ± 1 μm
245 ± 15 μm
< 0.5 μm
≤ 5 μm
UV Cured, Dual Acrylate
- 55 to + 85°C
≥ 6 mm
≥ 13 mm
≥ 200 kpsi (1.4 GN/m²)

125.0 ± 1.5 μm
245 ± 15 μm
< 0.5 μm
≤ 5 μm
UV Cured, Dual Acrylate
- 55 to + 85°C
≥ 6 mm
≥ 13 mm
≥ 200 kpsi (1.4 GN/m²)

125.0 ± 1.5 μm
245 ± 15 μm
< 0.5 μm
≤ 5 μm
UV Cured, Dual Acrylate
- 55 to + 85°C
≥ 6 mm
≥ 13 mm
≥ 200 kpsi (1.4 GN/m²)



7 Airport Park Road, East Granby, CT 06026 • 860.408.5000 • Toll-free 866.466.0214 • Fax 860.844.0210 E-mail info @ nufern.com • www.nufern.com

Standard specifications and design parameters are listed above. Specifications are subject to change without notice. Other configurations such as alternative form factors, optimized cut-off and UV cured color coating may be available. Let us know how Nufern can assist with your requirements.

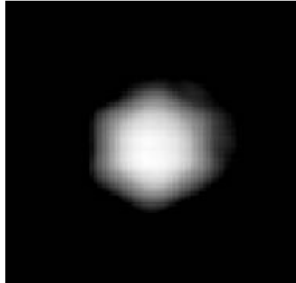


NU0103-08/06

Caractéristiques de la seconde fibre commerciale



NL – 1.7 – 670



Typical measured near field profile (log scale)

Optical properties

- Zero dispersion wavelength (λ_0) 670 ± 5 nm
- Dispersion slope at λ_0 0.51 ps·nm⁻²·km⁻¹
- Attenuation

λ_0	< 250 dB/km
1550 nm	< 90 dB/km
1380 nm	< 500 dB/km
1000 nm	< 170 dB/km
600 nm	< 300 dB/km
- Mode field diameter¹ at λ_0 1.1 ± 0.1 μ m
- Numerical aperture² at λ_0 0.24
- Effective nonlinear area³ 1.4 μ m²
- Nonlinear coefficient⁴ at λ_0 168 W⁻¹ km⁻¹

Physical properties

- Core diameter (average) 1.7 ± 0.1 μ m
- Pitch (distance between cladding holes) 1.9 ± 0.1 μ m
- Air Filling Fraction in the holey region >90%
- Width of struts holding the core 70 ± 10 nm
- Diameter of holey region 19 ± 0.5 μ m
- Diameter of outer silica cladding (OD) 114 ± 1 μ m
- Coating diameter (single layer acrylate) 230 ± 5 μ m
- Available length up to 1 km

To contact BlazePhotonics, please visit our website www.blazephotonics.com or send an email message to info@blazephotonics.com



Chapitre III : Développement et caractérisation d'un microscope basé sur une excitation en réflexion totale interne pour la mesure de temps de vie de fluorescence

Ce chapitre est consacré au dispositif d'imagerie de fluorescence que nous avons mis au point. Pour commencer, après une brève introduction, nous exposons les concepts physiques de la réflexion totale interne et du champ évanescent. Puis nous montrons l'intérêt d'un tel champ excitateur pour la microscopie de fluorescence, avant de nous intéresser aux applications de cette microscopie en réflexion totale interne, et de rapporter les principales configurations utilisées. Ensuite, nous présentons notre montage expérimental, en séparant d'une part la mise en forme du faisceau excitateur, provenant de la source présentée dans le chapitre précédent, pour obtenir le champ évanescent, et d'autre part la collection et le traitement du signal de fluorescence nécessaire à la mesure du temps de vie de fluorescence. Ultérieurement, nous caractérisons ce montage dans son ensemble, en évaluant ses performances spatiales et temporelles. Pour terminer ce chapitre, nous présentons les premières mesures de temps de vie de fluorescence sur des échantillons cellulaires vivants.

Comme nous l'avons vu lors de la présentation du projet à la fin du premier chapitre, nous souhaitons, pour faire de l'imagerie de temps de vie de fluorescence, utiliser une technique de microscopie qui permette d'allier les avantages de la microscopie plein champ en épifluorescence, et ceux des microscopies à balayage.

En effet, en microscopie plein champ, l'illumination de l'échantillon est réalisée avec un cône de lumière, ce qui permet une excitation uniforme sur un champ large, et qui confère par conséquent une rapidité certaine pour l'acquisition d'une image. L'inconvénient majeur de cette technique est sa mauvaise résolution axiale, qui se traduit concrètement par une dégradation du signal provenant du plan de l'échantillon imagé à cause de la contribution des plans supérieurs et inférieurs.

Concernant les dispositifs à balayage, par des processus de filtrage spatial (par exemple une réduction de la zone de détection en microscopie confocale, ou une réduction de la zone d'excitation en microscopie multiphotonique), ils permettent d'imager des sections optiques fines (inférieures au micromètre). Mais comme leur nom l'indique, ces techniques nécessitent un balayage, ce qui implique un certain nombre d'inconvénients, et notamment un temps nécessaire pour l'acquisition plus élevé.

Par conséquent, nous nous sommes intéressés à des techniques d'imagerie qui permettent de réduire le temps d'acquisition (notamment dans le but de pouvoir observer des processus dynamiques et de préserver les échantillons biologiques), d'étendre la zone de l'échantillon étudié, et d'améliorer la résolution axiale. La méthode qui nous a semblé la plus appropriée et en accord avec nos applications biomédicales est la microscopie de fluorescence en réflexion totale interne, que nous allons présenter en détail.

I - Physique de la réflexion totale interne et expression du champ évanescent

Considérons une interface entre deux milieux d'indices respectifs n_i pour le milieu incident et n_t pour le second milieu. D'une manière générale, un rayon incident à cet interface suit les lois de la réfraction de Snell-Descartes, i.e. :

$$n_i \sin(\theta_i) = n_t \sin(\theta_t) \quad (1)$$

Un phénomène de réflexion totale interne peut se produire à cette interface lorsque $n_i > n_t$. Dans ces conditions, le rayon réfracté s'écarte de la normale (figure 3-1).

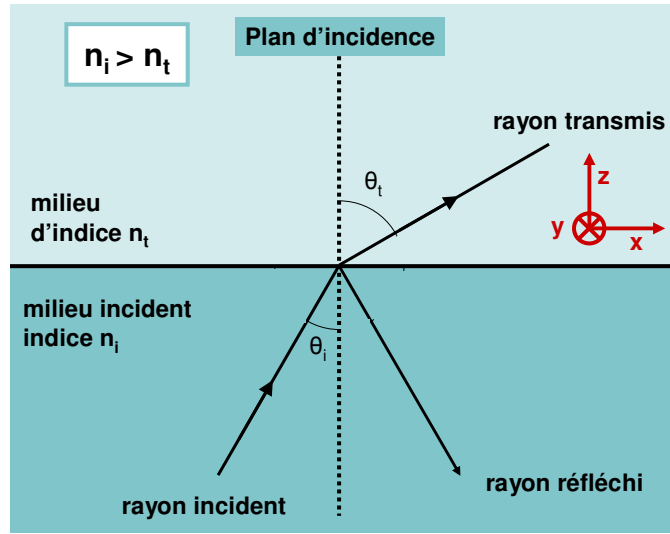


Figure 3-1 : schéma de principe et définition des notations.

Au fur et à mesure que θ_i augmente, le rayon transmis se rapproche de l'interface, et de plus en plus d'énergie est transférée au rayon réfléchi. On conçoit ainsi qu'à partir d'une certaine valeur de l'angle incident, le rayon transmis n'aura plus de réalité et que toute l'énergie sera réfléchie dans le milieu initial. Ceci se produira pour des valeurs d'angle d'incidence θ_i supérieures à l'angle critique θ_c défini par :

$$n_i \sin(\theta_c) = n_t \sin\left(\frac{\pi}{2}\right)$$

$$\sin(\theta_c) = \frac{n_t}{n_i} \quad (2)$$

C'est dans ce cas que l'on parle de réflexion totale interne. Les équations de Maxwell imposant des conditions de continuité, une petite partie du champ est transmise au second milieu et reste confinée à proximité de l'interface [Hecht 2002], [Axelrod 2005].

Soit $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ un repère orthonormal direct : (\vec{x}, \vec{z}) définit le plan d'incidence et (\vec{x}, \vec{y}) définit le plan de l'interface (figure 3-1). Considérons une onde plane propagative dans le milieu homogène d'indice n_i , incidente avec un angle θ_i par rapport à la normale à l'interface plane diélectrique avec le milieu d'indice n_t .

Toujours d'après la loi de Snell-Descartes (1), on peut exprimer le cosinus de l'angle formé par le rayon transmis avec la normale par :

$$\begin{aligned}\cos^2(\theta_t) &= 1 - \sin^2(\theta_i) \\ \cos^2(\theta_t) &= 1 - \left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i)\end{aligned}\quad (3)$$

Dans la configuration de réflexion totale, on a :

$$0 < \theta_c < \theta_i < \frac{\pi}{2}$$

Ce qui se traduit par :

$$0 < \sin(\theta_c) = \frac{n_t}{n_i} < \sin(\theta_i)$$

et donc,

$$1 < \left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i)$$

Par conséquent, d'après (3), le cosinus de l'angle transmis est imaginaire pur et vaut :

$$\cos(\theta_t) = \pm i \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \quad (4)$$

Avec une onde incidente plane d'amplitude A, la solution des équations de Maxwell pour le champ électrique transmis dans le milieu d'indice n_t peut être écrite :

$$\vec{E}_t = A \vec{E}_{t0} \exp[i(\vec{k}_t \cdot \vec{x} - \omega t)]$$

avec \vec{k}_t le vecteur d'onde dans le milieu d'indice n_t , de norme $k_t = \frac{2\pi n_t}{\lambda_0}$ où λ_0 est la longueur

d'onde dans le vide. En développant et en introduisant l'angle de réfraction θ_t dans l'écriture, on obtient :

$$\begin{aligned}\vec{E}_t &= A \vec{E}_{t0} \exp[i(k_{tx}x + k_{tz}z - \omega t)] \\ \vec{E}_t &= A \vec{E}_{t0} \exp[i(k_t \sin(\theta_t)x + k_t \cos(\theta_t)z - \omega t)]\end{aligned}$$

Puis, en utilisant (4),

$$\vec{E}_t = A \vec{E}_{t0} \exp\left[i\left(k_t \frac{n_i}{n_t} \sin(\theta_i) \times x - \omega t\right)\right] \times \exp\left[\pm k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \times z\right]$$

Seule la solution avec un argument de l'exponentielle réel négatif convient physiquement (sinon l'amplitude tend vers l'infini avec z), donc :

$$\vec{E}_t = A \vec{E}_{t0} \exp\left[i\left(k_t \frac{n_i}{n_t} \sin(\theta_i) \times x - \omega t\right)\right] \times \exp\left[-k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \times z\right]$$

Ainsi l'onde résultante se propage suivant x , c'est-à-dire parallèlement à la surface et décroît exponentiellement suivant z . Une telle onde est par conséquent **évanescence**. En terme d'intensité, on a :

$$I_t(z) = I_0 \times \exp\left(-2k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1} \times z\right)$$

$$I_t(z) = I_0 \times \exp\left(-\frac{z}{d}\right)$$

$$\text{avec } d = \frac{1}{2k_t \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1}} = \frac{\lambda_0}{2 \times 2\pi n_t \times \sqrt{\left(\frac{n_i}{n_t}\right)^2 \sin^2(\theta_i) - 1}}$$

$$\text{c'est-à-dire } d = \frac{\lambda_0}{4\pi \times \sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}.$$

Cette longueur, caractéristique de la décroissance de l'intensité, est appelée **profondeur de pénétration** du champ évanescent [Born 1975], [Oheim 2005]. Par exemple, pour $n_i = 1,50$, $n_t = 1,38$, $\lambda_0 = 480 \text{ nm}$ et $\theta_i = 69^\circ$ (ces valeurs correspondent aux valeurs expérimentales utilisées dans la suite), on obtient $d = 161 \text{ nm}$, ce qui est inférieur à la longueur d'onde d'excitation.

En partant des équations de Fresnel, qui donnent le rapport entre les champs électriques transmis et incident, il est possible de calculer les composantes du champ électrique évanescent dans le repère $(\vec{x}, \vec{y}, \vec{z})$ (avec $\theta_i > \theta_c$ pour que ce champ évanescent existe). En considérant que le faisceau incident est polarisé avec un angle α par rapport au plan d'incidence, on obtient les composantes suivantes pour le champ électrique évanescent \vec{E}_{t0} :

$$\begin{aligned} E_{t0x} &= \frac{2 \cos(\theta_i) n_i \times \sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}{\sqrt{n_t^4 \cos^2(\theta_i) + n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_i^2 n_t^2}} \times \cos(\alpha) \times \exp\left[-i \left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_i^2 n_t^2}}{n_t^2 \cos(\theta_i)}\right) + \frac{\pi}{2} \right)\right] \\ E_{t0y} &= \frac{2 \cos(\theta_i) n_i}{\sqrt{n_i^2 - n_t^2}} \times \sin(\alpha) \times \exp\left[-i \left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}{n_i \cos(\theta_i)}\right) \right)\right] \\ E_{t0z} &= \frac{2 n_i^2 \cos(\theta_i) \sin(\theta_i)}{\sqrt{n_t^4 \cos^2(\theta_i) + n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_i^2 n_t^2}} \times \cos(\alpha) \times \exp\left[-i \left(\arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_i^2 n_t^2}}{n_t^2 \cos(\theta_i)}\right) \right)\right] \end{aligned}$$

[Abney 1992], [Jozefowski 2007].

Nous pouvons remarquer que ces composantes possèdent un facteur exponentiel complexe. Les

$$\text{deux termes de phase } \delta_{//} = \arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_i^2 n_t^2}}{n_t^2 \cos(\theta_i)}\right) \text{ et } \delta_{\perp} = \arctan\left(\frac{\sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}}{n_i \cos(\theta_i)}\right),$$

qui dépendent de l'angle d'incidence θ_i , donnent accès aux décalages longitudinal et transverse du faisceau réfléchi par rapport au faisceau incident. Ces deux décalages sont respectivement connus sous les nom de décalage de Goos-Hanchen et décalage de Imbert [Imbert 1972], [Beauregard 1972].

L'expression des composantes du champ électrique nous permet également de mettre en évidence les propriétés particulières de la polarisation du champ évanescent :

- lorsque le champ électrique incident est perpendiculaire au plan d'incidence (ou autrement dit $\alpha = \pi/2$), les deux composantes E_{tx} et E_{tz} du champ évanescent sont nulles. Ainsi dans ce cas, et uniquement dans ce cas, le champ électrique évanescent est transverse à la direction de propagation, c'est-à-dire perpendiculaire au plan d'incidence.

- lorsque le champ électrique incident est dans le plan d'incidence (ou autrement dit $\alpha = 0$), le champ électrique évanescent a des composantes non nulles suivant les directions x et z qui sont respectivement parallèle et perpendiculaire à la direction de propagation. Le champ électrique évanescent reste dans ce cas dans le plan d'incidence. La polarisation de l'onde évanescente sera donc elliptique. Avec une telle polarisation incidente, il est possible d'avoir une onde évanescente polarisée de manière prédominante perpendiculairement à l'interface (et même polarisée complètement perpendiculairement à l'interface pour un angle d'incidence égale à l'angle critique). Une telle particularité trouve un certain nombre d'applications, comme par exemple pour la visualisation de l'orientation des membranes cellulaires [Sund 1999].

Dans ces deux cas particuliers, l'intensité relative du champ évanescent par rapport à celle du champ incident est facilement accessible à partir des composantes du champ électrique évanescent \vec{E}_{t0} . Dans le premier cas, avec un champ électrique incident perpendiculaire au plan d'incidence, l'intensité relative est donnée par :

$$I_{r,\perp} = \left| E_{t0x} \left(\alpha = \frac{\pi}{2} \right) \right|^2 + \left| E_{t0z} \left(\alpha = \frac{\pi}{2} \right) \right|^2 = \frac{4 \cos^2(\theta_i) (2 n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2)}{n_i^4 \cos^2(\theta_i) + n_i^4 \sin^2(\theta_i) - n_t^2 n_i^2}$$

Dans le second cas, avec un champ électrique incident parallèle au plan d'incidence, on obtient :

$$I_{r,\parallel} = \left| E_{t0y}(\alpha = 0) \right|^2 = \frac{4 n_i^2 \cos^2(\theta_i)}{n_i^2 - n_t^2}.$$

Le tracé de ces grandeurs en fonction de l'angle d'incidence révèle une augmentation d'un facteur 4 à 5 relativement à l'intensité incidente près de l'angle critique (figure 3-2). Ceci peut s'interpréter en terme d'interférences entre les faisceaux incidents et réfléchis.

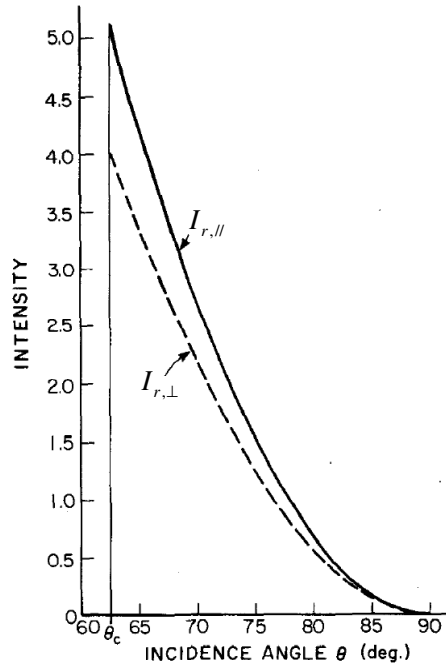


Figure 3-2: Intensités relatives à l'interface ($z = 0$) en fonction de l'angle d'incidence pour $n_i=1,50$ et $n_t=1,33$, correspondant à un angle critique de $62,46^\circ$ [Axelrod 1984].

Il est aussi important de souligner que la profondeur de pénétration du champ évanescent calculée précédemment ne dépend nullement de la polarisation.

En présence d'une couche intermédiaire entre le milieu incident d'indice n_i et le milieu d'indice n_t , il est possible de modifier les propriétés du champ évanescent. En particulier le dépôt d'un film métallique est très intéressant. Sous certaines conditions, il est possible d'exciter des électrons libres situés à la surface du film métallique et de provoquer une oscillation de ces particules, autrement appelée plasmon de surface [Axelrod 2001], [Economou 1969], [Barnes 2003].

Suivant la polarisation de l'onde incidente, le champ résultant est différent. Pour une onde évanescence polarisée dans le plan d'incidence (polarisation p), quand sa vitesse de phase est en accord avec celle du plasmon de surface, il va y avoir un phénomène de résonance qui va se traduire par une augmentation de l'intensité de l'onde évanescence polarisée dans le plan d'incidence. Concernant la polarisation perpendiculaire au plan d'incidence, un tel film réduit grandement, voire annule, l'intensité du champ évanescent polarisé dans cette direction (perpendiculaire au plan d'incidence), ceci quel que soit le champ incident. Ainsi au final, l'onde évanescence est polarisée linéairement dans le plan d'incidence, et ce quelle que soit la polarisation incidente.

La condition d'accord de phase entre le champ évanescent et le plasmon de surface, est réalisée pour un certain angle d'incidence, qui dépend de la constante diélectrique du métal (figure 3-3) [Kou 1988]. Une telle augmentation de l'intensité est d'autant plus remarquable qu'une couche de métal de 20 nm paraît opaque à l'œil.

Ce phénomène de résonance plasmon trouve de nombreuses applications notamment dans des biocapteurs [Maillart 2004], [Byun 2007], ou en microscopie [He 2006].

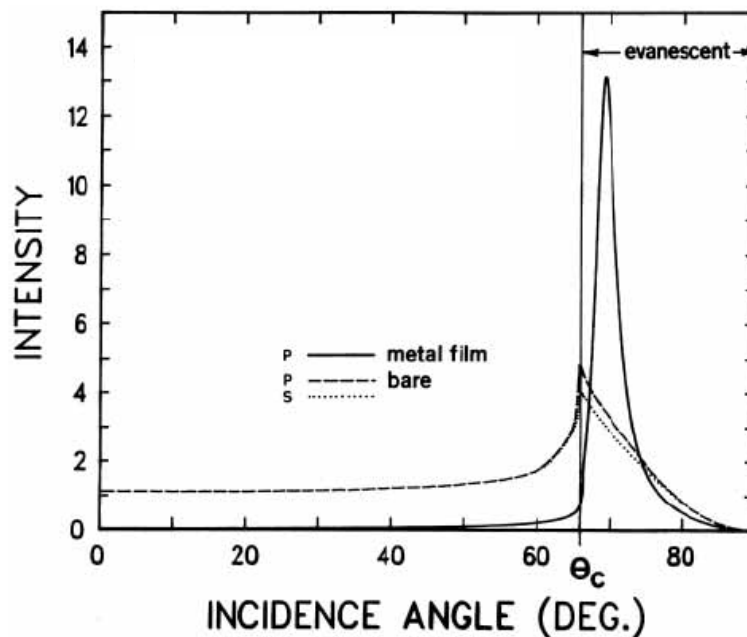


Figure 3-3 : Intensités évanescences relatives suivant les polarisations s et p juste à l'interface ($z = 0$) en considérant une intensité incidente dans le verre égale à l'unité. Pour cette simulation, $n_i=1,46$ et $n_t=1,33$, correspondant à un angle critique de $65,7^\circ$. Le film métallique est ici une couche d'aluminium de 20 nm [Axelrod 2001].

Etant donné que nous ne travaillons que sur des substrats en verre sans couche métallique intermédiaire, nous ne reviendrons plus sur cette configuration dans ce manuscrit.

II - Utilisation en microscopie de fluorescence

Dans un contexte de recherche de l'amélioration de la résolution spatiale en microscopie, on conçoit aisément comment les propriétés physiques d'un tel champ évanescent peuvent profiter à des dispositifs d'imagerie. Dans le cas de la microscopie de fluorescence, les échantillons biologiques observés ont un indice de réfraction voisin de 1,38, et sont posés sur une lamelle de verre d'indice 1,5. Ainsi, à l'interface entre le verre et l'échantillon, la condition sur les indices est vérifiée pour permettre l'existence du phénomène de réflexion totale interne. Si l'angle d'incidence du faisceau est suffisant (c'est-à-dire supérieur à l'angle critique qui vaut dans ce cas environ 67°), la génération d'un champ exciteur évanescent est possible. Dès lors, la localisation de l'intensité lumineuse près de l'interface permet un confinement spatial de l'excitation, et confère à un tel dispositif d'imagerie une résolution axiale égale à la profondeur de pénétration du champ évanescent. Tout l'intérêt de cette technique est que la résolution axiale sub-longueur d'onde est obtenue uniquement à l'excitation et en champ large.

Un tel dispositif de microscopie de fluorescence, où l'excitation de l'échantillon est réalisée grâce au champ évanescent consécutif au phénomène de réflexion totale interne entre la lamelle et l'échantillon, est appelé TIRFM (pour Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy) [Oheim 2005], [Toomre 2001]. Les mesures avec cette technique bénéficient d'un très faible bruit de fond, puisque les fluorophores situés plus profondément dans l'échantillon ne sont pas excités. De plus cette excitation assure une exposition minimale à la lumière des plans de l'échantillon loin de l'interface, ce qui réduit les photodommages et le photoblanchiment. La microscopie TIRF permet également de travailler en plein champ, ce qui permet d'obtenir des images sans avoir à « balayer » l'échantillon, sans reconstruction d'image.

II.1 – Confinement de l'excitation et modification de l'émission à proximité de l'interface

Cependant, l'interprétation quantitative du TIRF nécessite de prendre des précautions. En effet, la profondeur de pénétration est facilement calculable théoriquement, mais un certain nombre de paramètres difficilement appréciables influe expérimentalement sur cette grandeur. C'est le cas du profil spatial (divergence) et spectral (monochromaticité) du faisceau exciteur, de la qualité de l'interface (rugosité, pureté, inhomogénéités), et des propriétés optiques de l'échantillon (inhomogénéité d'indices sur de courtes distances subcellulaires, avec des variations de 1,32 à 1,38). Ces changements d'indices dans l'échantillon vont provoquer la diffusion (voire la réfraction) du champ évanescent aux interfaces. Ainsi le confinement du champ exciteur est graduellement perdu dans la direction de propagation, et la fluorescence générée par l'échantillon devient la superposition des fluorescences excitées respectivement par le champ évanescent et par la lumière diffusée (figure 3-4).

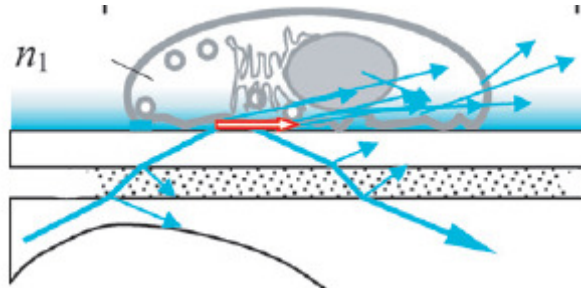


Figure 3-4: schéma illustrant la perte du confinement du champ évanescent au cours de la propagation. Ici, cette perte est due aux inhomogénéités de l'échantillon. [Oheim 2005]

De plus, il faut bien garder à l'esprit que la proximité d'une interface, qu'elle soit diélectrique ou métallique, modifie l'émission du fluorophore. Sans rentrer dans les calculs, nous allons tenter de rapporter ici les notions essentielles, pour appréhender l'influence de la proximité de l'interface sur les intensités et les temps de vie de fluorescence mesurés. Les résultats rapportés ici sont basés sur un modèle utilisant l'émission d'un « dipôle à puissance fixée » [Hellen 1987].

Si on étudie la répartition radiale de l'intensité émise par le dipôle suivant son orientation (figure 3-5), on observe une forte anisotropie de l'émission. Il est intéressant de constater que, dans le cas d'un substrat en verre, la plus grande partie de l'intensité est émise dans le verre. Aussi, à condition de réussir à collecter les angles correspondant aux « pics », c'est-à-dire d'avoir des objectifs avec des ouvertures numériques assez grandes (supérieures à 1,4), la détection de la fluorescence dans le substrat est même meilleure.

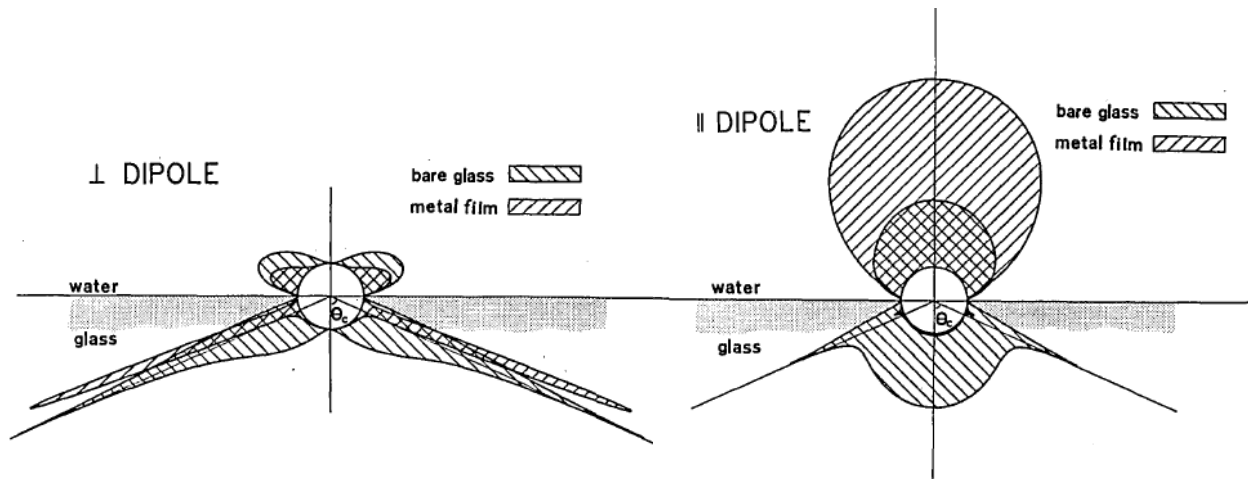


Figure 3-5 : intensité moyenne normalisée en fonction de l'angle d'observation polaire avec un dipôle situé à 80 nm de l'interface. Deux orientations sont présentées : perpendiculaire (à gauche) et parallèle (à droite) à l'interface. Dans chaque cas la répartition d'intensité est représentée avec ou sans une couche d'aluminium de 22 nm déposée sur le verre. [Hellen 1987].

La proximité de l'interface influe également sur le temps de vie de fluorescence du fluorophore. Pour voir cela, il est nécessaire d'introduire les notations suivantes :

$$p \equiv \frac{P_T(z)}{P_T(z = \infty)}$$

avec $P_T(z)$ la puissance totale dissipée par le dipôle (rayonnement plus chaleur) à amplitude fixée à une distance z de l'interface et :

$$f \equiv \frac{\int_{4\pi} d\Omega S(\Omega', \Omega, z)}{\int_{4\pi} d\Omega S(\Omega', \Omega, z = \infty)}$$

où S est l'intensité rayonnée à amplitude fixée, Ω l'angle solide d'observation, Ω' l'angle solide d'excitation. Ces deux quotients représentent respectivement le rapport entre la puissance totale dissipée par un dipôle à une altitude z et le même dipôle à l'infini, et le rapport entre la puissance rayonnée par un dipôle à une altitude z et le même dipôle à l'infini. Notons que ces deux quotients sont fonctions de z , mais aussi de l'orientation du dipôle.

Si on note q l'efficacité quantique du fluorophore (dépendant de l'orientation du dipôle) à une distance z , et q_0 l'efficacité quantique du même dipôle isolé, on peut montrer que :

$$\frac{1}{q} = \frac{\left(\frac{1}{q_0} + p - 1 \right)}{f}$$

En considérant un fluorophore avec un temps de vie τ_0 en l'absence de désexcitation non radiative, on montre que le temps de vie de fluorescence du même fluorophore près de l'interface est :

$$\tau = \frac{q\tau_0}{f}$$

Dans la plupart des cas, et notamment avec des interfaces en verre, la proximité de l'interface se traduit de deux manières. D'une part, en interagissant avec la surface, le champ proche du dipôle va provoquer une augmentation du champ rayonné dans le milieu le plus dense (i.e. le verre). D'autre part, la surface peut dissiper l'énergie en chaleur. Ainsi pour des distances à l'interface d'une dizaine de nm, ces deux effets se combinent pour augmenter la puissance totale dissipée P_T et donc diminuer le temps de vie de fluorescence de l'ordre de 10 %. Ainsi, si expérimentalement nous observons des diminutions de temps de vie de fluorescence en TIRF, il faudra garder à l'esprit que la proximité de l'interface peut en être responsable.

II.2 - Applications

Intrinsèquement, cette technique ne permet d'observer que les premières centaines de nanomètres de l'échantillon près de l'interface, ce qui exclut toute imagerie en profondeur (figure 3-6). Mais le très bon rapport signal à bruit et la résolution axiale sublongueur d'onde obtenue simplement font de cette technique de microscopie une méthode complémentaire aux autres méthodes de microscopie [Axelrod 2001], [Mashanov 2003].

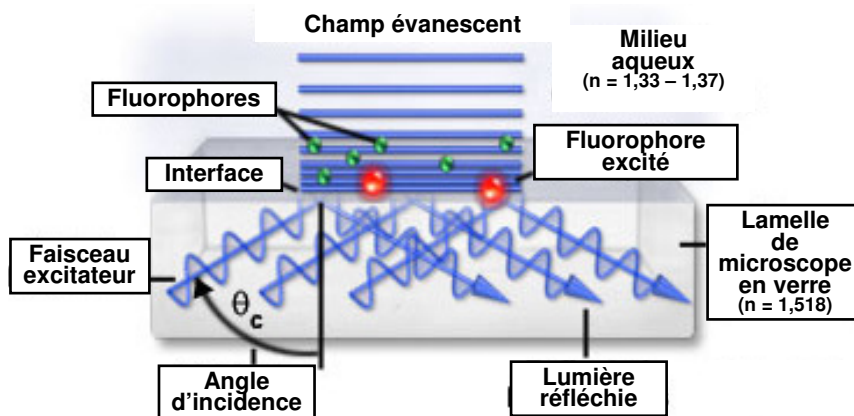


Figure 3-6 : schéma de principe de la microscopie TIRF d'après [Nikon 2008].

Nous allons rapporter ici un certain nombre d'applications biomédicales de la microscopie TIRF. Cette technique d'imagerie autorise une visualisation sélective des régions de contact cellules-substrats. Elle permet d'observer qualitativement la position, l'extension, la composition ou encore le mouvement des régions de contact. Il est ainsi possible de mettre en évidence l'influence des composantes d'une surface biomatérielle [Burmeister 1998] ou des protéines d'adhésion [Delanoë-Ayari 2004] lors de ces contacts cellules-substrats. Des travaux rapportent l'étude du contact entre des cellules leucémiques de rat et des cibles de membrane lipidique déposées sur une lamelle [Weis 1982], ou du rôle de l'actine et des granules de sécrétion quand la cellule adhère au verre [Lang 2000].

Il est également possible de visualiser des molécules uniques près de la surface et de réaliser des mesures spectroscopiques sur ces entités. Le but est ici de pouvoir observer les propriétés de molécules individuelles sans le moyennage d'ensemble inhérent aux spectroscopies standards dans les milieux massifs. Ainsi des détections de molécules uniques dans des volumes de quelques attolitres sont possibles [Ruckstuhl 2004]. On peut ainsi par exemple observer le mouvement de molécules uniques dans des gels [Dickson 1996]. Il est également possible de suivre des interactions de molécules uniques avec des microtubules [Vale 1996] ou des bactéries [Khan 2000]. Un autre domaine d'application de la microscopie TIRF est la mesure des vitesses de fixation des protéines extra- et intracellulaires aux récepteurs de surface de cellules ou à des membranes artificielles. Pour cela, il a été démontré assez tôt l'utilité de l'association de la microscopie TIRF à la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) et à la mesure du recouvrement de fluorescence après photoblanchiment (FRAP) [Thompson 1981], notamment avec la réalisation de premières mesures relatives à l'adsorption de l'immunoglobuline [Thompson 1983]. Plus récemment l'association TIRF-FCS a permis d'observer des réactions de surface et de diffusion à une interface liquide solide [Starr 2001], [Leutenegger 2006], ou de mesurer la diffusion latérale d'une protéine fluorescente en intracellulaire dans la membrane plasmique [Ohsugi 2006]. Grâce au couplage avec des expériences de FRAP, l'influence de certaines protéines dans l'activité de canaux ioniques a également pu être mise en évidence [Pochynyuk 2007].

On peut en outre utiliser le déclin exponentiel du champ évanescent pour suivre les granules de sécrétion dans des cellules, avant et pendant le processus de sécrétion. En effet, des petits déplacements nanométriques de ces granules perpendiculairement à l'interface vont se traduire par des variations d'intensité mesurables [Oheim 1998], [Steyer 1999], [Allersma 2006].

La microscopie TIRF est aussi employée pour appréhender les structures micromorphologiques et dynamiques des cellules vivantes. Par exemple, les propriétés de polarisation du champ évanescent sont utilisées pour étudier l'orientation de la membrane [Sund 1999]. La microscopie TIRF permet également d'observer en temps réel des processus comme la polymérisation de filament d'actine [Kuhn 2005], ou encore d'étudier les irrégularités submicrométriques comme les sites d'exocytose et voir le rôle du calcium dans la régulation de ce processus [Becherer 2003].

Enfin, la très faible proportion de la cellule exposée au rayonnement en microscopie TIRF permet de faire des acquisitions à long terme, notamment pendant le développement de la cellule en culture sans l'altérer. Ainsi des acquisitions sur plusieurs jours, voire plusieurs semaines ont été rapportées [Wang 1994].

II.3 - Géométries

Expérimentalement, l'excitation d'un échantillon par un champ évanescent peut être réalisée grâce à différentes géométries de réflexion totale interne. Cette dernière peut être obtenue avec

des systèmes basés sur l'utilisation soit d'un (ou plusieurs) prisme(s), soit d'un objectif à grande ouverture numérique. [Axelrod 2001], [Conibear 2000], [Schneckenburger 2005], [Stout 1989].

II.3.1 - Configurations avec prisme

Historiquement, le premier dispositif de microscopie de fluorescence cellulaire en réflexion totale interne rapporté par Axelrod en 1981 utilise un prisme de forme cubique [Axelrod 1981] (figure 3-7). Axelrod proposa d'appliquer cette méthode d'illumination à la microscopie cellulaire en s'inspirant des travaux d'Ambrose, qui introduisit cette technique d'illumination [Ambrose 1961], et de travaux en spectroscopie de fluorescence pour l'observation de monocouches [Harrick 1973].

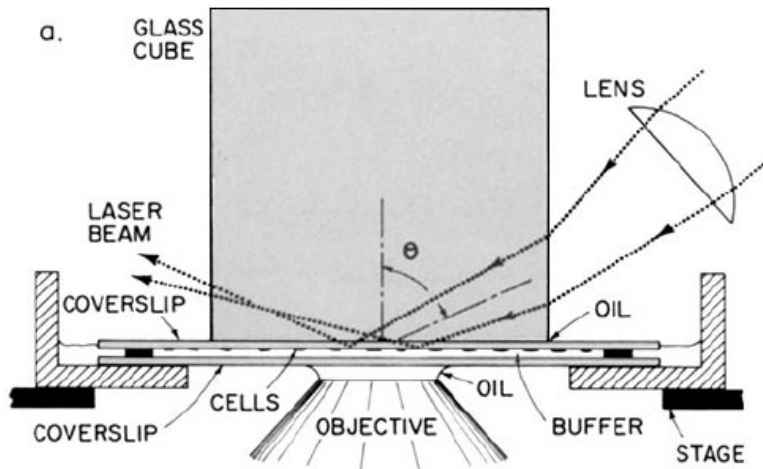


Figure 3-7 : premier dispositif de microscopie cellulaire TIRF proposé par Axelrod [Axelrod 1981].

Le principe est le suivant : la réfraction dans le prisme, dont l'indice de réfraction est plus élevé que celui du milieu incident (de l'air) va rapprocher le faisceau excitateur de la normale au plan d'incidence et par conséquent l'incliner d'avantage par rapport à la lamelle. Ainsi, à l'interface entre la lamelle et l'échantillon, des angles supérieurs à l'angle critique peuvent être atteints assez simplement, sans avoir besoin d'illuminer le montage avec des incidences rasantes.

Dans la configuration historique précitée, le prisme est positionné sur l'axe optique. La même géométrie peut être adoptée mais avec des prismes équilatéraux, trapézoïdaux ou hémisphériques (figure 3-8).

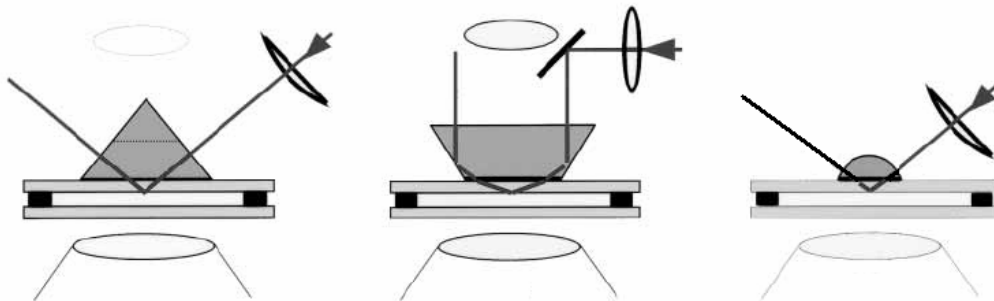


Figure 3-8 : différentes géométries de réflexion totale interne avec un prisme positionné sur l'axe optique d'après [Axelrod 2001]. De gauche à droite, sont utilisés un prisme équilatéral, un prisme trapézoïdal et un prisme hémisphérique.

L'utilisation de ces géométries oblige à réaliser la détection du signal de fluorescence avec l'objectif de microscope de l'autre côté de l'échantillon. De plus, la présence du prisme restreint le mouvement de la platine où se trouve l'échantillon. Avec des microscopes inversés, l'échantillon doit être monté entre deux lamelles, et coincé entre le prisme d'un côté et l'objectif de l'autre, ce qui réduit l'accessibilité au spécimen observé. Le choix de l'objectif est aussi primordial : l'utilisation des objectifs à immersion à huile permet une collection de la fluorescence plus efficace, mais le contraste va être altéré pour des échantillons épais. En effet, comme le signal traverse l'échantillon avant d'être détecté, des aberrations sont introduites. Pour des épaisseurs d'échantillons comprises entre 30 μm et 100 μm , il vaut mieux travailler avec des objectifs à immersion à eau. Pour avoir les meilleures images avec cette géométrie, il faut utiliser un microscope droit et un objectif à immersion à eau directement submergé dans la « chambre » contenant l'échantillon (figure 3-9). Pour les échantillons trop épais ou trop diffusants, la détection ne peut pas se faire du côté opposé à l'excitation.

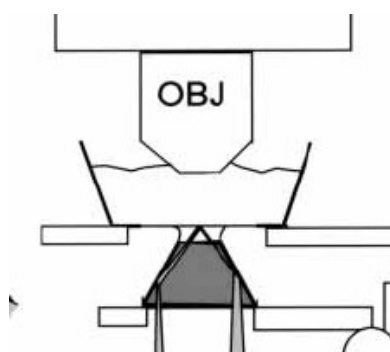


Figure 3-9 : utilisation d'un microscope droit et d'un objectif à immersion à eau. Une géométrie avec un prisme trapézoïdal est réalisée [Axelrod 2001].

Il faut également choisir précautionneusement le prisme et la lamelle (ou la lame) où se produit la réflexion totale : ces deux éléments doivent avoir exactement le même indice et le couplage optique doit être de bonne qualité (utilisation de glycérol, de cyclohexanol ou d'huile).

Dans ces configurations, une lentille est utilisée pour focaliser le faisceau excitateur sur l'échantillon, avec une étendue spatiale de l'ordre du champ de vue pour limiter la diffusion de l'excitation et la fluorescence parasite des éléments du montage (huile, lamelle, prisme). La largeur angulaire doit être également assez faible pour pouvoir sélectionner proprement l'angle d'incidence et donc la profondeur de pénétration du champ évanescent.

L'utilisation d'une géométrie avec prisme présente des avantages certains. C'est avec cette technique que l'on obtient les champs évanescents les plus homogènes. De plus, l'angle d'incidence est facilement ajustable, et peut prendre toutes les valeurs de 0 à 90°, ce qui assure une maîtrise de la profondeur de pénétration du champ évanescent. D'ailleurs cette configuration est utilisée pour détecter sélectivement les fluorophores selon la profondeur et faire de la topographie [Schneckenburger 2005].

Certaines géométries alternatives ont été développées toujours avec des prismes, mais en utilisant la lame (ou la lamelle) comme guide d'ondes pour exploiter de multiples réflexions (figure 3-10). Avec ces géométries, la troisième ou quatrième réflexion est utilisée pour illuminer l'échantillon. La présence d'un deuxième prisme de « sortie » est indispensable pour que la lumière ne soit pas piégée dans le guide ni diffusée sur la face de fin de la lame(lle). Ainsi, en déportant le prisme, il est possible d'exciter l'échantillon et de détecter la fluorescence du même côté, libérant l'accès à l'échantillon. Le couplage de l'excitation est assez critique, et encore plus dans la configuration où excitation et détection se font du même côté (puisque dans ce cas-là, il faut guider l'excitation dans une lamelle et non plus dans une lame).

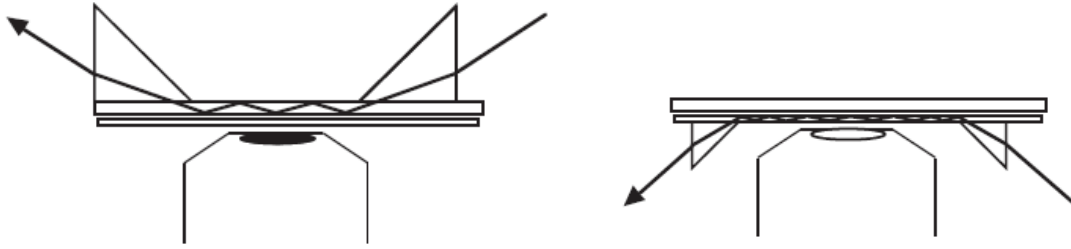


Figure 3-10 : deux configurations avec des prismes hors d'axe. A gauche, excitation et détection sont réalisées sur les faces opposées de l'échantillon, alors qu'à droite tout se fait du même côté [Conibear 2000].

D'autres équipes ont quant à elles travaillé sur des géométries de prismes particulières pour optimiser l'excitation et ne privilégier aucune direction [Wakelin 2002].

II.3.2 - Configurations sans prisme avec un objectif à grande ouverture numérique

Ces géométries sont quant à elles basées sur l'utilisation d'objectifs de microscope avec des ouvertures numériques (ON) élevées. En effet, on pourra se placer dans des conditions de réflexion totale interne uniquement si l'ouverture numérique de l'objectif est supérieure à l'indice de réfraction du milieu observé. En notant θ_m l'angle maximum avec lequel le faisceau émerge dans l'huile, nous avons :

$$ON = n_{\text{huile}} \sin(\theta_m)$$

Comme l'égalité de Snell-Descartes est vérifiée au cours des différentes réfractions à chaque interface plane, nous obtenons :

$$ON = n_i \sin(\theta_{i,m})$$

où n_i est l'indice de la lamelle (avec toujours les notations définies au début de ce chapitre) et $\theta_{i,m}$ est l'angle d'incidence à l'interface lamelle échantillon maximal atteignable avec l'ouverture numérique de l'objectif. Pour pouvoir être en réflexion totale, il faut que cet angle $\theta_{i,m}$ soit plus grand que l'angle critique, ou autrement dit :

$$\sin(\theta_{i,m}) > \sin(\theta_c)$$

$$n_i \sin(\theta_{i,m}) > n_i \times \frac{n_t}{n_i}$$

$$ON > n_t$$

L'indice de réfraction d'un échantillon biologique étant voisin de 1,38, des objectifs avec des ouvertures numériques supérieures ou égales à 1,4 peuvent être utilisés. De tels objectifs sont maintenant disponibles commercialement, et ont permis de remettre au goût du jour la microscopie TIRF une vingtaine d'années après sa découverte. Toutes les grandes entreprises de microscopie proposent de tels objectifs avec des grossissements de 60x et des ouvertures numériques autour de 1,45 (Olympus 1,45 ; Leica 1,46 ; Nikon 1,49) qui utilisent des huiles et des lamelles « traditionnelles ». D'autres objectifs avec des grossissements de 100x et des ouvertures numériques encore plus grandes (Olympus 1,65) existent aussi, mais ces derniers nécessitent des huiles d'indice 1,78, très volatiles (qui laissent en plus des résidus cristallins) et toxiques, ainsi que des lamelles en verres particuliers (SF11 ou LAFN21) beaucoup plus onéreuses et avec une forte dispersion chromatique.

Dans cette géométrie avec des objectifs à forte ouverture numérique, pour qu'un phénomène de réflexion totale à l'interface lamelle échantillon se produise, il faut un angle d'incidence élevé à l'interface lamelle-échantillon, ce qui signifie que le faisceau excitateur doit couvrir une zone périphérique de la pupille de l'objectif. Pratiquement, cette configuration est réalisée d'une manière simple en focalisant le faisceau excitateur dans le plan focal arrière de l'objectif (figure 3-11). Ainsi, la position hors d'axe où ce faisceau est focalisé, ou plus précisément la distance entre le point de focalisation et l'axe optique est directement liée à l'angle incident entre la lamelle et l'échantillon. Pour des positions trop proches de l'axe optique, il n'y a pas de phénomènes de réflexion totale, et l'échantillon est éclairé dans une configuration d'épifluorescence classique. Quand le point de focalisation est situé à la distance qui correspondrait à une ouverture numérique égale à l'indice de réfraction du milieu d'observation, on passe en réflexion totale interne, et le champ évanescent est excité. Ensuite, en augmentant encore la distance à l'axe optique, on va réduire la profondeur de pénétration du champ évanescent (figure 3-11). En opérant ainsi, une telle configuration permet de changer continûment l'angle d'incidence de la position d'épifluorescence jusqu'au TIRF, uniquement en déplaçant dans le plan focal arrière de l'objectif le point de focalisation du centre vers la périphérie de la pupille d'entrée. Ceci peut être réalisé de différentes manières, par exemple en déplaçant la lentille de focalisation ou en augmentant l'angle d'incidence sur cette lentille.

La taille de la zone d'excitation augmente avec la convergence des rayons dans le plan focal arrière de l'objectif. Expérimentalement, cette augmentation est réalisée en étendant le faisceau sur la lentille qui permet de focaliser dans le plan focal arrière de l'objectif.

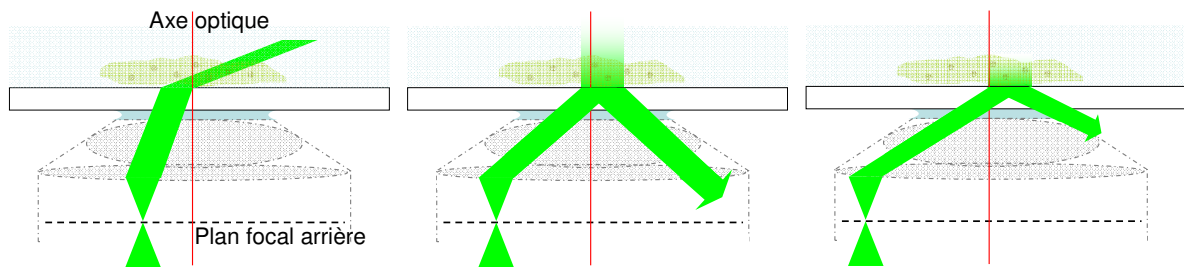


Figure 3-11 : schéma illustrant l'influence de la position du point de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif.

Plus la focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif est de bonne qualité, autrement dit plus la tâche de focalisation est petite, plus le nombre d'angles émergent de l'objectif est faible, et mieux la profondeur de pénétration du champ évanescent est maîtrisée. Dans le cas idéal, pour une tâche ponctuelle dans le plan focal arrière, on a un unique angle émergent et donc une unique profondeur de pénétration du champ évanescent.

Cependant, le champ évanescent créé avec cette géométrie souffre d'un certain nombre d'inhomogénéités. Tout d'abord, il n'est pas rare d'avoir des problèmes de réflexion du faisceau à l'intérieur de l'objectif, ce qui peut être causé par l'écrêtage du faisceau par l'objectif lorsque la focalisation dans le plan focal arrière est importante. Ainsi certains rayons préalablement déviés par des réflexions parasites vont arriver à l'interface lamelle-échantillon avec un angle inférieur à l'angle critique, créant des irrégularités du fond lors de l'observation. De plus, lorsque l'on travaille avec une source d'excitation cohérente comme le laser, ces réflexions, ainsi que les poussières sur les éléments du trajet optique vont créer des phénomènes d'interférences ou de diffraction qui vont dégrader le champ excitateur au niveau de l'échantillon.

On constate également que l'asymétrie de l'excitation (on focalise dans le plan focal arrière en un point) va définir une unique direction de propagation du champ évanescent (figure 3-12). Par conséquent, dans cette direction, à cause des inhomogénéités de l'échantillon, le confinement spatial du champ évanescent va diminuer, et on observe un « bavement », une perte de contraste.

Pour remédier à ces problèmes d'inhomogénéité, plusieurs dispositifs ont été élaborés dernièrement en utilisant la même idée : faire décrire au point de focalisation dans le plan focal arrière de l'objectif un cercle centré autour de l'axe optique. En utilisant des temps d'acquisition assez longs devant cette période de rotation pour permettre un moyennage, des images de meilleure qualité avec un champ plus homogène sont obtenues [Mattheyses 2006], [Fiolka 2008].

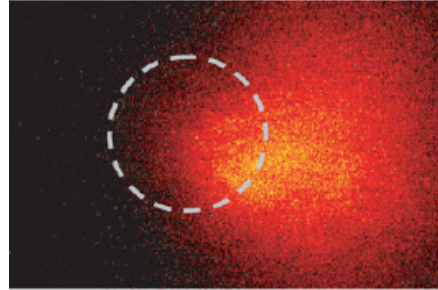


Figure 3-12 : asymétrie du champ évanescent. Le cercle central représente la pupille de sortie de l'objectif. Dans ce cas, la focalisation est réalisée à gauche dans l'objectif (en regardant l'échantillon et l'objectif par-dessus) [Oheim 2005].

Il est également possible avec ces géométries basées sur un objectif à forte ouverture numérique, de créer un plan équivalent au plan focal arrière de l'objectif et accessible, pour mettre en forme le faisceau. Ainsi la sélection des rayons périphériques hors d'axe se fait dans ce plan. On peut placer un disque opaque amovible qui bloque les rayons centraux, et ne laissent passer que les rayons périphériques « supercritiques » : ainsi en retirant le disque on passe de la configuration TIRF à la configuration épifluorescence traditionnelle. Cette technique peut être utilisée avec des lampes à arc, permettant à l'expérimentateur de s'affranchir des problèmes de cohérence de l'excitation. Cependant, la plupart de la puissance de la lampe est bloquée par le disque. On peut également utiliser une lentille conique associée à une lampe à arc, ou encore, lorsque l'on travaille avec un laser, casser la cohérence de l'excitation en passant à travers une suspension de billes de latex (figure 3-13).

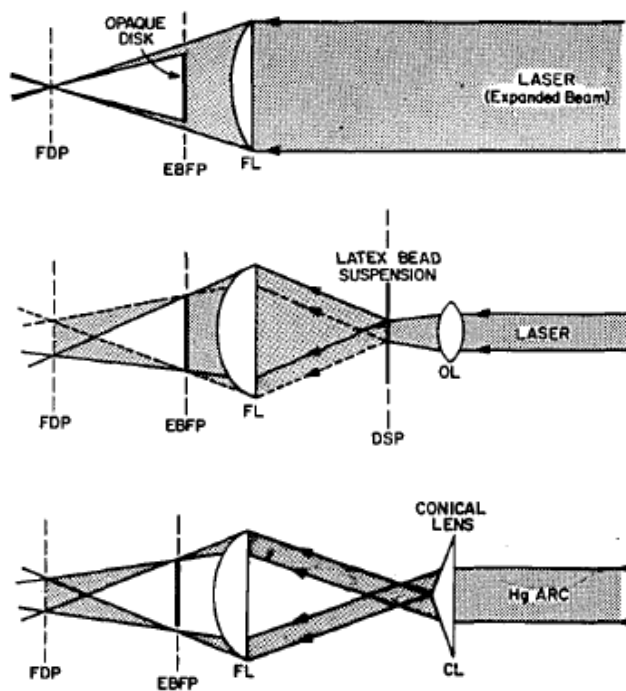


Figure 3-13 : mise en forme du faisceau dans un plan équivalent au plan focal arrière de l'objectif (EBFP). En haut, disque opaque qui ne laisse passer que les rayons « supercritiques » ; au centre utilisation d'une suspension de bille de latex pour casser la cohérence de l'illumination ainsi que d'un disque opaque ; en bas, utilisation d'une lampe à arc avec un axicon pour augmenter la puissance de lumière supercritique au détriment de la lumière subcritique. [Stout 1989].

Avec ces géométries sans prisme, l'échantillon est complètement accessible, ce qui constitue un avantage considérable. En configuration de microscopie inversée, il est alors possible d'ajouter facilement des réactifs pour suivre l'évolution du spécimen en temps réel. De plus, l'imagerie est réalisée en épifluorescence, c'est-à-dire que l'excitation et la détection se font à travers le même objectif. Ainsi le signal de fluorescence ne traverse pas l'échantillon avant d'être collecté, ce qui réduit notablement les problèmes de diffusion de l'émission, et diminue les contraintes dans le choix des échantillons observables. Mais par contre, la dimension physique de la pupille de l'objectif utilisé ne permet pas d'atteindre les angles les plus élevés, et dans ces configurations, l'utilisateur est limité dans les profondeurs de pénétration du champ évanescent accessibles.

Après cet aperçu des techniques d'excitation du champ évanescent les plus utilisées en microscopie, il apparaît nettement que chacune a ses avantages et ses inconvénients. L'argument qui a le plus retenu notre attention est la simplicité du montage, c'est pourquoi nous avons choisi une configuration avec un objectif à grande ouverture numérique. Dans cette géométrie, la préparation de l'échantillon est simple (entre lame et lamelle, ou dans des puits, comme avec les microscopes inversés traditionnels), et les alignements nécessaires pour obtenir le champ évanescent sont plus faciles et basés sur l'utilisation d'éléments optiques courants (miroirs et lentilles uniquement). Nous nous sommes donc procurés chez Olympus un objectif d'ouverture numérique 1,45 60x pour réaliser notre montage (ses caractéristiques sont données en annexe 1).

III – Présentation du montage expérimental

Comme on l'a vu, l'intérêt majeur de la microscopie TIRF est d'obtenir une résolution axiale sublongueur d'onde en illumination plein champ. Avec cette technique, il n'est pas nécessaire d'utiliser de dispositifs à balayage à l'excitation. La détection peut donc également se faire en champ large en utilisant des caméras CCD comme détecteurs. On comprend alors tout l'intérêt de coupler cette technique d'imagerie à une mesure du temps de vie de fluorescence en plein champ (dont le principe est rappelé dans l'introduction), puisque l'accès à une image d'intensité pour un champ large est possible en une seule acquisition et sans reconstruction. Nous allons maintenant présenter notre montage expérimental complet de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne résolue en temps. Un schéma du dispositif dans son ensemble est présenté figure 3-14, et des photographies de la mise en forme du faisceau d'excitation (figure 3-15), du microscope (figure 3-16) et des deux voies de détection (figure 3-20) sont également rapportées.

III.1 – Excitation de la fluorescence en réflexion totale interne

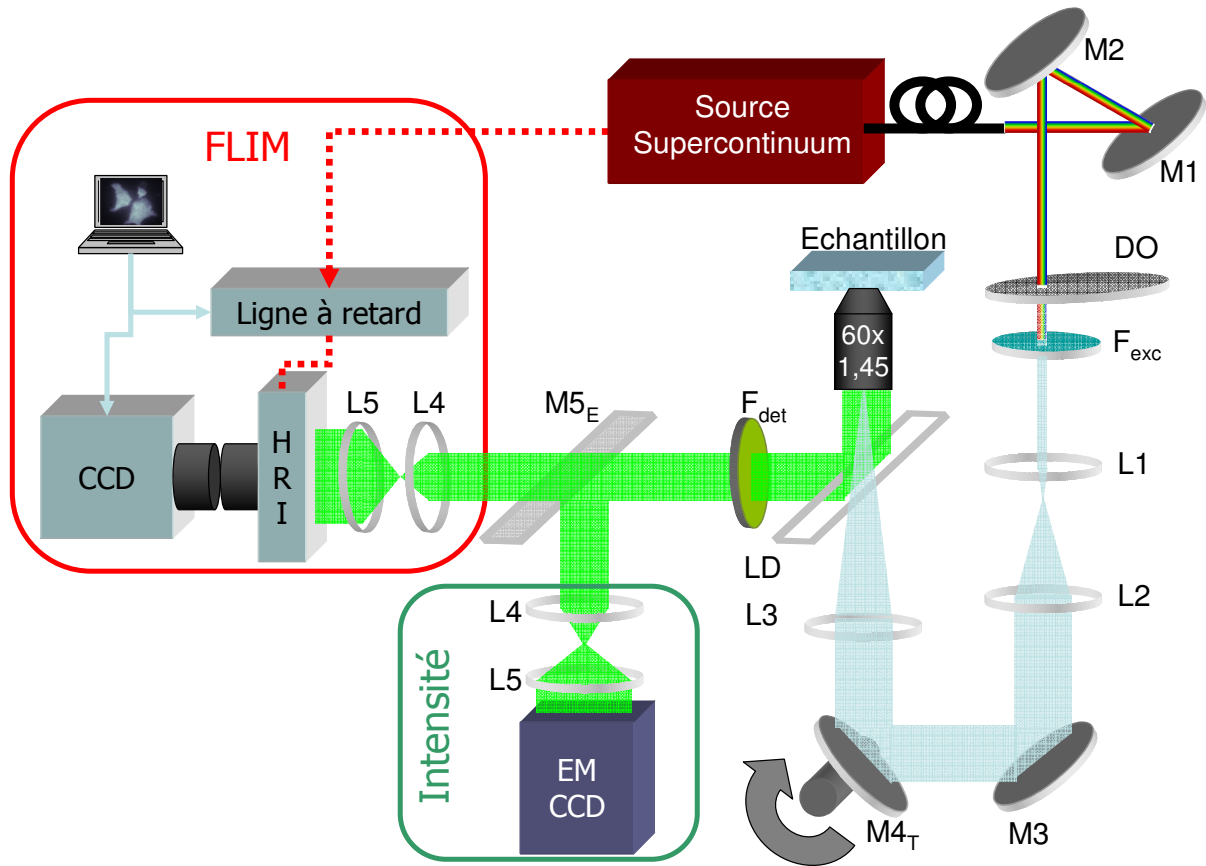


Figure 3-14 : montage expérimental.

M1, M2, M3 : miroirs diélectriques HR dans le visible ; M4T : miroir diélectrique HR dans le visible sur une monture tournante ; M5E : miroir escamotable traité dans le visible pour passer d'une voie de détection à l'autre ; DO : densité optique ajustable ; F_{exc}, LD, F_{det} : filtre à l'excitation, lame dichroïque et filtre à la détection pour réaliser la sélection spectrale ; L1 : f = 10mm ; L2 : f = 300mm ; L3 : f = 300mm ; L4 : f = 50mm ; L5 : f = 150mm ; HRI : High Rate Imager (ou intensificateur).

III.1.1 - Mise en forme du faisceau excitateur

La source excitatrice utilisée est la source laser supercontinuum présentée dans le chapitre précédent (p 81). La sortie fibrée de cette source est positionnée directement à la hauteur d'entrée du faisceau dans le microscope, pour faciliter l'alignement en travaillant dans un unique plan horizontal et ainsi éviter d'avoir à utiliser un périscope. Les deux miroirs de renvoi M1 et M2, réfléchissants dans le visible, servent d'une part à s'affranchir de toute réinjection infrarouge dans l'oscillateur (voir la caractérisation de la source dans le chapitre précédent) et d'autre part à retrouver l'alignement en cas de déplacement de la source. Après le miroir M2, les fuites dans l'infrarouge sont récupérées (visible sur la photo mais pas sur le schéma) et envoyées, par l'intermédiaire d'un miroir, sur une photodiode pour récupérer le train d'impulsions du laser, qui va nous servir de signal de référence pour synchroniser la détection temporelle.

La densité optique ajustable (roue avec une densité continûment variable de 0 à 4) permet de maîtriser la puissance laser incidente sur l'échantillon. Pour mesurer la puissance incidente dans

les gammes spectrales où la puissance de la source varie, nous plaçons le filtre à l'excitation après la densité optique, et un miroir escamotable placé juste après le filtre à l'excitation renvoie le faisceau sur un puissancemètre (non représenté sur le schéma). Connaissant la transmission des optiques jusqu'à l'échantillon, on peut ainsi évaluer précisément la puissance incidente sur l'échantillon et par conséquent ajuster la valeur de la densité optique pour avoir la puissance souhaitée. Dans des régions du spectre d'émission de la source où la densité spectrale ne varie que très peu, le filtre à l'excitation est placé directement dans le cube dans le microscope, juste avant l'objectif.

Les deux lentilles L1 et L2 forment un afocal qui permet d'élargir le faisceau excitateur d'un facteur $\frac{300}{10} = 30$. Cet élargissement est nécessaire pour avoir au niveau de l'échantillon une zone d'excitation assez large. Nous avons sélectionné ce facteur 30 pour que la zone de l'échantillon imagée soit excitée d'une manière uniforme, bien entendu sans trop étaler le faisceau pour avoir un éclairage suffisant et ne pas créer de diffusion de l'excitation dans le reste de l'échantillon. Deux autres miroirs (le miroir M3 et un autre non représenté sur le schéma) sont utilisés pour replier le faisceau et garantir l'accessibilité aux différentes parties du montage. De même des diaphragmes, apparents sur la photo mais non représentés sur le schéma, sont utilisés pour retrouver l'alignement, mais également pour couper la partie périphérique du faisceau, partie inhomogène à cause des aberrations chromatiques de la lentille à l'extrémité de la fibre du laser.

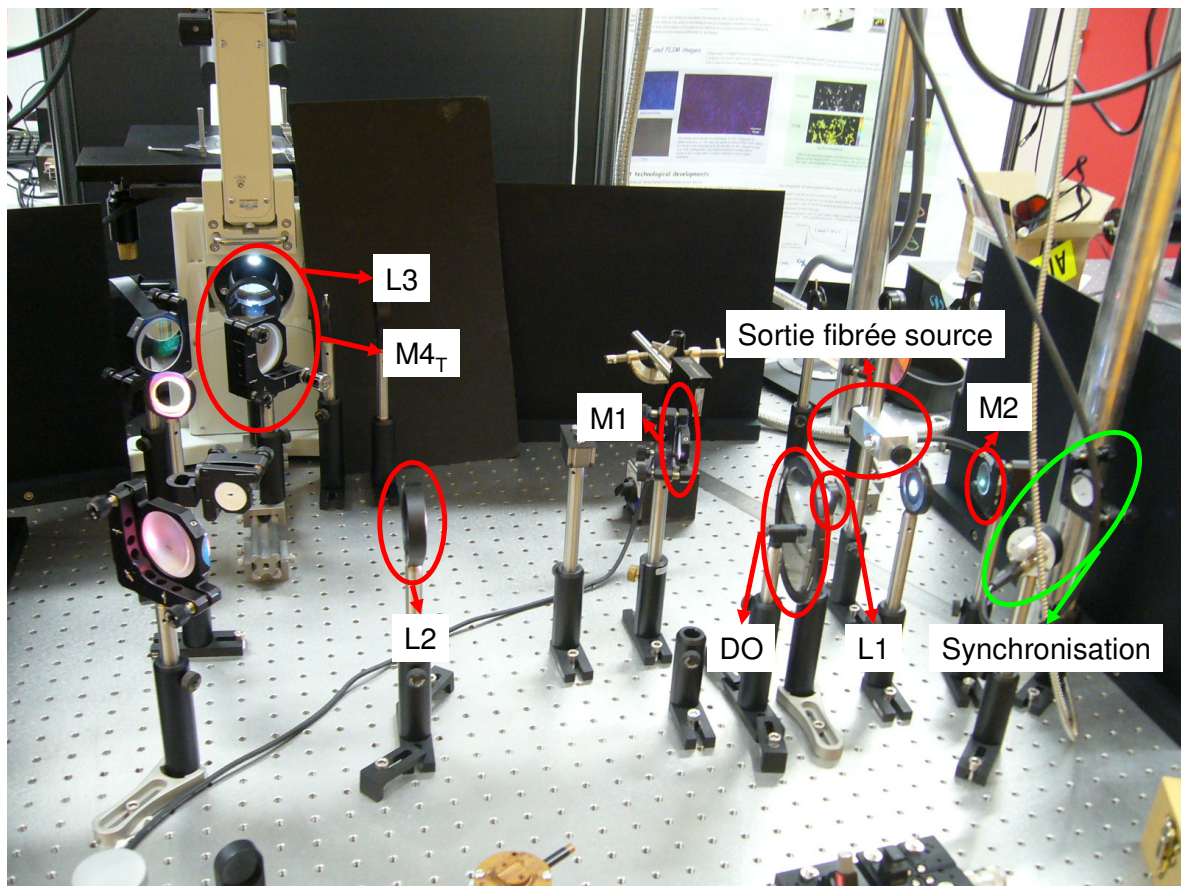


Figure 3-15 : photographie de la partie mise en forme du faisceau d'excitation.

Les mêmes notations que sur le schéma (figure 3-14) sont utilisées. La partie « synchronisation » regroupe un miroir hautement réfléchissant dans l'infrarouge et une photodiode qui nous permettent de récupérer le train d'impulsions.

III.1.2 – Procédure d'alignement pour générer le champ évanescent

Le miroir $M4_T$ et la lentille $L3$ (associés à l'objectif, qui est présenté dans l'annexe 1) sont les éléments qui nous permettent de réaliser une excitation en réflexion totale interne. La lentille $L3$ permet de focaliser le faisceau excitateur dans le plan focal arrière de l'objectif. Son positionnement est assez délicat. En effet, elle doit se situer à la bonne distance pour focaliser le faisceau excitateur dans le plan focal de l'objectif, et elle doit être centrée pour ne pas introduire d'aberrations qui créeraient des inhomogénéités supplémentaires dans le champ évanescent. Pour faciliter l'alignement, nous utilisons un rail qui nous garantit le centrage de la lentille par rapport à l'axe défini par le microscope, et qui nous permet d'avancer ou de reculer la lentille pour bien focaliser l'excitation dans le bon plan. Concrètement, le positionnement de la lentille est réalisé en observant la tâche produite par le faisceau excitateur après l'objectif. Si la lentille est bien centrée, normale au faisceau, elle va induire peu d'aberrations, et donc en défocalisant l'objectif, on doit voir une tâche qui reste à symétrie circulaire. Si la lentille est à la bonne distance, pour une position de l'objectif correspondant à sa position lors de l'acquisition (i.e. avec une mise au point réglée à l'interface lamelle-échantillon), la tâche « à l'infini », c'est-à-dire projetée au plafond sera la plus petite possible (idéalement de la taille de la pupille de sortie de l'objectif puisque le faisceau doit être collimaté). Bien entendu, vue la faible ouverture numérique de la lentille $L3$ nous permettant de focaliser, la tâche dans le plan focal arrière n'est pas ponctuelle, et donc la collimation n'est pas parfaite. Mais on l'optimise en réglant la position de cette lentille.

Le miroir $M4_T$ quant à lui nous permet de modifier l'angle d'incidence du faisceau sur la lentille $L3$, et ainsi de décaler la tâche dans le plan focal arrière de l'objectif, ce qui augmente l'angle d'incidence à l'interface lamelle-échantillon. Ainsi en tournant ce miroir et en augmentant l'angle, on va pouvoir passer d'une excitation d'épifluorescence classique à une excitation en réflexion totale interne. Puis, une fois en configuration TIRF, on peut changer légèrement l'angle, et ainsi jouer sur la profondeur de pénétration du champ évanescent.

Avec cette configuration, nous pouvons estimer l'angle incident du faisceau excitateur sur la lentille, et donc en déduire approximativement une profondeur de pénétration pour le champ évanescent. Mais nous n'avons pas accès précisément à cette grandeur.

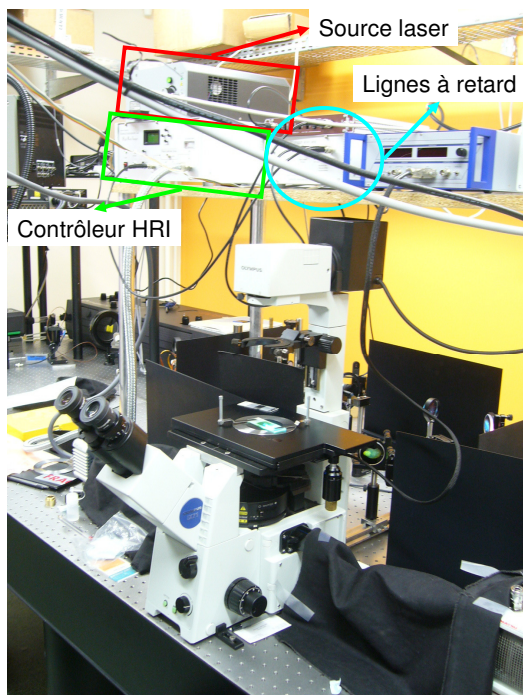


Figure 3-16. : photographie du microscope. On peut remarquer sur l'étagère du dessus le boîtier de la source laser, ainsi que le contrôleur du HRI et les lignes à retard utilisées.

Après la lentille L3, le faisceau rentre dans le bâti du microscope (modèle Olympus IX 71) (figure 3-16). L'excitation arrive par le port arrière du microscope, dépourvu de toute optique. Il arrive sur un cube contenant le jeu de filtre utilisé pour l'observation (figure 3-17). Ce jeu est constitué d'un filtre à l'excitation (que nous pouvons également placer juste après la densité optique, pour pouvoir mesurer la puissance incidente) qui sélectionne le spectre incident sur l'échantillon, d'une lame dichroïque qui est réfléchissante pour l'excitation et qui transmet la fluorescence, et d'un filtre à la détection centré autour de la longueur d'onde du maximum d'émission du fluorophore. L'objectif que nous utilisons est ouvert à 1,45 et possède un grandissement de 60 (Plapon 60x OTIRFM Olympus, annexe 1).

Concernant la polarisation, il semble qu'avec notre source, il n'y ait pas de direction privilégiée pour le champ électrique incident sur l'objectif. Le faisceau exciteur en sortie de la source n'est pas polarisé. Les miroirs diélectriques utilisés ont des coefficients de réflexion élevés et très proches pour les différentes polarisations, même positionnés avec un angle de 45°.



Figure 3-17 : à gauche : positionnement du cube dans le microscope, au centre: photographie de trois cubes et de la roue contenant les cubes [Olympus 2008] ; à droite, exemple de jeu de filtres utilisés ; ici cube pour la GFP [Semrock 2008].

III.2 – Détection du signal de fluorescence

III.2.1 - Présentation du matériel de détection

Pour réaliser les mesures de temps de vie de fluorescence en plein champ dans le domaine temporel, nous utilisons un intensificateur couplé optiquement à une caméra CCD.

Nous allons ici nous intéresser d'un peu plus près au fonctionnement de l'intensificateur d'image déclenché ou HRI (High Rate Imager) [Herman 2003], [Kentech 2008], [Kentech 2003], [Cole 2000]. Nous travaillons avec un intensificateur HRI fourni par la société Kentech Instruments Ltd. Ce système d'imagerie permet d'amplifier un signal lumineux émis à un temps spécifique après une référence (signal d'horloge) avec un temps d'intégration très court. Le détecteur est composé d'une photocathode sur laquelle est projetée la figure lumineuse à imager, d'une galette de microcanaux qui amplifie le signal (une seule galette dans notre cas mais un intensificateur peut être composé de plusieurs galettes successives) et d'un écran à phosphore où l'image amplifiée de la figure est formée (figure 3-18). L'intensificateur est synchronisé sur un signal d'horloge, qui est pour nous le train d'impulsions du laser d'excitation, via une ligne à retard contrôlée avec un pas de 25 ps par l'expérimentateur.

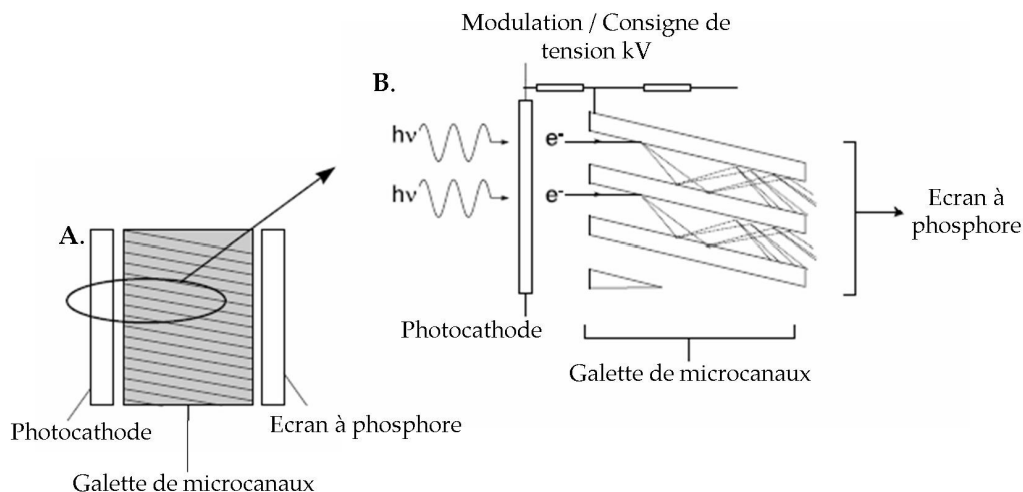


Figure 3-18 : schéma permettant d'expliquer le fonctionnement d'un intensificateur d'image [Deniset-Besseau 2008].

La photocathode reçoit le signal lumineux sous forme de photons qu'elle transforme en photoélectrons primaires. Ces photoélectrons sont accélérés grâce à la différence de potentiel entre la photocathode et la face d'entrée de la galette de microcanaux, puis entrent dans la galette où se déroule l'amplification. L'extrémité opposée de la galette est couverte d'un matériel émissif, du phosphore P-43 (de composition chimique $Gd_2O_2S:Tb$), sur lequel sont projetés les électrons secondaires, pour former ainsi une image amplifiée.

Avec ce détecteur, la résolution spatiale est limitée par le nombre de microcanaux par unité de surface du détecteur. Dans notre cas, la photocathode a un diamètre de 18 mm et le constructeur garantit une résolution de 10 paires de lignes par mm pour les portes les plus courtes. De même la cadence d'acquisition est limitée par la durée de vie de l'état excité du phosphore (autour de 1ms) et bien entendu par le système d'enregistrement de l'image (CCD). La réponse spectrale de l'intensificateur est fournie par le constructeur (elle couvre tout le visible et le proche infrarouge avec une sensibilité maximale dans le rouge, voir annexe 1), et l'émission de l'écran à phosphore est centrée vers le maximum d'émission de cet élément, c'est-à-dire autour de 540 nm.

Pour les mesures de temps de vie qui sont réalisées dans la suite, on utilise le HRI dans un mode particulier, appelé mode COMB par le constructeur. Dans ce mode, le HRI achemine le signal de synchronisation via un générateur d'impulsions, de telle sorte que chaque transition de la synchronisation (front montant ou descendant, suivant le choix de l'utilisateur) produit une impulsion créneau, une « porte ». La largeur de cette porte est choisie par l'utilisateur et varie de 200 ps à 1000 ps par pas de 100 ps. Les largeurs de ces portes sont garanties pour des valeurs de la fréquence du signal de synchronisation proche des valeurs définies par le constructeur (20 MHz et 80 MHz dans notre cas). Concrètement, l'entrée de la galette de microcanaux a son potentiel relié à la terre. Le détecteur est maintenu en position « off » par un petit potentiel positif appliqué à la photocathode. Pour « ouvrir » les portes temporelles, la courte impulsion générée par le HRI est appliquée sous forme d'un potentiel négatif à la photocathode pour déclencher la caméra en position « on ». De manière pratique, la largeur des portes, ainsi que le gain appliqué à la galette de microcanaux sont déterminés par l'utilisateur suivant l'intensité lumineuse incidente sur la photocathode.

A notre demande, des modes supplémentaires ont été ajoutés par le constructeur pour nous permettre d'ouvrir des portes plus grandes : le mode User 1 qui sera utilisé dans la suite permet d'ouvrir des portes de 5 ns à 20 MHz.

Les paramètres de l'intensificateur, à savoir le gain de la galette de microcanaux (de 260 V à 850 V), la largeur des portes temporelles (de 100 ps à 1000 ps), et le mode d'acquisition (COMB,

User,...) ne sont pas commandés par l'ordinateur : il faut les rentrer manuellement sur le boîtier de contrôle du HRI.

Pour lire l'écran à phosphore du HRI, nous utilisons une caméra CCD du modèle ORCA-ER de Hamamatsu (voir annexe 1). Deux objectifs de caméras identiques de focale 75 mm sont utilisés pour relayer l'écran à phosphore sur la caméra avec un grandissement de 1. Cette caméra a une surface sensible de $8,67 \times 6,6 \text{ mm}^2$ avec 1344×1024 pixels carrés de côté $6,45 \text{ }\mu\text{m}$. La réponse spectrale de cette caméra ne nous intéresse pas particulièrement puisqu'elle est toujours utilisée pour imager l'écran à phosphore qui émet autour de 540 nm, gamme spectrale qui se situe près du maximum d'efficacité.

L'interfaçage de la caméra a été réalisée au laboratoire avec le logiciel Labview. Grâce à ce programme, nous pouvons tout d'abord définir les paramètres d'acquisition de la caméra CCD : le gain (de 0 à 255), le temps d'exposition (de 10 μs à 3 s), et aussi le nombre d'acquisitions qu'on souhaite moyenner pour obtenir une image. Ces deux derniers paramètres sont d'autant plus importants ici que l'écran à phosphore du HRI souffre d'un scintillement des pixels aléatoire qui génère du bruit, surtout lorsque le gain du HRI est élevé. En moyennant suffisamment les images ou en intégrant sur un temps assez long, on réussit à s'affranchir en grande partie de ce scintillement et à augmenter le rapport signal à bruit de nos images.

Il est également possible de réaliser du « binning », c'est-à-dire fusionner plusieurs pixels de la CCD pour augmenter la vitesse d'acquisition, mais bien entendu ce procédé réduit la résolution spatiale. Etant donné que le HRI a une résolution de 10 paires de lignes par mm, que la taille d'un pixel sur la CCD est de $6,45 \text{ }\mu\text{m}$, et que le système optique utilisé pour imager l'écran à phosphore du HRI sur la CCD a un grandissement de 1, nous pouvons réaliser une fusion des pixels sans dégrader la résolution. C'est pourquoi, pour toutes les acquisitions un « binning » 2x2 est réalisé sur la caméra, ce qui revient au final à utiliser cette caméra comme un détecteur avec 672×512 pixels carrés de côté $12,9 \text{ }\mu\text{m}$. Ainsi, on double quasiment la cadence d'acquisition (de 8,3 Hz à 16,4 Hz). Cette caméra sert véritablement de relais, et la plupart des caractéristiques de la détection en terme de résolution et de sensibilité sont dictées par le HRI.

Nous utilisons également sur le montage une caméra intensifiée EM-CCD (Electron Multiplier CCD) du modèle ImagEM de Hamamatsu [Hamamatsu 2006] qui permet d'obtenir des images de fluorescence en intensité. Grâce à cette caméra, nous pouvons faire de la vidéomicroscopie avec une résolution spatiale meilleure que sur la voie résolue en temps (il n'y a pas ici de dégradation de la résolution causée par l'intensificateur). Ce détecteur constitue également une opportunité d'évolution intéressante, puisque l'on peut facilement lui coupler des outils de sélections en longueur d'ondes ou en polarisations. Brièvement, ce type de caméra fonctionne pour les premières étapes comme les CCD à transfert de trames : les charges détectées dans la zone de détection sont rapidement transférées dans la zone de stockage, et ensuite la charge accumulée est transférée ligne par ligne au registre en série horizontale pour la lecture. C'est à ce niveau que se situe la spécificité des EM-CCDs : un registre de multiplication est créé. Une amplification du signal est réalisée grâce à l'application d'une tension plus importante à chaque électrode de transfert horizontale (figure 3-19).

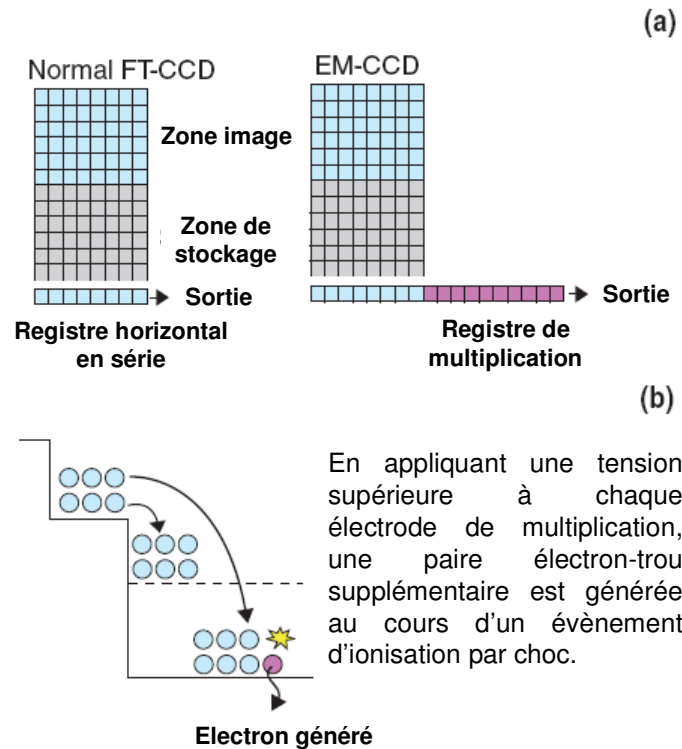


Figure3-19 : principe du fonctionnement de l'EM-CCD d'après [Hamamatsu 2006].

En utilisant cette caméra en mode EM-CCD, nous pouvons détecter des signaux très faibles, allant même jusqu'au photon unique dans des conditions de refroidissement du détecteur adéquates (c'est-à-dire à une température de -90°C). Enfin, cette caméra a une surface sensible de $8,192 \times 8,192 \text{ mm}^2$ avec 512×512 pixels carrés de côté $16 \mu\text{m}$ (voir annexe 1).

Un logiciel commercial vendu par Hamamatsu (le logiciel Wasabi) nous permet de piloter cette caméra et de réaliser l'acquisition. Grâce à ce logiciel nous pouvons d'une part choisir le mode de fonctionnement de la caméra (CCD ou EM-CCD), et d'autre part sélectionner les valeurs de gain et de temps d'exposition optimales pour les mesures, ainsi que le nombre d'acquisitions qu'on souhaite moyenner pour avoir une image. L'affichage se fait en temps réel à la cadence vidéo, et le contraste, la brillance des images peuvent être ajustés. Il est possible de sauvegarder les images une par une, ou de réaliser des films en enregistrant des piles d'images à intervalle de temps défini par l'utilisateur.

III.2.2 - Utilisation des détecteurs sur le montage

Sur notre bâti de microscope, nous disposons de deux ports externes pour la détection. Pour passer de l'un à l'autre, il y a un système de renvoi avec un miroir escamotable dans le microscope (miroir $M5_E$ sur le schéma).

Sur le port droit, nous avons installé la caméra EM-CCD pour réaliser la détection en intensité et sur le port gauche se trouvent l'intensificateur et la caméra CCD pour la détection résolue en temps (figure 3-20). Sur les deux voies, avant les détecteurs, nous avons placé les deux lentilles L4 et L5, de focale respective 50 mm et 150 mm , qui forment un télescope permettant d'augmenter la taille de l'image d'un facteur approximativement égal à 3 sur le détecteur. Ce télescope est indispensable sur le port gauche puisque la galette à microcanaux de l'intensificateur limite la résolution spatiale de nos images. Avec ce télescope, nous nous assurons que la résolution

spatiale est essentiellement dictée par les performances de l'objectif et non pas par le détecteur. Nous avons placé le même télescope sur l'autre port pour obtenir des images avec le même grandissement sur les deux voies. Pour imager le même plan de l'échantillon et la même zone sur les deux voies, il a fallu aligner minutieusement ces deux télescopes.

La référence temporelle pour la détection résolue en temps est le train d'impulsions récupéré par la photodiode après le miroir M2. Grâce à une ligne à retard pilotée par l'ordinateur, l'ouverture de la porte temporelle est déclenchée à différents instants après l'impulsion. Vu la relativement basse cadence de la source employée, une seconde ligne à retard fixe est utilisée pour permettre de positionner l'impulsion laser dans la fenêtre accessible grâce à la ligne pilotée (lignes à retard visibles sur la figure 3-16).

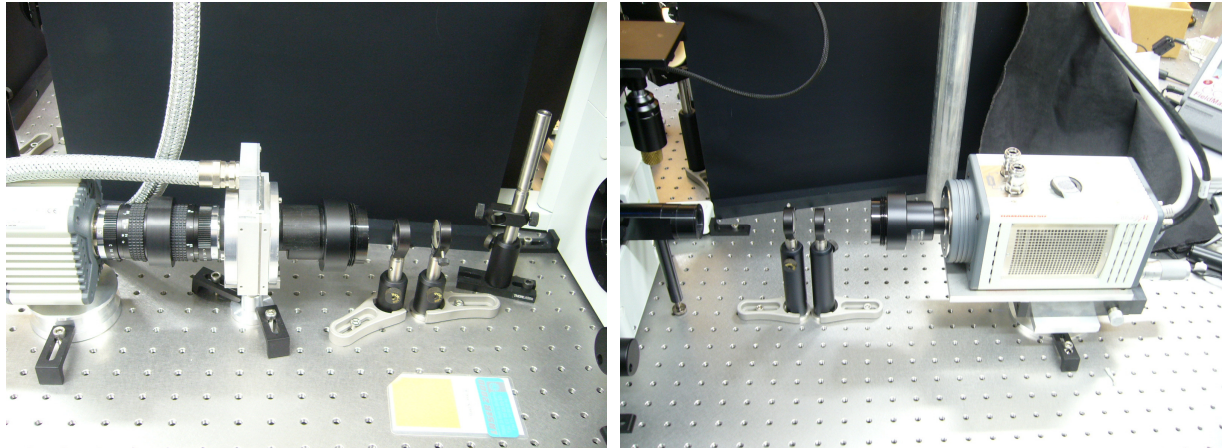


Figure 3-20 : photographie des deux voies de détection. À gauche, on reconnaît le HRI et la CCD pour la mesure du temps de vie ; à droite, l'EM-CCD. On remarque avant les détecteurs les deux lentilles L4 et L5 qui forment le télescope $\times 3$.

III.2.3 - Interface pour l'acquisition et le traitement

Le programme (sous Labview) qui pilote la caméra CCD utilisée pour la détection résolue en temps, permet également de piloter la ligne à retard et d'enregistrer les images d'intensité le long du déclin. Ainsi, nous commandons l'ouverture de la « porte temporelle » en maîtrisant le temps passé depuis l'impulsion excitatrice. Pour réaliser un échantillonnage convenable du déclin de fluorescence que l'on souhaite étudier, il faut déterminer le nombre d'images et à quels instants on souhaite acquérir chaque image. Etant donné que les déclins étudiés sont de profil exponentiel décroissant, il est nécessaire au début du déclin d'acquérir plus d'images avec des intervalles de temps plus courts, qu'à la fin du déclin. Le meilleur nombre de portes et le délai optimal entre les différentes acquisitions peuvent être prédits théoriquement [Deniset-Besseau 2008], [Webb 2003]. Cependant, comme nos études sont réalisées sur des échantillons vivants, le souci de réduire les temps d'acquisition nous a amené à choisir les algorithmes de manière plus empirique.

Dans le programme, il faut rentrer le tableau avec les valeurs de retard par rapport à l'impulsion souhaitées, et lorsqu'on lance le programme, les différentes acquisitions sont réalisées aux instants choisis et enregistrées dans un fichier. Ensuite, il faut traiter ces données.

Le traitement est réalisé à l'aide d'un autre programme développé dans l'équipe en Labview. Ce programme ouvre la pile d'images sélectionnée pour la traiter. Sur la première image d'intensité (l'image la plus près de l'excitation, donc la plus intense), on définit un seuil, choisi de manière à exclure le bruit de fond et les pixels les moins intenses pour lesquels un signal d'intensité n'est

mesuré que sur les toutes premières acquisitions ce qui fausse la détermination du temps de vie. On dessine également une région d'intérêt dans laquelle se font les calculs (figure 3-21 à gauche). Puis le programme effectue les calculs pixel par pixel. Dans un premier temps, il ajoute les intensités de toutes les images de la pile pour obtenir une « image d'intensité ». Puis dans un second temps, il ajuste le déclin associé à chaque pixel par un modèle de déclin monoexponentiel. Le calcul est réalisé avec l'algorithme de Levenberg-Marquardt qui est une méthode d'ajustement par les moindres carrés [Tellinghuisen 1994]. Pour ce modèle, on ne considère qu'une seule espèce avec une seule durée de vie moyenne (donc un déclin mono-exponentiel). Ce modèle offre le temps de traitement le plus court, et nous permet d'avoir rapidement une bonne estimation des durées de vie. Bien entendu, d'autres ajustements plus complexes, de type multiexponentiel, sont possibles en retravaillant les données brutes obtenues.

Le programme affiche également les images d'intensité et de durée de vie en fausses couleurs, suivant les paramètres d'affichage (contraste, brillance,...) choisis par l'utilisateur. De plus, il calcule le temps de vie moyen de la zone sélectionnée et l'écart type, et rapporte la distribution des durées de vie sur l'ensemble de la carte sous forme d'un histogramme. On peut également afficher, pour chaque pixel, les valeurs expérimentales ainsi que l'ajustement monoexponentiel, et les résidus correspondants (figure 3-21 à droite).

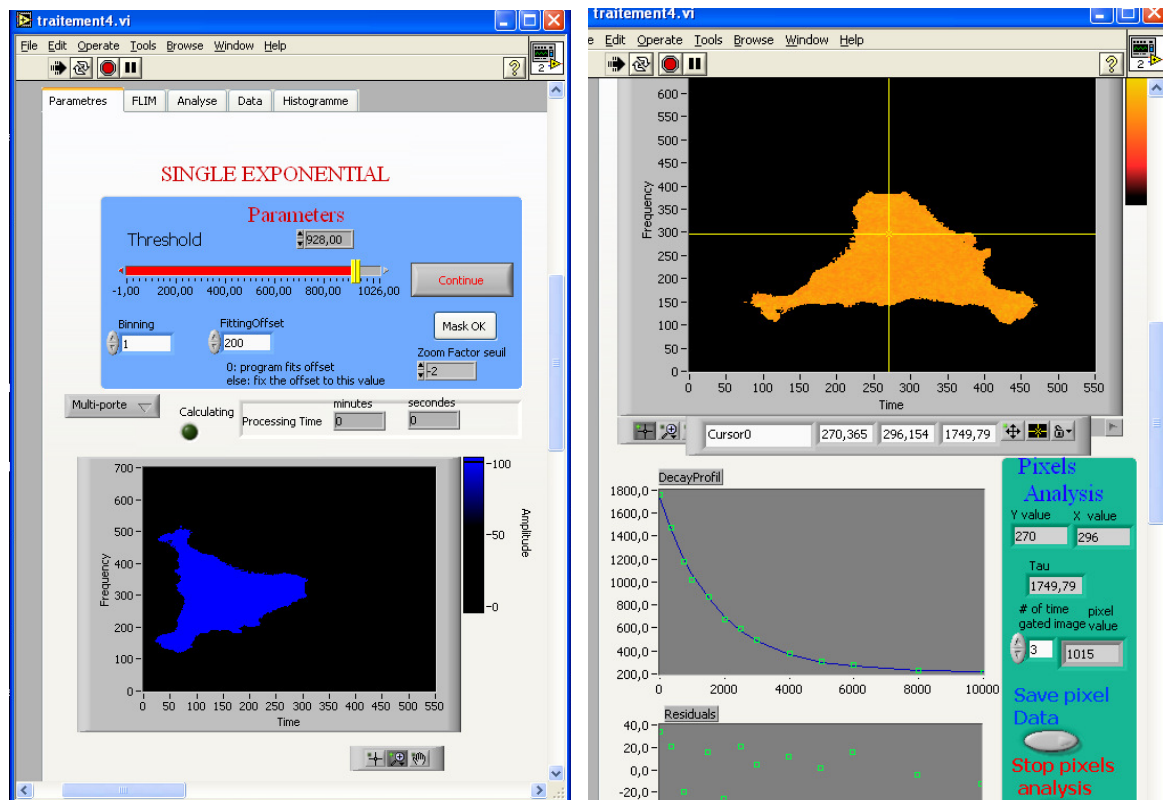


Figure 3-21 : deux impressions d'écran du logiciel de traitement.

L'ensemble du matériel utilisé ayant été présenté, nous allons maintenant nous intéresser à la caractérisation et à la calibration de ce dispositif de microscopie TIRFLIM.

IV – Caractérisation du montage

IV.1 – Résolution spatiale

Dans un premier temps, il est indispensable de s'intéresser aux performances spatiales de notre dispositif, afin de déterminer le grossissement et la résolution de notre montage.

IV.1.1 - Résolution latérale

Nous quantifions d'abord la résolution latérale du dispositif. C'est une étape importante qui nous permet de déterminer la taille de ce que l'on observe et de connaître les limites de notre dispositif. Nous commençons par imager une mire avec les deux voies de détection. Cette mire USAF est fournie par Edmund avec la taille de tous les motifs. Ceux imagés sur la figure 3-22 sont les plus petits, avec un nombre de paires de lignes par mm de respectivement 228, 203 et 181.

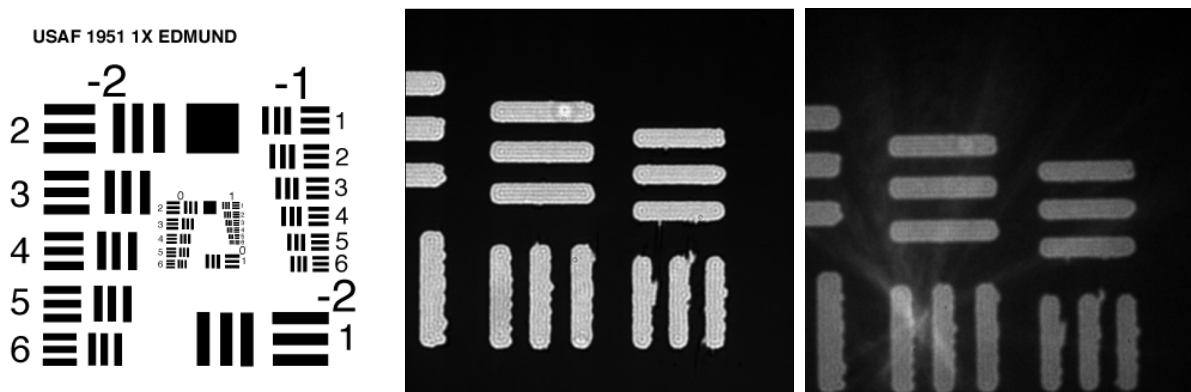


Figure 3-22 : mire utilisée dans les mesures de calibration. A gauche, schéma du constructeur, au centre, image obtenue sur l'EMCCD, à droite, image obtenue sur la CCD après le HRI.

A partir de ces images, il nous est possible de mesurer le grandissement. Nous trouvons qu'un pixel de la caméra EMCCD correspond à 91 nm dans le plan objet, et qu'un pixel de la caméra CCD (après le HRI) correspond à 87 nm. Nous nous assurons rapidement, que dans les deux cas, cette valeur est proche de celle que l'on peut retrouver par le calcul.

Pour l'EMCCD, un pixel mesure 16 μm de côté, et on trouve un grandissement de $\frac{16}{0,091} \approx 176$;

et pour la CCD, un pixel mesure $6,45 \times 2 = 12,90 \mu\text{m}$ de coté (à cause du binning), et par conséquent on trouve : $\frac{12,9}{0,087} \approx 150$. Or l'objectif est un 60x et le télescope que nous avons

construit a un grandissement d'environ 3, ce qui au total fait un grandissement effectif autour de 180. Les valeurs mesurées nous paraissent donc cohérentes, étant donné que nous ne connaissons le grandissement effectif ni de l'objectif, ni de nos télescopes. Nous disposons dès lors d'une calibration spatiale pour toutes nos images, en intensité ou en durée de vie.

Ensuite, nous mesurons la réponse percussionnelle de notre dispositif. Pour cela, nous observons des microsphères Invitrogen de 100 nm excitées à 505 nm et qui fluorescent à 515 nm. Nous les observons avec le cube GFP (filtre pour l'excitation centré à 472 nm avec une largeur de 30 nm, filtre pour la détection centré à 520 nm avec une largeur de 35 nm). Il est intéressant de constater que, dans les deux cas, l'image de cette bille couvre plus d'un pixel. Ceci signifie que, grâce au télescope x3, la résolution est limitée par l'objectif et non pas par l'intensificateur, même si ce dernier la dégrade un peu.

Sur l'EMCCD, nous trouvons que la largeur à mi-hauteur de l'image vaut (en moyenne pour 20 mesures) 350 ± 20 nm dans le plan objet. Sur la CCD, la résolution est un peu moins bonne puisque nous trouvons une largeur à mi-hauteur moyenne (pour 20 mesures) de 395 ± 20 nm (une des 20 mesures réalisées est rapportée figure 3-23).

D'après la théorie (chapitre 1, p 27), le rayon de la réponse percussionnelle mesure $\frac{0,61 \times \lambda}{ON} = \frac{0,61 \times 515}{1,45} = 217 \text{ nm}$. Etant donnée la forte ouverture numérique de l'objectif, et le

nombre d'éléments optiques nécessaires à sa fabrication pour atténuer les nombreuses aberrations, notamment chromatiques, nous ne sommes pas étonnés de ne pas être limités par la diffraction. De plus, des éléments supplémentaires ajoutés sur le trajet optique (et notamment une lentille de tube incluse dans le bâti et totalement inconnue) peuvent dégrader cette résolution. De même, on s'aperçoit que la présence de l'intensificateur altère de manière sensible la résolution latérale. Pour l'observation d'échantillons biologiques comme des cellules, cette résolution latérale est néanmoins suffisante.

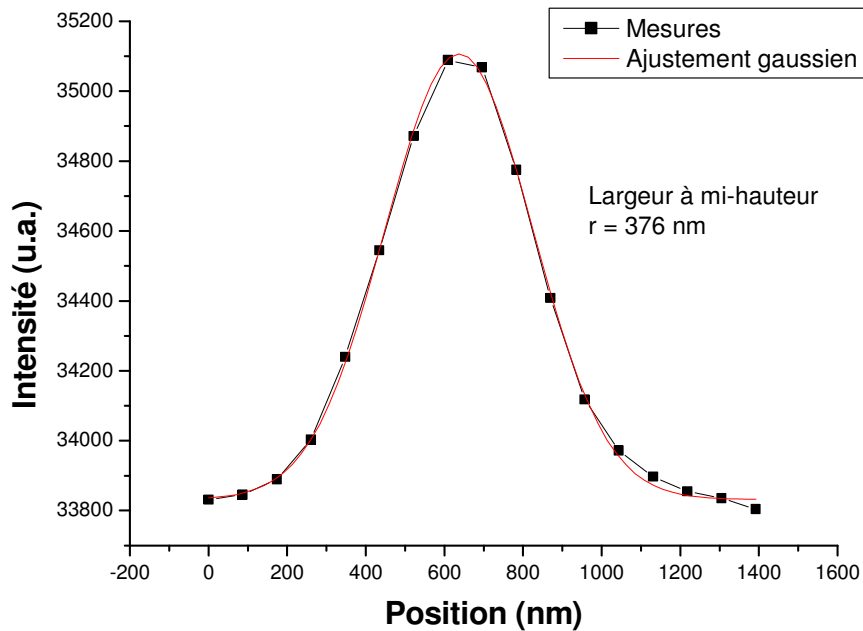


Figure 3-23 : profil d'intensité d'une bille de 100 nm observée sur la voie résolue en temps (HRI+CCD). La mesure de la largeur à mi-hauteur (376 nm dans ce cas) nous donne la réponse percussionnelle latérale de notre dispositif d'imagerie.

IV.1.2 - Sectionnement optique et résolution axiale

Nous nous intéressons dorénavant à la résolution axiale (ou en profondeur) de notre microscope TIRFLIM. Pour commencer, nous présentons les premières images TIRF en intensité sur des cellules vivantes (figure 3-24), pour montrer la qualité des images obtenues avec cette technique.

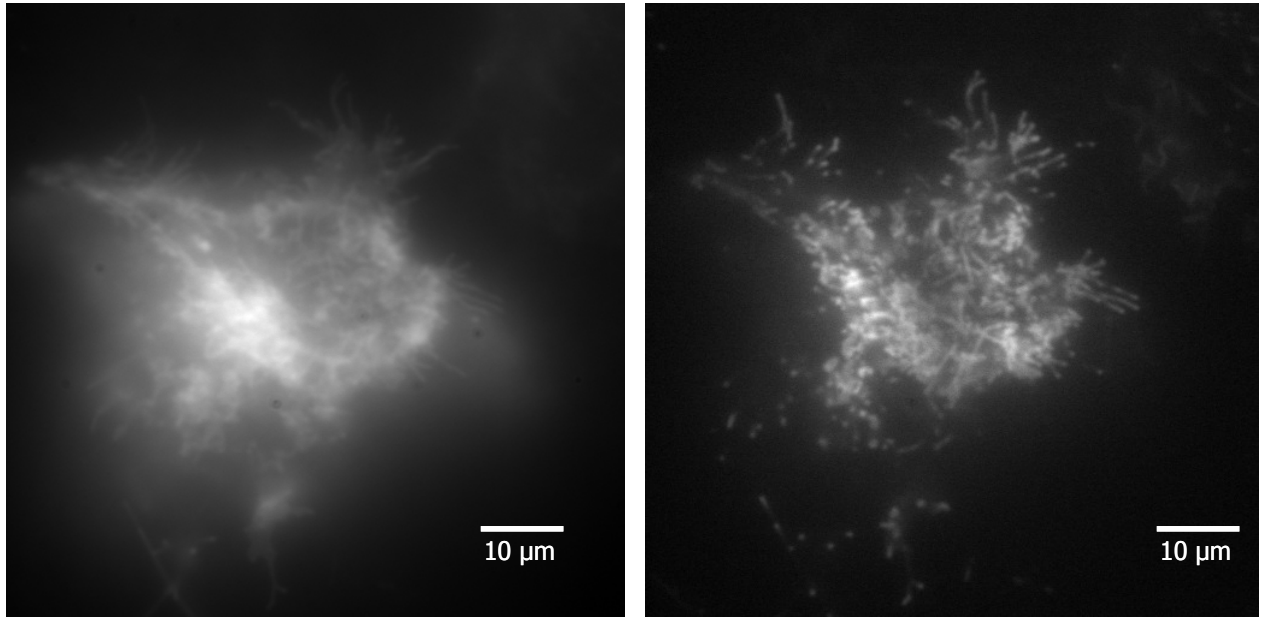


Figure 3-24 : image en épifluorescence classique (à gauche) et en TIRF (à droite) de cellules HEK-293 avec une transfection stable CB1R-GFP. Images obtenues avec la caméra EM-CCD.

Nous observons ici une lignée de cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney), qui ont été transfectées avec des récepteurs cannabinoïdes de type I marqués à la GFP (CB1R-GFP) de manière stable (voir le quatrième chapitre sur les applications). Ceci signifie que cette lignée exprime de manière perpétuelle les CB1R-GFP. Ces cellules, qui nous ont été fournies par les chercheurs du Laboratoire de Neurobiologie et Diversité Cellulaire de l'ESPCI à Paris avec qui nous collaborons, sont pour nous un outil indispensable pour l'amélioration de notre système. En effet, des échantillons comme les billes en latex fluorescentes ou les solutions de colorant sont utiles pour cerner le comportement de notre montage, mais l'optimisation du dispositif est réalisée grâce aux échantillons biologiques.

On voit d'ailleurs sur ces photographies qu'avec ce type d'échantillons, il est très facile de savoir si les observations se font en épifluorescence classique ou en TIRF. Les structures plus fines collées à l'interface sont plus apparentes en TIRF. En excitant uniquement les premières dizaines de nanomètres (environ 150 nm) de l'échantillon, nous nous affranchissons complètement de la fluorescence des plans supérieurs et notamment du cytoplasme, ce qui au final améliore le contraste des entités cellulaires proches de la lamelle.

Sur notre montage actuel, nous ne pouvons pas mesurer la profondeur de pénétration du champ évanescent. Cependant, il est possible de l'estimer, en utilisant la formule démontrée en introduction, qui relie la profondeur de pénétration d à la longueur d'onde d'excitation, aux indices des deux milieux de part et d'autre de l'interface, et à l'angle d'incidence :

$$d = \frac{\lambda_0}{4\pi \times \sqrt{n_i^2 \sin^2(\theta_i) - n_t^2}} . \text{ A l'interface lamelle - échantillon biologique, nous avons } n_i = 1,50$$

et $n_t = 1,38$, ce qui correspond à un angle critique légèrement inférieure à 67° . Dans le cas de la GFP, l'excitation est réalisée à 480 nm, ce qui nous donne une profondeur de pénétration $d(67^\circ, 480\text{nm}) = 835 \text{ nm}$. La plus petite profondeur de pénétration accessible est limitée par l'ouverture numérique de l'objectif. A la limite, c'est-à-dire lorsque nous profitons de l'ouverture numérique de 1,45, l'angle d'incidence maximal à l'interface vaut 75° , ce qui correspond à une profondeur $d(75^\circ, 480\text{nm}) = 86 \text{ nm}$. Dans le tableau 3-1 sont reportées les profondeurs de pénétration obtenues pour la gamme d'angles accessible avec notre objectif.

Angle incident (deg)	Profondeur de pénétration (nm)
67	835
68	221
69	161
70	133
71	117
72	106
73	98
74	91
75	86

Tableau 3-1 : profondeur de pénétration du champ évanescent suivant l'angle d'incidence.
Les résultats ont été obtenus par le calcul, en considérant une longueur d'onde d'excitation de 480 nm.

Ainsi, en estimant l'angle de rotation du miroir M_T , il est possible d'avoir une valeur approchée de l'angle d'incidence, et donc une estimation de la profondeur de pénétration du champ évanescent. Cette estimation n'est pas très précise, mais vues les faibles variations de la profondeur en fonction de l'angle incident (pour des valeurs supérieures à 69° , ce qui est vraisemblablement notre cas), cette estimation nous donne une idée assez précise de la profondeur de pénétration du champ évanescent pour nos premières expériences. Cependant, il apparaît indispensable de quantifier plus précisément cette grandeur, ce qui fait partie de nos perspectives d'amélioration du montage.

IV.2 – Influence des paramètres d'acquisition sur les temps de vie mesurés

Dans cette partie, nous nous intéressons aux différents paramètres d'acquisition sur la voie de détection résolue en temps, pour quantifier l'influence de chacun sur la mesure des temps de vie de fluorescence, et pour pouvoir optimiser cette détection. Les expériences que nous avons réalisées, ainsi que les résultats qui en ont découlé figurent dans l'annexe 2. Ici nous allons juste souligner le rôle des paramètres les plus influents, et définir les conditions d'acquisition dans lesquelles nous allons travailler dans la suite.

Avant de réaliser des mesures de temps de vie de fluorescence, nous devons nous assurer que les éléments de détection utilisés ont une réponse qui varie linéairement avec l'intensité incidente. Cette précaution est indispensable si on souhaite interpréter les variations d'intensité mesurées comme des diminutions de la fluorescence des entités dans l'échantillon, et donc comme un déclin de la fluorescence, et non comme des artefacts dus aux détecteurs. Pour chacun de ces paramètres, une valeur par défaut a été définie (valeurs les plus souvent utilisées ou centrales), qui sert de référence. Ainsi lors de l'étude de l'influence d'un paramètre, les autres paramètres prennent cette valeur par défaut. Toutes les valeurs choisies pour l'étude sont consignées dans le tableau 3-2.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	250	0	400	460
Valeurs prises pour l'étude	1	1	50	200	260
	5	100	100	300	360
	10	200	150	400	460
	15	250	200	500	560
	20	300	250	600	660
	30	400		700	760
		1000		800	850
				900	
				1000	
				5000	

Tableau 3-2 : valeur des paramètres pour l'étude de la linéarité des détecteurs.

Nous avons ainsi vérifié que le nombre d'images moyennées pour obtenir une image finale, le gain et le temps d'exposition de la caméra CCD ne perturbaient pas la mesure d'intensité, tant que la saturation du détecteur n'était pas atteinte. Pour l'intensificateur, nous avons vérifié que l'allure du gain était conforme à ce qui est attendu lorsque l'on travaille avec un tube photomultiplicateur, que l'intensité du signal détecté variait linéairement avec la largeur des portes temporelles et nous avons mesuré expérimentalement leur largeur.

Cette première série de mesures étant réalisée, nous avons par la suite étudié l'influence de ces cinq mêmes paramètres sur les temps de vie de fluorescence mesurés sur des échantillons de référence. Pour toutes ces mesures, nous avons utilisé le même algorithme, qui est notre algorithme de référence (nous le noterons A_{ref}) et qui est défini dans le tableau 3-3 (les temps sont exprimés en ps). Dans cet algorithme, nous réalisons 13 acquisitions pour échantillonner le déclin. Pour limiter l'influence de la persistance de notre système de détection, l'acquisition se fait en remontant le déclin. Au début du déclin, les acquisitions sont plus proches. Nous exploitons la relative basse cadence de la source en prenant un point 10 ns après l'impulsion. Cet algorithme permet de mesurer proprement des temps de vie aux alentours de 2 ns (pour mesurer des temps de vie plus courts ou plus longs de manière optimale, il faut revoir la position des différents instants d'échantillonnage). Il est important de signaler ici que chacune des valeurs de temps de vie moyen rapportées a été obtenue avec une unique mesure à chaque fois, c'est-à-dire qu'elle correspond à une moyenne sur l'ensemble d'une image, sur les 672x512 pixels de notre caméra CCD, et l'écart type de chaque mesure est également l'écart type obtenu sur ces mêmes 344064 pixels.

1ère acquisition	$t_0 + 10000$
2ème acquisition	$t_0 + 8000$
3ème acquisition	$t_0 + 6000$
4ème acquisition	$t_0 + 5000$
5ème acquisition	$t_0 + 4000$
6ème acquisition	$t_0 + 3000$
7ème acquisition	$t_0 + 2500$
8ème acquisition	$t_0 + 2000$
9ème acquisition	$t_0 + 1500$
10ème acquisition	$t_0 + 1000$
11ème acquisition	$t_0 + 750$
12ème acquisition	$t_0 + 350$
13ème acquisition	$t_0 + 0$

Tableau 3-3 : algorithme A_{ref} (temps exprimés en ps).

Concernant le rôle des paramètres d'acquisitions de la caméra CCD sur la mesure du temps de vie de fluorescence, nous constatons une influence comparable du nombre d'images utilisées pour moyenner et du temps d'exposition. En effet, l'écran à phosphore de l'intensificateur souffre d'un scintillement aléatoire des pixels, et notre chaîne de détection connaît une certaine persistance. Dès lors, en augmentant le nombre d'images utilisées pour faire la moyenne ou en augmentant le temps d'exposition, ces deux artefacts deviennent moins gênants, mais le temps total d'acquisition

augmente. Par conséquent, il faut trouver un compromis pour avoir des valeurs de temps de vie pertinentes avec un écart type faible, tout en ne rallongeant pas trop la durée de l'acquisition. Un

bon optimum (pour un niveau de signal comparable à ce que l'on obtient pour de la fluorescence dans les cellules) semble être de travailler avec 10 images pour obtenir la moyenne, et un temps d'exposition de 250 ms. Le gain de la CCD quant à lui n'a une influence que très minime sur le temps de vie mesuré.

Pour l'intensificateur, nous observons une faible augmentation du temps de vie mesuré avec la largeur des portes, et ceci essentiellement pour les portes les plus larges. Par contre, l'écart type diminue logiquement lorsque la largeur des portes augmente, c'est-à-dire lorsque le signal est intégré pendant plus longtemps. Nous décidons dans toute la suite de ce travail d'échantillonner les déclins de fluorescence avec des portes de 800 ps, qui permettent de collecter un signal assez important pour réduire l'écart type sans perturber la mesure du temps de vie. L'influence du gain du HRI sur l'écart type est la même : en augmentant ce dernier, nous réduisons l'écart type. Il ne semble pas influencer de manière notable sur les temps de vie mesurés. Concernant ce paramètre, il est important de l'ajuster pour bénéficier de la plus grande dynamique possible sur la caméra CCD.

En plus de ces paramètres concernant directement les détecteurs, nous avons mis en évidence le rôle prépondérant d'autres facteurs liés à l'échantillonnage du déclin réalisé. Tout d'abord, la position du début de l'acquisition est très importante (ou autrement dit, l'instant d'acquisition de la première image du déclin dans le sens du temps, c'est-à-dire la plus intense, par rapport à l'impulsion excitatrice). Si l'échantillonnage commence trop tôt, nous constatons une fâcheuse tendance à surestimer le temps de vie de fluorescence, alors que s'il commence trop tard, nous allons le sous-estimer. Il est par conséquent primordial de repérer précisément le maximum d'intensité (qui correspond au début du déclin et qui en plus varie suivant la largeur de portes). Avec l'algorithme A_{ref} , nous obtenons les meilleurs résultats en commençant l'acquisition 300 ps après la position du maximum d'intensité. Ensuite, notre système de détection dans son intégralité a une persistance qui peut induire des erreurs significatives. Pour obtenir des mesures correctes, il faut commencer par acquérir les images de fin du déclin (comme le fait l'algorithme A_{ref}). On minimise les effets de cette persistance en utilisant des temps d'acquisition sur la caméra longs, et en réalisant beaucoup d'acquisitions pour faire la moyenne et obtenir une image. Avec A_{ref} en moyennant sur 10 images et en utilisant des temps d'acquisition sur la caméra de 250 ms, nous obtenons des résultats corrects. Cette persistance semble essentiellement due à des problèmes de synchronisation entre la ligne à retard et l'acquisition, qui est gérée par notre logiciel développé en Labview. Nous avons constaté qu'il est également indispensable de positionner la porte temporelle loin après l'impulsion avant l'acquisition, pour bien partir d'un niveau de signal correspondant au bruit de fond.

IV.3 - Reproductibilité

Maintenant que nous avons fixé certains paramètres et que nous avons pu évaluer l'influence des autres, il faut s'assurer de la reproductibilité des mesures. Avant de travailler avec des échantillons plus complexes, nous devons être sûrs que, pour un échantillon fluorescent stable, lorsque l'on mesure le temps de vie de fluorescence dans les mêmes conditions (avec la même excitation, la même quantité de signal de fluorescence, les mêmes paramètres d'acquisitions pour nos détecteurs et l'utilisation du même algorithme), nous obtenons toujours le même temps de vie. Pour cela, nous observons différentes solutions de rhodamine B diluée dans de l'éthanol : les concentrations sont assez élevées mais ne sont pas connues précisément. Un tel échantillon est

stable, car d'une part il est homogène, et de plus, même si nous détériorons certains fluorophores, leur mouvement brownien dans la solution nous garantit la stabilité globale de l'échantillon.

Nous réalisons 20 mesures dans chaque cas avec l'algorithme A_{ref} et comme pour toutes nos expériences, chaque mesure correspondant déjà à une moyenne sur l'ensemble de l'image, c'est-à-dire sur les 672x512 pixels.

Nous travaillons d'abord avec une première solution et un niveau de signal de fluorescence « moyen », c'est-à-dire comparable à celui obtenu lors de l'observation des cellules HEK-C9. Les paramètres de l'acquisition sont reportés dans le tableau 3-4.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	600	680

Tableau 3-4 : paramètres d'acquisition.

Nous faisons ensuite les mêmes mesures avec une autre solution et cette fois un signal de fluorescence très faible, à la limite de sensibilité de la détection (tableau 3-5). Les résultats obtenus figurent dans le graphe de la figure 3-25.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	1000	850

Tableau 3-5 : paramètres d'acquisition.

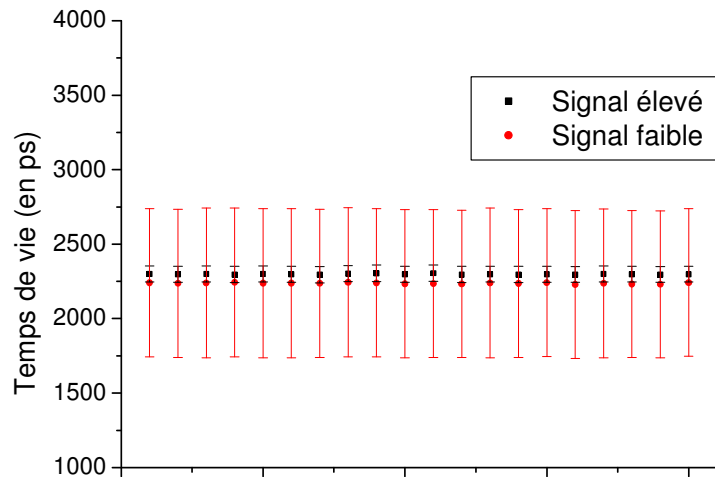


Figure 3-25 : séries de 20 mesures pour deux niveaux de signaux différents pour mettre en évidence la reproductibilité.

Dans le premier cas, nous obtenons une moyenne pour l'ensemble des 20 mesures de 2298 ps avec un écart type de 2,70 ps, la moyenne des écarts types est de 53,8 avec un écart type de 0,62. Dans le second cas, nous avons une moyenne de 2237 ps avec un écart type de 4,15 ps, la moyenne des écarts types est de 498 ps avec un écart type de 2,81 ps.

Il est donc intéressant de constater ici que, quel que soit le niveau de signal, pour un échantillon stable, nous avons une grande reproductibilité, tant pour la mesure de la moyenne que pour l'évaluation de l'écart type sur l'image. On remarque aussi que, pour des signaux plus faibles, l'écart type augmente, ce qui était bien entendu prévisible : en diminuant le rapport signal à bruit pour chacune des images d'intensité, l'ajustement est plus délicat pour chaque pixel, et les valeurs de temps de vie trouvées sont plus disparates.

Les valeurs absolues trouvées ne sont pas nécessairement exploitables, puisque pour cette étude, nous ne connaissons pas la concentration en fluorophore de l'échantillon qui n'est pas d'excellente qualité.

Maintenant que nous avons une idée précise de ce que nous mesurons, et du rôle de tous les paramètres d'acquisitions, il semble pertinent de comparer, toujours sur des échantillons de référence très stables, les temps de vie mesurés avec notre dispositif TIRFLIM avec ceux obtenus sur un microscope confocal commercial équipé d'une carte d'acquisition TCSPC.

IV.4 - Comparaison avec un système commercial

Pour cette étude, nous utilisons le dispositif d'imagerie multimodale commercial dont est équipé le laboratoire : cette instrumentation commerciale, installée et calibrée par des professionnels est pour nous une référence. Il s'agit d'un microscope confocal Leica TCS SP5 [Leica 2006], d'une carte d'acquisition Picoquant PicoHarp 300 [Picoquant 2006], et d'un laser impulsif titane saphir femtoseconde Coherent Chameleon XR [Coherent 2004].

Nous observons ici deux solutions de rhodamine B dans différents solvants : de l'eau et de l'éthanol. Nous avons choisi ces échantillons car ils sont stables (un colorant en solution), ils ont des temps de vie autour de 2 ns (comme la plupart des fluorophores qui vont nous intéresser par la suite), et le changement de solvant doit provoquer un changement de temps de vie que nous espérons pouvoir mettre en évidence [Magde 1999].

Avec notre dispositif TIRFLIM, nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 531 nm avec une largeur de 40 nm, et pour la détection, un filtre centré à 593 nm avec une largeur de 40 nm. Nous réalisons ces mesures de temps de vie en configuration d'épifluorescence classique. Vue la reproductibilité mise en évidence précédemment sur des échantillons comparables, nous ne réalisons qu'une mesure dans chaque solution avec l'algorithme A_{ref} et les paramètres d'acquisition du tableau 3-6.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	800	580

Tableau 3-6 : paramètres d'acquisition.

Dans ces conditions nous trouvons pour la solution de rhodamine B diluée dans l'éthanol un temps de vie moyen (sur une image 672x512 pixels) de 2,22 ns avec un écart type de 29 ps. Pour la rhodamine B diluée dans l'eau, nous trouvons un temps de vie plus court d'une valeur de 1,79 ns avec le même écart type.

Avec le dispositif commercial, nous excitons l'échantillon à deux photons à une longueur d'onde de 830 nm. Nous obtenons des temps de vie de fluorescence de 2,23 et 1,79 ns pour le colorant dilué respectivement dans l'éthanol et dans l'eau. L'écart type (pour une image 512x512 pixels) est évalué à 80 ps pour une moyenne de 1900 coups par pixel.

	Ethanol		Eau	
	Temps de vie (ns)	Ec. Type (ps)	Temps de vie (ns)	Ec. Type (ps)
TIRFLIM	2,22	29	1,79	29
Système commercial	2,23	80	1,79	80

Tableau 3-7 : temps de vie mesurés sur les solutions de rhodamine avec notre dispositif et le dispositif commercial.

Ces résultats sont tout à fait satisfaisants (tableau 3-7), puisque sur notre dispositif nous obtenons les mêmes valeurs que sur le dispositif commercial à 10 ps près. L'écart type que nous obtenons est un peu plus faible, mais en augmentant le nombre de coups par pixel avec la méthode TCSPC

(en augmentant la puissance d'excitation ou le temps d'acquisition), nous pourrions obtenir des valeurs comparables voire inférieures...

Par rapport à la référence citée précédemment [Magde 1999] (temps de vie entre 1,52 ns et 1,68 ns dans l'eau, et entre 2,45 ns et 2,93 ns dans l'éthanol suivant la forme chimique du colorant), les temps de vie trouvés sont quelque peu différents, mais les conditions expérimentales ne sont pas les mêmes. Notamment, nous ne travaillons pas avec la même concentration de colorant en solution, ni avec des solvants ayant la même viscosité (la température n'est pas la même), or ces deux paramètres ont une grande influence sur le temps de vie de fluorescence mesuré [Moog 1982].

V – Premières mesures sur des échantillons biologiques

Nous pouvons dorénavant travailler avec des échantillons biologiques, en étant confiants dans les valeurs de temps de vie trouvées.

Pour terminer cette partie, nous présentons ici les cartes de durée de vie de fluorescence obtenues avec différents fluorophores transfectés dans des cellules HEK-293. Nous reviendrons dans la partie 4 sur les différentes protéines membranaires utilisées ici et leur rôle au sein de la cellule. Nous rapportons ces images ici pour montrer les performances de notre système sur des échantillons vivants, en terme de résolution axiale, de mesure de temps de vie, et aussi d'accordabilité grâce à la souplesse de la source supercontinuum (il suffit de changer les filtres à l'excitation et à la détection pour travailler avec différents fluorophores).

Tout d'abord, nous observons des cellules HEK 293 transfectées avec la protéine APP (Amyloid Precursor Protein) marquée à la CFP. Pour imager proprement ce fluorophore, nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 438 nm avec une largeur de 24 nm, et pour la détection, un filtre centré à 483 nm avec une largeur de 32 nm. La puissance moyenne incidente est ajustée autour de 450 μ W. En mesurant l'angle d'incidence du faisceau exciteur sur la lentille qui permet de focaliser dans le plan focal arrière de l'objectif, nous estimons que la profondeur de pénétration du champ évanescent est comprise entre 160 et 190 nm. Nous utilisons l'algorithme A_{ref} et les paramètres d'acquisition sont reportés dans le tableau 3-8.

Pour mettre en évidence le gain en résolution axial de notre dispositif, nous comparons sur une même cellule les images d'intensité et de durée de vie en TIRF et en épifluorescence classique (figure 3-26).

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Epi	10	100	0	800	590
	TIRF	10	250	0	800	750

Tableau 3-8 : paramètres d'acquisition.

Comme nous avons pu le voir sur les premières images de cellules présentées précédemment, lorsque l'on souhaite observer la membrane d'une cellule, nous obtenons un bien meilleur contraste avec l'excitation par onde évanescente. Les fluorophores qui se situent dans tout le reste de la cellule et essentiellement dans le cytoplasme ne contribuent pas au signal collecté

puisque ces entités ne sont pas excitées : nous n'imagesons que les fluorophores situés dans la membrane ou très proches de cette dernière.

Les cartes de temps de vie de la CFP en épifluorescence classique et en TIRF sont respectivement reportées figure 3-26b) et 3-26d). Les temps de vie moyens obtenus pour la cellule entière valent 2180 ps avec un écart type de 68 ps en épifluorescence et 2100 ps avec un écart type de 168 ps en TIRF. La petite différence observée sur la moyenne peut être expliquée par un possible amortissement de la fluorescence (quenching) provoqué par la proximité de l'interface, ce qui aurait tendance à réduire le temps de vie en TIRF (cf. chapitre III, p 113).

Comme prévu, l'écart type est plus bas en épifluorescence puisque le signal de fluorescence collecté est nettement supérieur.

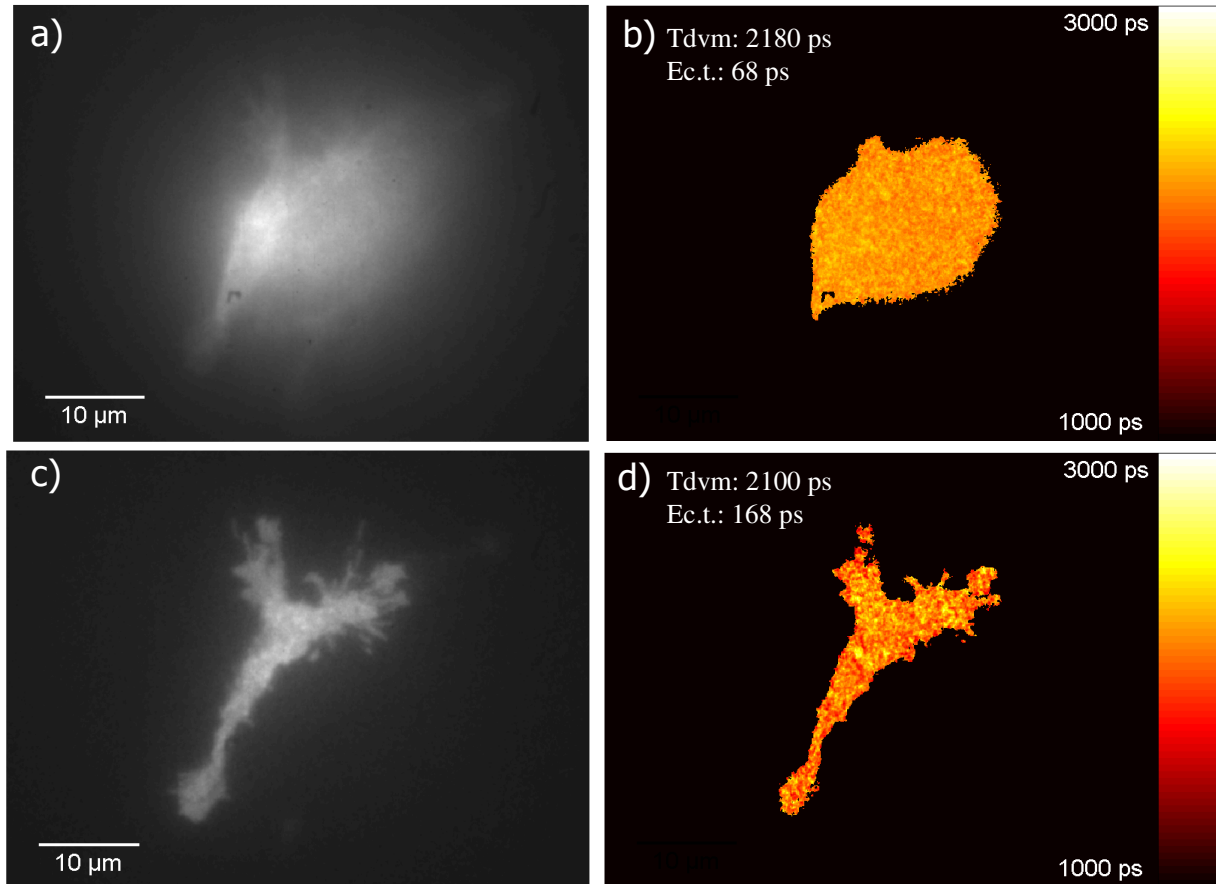


Figure 3-26 : images en intensité (a,c) et carte des temps de vie (b,d) d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-CFP. Comparaison des résultats obtenus en épifluorescence (a,b) et en TIRF (b,d).

Nous avons rapporté le déclin en un pixel représentatif (figure 3-27a) de la carte de temps de vie en TIRF. Nous pouvons voir un bon accord entre les données obtenues expérimentalement et l'ajustement par un déclin monoexponentiel. Nous avons également tracé l'histogramme correspondant, qui montre une distribution assez homogène du temps de vie de fluorescence de la CFP à travers toute la cellule.

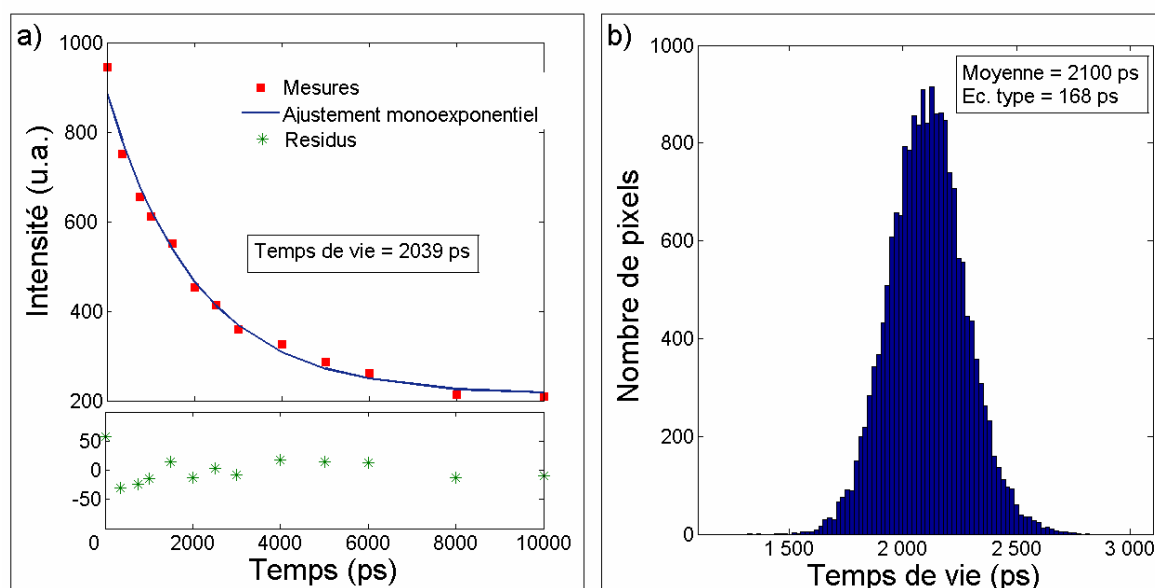


Figure 3-27:(a) déclin de fluorescence pour un pixel de la carte des temps de vie obtenue en TIRF (2d), ajusté avec un modèle de déclin monoexponentiel, et (b) histogramme des temps de vie calculés pour toute la carte.

Ensuite, nous observons les cellules HEK-293 avec la transfection stable CB1R-GFP.

Pour ces mesures, nous utilisons un filtre à l'excitation centré à 472 nm avec une largeur de 30 nm, et pour la détection, un filtre centré à 520 nm avec une largeur de 35 nm. Les paramètres d'acquisition figurent dans le tableau 3-9. Nous mesurons une puissance incidente de 510 μ W. Pour cette mesure, nous obtenons un temps de vie moyen de 2430 ps avec un écart type de 100 ps (figure 3-28).

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	GFP	10	250	0	800	650
	YFP	10	250	0	800	750
	mChe.	10	250	0	800	710

Tableau 3-9 : paramètres d'acquisition.

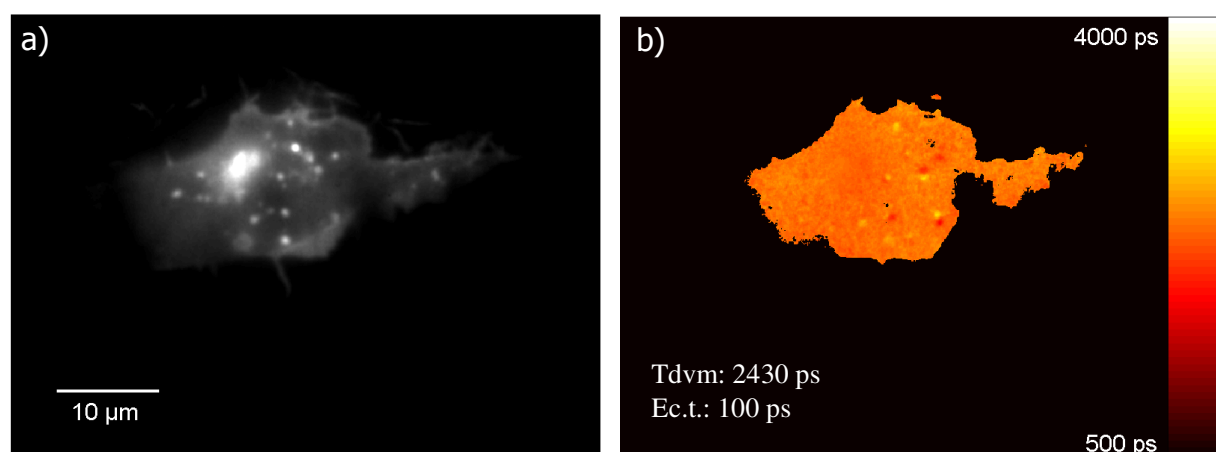


Figure 3-28 : Images TIRF en intensité (a) et en temps de vie (b) d'une cellule HEK-293 avec une transfection stable CB1R-GFP.

Enfin, nous observons toujours des cellules HEK-293 mais cette fois cotransfectées avec APP-YFP et CB1-mCherry (paramètres d'acquisition dans le tableau 3-9). Pour changer de

fluorophore imagé, il suffit de changer le jeu de filtres. Concernant la protéine fluorescente YFP (excitation : $\lambda=482$ nm, $\Delta\lambda=35$ nm; détection : $\lambda=536$ nm, $\Delta\lambda=40$ nm, puissance incidente autour de $650 \mu\text{W}$), nous mesurons un temps de vie de fluorescence moyen de 2592 ps avec un écart type de 159 ps (figure 3-29).

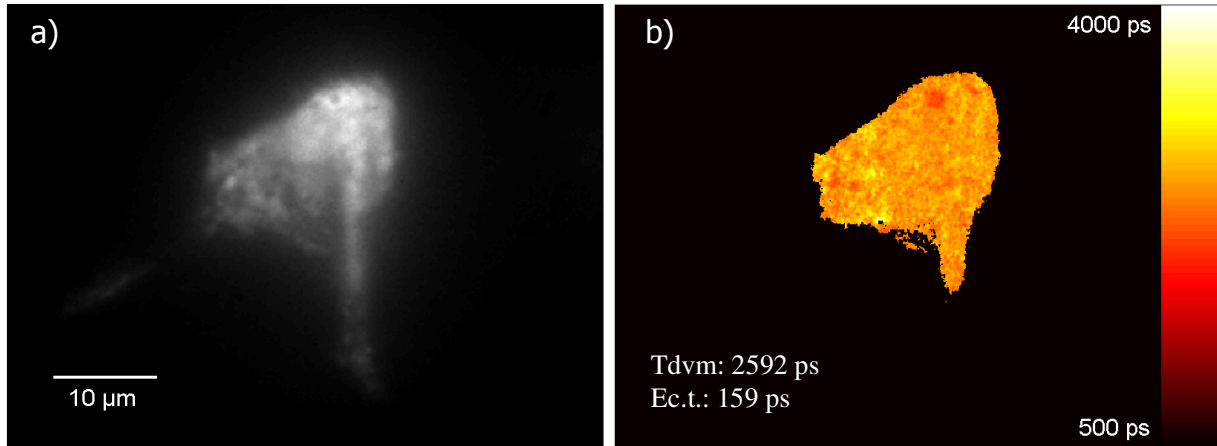


Figure 3-29 : Images TIRF en intensité (a) et en temps de vie (b) de la protéine fluorescente YFP dans une cellule HEK-293 cotransfectée avec APP-YFP et CB1-mCherry.

Pour la mCherry, (excitation : $\lambda=531$ nm, $\Delta\lambda=40$ nm; détection : $\lambda=607$ nm, $\Delta\lambda=36$ nm; puissance moyenne autour de $600 \mu\text{W}$) un temps de vie moyen de 1358 ps avec un écart type de 57 ps est obtenu (figure 3-30).

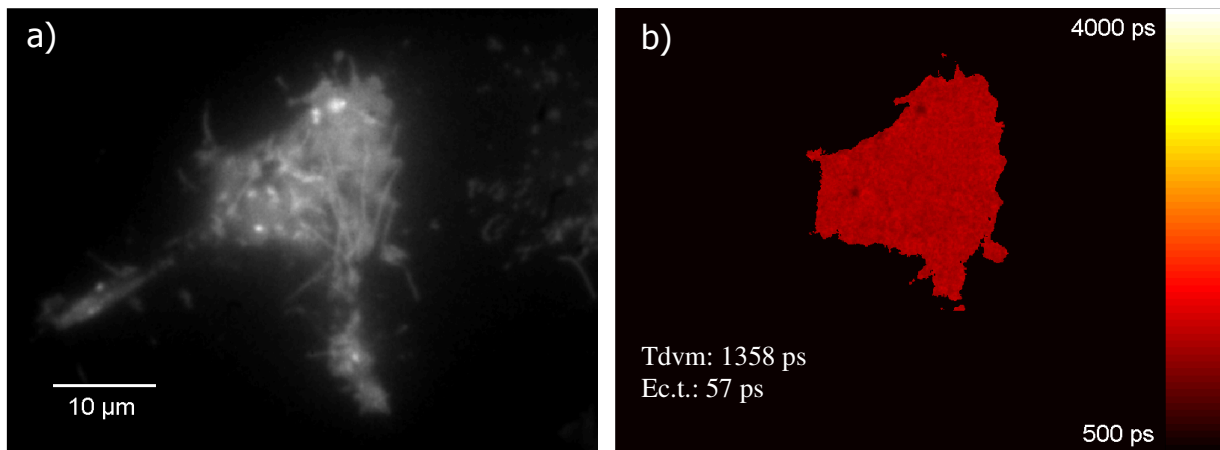


Figure 3-30 : Images TIRF en intensité (a) et en temps de vie (b) de la protéine fluorescente mCherry dans la même cellule que la figure 3-29.

Les écarts types pour ces trois mesures sont quelque peu différents, car le signal de fluorescence collecté dépend du fluorophore observé, et aussi de la position de la protéine marquée dans la cellule. Pour ces trois mesures, l'angle d'incidence n'a pas été modifié, et par conséquent la profondeur de pénétration du champ évanescent n'est affectée que par le changement de longueur d'onde du faisceau exciteur.

L'ensemble de ces mesures est récapitulé dans le tableau 3-10.

Fluorophore	Excitation (nm)	Détection (nm)	Temps de vie (ps)	Ec. type (ps)
CFP	438	483	2100	168
GFP	472	520	2430	100
YFP	482	536	2592	159
mCherry	531	607	1358	57

Tableau 3-10 : récapitulatif des temps de vie mesurés pour les différents fluorophores étudiés.

Ces valeurs sont tout à fait comparables à ce que l'on peut trouver dans la littérature : pour la CFP, les temps de vie mesurés varient entre 2,2 et 2,6 ns [Grailhe 2006], [Tramier 2006], [Chen 2004], pour la GFP les valeurs rapportés sont entre 2,51 [Chen 2004] et 2,64 ns [Tramier 2006], pour la YFP, les valeurs semblent être proches de 2,8 ns [Chen 2004], [Becker 2004], et enfin, pour la mCherry, les temps de vie mentionnés sont plus courts autour de 1,4 ns [Merzlyak 2007].

VI - Conclusions

En utilisant les propriétés du champ évanescent, la microscopie TIRF permet d'imager la première centaine de nanomètres d'un échantillon. Une telle résolution axiale sublongueur d'onde trouve de nombreuses applications, notamment en imagerie cellulaire. Avec cette technique il est possible d'observer précisément la membrane en s'affranchissant de la fluorescence du reste de la cellule. En utilisant cette technique d'imagerie couplée à de la fluorescence résolue en temps, nous sommes capables de faire de l'imagerie fonctionnelle très localisée.

L'originalité de notre montage réside dans l'utilisation d'une source supercontinuum pour l'excitation, d'une géométrie de TIRF basée sur l'utilisation d'un objectif à grande ouverture numérique et d'une détection temporelle réalisée en plein champ grâce à un intensificateur.

Au niveau des performances de notre système d'imagerie, nous avons pu mesurer expérimentalement la résolution spatiale latérale. Pour la résolution axiale, nous ne pouvons actuellement donner qu'une estimation de la profondeur de pénétration du champ évanescent. Concernant la mesure de temps de vie de fluorescence, nous avons cerné l'influence des différents paramètres d'acquisition. Ceux qui semblent les plus importants sont la position du début de l'échantillonnage (l'optimum semble être 300 ps après le maximum d'intensité) et la position de la dernière prise d'image avant acquisition (à cause de la persistance de l'intensificateur). En accord avec les niveaux de signal que nous avons dans les cellules, nous avons décidé de fixer à 10 le nombre d'acquisitions moyennées pour obtenir une image, de prendre un temps d'exposition sur la caméra de 250 ms et une largeur de porte temporelle de 800 ps. Le gain de l'intensificateur est ajusté suivant les niveaux de signal.

Nous nous sommes ensuite assurés de la reproductibilité de nos mesures, et nous avons comparé les résultats obtenus sur notre dispositif à ceux obtenus sur un système commercial. Il semble que nous disposions d'un dispositif robuste, qui donne des valeurs de temps de vie de fluorescence correctes.

Nous avons ensuite présenté plusieurs images de cellules transfectées avec différents fluorophores, pour montrer l'accordabilité en longueur d'onde de notre dispositif, et aussi les performances que l'on pouvait atteindre en terme de résolutions spatiale et temporelle.

Dans la partie suivante de ce manuscrit, nous allons nous intéresser plus intensément aux échantillons biologiques, en accord avec une problématique biomédicale précise.

Ainsi, nous disposons d'un dispositif tout à fait utilisable en l'état pour travailler sur des échantillons biologiques. Néanmoins, certaines améliorations sont envisageables pour perfectionner cet outil.

La principale semble être la maîtrise de la profondeur de pénétration du champ évanescent. Comme nous l'avons vu, pour l'instant nous pouvons estimer cette profondeur d'après une

mesure de l'angle d'incidence du faisceau excitateur sur la lentille de focalisation. Nous ne mesurons pas assez précisément cet angle pour nous assurer de la reproductibilité. Et surtout, nous ne pouvons pas actuellement mesurer expérimentalement la profondeur de pénétration du champ et la relier à un « réglage » précis. Pour remédier à cela, nous avons envisagé plusieurs pistes, la plus intéressante étant selon nous de placer le rail avec les optiques (miroir et lentille de focalisation dans le plan arrière de l'objectif) sur une platine de translation motorisée pilotable. Ainsi, au lieu de tourner le miroir (ce qui en plus induit une asymétrie sur le faisceau), il suffirait de translater l'ensemble du rail, ce qui translaterait la tâche dans le plan focal arrière de l'objectif. Nous pourrions dès lors ajuster finement la position de ce point de focalisation et s'assurer de la reproductibilité. Pour la mesure expérimentale de la profondeur de pénétration du champ, nous travaillons en collaboration avec Emmanuel Fort, Yannick Goulam Houssen et Karla Balaa du Laboratoire Matériaux et Phénomènes Quantiques de l'Université Paris Diderot. Cette équipe est capable de réaliser des dépôts de divers matériaux en escalier avec des marches très fines de quelques nanomètres et de recouvrir ces marches de fluorophores (figure 3-31). Ainsi avec un matériau d'indice proche de celui de l'eau, on peut se placer dans des conditions de réflexion totale comparables à celles que l'on a en travaillant sur des échantillons biologiques. Et en déposant des petites sphères fluorescentes (20 nm), nous allons pouvoir retrouver le déclin monoexponentiel du champ évanescent suivant l'augmentation de la distance à l'interface, et ainsi mesurer la profondeur de pénétration du champ.

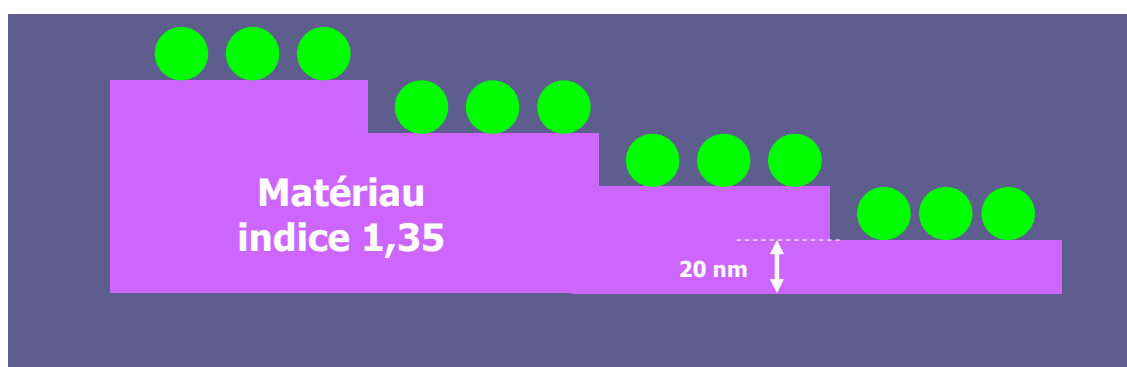


Figure 3-31 : schéma des échantillons pour mesurer la résolution axiale du dispositif de TIRF.

L'intérêt d'une telle calibration serait de cerner précisément la partie de l'échantillon que nous imageons. Puisque les membranes plasmiques ont une épaisseur d'environ une dizaine de nanomètres, il semble intéressant d'évaluer plus précisément la contribution de la fluorescence de la membrane au signal collecté. Pour les applications (en tout cas celles actuellement en cours au laboratoire), nous n'avons cependant pas besoin d'avoir une précision à 10 nm près. Mais d'un point de vue plus fondamental, une telle précision serait d'un grand intérêt pour étudier expérimentalement l'influence de la distance à l'interface sur le temps de vie de fluorescence mesurée.

Toujours en terme de résolution, des mesures complémentaires sont à faire sur la résolution latérale, et notamment sur la dégradation introduite par l'intensificateur

Pour l'instant, nous n'avons pas non plus tiré partie de la polarisation sur notre montage. Comme on l'a vu en introduction, la polarisation du champ évanescent a des caractéristiques très particulières qui sont reliées à l'état de polarisation incident. Il semblerait intéressant de voir l'influence de la polarisation sur les images obtenues.

Pour améliorer notre dispositif, nous voulons aussi agrémenter notre microscope d'une bague piézoélectrique permettant de déplacer finement l'objectif suivant l'axe optique. D'un point de vue expérimental, un tel ajout permettrait tout d'abord de mesurer la réponse percussionnelle

dans la direction parallèle à l'axe optique. Couplée aux échantillons évoqués ci-dessus, cette bague nous permettra de calibrer axialement notre dispositif.

Nous souhaitons également ajouter un dispositif d'imagerie qui peut séparer le signal collecté suivant deux voies, et de collecter les deux signaux sur la même caméra. Ainsi nous pourrions en parallèle détecter deux longueurs d'ondes d'émission différentes, ce qui est très utile lorsque l'on souhaite observer des phénomènes de transfert énergétique par FRET, ce qui est notre cas pour les applications neurobiologiques sur lesquelles nous travaillons (voir le chapitre suivant). Il est également envisageable de séparer avec ce dispositif deux polarisations orthogonales du signal de fluorescence, ce qui s'avère indispensable pour pouvoir faire de l'anisotropie de fluorescence.

Concernant la mesure de temps de vie de fluorescence, nous devons améliorer les performances essentiellement en retravaillant le logiciel. Le problème de persistance de la détection doit pouvoir être résolu. D'une manière simple, nous pensons essayer dans un premier temps augmenter le nombre d'acquisitions utilisées pour obtenir une image moyenne, et s'affranchir des premières acquisitions pour le calcul (par exemple, on réalise 12 acquisitions pour chaque position de la porte temporelle, et la moyenne est calculée uniquement sur les 10 dernières, ce qui permet de se débarrasser du signal due à la persistance et qui fausse uniquement les premières images d'intensité). Il est également envisageable d'utiliser une autre carte de synchronisation plus fiable que la carte National Instruments gérée par le logiciel Labview, permettant de déclencher très précisément les différents éléments de détection, plutôt que de se baser uniquement sur les séquences d'acquisition écrites en Labview.

Annexe 1 : Fiches techniques du matériel utilisé

Caractéristiques de l'objectif PLAPON 60XOTIRFM

OLYMPUS Your Vision, Our Future

UIS2 series
Biological Microscope
OBJECTIVES

- UPLSAPO
- PLAPON
- UPLFLN
- UPLFLN-PH
- PLN
- PLN-PH
- PLN-CY & PLFLN-CY
- PLN-P & ACHN-P
- LUCPLFLN
- CPLFLN-PH
- LUCPLFLN-PH
- CPLFLN-RC
- LUCPLFLN-RC
- CPLN-PH
- LCACHN-PH
- CPLN-RC
- LCACHN-RC
- UPLFLN-PHP
- CACHN-PHP
- LCACHN-PHP

MIRROR UNITS

- Ultraviolet excitation
- Violet excitation
- Blue Violet excitation
- Blue excitation
- Green excitation
- Yellow excitation
- CFP, GFP, YFP, RFP


OPTIONS

- Low Auto-fluorescence
- Immersion Oil

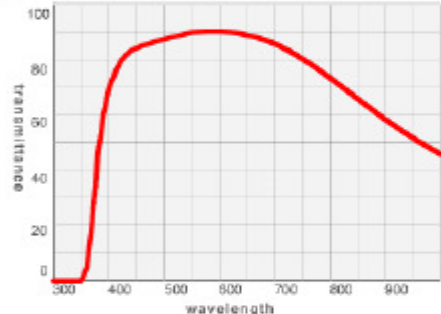
Discontinued

UIS2 series : Objectives
PLAPON 60XOTIRFM

BF DIC PO FL UV FL F.N. 26.5




Transmittance / Wavelength



Main specifications

N.A.	W.D.	F.N.
1.45	0.1	26.5

Dimensions



Click To Popup

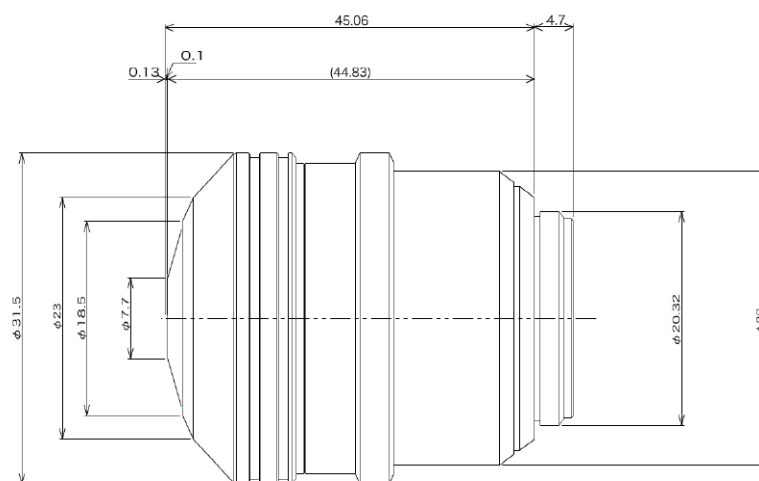
Specifications

N.A.	W.D. (mm)	F.N.	Cover Glass Thickness (mm)	Immersion	Spring
1.45	0.1	26.5	0.13-0.19	Oil	Yes

Correction Ring	Iris Diaphragm	Waterproof & Oil proof function	Ultra Wide anti-reflection coating	Super apochromatic	Brightfield	Darkfield
Yes	-	Yes	Yes	-	Excellent	N/A

DIC	Phase-Contrast	Relief Contrast	Polarized Light	Fluorescence (B, G Excitation)	UV Fluorescence (at 365nm)
Excellent	N/A	N/A	Good	Excellent	Good

Copyright 2004 OLYMPUS CORPORATION All Rights Reserved.



Copyright 2004 OLYMPUS CORPORATION All Rights Reserved.

resizable

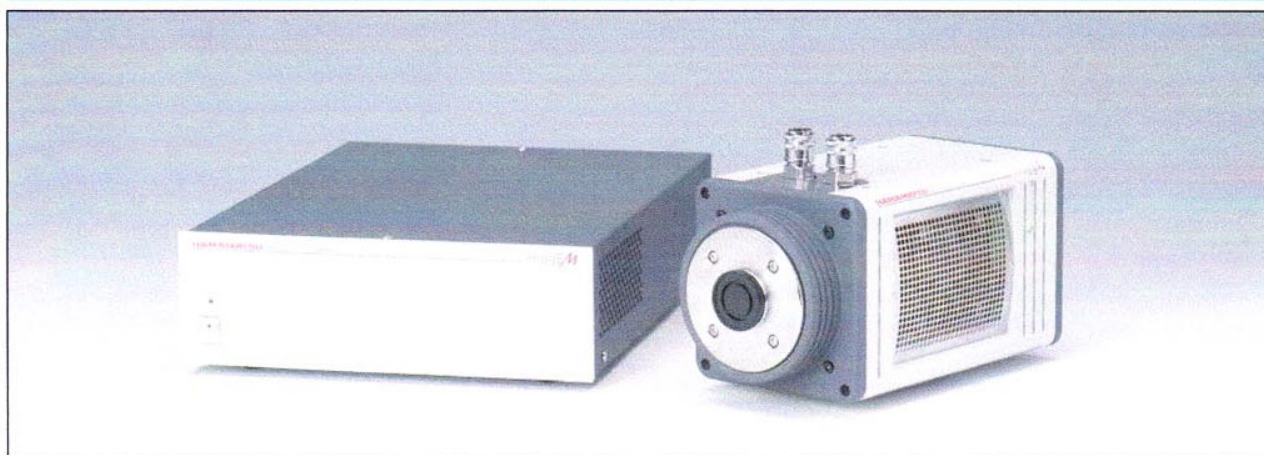
Caractéristiques de la caméra EMCCD

ImageMTM



EM-CCD Camera C9100-13

Electron Multiplier CCD Camera



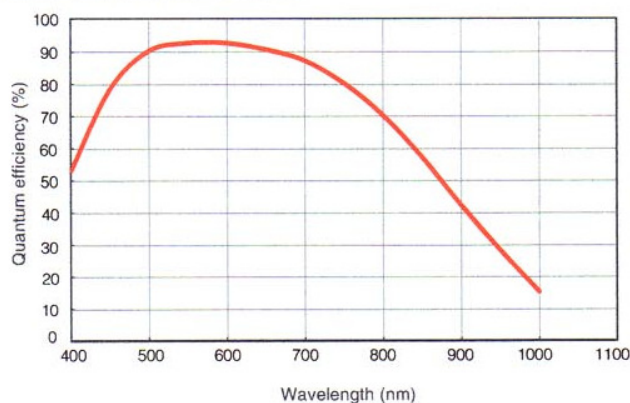
The ImageM camera evolved from the popular C9100-12 electron multiplier CCD camera. This new generation camera incorporates the latest Hamamatsu engineering and technology to provide a high speed readout rate of 32 frames per second at full spatial resolution and 16 bit digitization. With QE over 90 % and cooling down to -90 °C, both low noise and high gain are realized in one camera. ImageM includes dual readout modes to take advantage of these features. In the EM-CCD readout mode, the on-chip gain provides high speed imaging at very low light levels. In the normal CCD readout mode, the low noise readout and deep cooling provide exceptional images even in long integration situations. High dynamic range, high resolution, high signal to noise ratios and high speed are all hallmarks of this new generation EM-CCD camera. In addition, Photon Imaging mode enables ultra low light detection.

Other new features included in the ImageM are real-time image processing (Background subtraction, Shading correction, and a Recursive filter) plus special internal and external synchronization features. It is now possible to optimize frame synchronization for spinning disk confocal microscopes at up to 32 frames per second with the synchronous readout trigger (Patent Pending).

FEATURES

- High quantum efficiency of 90 % at the peak wavelength
- -90 °C cooling with hermetic sealed head (requires water cooling at +10 °C)
- Dual readout mode (EM-CCD readout / NORMAL CCD readout)
- High EM gain (1200 times)
- Real time (32 frame/s) readout at full resolution (512 × 512)
- Ultra low light detection in Photon Imaging mode
- Flexible external synchronization modes
- Synchronous readout trigger mode (Patent pending)
- Both fan and water cooling are included (selectable)
- Image reversal function in the EM-CCD readout
- Anti-reflection coating on both sides of input window

SPECTRAL RESPONSE



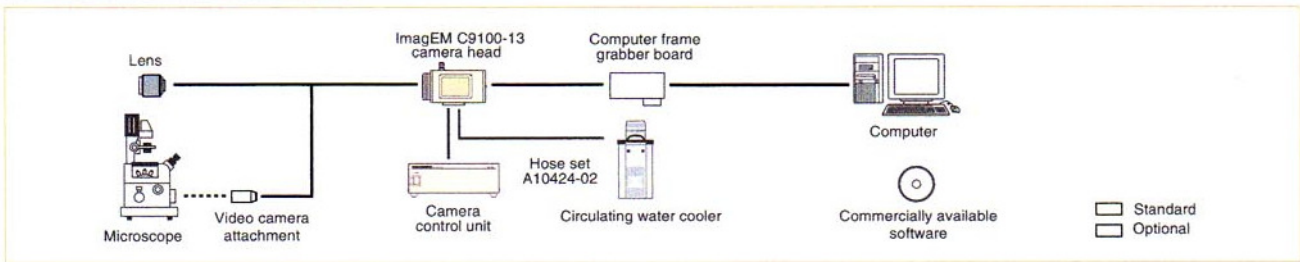
★ This is typical, not guaranteed.

APPLICATIONS

- Real time imaging of low light fluorescence
- Intracellular ion measurement
- Single molecule fluorescence imaging with TIRF microscopy
- Real time confocal microscopy
- Luciferase reporter gene assay
- Luminescence imaging

HAMAMATSU

SYSTEM CONFIGURATION



SPECIFICATIONS

Type number	C9100-13	
Camera head type	Hermetic vacuum-sealed air/water-cooled head ①	
Imaging device	Back-thinned Frame Transfer CCD	
Effective no. of pixels	512 (H) × 512 (V)	
Cell size	16 μm (H) × 16 μm (V)	
Effective area	8.192 mm (H) × 8.192 mm (V)	
Pixel clock rate	EM-CCD	11 MHz, 2.75 MHz, 0.69 MHz
	NORMAL CCD	2.75 MHz, 0.69 MHz
Electron multiplication gain (typ.)	1 or 4 to 1200 times ②	
Ultra low light detection	Photon Imaging mode	
Fastest readout speed	31.9 frame/s to 404.4 frame/s	
Readout noise (r.m.s.) (typ.)	EM-CCD	gain 4 times 25 electrons (at 11 MHz) 20 electrons (at 2.75 MHz) 8 electrons (at 0.69 MHz)
		gain 1200 times 1 electron max. (at 11 MHz) 1 electron max. (at 2.75 MHz) 1 electron max. (at 0.69 MHz)
		NORMAL CCD 17 electrons (at 2.75 MHz) 8 electrons (at 0.69 MHz)
Full well capacity (typ.) ③	370 000 electrons (Max. 800 000 electrons)	
Analog gain	1/2 times to 5 times	
Cooling method / temperature	Forced-air cooled	-65 °C stabilized (0 °C to +30 °C)
	Water cooled ④	-80 °C stabilized (Water temperature : +20 °C) -90 °C (Water temperature : lower than +10 °C) ⑤
Dark current (typ.)	Forced-air cooled (-65 °C)	0.01 electron/pixel/s
	Water cooled (-80 °C)	0.001 electron/pixel/s
Exposure time ⑥	Internal sync mode	30.5 ms or more
	External trigger mode	10 μs or more
A/D converter	16 bit	
Output signal / External control	CameraLink	
Sub-array	Yes	
Binning	2×2, 4×4 (8×8, 16×16) ⑦	
External synchronization ⑧	Edge trigger, Level trigger, Start trigger, Synchronous readout trigger	
Trigger output ⑧	Yes	
Image processing features (real-time)	Background subtraction, Shading correction, Recursive filter	
Lens mount	C-mount	
Power requirements	AC 100 V to 240 V 50 Hz / 60 Hz	
Power consumption	Approx. 140 V A	
Ambient storage temperature	-10 °C to +50 °C	
Ambient operating temperature	0 °C to +40 °C	
Performance guaranteed temperature	0 °C to +30 °C	
Ambient operating/storage humidity	70 % max. (with no condensation)	

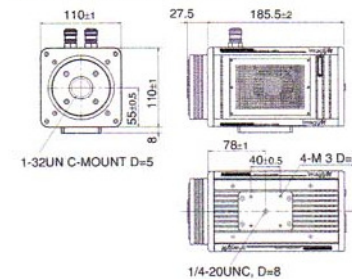
● Fastest Readout Speed (Internal synchronization mode, Unit : frame/s typ.)

Binning	Effective vertical width (Sub-array)					
	512	256	128	64	32	16
1 × 1	31.9	59.6	105.0	169.7	245.2	315.4
2 × 2	60.9	107.1	172.4	248.0	317.7	369.6
4 × 4	111.5	178.1	253.9	322.5	372.8	404.4

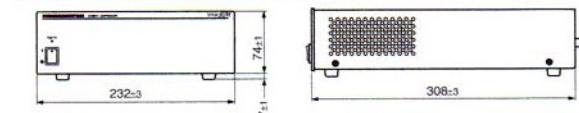
- ① The hermetic sealed head maintains a high degree of vacuum 10⁻⁸ Torr, without re-evacuation.
- ② Even with electron multiplier gain maximum, dark signal is kept low level for low light imaging.
- ③ Linearity is not assured when full well capacity is more than 370 000 electrons.
- ④ Water volume 1.2 liter/min.
- ⑤ Image smearing may appear when the exposure time is short.
- ⑥ C-MOS 3.3 V with reversible polarity.
- ⑦ 8 × 8 and 16 × 16 binning are available on special order. Please consult with our sales office.
- ⑧ The maximum cooling temperature may vary subject to set-up environment.

DIMENSIONAL OUTLINES (Unit : mm)

■ Camera head (Approx. 3.7 kg)



■ Camera control unit (Approx. 3.0 kg)



OPTIONS

- Commercially available software
- Circulating water cooler
- Hose set A10424-02

★ Windows is registered trademark of Microsoft Corporation in the U.S.A.

★ Product and software package names noted in this documentation are trademarks or registered trademarks of their respective manufacturers.

• Subject to local technical requirements and regulations, availability of products included in this promotional material may vary. Please consult with our sales office.

• Information furnished by HAMAMATSU is believed to be reliable. However, no responsibility is assumed for possible inaccuracies or omissions.

Specifications and external appearance are subject to change without notice.

© 2006 Hamamatsu Photonics K.K.

HAMAMATSU

Homepage Address <http://www.hamamatsu.com>

HAMAMATSU PHOTONICS K.K., Systems Division

812 Joko-cho, Hamamatsu City, 431-3196, Japan, Telephone: (81)53-431-0123, Fax: (81)53-433-8031, E-mail:sales2@sys.hpk.co.jp

U.S.A. and Canada: Hamamatsu Photonic Systems: 360 Foothill Road, Bridgewater, N.J. 08807-0910, U.S.A., Telephone: (1)908-231-1116, Fax: (1)908-231-0852, E-mail: usa@hamamatsu.com

Germany: Hamamatsu Photonics Deutschland GmbH: Arzbergerstr. 10, D-82211 Herrsching am Ammersee, Germany, Telephone: (49)8152-375-0, Fax: (49)8152-2658, E-mail: info@hamamatsu.de

France: Hamamatsu Photonics France S.A.R.L.: 19, Rue du Saule Trappu, Parc du Moulin de Massy, 91882 Massy Cedex, France, Telephone: (33)1 69 53 71 00, Fax: (33)1 69 53 71 10, E-mail: infos@hamamatsu.fr

United Kingdom: Hamamatsu Photonics UK Limited: 2 Howard Court, 10 Twin Road, Welwyn Garden City, Hertfordshire, AL7 1BW, U.K., Telephone: (44) 1707-294888, Fax: (44) 1707-325777, E-mail: info@hamamatsu.co.uk

North Europe: Hamamatsu Photonics Norden AB: Smidesvägen 12, SE-171-41 Solna, Sweden, Telephone: (46)8-509-031-00, Fax: (46)8-509-031-01, E-mail: info@hamamatsu.se

Italy: Hamamatsu Photonics Italia S.R.L.: Strada della Moia, 1/E 20020 Arese (Milano), Italy, Telephone: (39)02-935 81 733, Fax: (39)02-935 81 741, E-mail: info@hamamatsu.it

Cat. No. SCAS0022E03

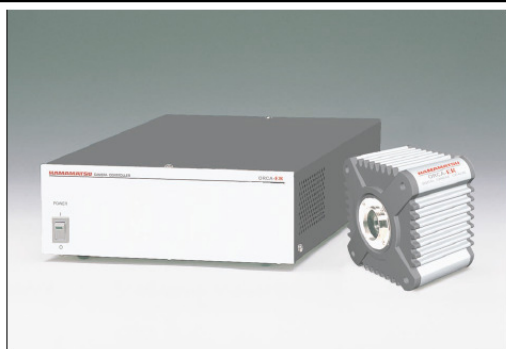
NOV/2006 HPK

Created in Japan (PDF)

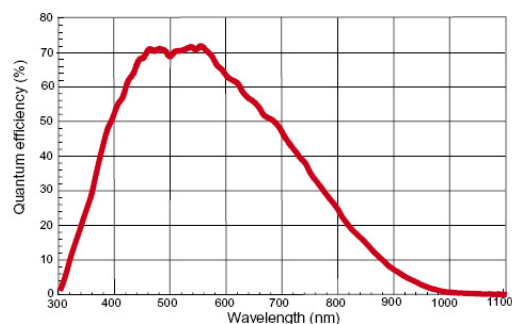
Caractéristiques de la caméra CCD

HAMAMATSU
DATA SHEET

**High Resolution Digital
B/W CCD Camera
ORCA-ER**



SPECTRAL RESPONSE CHARACTERISTICS



* This is typical, not guaranteed.

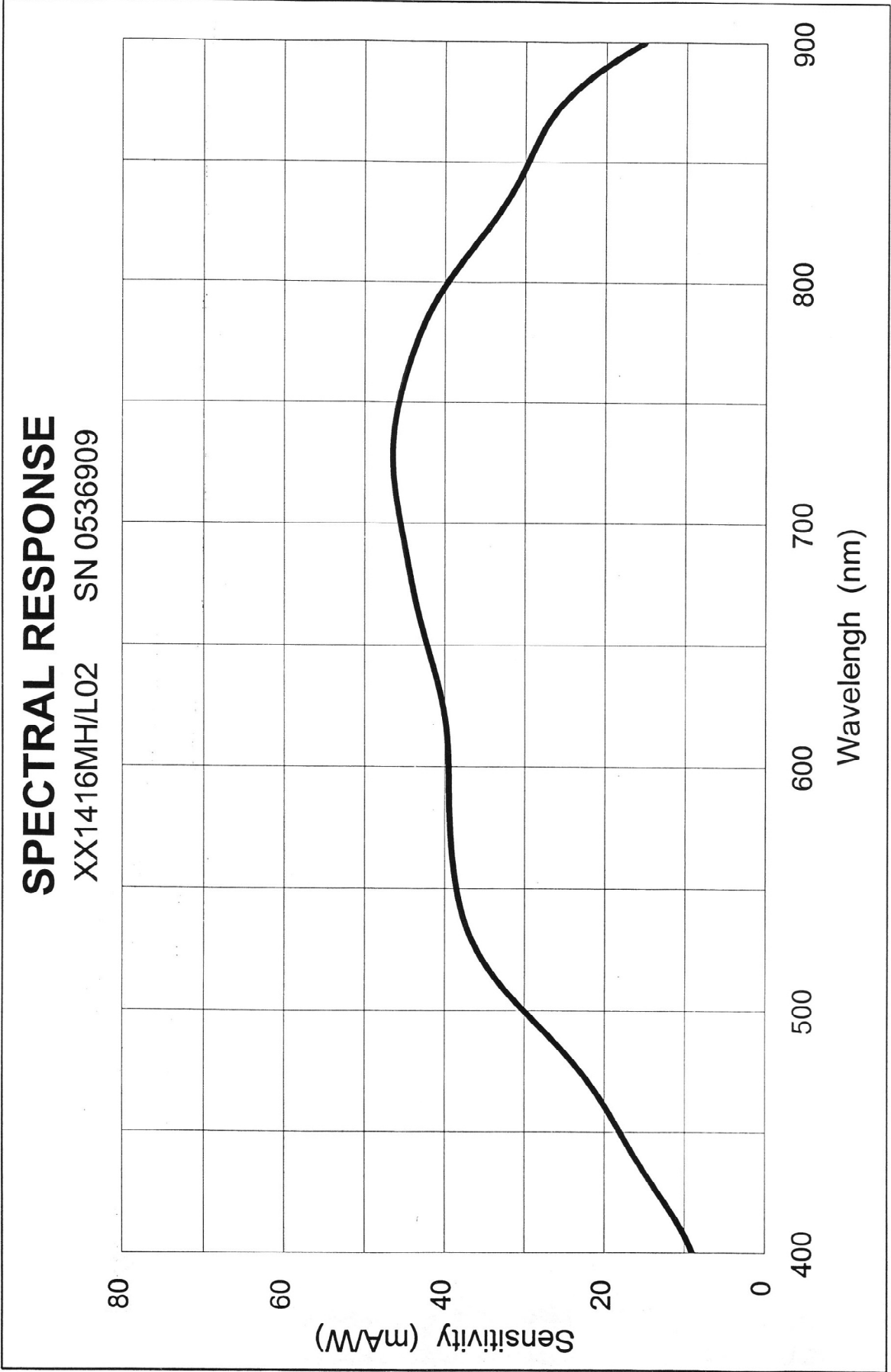
SPECIFICATIONS

Imaging device	Progressive scan interline CCD with micro-lens
Effective no. of pixels	1344 (H) × 1024 (V)
Cell size	6.45 μm × 6.45 μm (square format)
Effective area	8.67mm × 6.60 mm (2/3-inch format)
Pixel clock rate	14.75MHz/pixel
Frame rate	8.3 Hz
2 × 2 binning	16.4 Hz
4 × 4 binning	29.0 Hz
8 × 8 binning	45.3 Hz
Readout noise (r.m.s.)	8 electrons
Full well capacity	18,000 electrons
Dynamic range*	2250 :1
Cooling method	Peltier cooling with hermetic vacuum sealing
Cooling temperature	- 20 °C at 20 °C ambient temperature
Dark current	0.1 electron/pixel/sec
A/D converter	12 bit
Output signal (digital output)	RS-422A 12-bit parallel output
External control	RS-232C (full remote for all camera functions)
Sub array**	yes
External trigger	yes
Contrast enhancement	Analog Gain (10 times max.) and Offset functions
Power consumption	70 VA
Ambient storage temperature	-10 to +50 °C
Ambient operating temperature	0 to +40 °C
Ambient operating/storage humidity	70% max. (no condensation)

* Calculated from the ratio of the full well capacity and average readout noise.

** Note: Includes 1280 × 1024 image size software compatibility with ORCA and ORCA II series.

Réponse spectrale de l'intensificateur HRI



Annexe 2 : influence des différents paramètres d'acquisition

A2.1 – Influence des paramètres d'acquisition sur les intensités mesurées

A2.1.1 - Linéarité des détecteurs

Dans cette série de mesures, nous avons regardé l'influence de différents paramètres sur l'intensité mesurée en fonction de la puissance laser incidente. Pour la caméra, nous avons fait varier le nombre d'images pour faire la moyenne, le temps d'exposition, et le gain. Pour la porte temporelle, l'influence de la largeur des portes et celle du gain ont été observées.

Pour chacun de ces paramètres, une valeur par défaut a été définie (valeurs les plus souvent utilisées ou centrales), qui sert de référence. Ainsi lors de l'étude de l'influence d'un paramètre, les autres paramètres prennent cette valeur par défaut. Toutes les valeurs choisies pour l'étude sont consignées dans le tableau 3-A1-1. Pour réaliser ces mesures, nous plaçons un miroir en argent dans le plan d'observation, et la réflexion du faisceau (très fortement atténué) par le miroir est envoyée sur le système de détection. Nous enregistrons les résultats pour des puissances lasers incidentes sur le microscope de 5, 20, 60, 100, 140 et 220 μW .

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	250	0	400	460
Valeurs prises pour l'étude	1	1	50	200	260
	5	100	100	300	360
	10	200	150	400	460
	15	250	200	500	560
	20	300	250	600	660
	30	400		700	760
		1000		800	850
				900	
				1000	
				5000	

Tableau 3-A1-1 : valeur des paramètres pour l'étude de la linéarité des détecteurs.

La caméra CCD fonctionnant sur 12 bits, les valeurs d'intensité mesurées sur la caméra vont de 0 à 4096.

Concernant la caméra, nous retrouvons la linéarité attendue pour les trois paramètres.

Tout d'abord, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance laser incidente à nombre d'images fixé est parfaitement linéaire. De plus, l'intensité sur la caméra en fonction du nombre d'images est constante à puissance laser fixée (figure 3-A1-1).

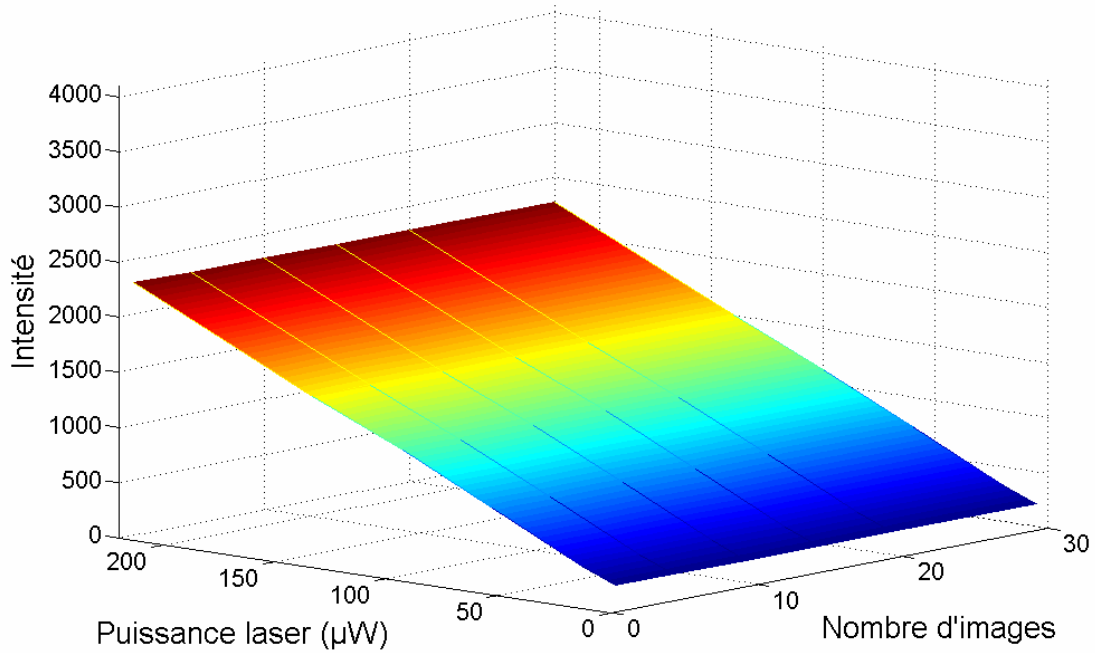


Figure 3-A1-1 : influence du nombre d'images utilisées pour faire la moyenne sur l'intensité détectée pour une image moyennée (la valeur d'intensité minimale est représentée en bleu et la maximale en rouge).

Ensuite, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance laser pour un temps d'exposition fixé est linéaire tant que l'intensité mesurée a des valeurs inférieures à 3500. Pour des valeurs supérieures, on voit apparaître une saturation. Il en va de même pour l'intensité en fonction du temps d'exposition à puissance laser fixée (figure 3-A1-2).

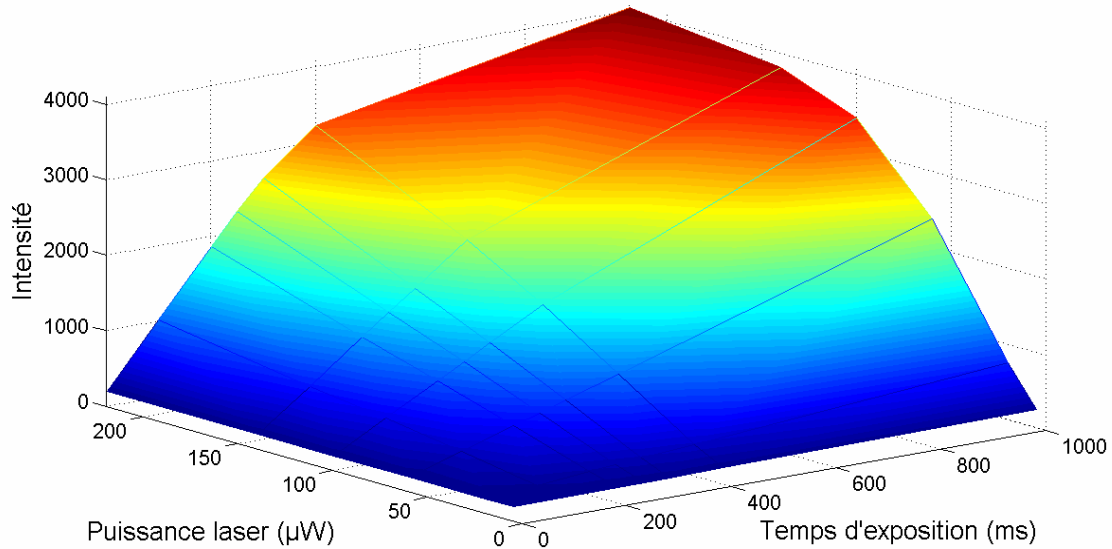


Figure 3-A1-2 : influence du temps d'exposition sur la caméra CCD sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

Enfin, en-dehors de la zone de saturation, c'est-à-dire pour des valeurs d'intensité pas trop proche du maximum, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance à gain fixé et l'intensité sur la caméra en fonction du gain à puissance fixée sont linéaires (figure 3-A1-3).

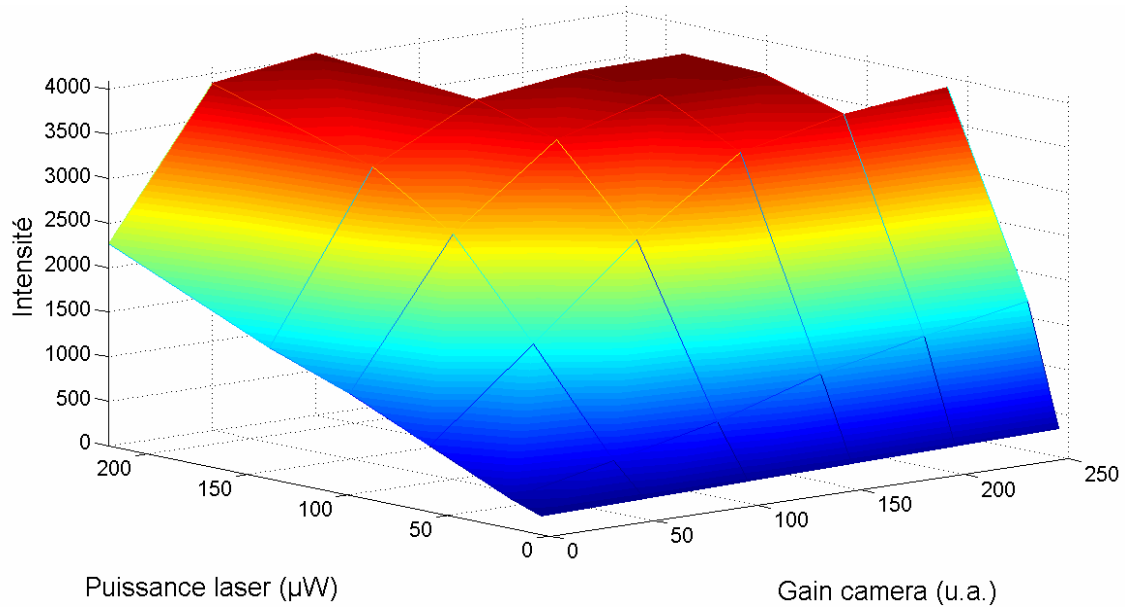


Figure 3-A1-3 : influence du gain de la caméra CCD sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

Concernant la porte temporelle, les résultats sont également concluants.

A gain fixé, loin de la saturation, l'intensité sur la caméra est une fonction linéaire de la puissance laser. Par contre, à puissance fixée, l'intensité sur la caméra ne varie pas linéairement en fonction du gain : l'évolution est plutôt exponentielle. Cette évolution est normale quand on utilise des détecteurs comme les galettes à microcanaux ou les photomultiplicateurs (figure 3-A1-4).

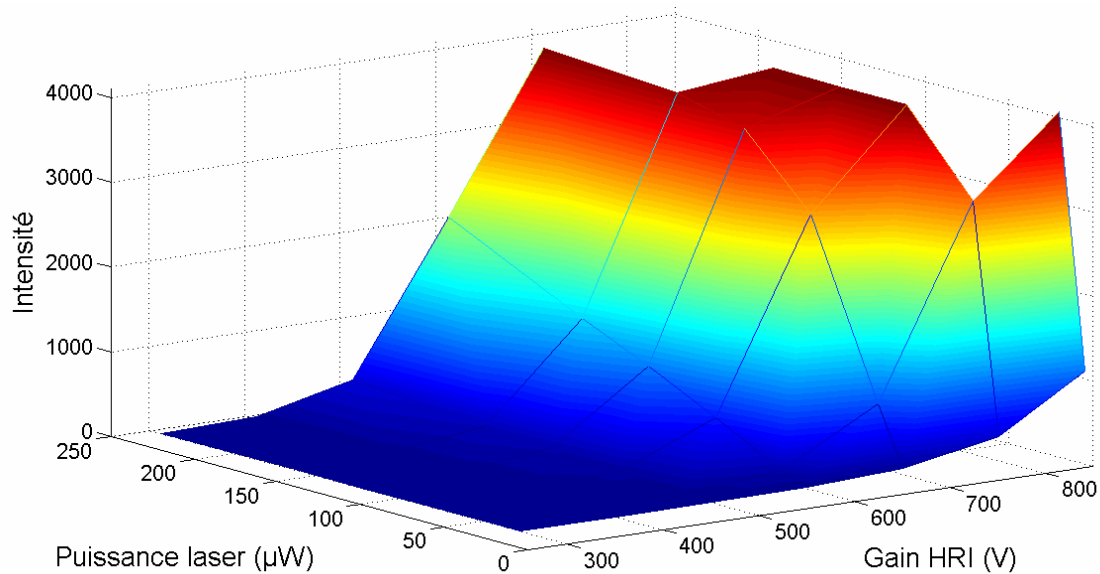


Figure 3-A1-4 : influence du gain de l'intensificateur sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

A largeur de porte fixée, l'intensité sur la caméra en fonction de la puissance laser est parfaitement linéaire. Par contre, l'intensité sur la caméra en fonction de la largeur de la porte à puissance laser fixée n'est pas complètement linéaire (figure 3-A1-5). Ceci n'est pas très gênant puisqu'a priori, nous n'allons pas changer largeur temporelle pour la porte au cours d'une acquisition. Et ceci pourrait s'expliquer par des largeurs de portes effectives quelque peu différentes des valeurs de consigne.

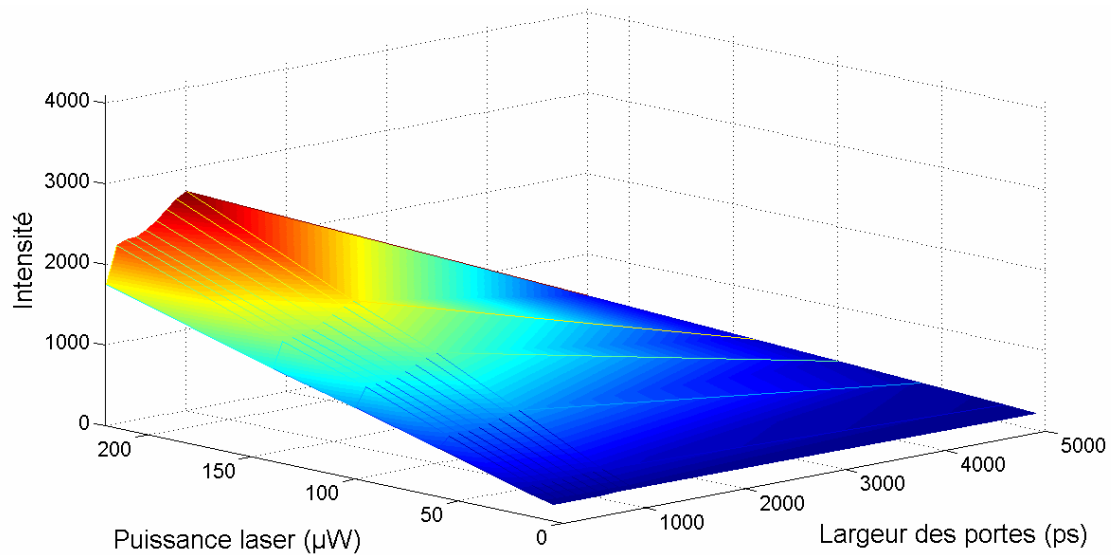


Figure 3-A1-5 : influence de la largeur des portes temporelles de l'intensificateur sur l'intensité détectée pour une image moyennée.

A2.1.2 - Détermination de la largeur des portes temporelles

La largeur des portes à une cadence de 15 MHz est contrôlée en plaçant un miroir dans le plan focal de l'objectif, comme précédemment. Une série d'images pour une largeur de porte donnée est enregistrée en déplaçant la porte de 25 ps (le plus petit pas possible) entre chaque acquisition. On trace ensuite l'intensité du signal reçu sur le système caméra/porte temporelle en fonction du retard autour de l'instant d'arrivée de l'impulsion. La largeur à mi hauteur de la courbe ainsi obtenue correspond à la largeur effective de la porte. Les profils obtenus sont rapportés figure 3-A1-6 et les largeurs mesurées à mi-hauteur figurent dans le tableau 3-A1-2.

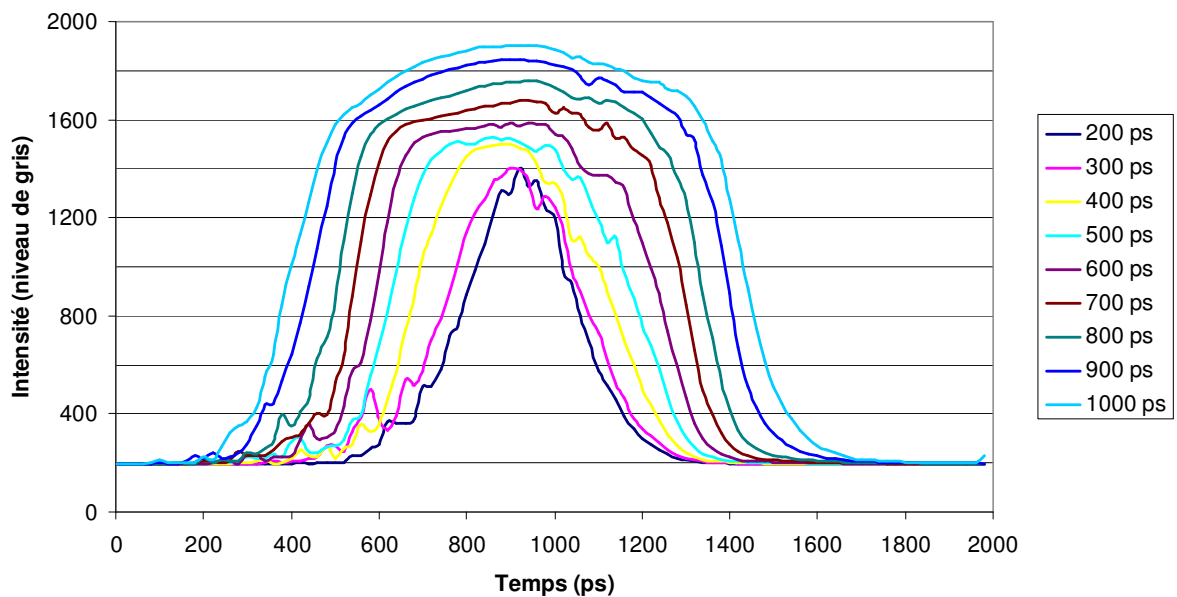


Figure 3-A1-6 : détermination expérimentale de la largeur des portes pour les différentes consignes.

Largeur de consigne (ps)	200	300	400	500	600	700	800	900	1000	5000
Largeur mesurée à mi-hauteur (ps)	272	328	441	540	624	742	840	940	1040	4800

Tableau 3-A1-2 : comparaison des largeurs de portes de consigne et mesurées.

On note des différences significatives entre les consignes et les largeurs de portes mesurées, ce qui pourrait expliquer la non-linéarité observée précédemment. Les portes mesurées dans le mode Comblow (porte de 100 ps à 1000 ps à une cadence de 20 MHz) sont plus longues que la consigne d'une quarantaine de ps. Ceci est sans doute due à la différence entre la cadence de travail de la porte (définie par le constructeur à 20 MHz), et la cadence de notre source laser (15 MHz). Les portes plus longues du mode User 1 pour des algorithmes d'acquisition à deux portes semblent quant à elles 200 ps plus courtes que la consigne (4800 ps mesurées contre 5000 ps de consigne).

Au cours de cette étude, nous avons également pu vérifier que la largeur effective des portes temporelles ne varie pas lorsque l'on change le gain du HRI.

Cette caractérisation des détecteurs étant achevée, nous allons maintenant nous intéresser à la mesure de temps de vie de fluorescence et aux performances temporelles de notre dispositif.

A2.2 – Influence des paramètres d'acquisition sur les temps de vie mesurés

Nous étudions l'influence des différents paramètres d'acquisition sur le temps de vie mesuré. Pour toutes ces mesures, nous utilisons le même algorithme, qui est notre algorithme de référence (nous le noterons A_{ref}) et qui est défini dans le tableau 3-A1-3 (les temps sont exprimés en ps).

1ère acquisition	$t_0 + 10000$
2ème acquisition	$t_0 + 8000$
3ème acquisition	$t_0 + 6000$
4ème acquisition	$t_0 + 5000$
5ème acquisition	$t_0 + 4000$
6ème acquisition	$t_0 + 3000$
7ème acquisition	$t_0 + 2500$
8ème acquisition	$t_0 + 2000$
9ème acquisition	$t_0 + 1500$
10ème acquisition	$t_0 + 1000$
11ème acquisition	$t_0 + 750$
12ème acquisition	$t_0 + 350$
13ème acquisition	$t_0 + 0$

Dans cet algorithme, nous réalisons 13 acquisitions pour échantillonner le déclin. Pour limiter l'influence de la persistance, l'acquisition se fait en remontant le déclin. Au début du déclin, les acquisitions sont plus proches. Nous exploitons la relativement basse cadence de la source en prenant un point 10 ns après l'impulsion.

Cet algorithme permet de mesurer proprement des temps de vie aux alentours de 2 ns.

Tableau 3-A1-3 : algorithme Aref.

A2.2.1 - Paramètres d'acquisitions CCD

Comme on l'a vu, nous avons trois paramètres à régler sur la caméra CCD : le nombre d'acquisitions à moyenner pour obtenir une image, le temps d'exposition et le gain. Nous avons donc analysé l'influence de chacun de ces paramètres en travaillant toujours avec le même algorithme. Pour cela, nous avons fait varier le paramètre concerné (« valeurs prises pour l'étude ») et nous avons fixé les autres aux valeurs « par défaut » indiquées dans le tableau 3-A1-4.

Nous observons ici une solution de rhodamine B et par conséquent nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 531 nm avec une largeur de 40 nm, et pour la détection, un filtre centré à 593 nm avec une largeur de 40 nm.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	100	0	500	600
Valeurs prises pour l'étude	1	1	0		
	5	100	50		
	10	200	100		
	15	250	150		
	20	300	200		
	30	400	250		
		1000	255		

Tableau 3-A1-4 : paramètres d'acquisition.

Les valeurs rapportées ont été obtenues avec une mesure à chaque fois, c'est-à-dire qu'elles correspondent à une moyenne sur l'ensemble d'une image, i.e. sur les 672×512 pixels. De plus, ces évolutions rapportées pour chacun des paramètres sont représentatives du comportement observé pour différentes séries de mesures et avec différents échantillons.

Concernant le nombre d'images (figure 3-A1-7), quand on acquiert une seule image et qu'on ne calcule pas de moyenne, on obtient des temps de vie aberrants avec un écart type important (environ 6%). Ces valeurs aberrantes s'expliquent sans doute par le fait qu'avec une seule acquisition, nous sommes gênés par la persistance de l'ensemble du système de détection qui fausse la mesure. L'écart type important quant à lui est probablement dû au scintillement de l'écran à phosphore qui dégrade le rapport signal à bruit de l'image obtenue. Dès que nous moyennons sur quelques acquisitions, les valeurs obtenues sont plus pertinentes (le poids des toutes premières acquisitions faussées par la persistance dans l'image finale diminue), et l'écart type diminue (le scintillement est moyenné). Ce paramètre a une certaine influence sur les temps de vie trouvés. Nous décidons donc de le fixer pour toutes nos mesures à la valeur de 10. En effet en effectuant la moyenne sur 10 acquisitions, nous obtenons des temps de vie corrects et un écart type relativement bas (moins de 2%). Bien entendu, en augmentant le nombre d'acquisitions, nous réduirions encore cet écart type mais de manière moins importante, et par contre nous augmenterions sensiblement le temps total d'acquisition.

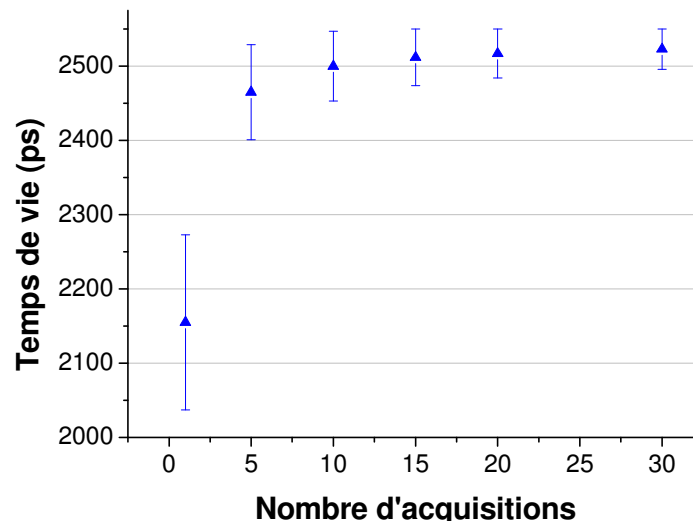


Figure 3-A1-7 : influence du nombre d'acquisitions utilisées pour obtenir une image moyennée sur le temps de vie mesuré.

Pour le temps d'exposition, nous obtenons une évolution comparable, ceci étant prévisible vue la linéarité du détecteur (figure 3-A1-8). Pour des temps d'exposition très courts (quelques ms), le

signal est vraiment noyé dans le bruit et le temps de vie mesuré est par conséquent faussé, avec un écart type important. En augmentant le temps d'exposition, nous retrouvons des valeurs convenables, avec un écart type plus raisonnable qui va en diminuant. Pour des niveaux de signal comparables à celui de la fluorescence dans des cellules, un temps d'exposition de 250 ms semble un bon compromis. On garde toutefois à l'esprit que pour des niveaux plus importants, il est possible de réduire raisonnablement le temps d'exposition (jusqu'à 100 ms) pour gagner du temps pendant l'acquisition.

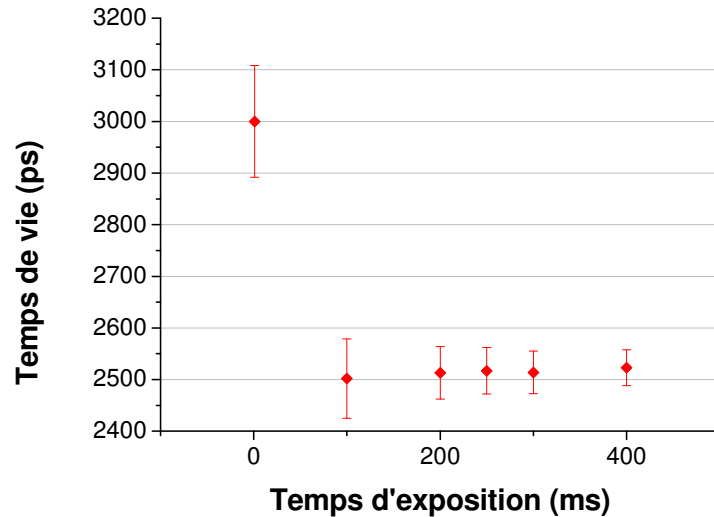


Figure 3-A1-8 : influence du temps d'exposition sur la CCD sur le temps de vie mesuré.

Le gain quant à lui a une influence très minime sur les temps de vie trouvés (figure 3-A1-9). Il n'apporte rien de plus par rapport aux choix des paramètres d'acquisition de la porte temporelle.

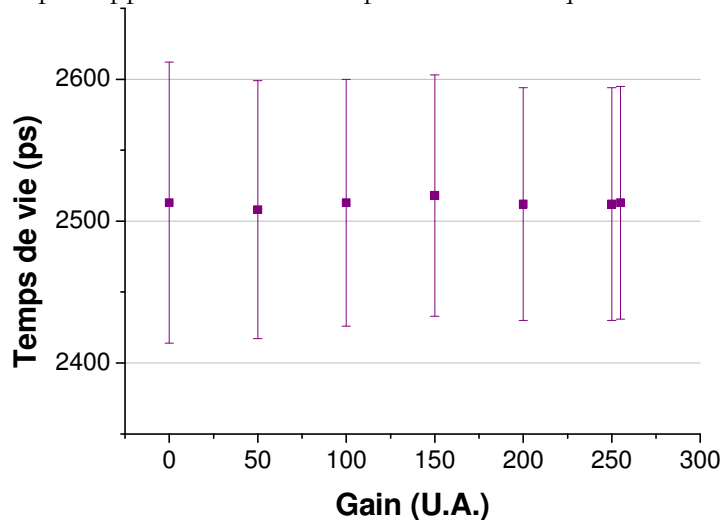


Figure 3-A1-9 : influence du gain de la CCD sur le temps de vie mesuré.

A2.2.2 - Paramètres d'acquisitions HRI

Pour l'intensificateur, l'utilisateur peut régler deux paramètres : la largeur des portes et le gain. Comme pour la caméra, nous avons donc regardé l'influence de chacun de ces paramètres en procédant exactement de la même manière (tableau 3-A1-5).

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	250	0	500	670
Valeurs prises pour l'étude				200	260
				300	300
				400	350
				500	400
				600	450
				700	500
				800	550
				900	600
				1000	650
					700
					750
					800
					850

Tableau 3-A1-5 : paramètres d'acquisition.

Pour la largeur des portes, nous rapportons ici les résultats obtenus avec un échantillon de fluorescéine, ce qui explique les temps de vie mesurés plus courts. L'excitation est réalisée grâce à un filtre centré à 482 nm avec une largeur de 35 nm, et la détection avec un filtre centré à 536 nm avec une largeur de 40 nm. On remarque une légère augmentation du temps de vie quand la largeur des portes augmente (une augmentation de 50 ps entre les deux extrêmes) ainsi qu'une diminution de l'écart type (figure 3-A1-10). Cette augmentation peut être due d'une part au temps de vie assez court, qui est proche de la largeur des portes les plus longues (900 ps et 1000 ps) pour lesquelles l'augmentation est la plus significative. De plus, comme on le verra par la suite, cette augmentation peut aussi s'expliquer par le décalage dans le temps du début du déclin suivant les portes. Toujours est-il que cette augmentation est assez faible. Pour l'écart type, l'évolution était prévisible : en intégrant plus longtemps le signal de fluorescence, on augmente le rapport signal à bruit pour chaque image. Dans la plupart de nos études, nous allons opter par conséquent pour des largeurs de portes de 800 ps.

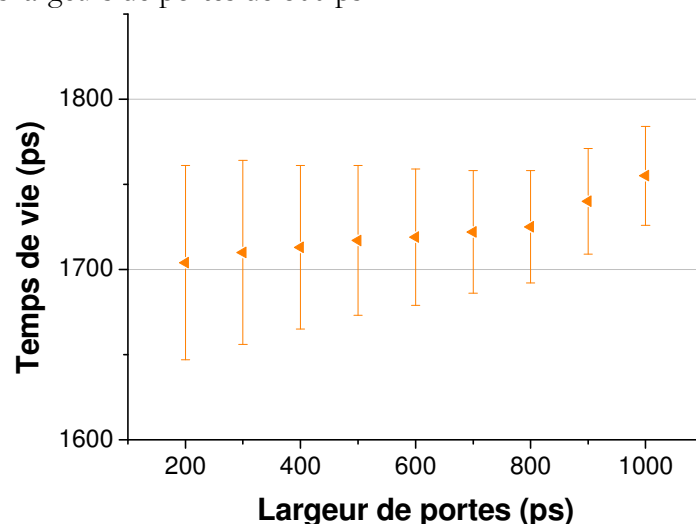


Figure 3-A1-10 : influence de la largeur des portes temporelles du HRI sur le temps de vie mesuré.

Pour étudier l'influence du gain, nous revenons à un échantillon de rhodamine B. Les résultats obtenus sont plus difficilement interprétables (figure 3-A1-11). En effet, il est impossible de parcourir toute la gamme de gain accessible avec le même niveau de signal de fluorescence. Ceci est nettement visible concernant l'écart type : sur le graphe de la figure 3-A1-11 correspondant, on voit une décroissance de l'écart type quand le gain augmente et que le signal de fluorescence est constant, et on peut ainsi déterminer précisément quand la valeur du signal de fluorescence a

été retouchée. On retiendra donc concernant ce paramètre que les variations de temps de vie mesurées consécutives au changement de gain sont inférieures à 60 ps.

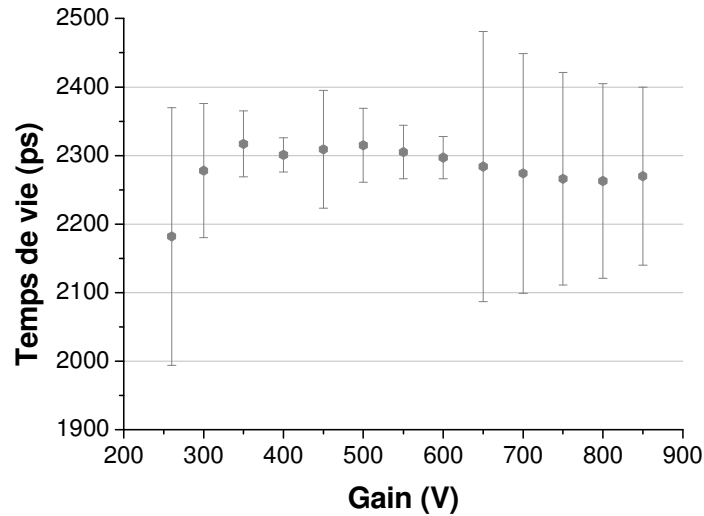


Figure 3-A1-11 : influence du gain du HRI sur le temps de vie mesuré.

Au final, ce paramètre est ajusté à chaque mesure, pour amplifier convenablement le signal de fluorescence, et bénéficier d'une dynamique importante sur la caméra CCD.

A2.2.3 - Position du maximum d'intensité

Ensuite, pour continuer l'étude de l'influence des différents paramètres sur la mesure du temps de vie, il semble qu'un des paramètres qui induise le plus d'erreur est la position de début de l'échantillonnage du déclin. En effet, au cours de toutes ces expériences d'étalonnage, nous avons pu constater que des petits décalages temporels de l'impulsion (plusieurs dizaines de ps) d'un jour sur l'autre entraînent des changements importants sur les temps de vie mesurés (plusieurs centaines de ps). Nous avons donc cherché à positionner précisément le début du déclin, ou autrement dit l'image la plus intense, et à voir l'influence d'un décalage entre cette image et le début de l'échantillonnage.

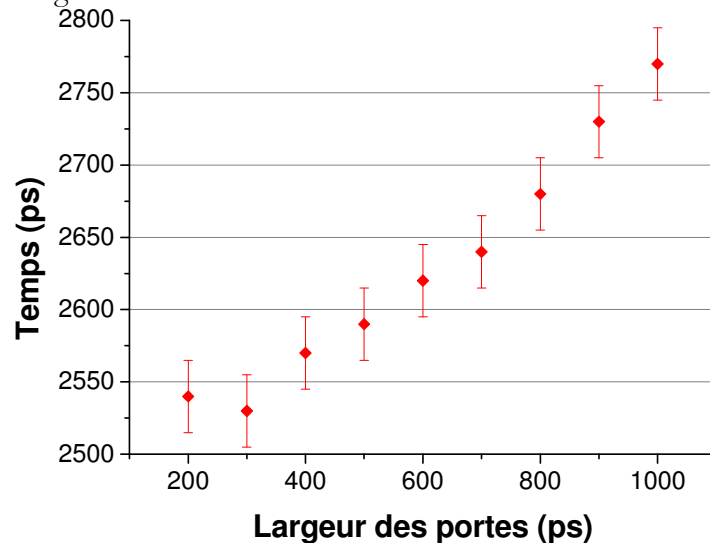


Figure 3-A1-12 : position du début du déclin suivant la largeur des portes.

La position de l'image la plus intense dépend de la largeur des portes. La référence (le 0) de l'échelle de temps est définie arbitrairement. Comme nous l'avons vu lors de la mesure de la largeur effective des portes, l'élargissement temporel se fait de manière symétrique, ce qui introduit cette petite dérive quand on augmente la largeur des portes.

Cette position peut être mise en évidence pratiquement de manière simple. Pour cela, il suffit pratiquement de localiser grossièrement le maximum d'intensité, puis de décaler la porte grâce à la ligne à retard du plus petit pas possible (25 ps) et de repérer ainsi précisément la position de l'image la plus intense. Lorsque ce repérage se fait avec des échantillons assez fluorescents et des paramètres d'acquisitions convenablement choisis, nous sommes capables de trouver cette position à 25 ps près (figure 3-A1-12).

Nous mesurons ensuite le temps de vie de fluorescence pour un échantillon de rhodamine B en solution. Les paramètres d'acquisition sont reportés dans le tableau 3-A1-6.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	10	100	0	800	550

Tableau 3-A1-6 : paramètres d'acquisition.

Le maximum d'intensité est repéré à 6625. Nous décalons donc la prise de l'image la plus intense autour de cette valeur mesurée (et par conséquent nous décalons toutes les prises d'images de l'algorithme). Les temps de vie obtenus figurent dans le graphe suivant (figure 3-A1-13).

On voit l'importance primordiale de ce paramètre : un décalage de 50 ps décale le temps de vie mesuré d'une soixantaine de ps. Si l'algorithme part trop tôt, les premières valeurs d'intensité du déclin (les dernières dans l'ordre de l'acquisition avec l'algorithme utilisé), vont créer un front montant ou un palier artificiel qui vont rallonger le temps de vie. Et à l'inverse, si l'algorithme part trop tard, les dernières images du déclin (les premières dans l'ordre de l'acquisition avec l'algorithme utilisé) sont noyées dans le bruit de fond, et ainsi on va raccourcir le déclin et écourter le temps de vie mesuré. L'optimum semble de choisir t_0 (début de l'algorithme) 300 ps après le maximum, pour se situer sur le « plateau » mis en évidence sur la courbe 3-24 et pour bénéficier d'un écart type le plus bas.

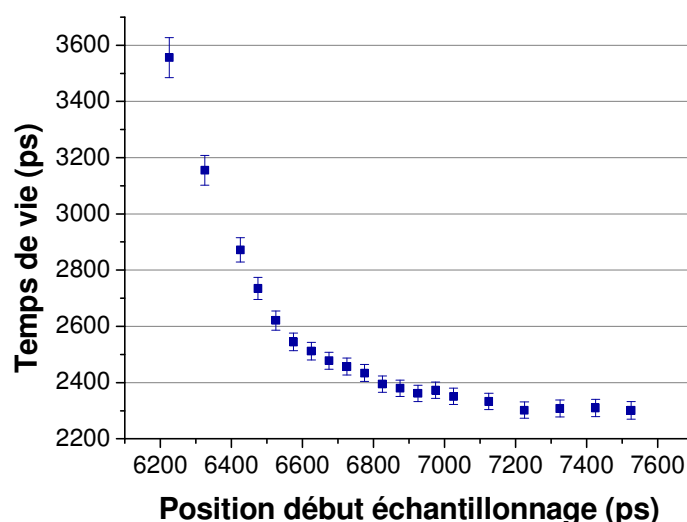


Figure 3-A1-13 : temps de vie mesuré en fonction du temps de départ de l'acquisition.

A la vue de ces résultats, il est essentiel, avant de lancer une série d'expérience, de repérer précisément la position du maximum d'intensité pour ne pas fausser le temps de vie mesuré.

A2.2.4 - Persistance de la détection

	Aref	Aenv	Araz
1ère acquisition	$t_0 + 10000$	$t_0 + 0$	$t_0 + 32000$
2ème acquisition	$t_0 + 8000$	$t_0 + 350$	$t_0 + 10000$
3ème acquisition	$t_0 + 6000$	$t_0 + 750$	$t_0 + 32001$
4ème acquisition	$t_0 + 5000$	$t_0 + 1000$	$t_0 + 8000$
5ème acquisition	$t_0 + 4000$	$t_0 + 1500$	$t_0 + 32002$
6ème acquisition	$t_0 + 3000$	$t_0 + 2000$	$t_0 + 6000$
7ème acquisition	$t_0 + 2500$	$t_0 + 2500$	$t_0 + 32003$
8ème acquisition	$t_0 + 2000$	$t_0 + 3000$	$t_0 + 5000$
9ème acquisition	$t_0 + 1500$	$t_0 + 4000$	$t_0 + 32004$
10ème acquisition	$t_0 + 1000$	$t_0 + 5000$	$t_0 + 4000$
11ème acquisition	$t_0 + 750$	$t_0 + 6000$	$t_0 + 32005$
12ème acquisition	$t_0 + 350$	$t_0 + 8000$	$t_0 + 3000$
13ème acquisition	$t_0 + 0$	$t_0 + 10000$	$t_0 + 32006$
14ème acquisition			$t_0 + 2500$
15ème acquisition			$t_0 + 32007$
16ème acquisition			$t_0 + 2000$
17ème acquisition			$t_0 + 32008$
18ème acquisition			$t_0 + 1500$
19ème acquisition			$t_0 + 32009$
20ème acquisition			$t_0 + 1000$
21ère acquisition			$t_0 + 32010$
22ème acquisition			$t_0 + 750$
23ème acquisition			$t_0 + 32011$
24ème acquisition			$t_0 + 350$
25ème acquisition			$t_0 + 32012$
26ème acquisition			$t_0 + 0$

Tableau 3-A1-7 : position des différentes acquisitions pour les 3 algorithmes. t_0 est le début du déclin.

Pour finir, nous avons étudié la persistance de la détection et son influence sur les temps de vie mesuré. Pour ce faire, nous avons utilisé trois algorithmes (tableau 3-A1-7) :

- A_{ref} défini précédemment
- A_{env} qui est le même algorithme que A_{ref} mais en procédant aux différentes acquisitions dans l'ordre inverse
- A_{raz} , qui échantillonne le déclin comme A_{ref} , mais en intercalant entre chaque mesure, une remise à zéro en enregistrant une image très loin après l'impulsion.

L'utilisation de l'algorithme A_{env} permet d'évaluer l'erreur induite par cette acquisition et de montrer pourquoi l'acquisition doit être réalisée en commençant par la fin du déclin. L'algorithme A_{raz} permet d'appréhender le pourcentage de l'intensité de l'image précédente qui persiste pour l'image suivante. De plus les déclins et les temps de vie obtenus avec cet algorithme peuvent être considérés comme une référence, puisque chaque image reçoit une contribution égale du bruit de fond.

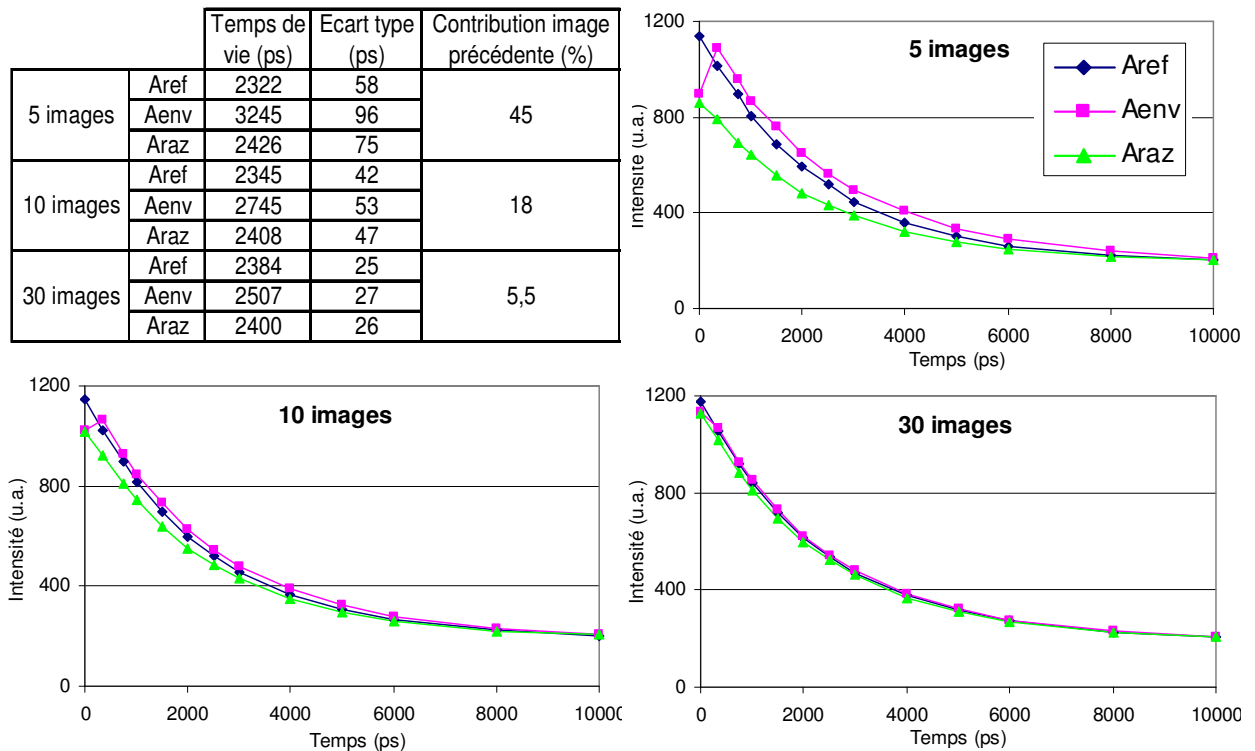
Nous observons dans cette étude toujours de la rhodamine B diluée dans de l'éthanol avec les mêmes filtres. La puissance du laser est réglée pour avoir un signal assez important qui nous permette de travailler avec des valeurs de gain et de largeur de portes pour le HRI pas trop importantes. Nous procédons ici comme pour les études précédentes, en faisant varier certains paramètres d'acquisition (tableau 3-A1-8), et en réalisant à chaque fois la mesure du temps de vie avec les trois algorithmes.

Paramètre	CCD			HRI	
	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur par défaut	10	100	0	600	600
Valeurs prises pour l'étude	5	100		200	
	10	250		600	
	30	400		1000	
		1000			

Tableau 3-A1-8 : paramètres d'acquisition.

Pour chaque valeur des différents paramètres étudiés, nous rapportons le tableau avec les temps de vie et les écarts types mesurés pour chacun des algorithmes. Les déclinés moyens obtenus (moyenne réalisée sur tous les pixels de l'image) figurent également dans cette annexe. La valeur de « Contribution image précédente (%) » représente le pourcentage de l'intensité de l'image précédente retrouvée sur l'image étudiée.

La persistance ayant une durée finie, nous pensons que seules les premières acquisitions utilisées dans le calcul pour obtenir l'image moyenne sont touchées.



Concernant le nombre d'images, nous remarquons que pour une moyenne sur 5 images, les algorithmes A_{ref} et A_{env} fournissent des temps de vie très différents (quasiment 1 ns d'écart) (figure 3-A1-14). Cette différence s'estompe quand le nombre d'images augmente. Les déclinés rapportés confirment cette tendance. De même la différence entre les temps de vie obtenus avec A_{ref} et A_{raz} s'amenuise, passant de 100 ps à 63 ps, puis à 16 ps. Il est également intéressant d'analyser la contribution de l'image précédente sur l'image étudiée : en passant de 5 images à 10 images, cette contribution est quasiment divisée par 3 (de 45% à 18%), puis en prenant 30 images, elle est divisée aussi par trois. Cette évolution confirme bien que ce problème de

persistance se pose vraiment pour les toutes premières images acquises, et en augmentant le nombre d'acquisitions, nous réduisons considérablement l'influence de cette persistance.

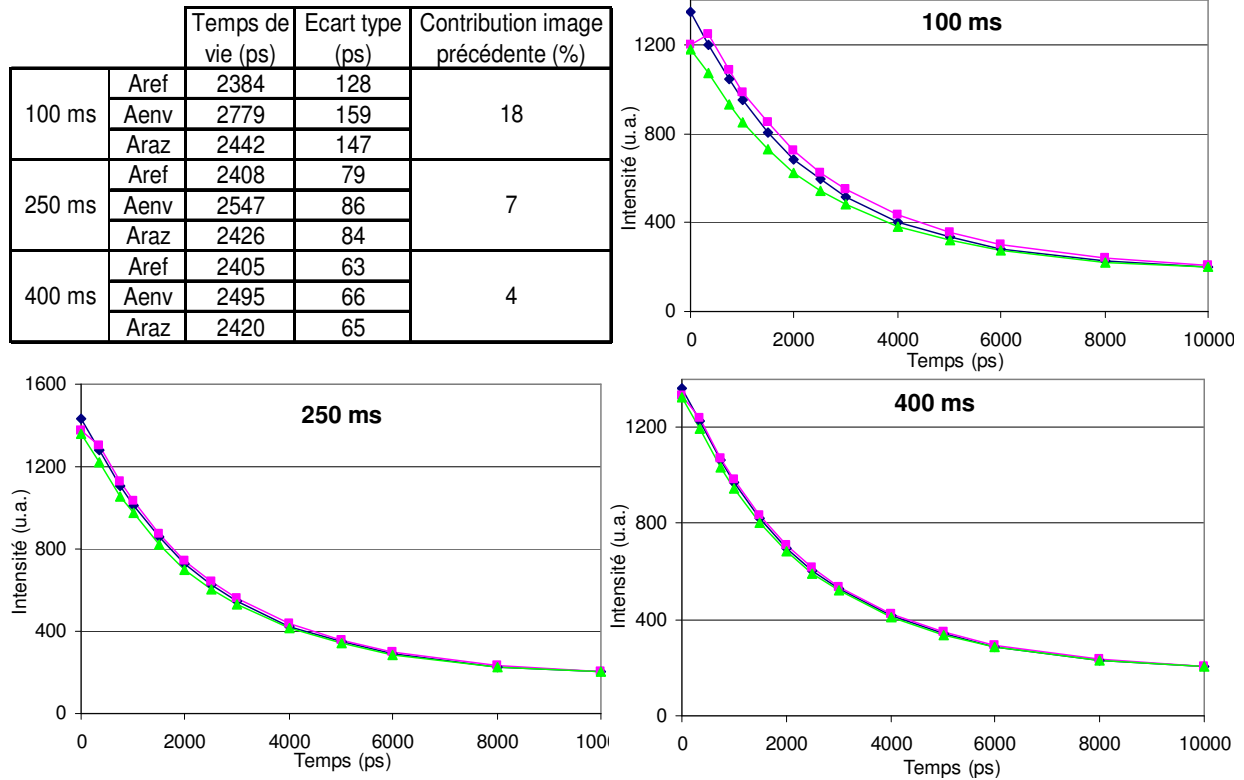


Figure 3-A1-15 : influence du temps d'exposition sur la CCD sur la persistance. En haut à gauche, tableau avec, pour chaque temps d'exposition et chaque algorithme, le temps de vie mesuré et l'écart type. Figure aussi dans ce tableau la contribution de l'image précédente mesurée suivant le temps d'exposition. Sont également rapportés dans cette figure les déclin moyens obtenus pour chaque algorithme dans chacune des conditions.

Le temps d'acquisition sur la caméra CCD a effectivement une influence comparable sur la mesure des temps de vie, mais dans des proportions moindres (figure 3-A1-15). En effet, les variations infligées au temps d'acquisition sont relativement bien moins importantes que les variations subies précédemment par le nombre d'images.

On retiendra ainsi, qu'augmenter le nombre d'images ou allonger le temps d'exposition permet logiquement de réduire l'influence de la persistance.

Par contre, nous nous sommes assurés que la largeur des portes temporelles ne jouait aucun rôle (figure 3-A1-16). Ceci confirme bien que cette persistance se produit au moment de relayer l'image, c'est-à-dire entre l'intensificateur et la CCD, et que c'est en jouant sur les paramètres de cette dernière que nous pouvons réduire la gêne occasionnée.

Cette étude nous conforte dans notre choix d'échantillonner le déclin de fluorescence en commençant par la fin. De plus, il semble que réaliser la moyenne sur 10 acquisitions pour obtenir chaque image et travailler avec un temps d'exposition de 250 ms nous permet de nous affranchir raisonnablement de la persistance de l'écran à phosphore. Dans ces conditions, seule 7% de l'intensité de l'image précédente affecte l'image acquise, ce qui est faible et n'induit qu'une faible erreur lorsque l'acquisition commencera par la fin du déclin. Ici encore, le choix final des paramètres est un compromis, puisque l'augmentation du nombre d'images ou du temps d'exposition est coûteuse en temps.

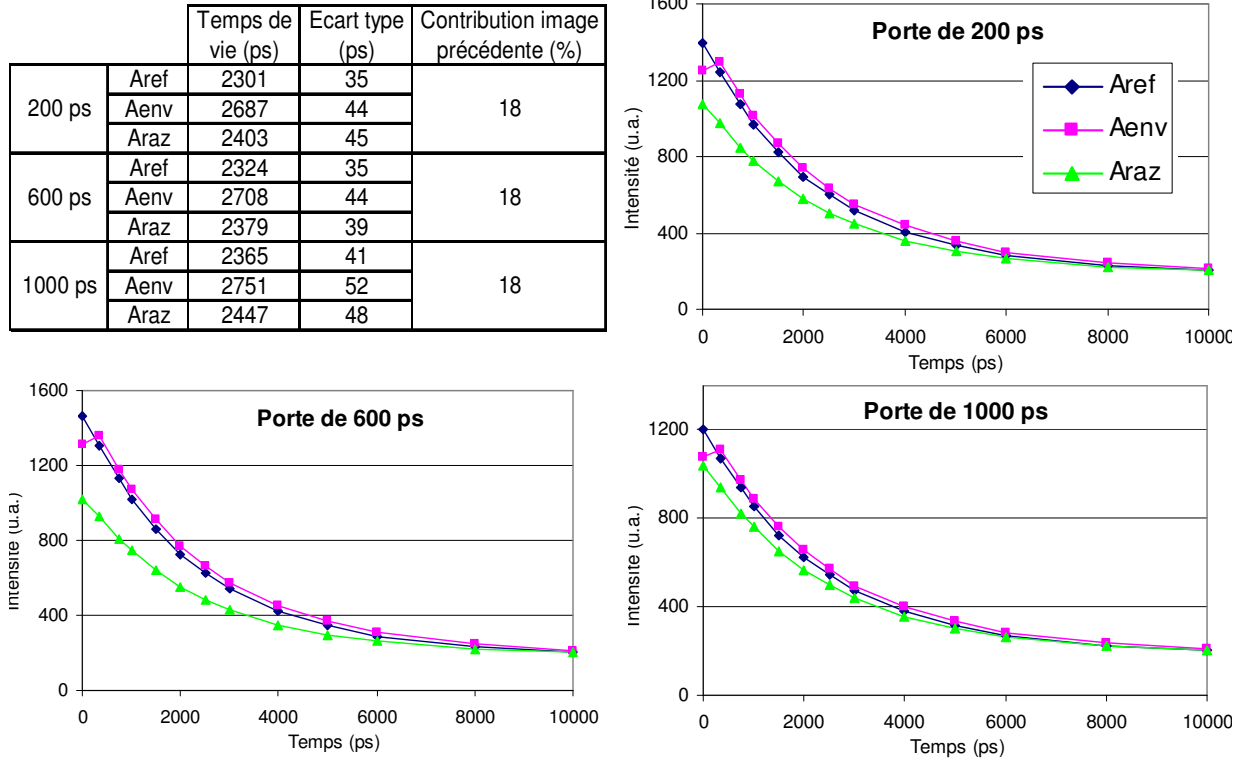


Figure 3-A1-16 : influence de la largeur des portes temporelles du HRI sur la persistance. En haut à gauche, tableau avec, pour chaque largeur de porte et chaque algorithme, le temps de vie mesuré et l'écart type. Figure aussi dans ce tableau la contribution de l'image précédente mesurée suivant la largeur de la porte. Sont également rapportés dans cette figure les déclin moyens obtenus pour chaque algorithme dans chacune des conditions.

Notons également qu'une erreur conséquente sur le temps de vie (quelques centaines de ps) est introduite lorsque la dernière image affichée avant de lancer l'algorithme d'acquisition (A_{ref}) a une intensité importante. Effectivement, puisque la première image réalisée est celle de fin de déclin, si juste avant de lancer l'acquisition, l'image affichée a une intensité importante, la persistance de la détection fausse la mesure : au lieu d'avoir une valeur d'intensité proche du bruit de fond (puisque la première acquisition se situe 10 ns après l'impulsion), nous surestimons l'intensité de cette dernière image, et en augmentant ainsi artificiellement ce que l'ajustement considère comme le 0, nous raccourcissons le déclin. Ainsi, avant de lancer l'acquisition, il faut que l'image affichée à l'écran soit du bruit de fond.

Cette persistance semble être essentiellement due à des problèmes de synchronisation des différents outils utilisés pour échantillonner le déclin et acquérir les images d'intensité, et pilotés par notre programme : la ligne à retard et la caméra CCD. Le décalage de la ligne à retard ne semble pas être immédiat, permettant ainsi à la caméra d'enregistrer quelques images (une ou deux suivant les temps d'exposition utilisés) alors que la ligne est en train de changer de position mais n'a pas encore atteint la position qu'elle doit occuper pour l'acquisition. L'écran à phosphore souffre également d'une certaine persistance, mais les valeurs ne sont pas du tout du même ordre de grandeur (la persistance du phosphore utilisé P43, composition $Gd_2O_2S:Tb$ est d'environ 1,2 ms).

Chapitre IV : Application en neurobiologie

Tout le développement instrumental présenté dans les chapitres précédents a été motivé par différentes problématiques biomédicales. Dans ce dernier chapitre, nous allons particulièrement nous concentrer sur une de ces applications qui consiste en l'étude de l'influence du cholestérol sur la maladie d'Alzheimer. Tous les travaux rapportés ici sont le fruit d'une collaboration avec l'équipe de Marie-Claude Potier, Jack-Christophe Cossec et Catherine Marquer, du Laboratoire Neurobiologie et Diversité Cellulaire de l'ESPCI. Dans une introduction rapide sur la maladie d'Alzheimer, nous soulignons les mécanismes que nous allons étudier, à savoir l'homodimerisation d'une protéine responsable de la production du peptide amyloïde. Nous annonçons ensuite les mesures que nous voulons réaliser, et pourquoi seul un dispositif comme le nôtre les rend possible. Après avoir présenté les lignées cellulaires utilisées pour nos expériences, nous rapportons les premiers résultats obtenus et les problèmes de photoblanchiment rencontrés. Nous proposons des solutions, que nous implémentons par la suite sur notre montage, pour pouvoir réaliser les mesures souhaitées dans des conditions convenables. Enfin, nous terminons ce chapitre par une conclusion relative aux mesures que nous souhaitons réaliser, et nous présentons plusieurs pistes à suivre pour répondre à notre problématique.

Pour de nombreuses applications biomédicales, et spécialement pour l'analyse des interactions protéine-protéine dans les phénomènes de signalisation, d'activation et d'inhibition de protéines, il est nécessaire d'imager avec de hautes résolutions spatiale et temporelle des cellules pour étudier les processus biologiques intracellulaires. Ceci est vrai notamment en neurobiologie, où la localisation neuronale subcellulaire de nombreuses protéines, donne des informations cruciales sur leurs voies d'acheminement et sur la structure neuronale. Notre dispositif est un outil de choix pour de telles problématiques, puisqu'il permet de localiser les protéines d'intérêt au niveau de la membrane plasmique (i.e. avec une résolution subneuronale) et de détecter en parallèle leur activité grâce à la technique FLIM (qui rend l'imagerie fonctionnelle possible), tout ceci sur des cellules vivantes dans un environnement physiologique, permettant ainsi de préserver leurs fonctionnalités.

I – Présentation de l'application

I.1– Problématique biomédicale

La fréquence élevée de la maladie d'Alzheimer fait aujourd'hui de cette pathologie un problème de santé publique majeur. Il y aurait aujourd'hui en France plus de 850 000 cas de démence [Inserm 2007]. La maladie d'Alzheimer représente globalement 70 % de ces cas. Et chaque année on compte 225 000 nouveaux cas. Au niveau mondial, le nombre de cas de démence est évalué à

24,3 millions, avec près de 4,6 millions de nouveaux cas chaque année. Avec l'allongement de la durée de vie, principalement dans les pays développés, son incidence augmente de façon vertigineuse. Le nombre de cas attendus devrait doubler tous les 20 ans, et pourrait concerner plus de 80 millions d'individus en 2040. De plus, l'étude de cette pathologie est difficile à cause des difficultés de diagnostic et de prise en charge des patients. On estime actuellement que 30 à 50% des personnes atteintes sont diagnostiquées et que 30% des patients diagnostiqués sont pris en charge [FRM 2006], [Inserm 2007]. En France, une volonté politique a été exprimée pour lutter contre cette maladie, avec le plan Alzheimer qui représente un investissement de 1,6 milliards d'euros d'ici 2012. La plus grande partie de cette somme est destinée au volet médico-social et sanitaire, et 12% seront consacrés à la recherche [Gouvernement 2007].

La maladie d'Alzheimer a été décrite pour la première fois il y a un siècle par le médecin allemand Alois Alzheimer [Alzheimer 1906].

Cette maladie est la forme de démence la plus fréquemment rencontrée. Les perturbations les plus précoces et les plus fréquentes sont des troubles bénins de la mémoire portant sur les faits récents et le plus souvent sur des détails de la vie quotidienne [Laisney 2004], [Eustache 2006]. Il s'ensuit une lente évolution des symptômes qui vont progressivement s'étendre à des troubles de l'organisation et de la programmation (fonctions exécutives) [Perry 2003], du langage (aphasie) [Murdoch 1987], une maladresse gestuelle (apraxie) [Mozaz 2006], un défaut de reconnaissance des objets, des lieux, des personnes (agnosie). La maladie s'accompagne également de divers troubles du comportement qui viennent aggraver les troubles cognitifs et peuvent diminuer la tolérance de l'entourage du patient : repli sur soi, apathie, symptômes dépressifs, troubles du sommeil, de l'appétit, agitation, hallucinations ... [Aalten 2007], [Aalten 2008]. Enfin, des signes neurologiques somatiques apparaissent le plus souvent, entraînant des troubles de l'équilibre, de la marche, et augmentant le risque de chutes [Pettersson 2002].

Dans la majorité des cas, la maladie d'Alzheimer apparaît comme une pathologie multifactorielle résultant de l'interaction de divers facteurs environnementaux et de facteurs génétiques qui pourraient favoriser son apparition. Mais à l'heure actuelle, on ne sait pas encore agir sur les causes de la maladie d'Alzheimer. Il existe certaines protéines dont le rôle délétère a été mis en évidence dans la maladie d'Alzheimer, mais ces entités jouent d'autres rôles dans le métabolisme. Il est indispensable de comprendre les mécanismes cellulaires, pour définir une thérapie, c'est-à-dire savoir ce qu'il faut cibler et comment le cibler. En attendant, il semble possible de réduire les facteurs de risque de la maladie. Même s'il s'agit d'une pathologie qui survient le plus souvent à un âge avancé, on s'intéresse de plus en plus globalement à la vie entière du sujet, en particulier la période 40-50 ans, plutôt qu'aux caractéristiques des sujets dans les années précédant le diagnostic. Différentes études ont identifié des « facteurs de risque » et des « facteurs de protection » [Fratiglioni 2004]. Des facteurs cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle, le tabac, le bas niveau d'étude, le sexe féminin, l'hypercholestérolémie, le diabète ou encore les symptômes dépressifs seraient des facteurs de risque. À l'inverse, la richesse du réseau social et des activités de loisirs, une bonne hygiène de vie (activités physiques et intellectuelles), un apport suffisant en antioxydants, semblent exercer des effets protecteurs. Si elle ne permet pas d'empêcher la survenue de la maladie, au moins cette approche pourrait faire reculer de plusieurs années l'expression des symptômes. Il est également possible grâce à certains traitements pharmacologiques d'atténuer quelques symptômes invalidants, et d'améliorer un peu le confort de vie des malades.

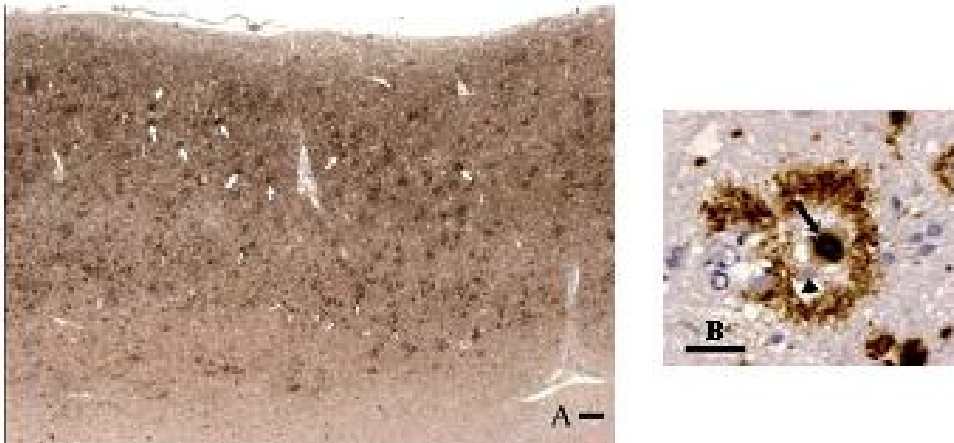


Figure 4-1 : Marquage de la protéine Tau par immunohistochimie et révélation par le complexe avidine-biotine. L'immunohistochimie, est une technique de marquage spécifique qui recourt à un anticorps dirigé contre la protéine d'intérêt. Toutes les structures colorées en marron sont pathologiques. A : Pathologie Tau dans le cortex cérébral (faible grossissement). La protéine Tau agrégée apparaît en marron. Les flèches les plus volumineuses indiquent des plaques séniles, les flèches plus petites, les neurones. Barre d'échelle=100 μ m. B : Plaque sénile telle qu'elle apparaît après immunohistochimie du peptide. A β Barre d'échelle=20 μ m [Inserm 2007].

Le diagnostic certain de la maladie d'Alzheimer repose sur l'observation de lésions cérébrales caractéristiques (généralement constatées à l'occasion d'un examen post mortem) : les plaques séniles et les dégénérescences neurofibrillaires [McKhann 1984]. La dégénérescence neurofibrillaire est due à l'accumulation pathologique dans le neurone d'une protéine naturellement présente, la protéine Tau. Cette protéine joue normalement un rôle dans la polymérisation des microtubules. La pathologie amyloïde est quant à elle caractérisée par l'accumulation extracellulaire d'un peptide normalement présent à faible concentration, le peptide β -amyloïde ou A β . Ces accumulations de peptide A β et de protéine Tau prennent différents aspects morphologiques [Delaère 1991] (figure 4-1). Le peptide A β extracellulaire peut former des dépôts volumineux, faiblement concentrés, en « carte de géographie » : les dépôts diffus. Les « dépôts focaux » de peptide A β sont, au contraire, denses et de forme sphérique. La protéine Tau s'accumule aussi dans les axones qui entourent les dépôts focaux de peptide A β , formant la couronne de ce qu'on appelle la plaque sénile. Ces altérations microscopiques sont associées à des modifications macroscopiques [Duyckaerts 2003]. Le poids et le volume du cerveau sont en moyenne diminués. Des aires corticales qui jouent un rôle dans les fonctions mnésiques et sont situées à la face interne des hémisphères – le cortex entorhinal et l'hippocampe – sont les premières à perdre du volume, suivies par les régions du cortex impliquées dans des fonctions telles que le langage, l'analyse complexe des influx visuels ou auditifs ou la programmation des mouvements volontaires [Inserm 2007].

Le peptide A4 [Glenner 1984], amyloïde ou A β (comme il est habituel de l'appeler aujourd'hui), responsable de la formation des plaques séniles, est naturellement produit dans le cerveau [Seubert 1992]. Il est issu d'une protéine transmembranaire : la β APP (pour β -Amyloid Precursor Protein, [Kang 1987]), suite à deux coupures enzymatiques (par les β - et γ - secrétases) : c'est ce qu'on appelle la voie amyloïdogénique (figure 4-2). Dans la maladie d'Alzheimer, pour des raisons qui restent encore mal comprises, le peptide s'accumule principalement en dehors des cellules et échappe aux divers systèmes biologiques d'élimination, enzymatiques ou cellulaires. La fonction normale de ce peptide amyloïde et de son précurseur demeure relativement méconnue.

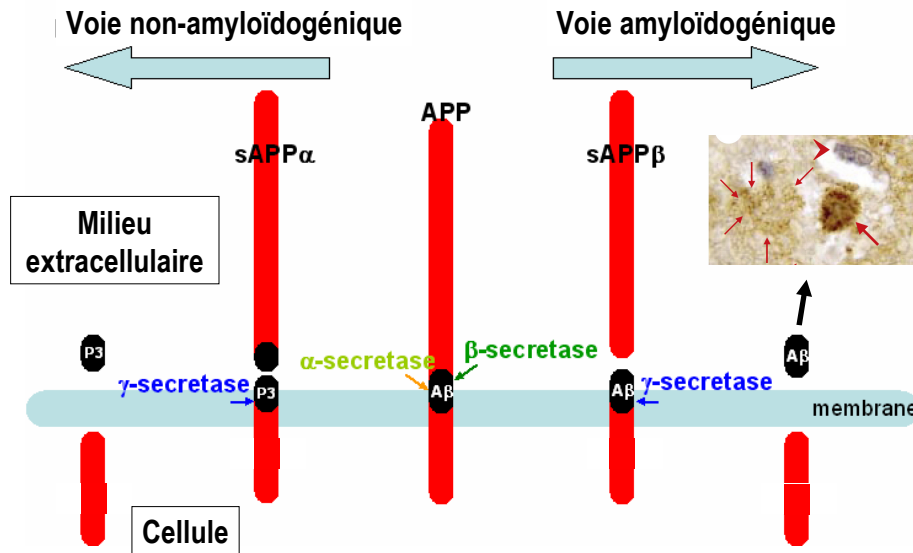


Figure 4-2 : évolution de la protéine précurseur amyloïde (APP) suivant les deux voies métaboliques qu'elle peut suivre. Le peptide amyloïde est produit au cours de la voie amyloïdogénique. sAPP α et sAPP β sont des fragments de l'APP produits après action des enzymes et qui sont solubles.

Dès lors, nous comprenons tout l'intérêt d'étudier ce peptide et son précurseur. L'équipe de neurobiologistes avec qui nous travaillons s'intéresse plus précisément au lien qu'il existe entre le cholestérol et la maladie d'Alzheimer, et à l'influence du cholestérol sur les mécanismes cellulaires de production du peptide amyloïde.

En effet, comme nous l'avons vu, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer [Sambamurti 2004]. Des études ont montré que l'administration de régimes riches en cholestérol à un modèle murin de la maladie d'Alzheimer induit une augmentation de la production des plaques séniles. De plus, le taux de cholestérol serait augmenté dans les cerveaux de patients atteints de cette maladie [Shobab 2005]. Cependant, l'effet du cholestérol sur la voie amyloïdogénique reste controversé [Ledesma 2006]. Quelques papiers ont rapporté des résultats importants il y a une dizaine d'années : Simons et son équipe ont montré que la réduction de cholestérol dans la membrane plasmique de neurones de rats en culture surexprimant APP entraînait une décroissance de la production du peptide amyloïde [Simons 1998]. De plus, il a été démontré (sur des cellules d'ovaire de hamster chinois) que la réduction du cholestérol à la membrane plasmique provoquait une diminution de l'endocytose [Subtil 1999].

Aux vues de ces travaux, nos collègues neurobiologistes ont formulé l'hypothèse de travail suivante : le cholestérol régule l'endocytose de l'APP et son clivage. A partir de ce point de départ, plusieurs pistes d'investigation ont été dégagées :

1. Les effets du cholestérol sur la distribution subcellulaire de l'APP et la distribution membranaire dans des cellules HEK-293
2. Les mécanismes d'action du cholestérol sur l'endocytose de l'APP
3. Les effets du cholestérol sur la production du peptide amyloïde
4. L'action du cholestérol sur des cultures primaires de neurones

Après une première série de travaux, certaines réponses ont été apportées. Une présence importante du cholestérol au niveau de la membrane plasmique augmente la production du peptide amyloïde par un accroissement de l'internalisation du précurseur APP. De plus, des études récentes ont démontré que l'homodimérisation de l'APP jouait un rôle dans l'augmentation de la production du peptide amyloïde [Munter 2007]. En effet, lorsque deux précurseurs créent des liaisons chimiques et s'associent pour former un dimère, l'action des enzymes (β - et γ - secrétases) semble favorisée. L'équipe de neurobiologistes propose par

conséquent que l'excès d'internalisation de l'APP soit dû à une augmentation de la concentration de ce précurseur dans les microdomaines de la membrane plasmique enrichi en cholestérol, et s'accompagne d'une homodimérisation de l'APP. Il serait donc intéressant d'observer l'APP à la membrane plasmique et de trouver un moyen de mettre en évidence l'augmentation de ce précurseur à la membrane via une hausse de son homodimérisation.

C'est dans ce cadre qu'intervient le dispositif de TIRFLIM que nous avons développé. En effet, grâce au TIRF, nous allons pouvoir observer uniquement la membrane plasmique et donc l'APP à la membrane, et grâce à la mesure de temps de vie de fluorescence, nous allons pouvoir mettre en évidence un processus de transfert non rayonnant appelé FRET (qui est l'acronyme de Förster Resonance Energy Transfer), témoin d'une augmentation de l'homodimérisation de l'APP.

I.2 – Le FRET

Nous allons maintenant détailler plus précisément ce processus de FRET, qui est aujourd'hui une technique très répandue dans l'étude du vivant à l'échelle cellulaire. En effet, les phénomènes biologiques sont basés sur des processus physico-chimiques fondamentaux de liaison, d'association, de changement conformationnel, de diffusion ou de catalyse. Pour étudier ces réactions en milieu cellulaire, il est impératif d'avoir accès à la distribution spatio-temporelle et à l'état fonctionnel des molécules constitutives de la cellule. Le FRET est un outil capable de résoudre les interactions moléculaires et les conformations moléculaires avec une grande précision. Il s'agit d'un processus dans lequel l'énergie d'un fluorophore dans un état excité (le donneur) est transférée de façon non radiative à un autre chromophore (l'accepteur), qui peut être fluorescent mais ne l'est pas forcément (figure 4-3, figure 4-4). Ce transfert est réalisé via un couplage dipôle-dipôle [Jares-Erijman 2003], [Pelet 2006].

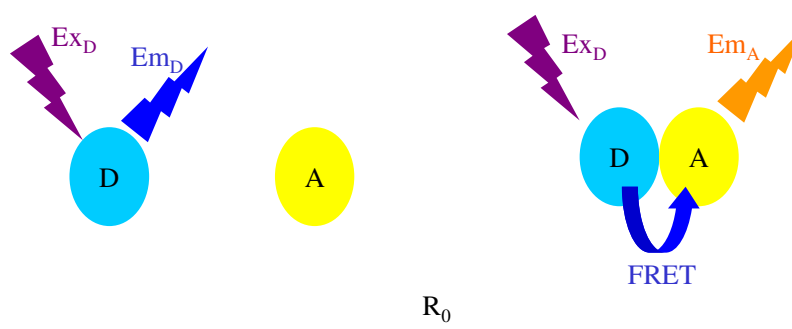


Figure 4-3 : schéma de principe du FRET. D est l'indice pour le donneur et A celui de l'accepteur. Ex signifie excitation, et Em émission. A gauche, la distance entre donneur et accepteur est trop importante pour qu'il y ait du FRET : ainsi, en excitant l'accepteur, on observe l'émission de l'accepteur. A droite, un transfert FRET est possible, et en excitant le donneur, nous observons la fluorescence de l'accepteur.

Cette technique trouve de nombreuses applications. Citons d'abord quelques utilisations du FRET en milieu extracellulaire, comme il est utilisé par exemple lors d'un marquage en immunofluorescence [Youn 1995] : antigène et anticorps sont marqués avec deux espèces chimiques entre lesquelles un transfert FRET est possible (par exemple dans la référence citée précédemment, l'antigène est marqué avec un fluorophore et l'anticorps avec un absorbeur qui sert d'accepteur), et lorsque ces deux protéines sont présentes dans la solution et se lient, ce

transfert peut être mis en évidence. Le FRET est également largement employé pour mesurer des distances intramoléculaires et suivre les changements de conformation de protéines [Zhuang 2003], [Weiss 2000].

D'autre part, le FRET est appliqué à l'étude des interactions entre protéines à l'intérieur des cellules vivantes [Sekar 2003], [Kenworthy 2001]. Dans ce cas, le transfert d'énergie indique que les deux protéines d'intérêt interagissent. Dans une expérience typique, la cellule est modifiée génétiquement pour exprimer les deux protéines d'intérêt, chacune liée par une petite chaîne peptidique à une protéine fluorescente. Dès lors, les processus biologiques et physiques, tels que les interactions de protéines qui regroupent les deux fluorophores dans un petit volume, se traduisent par un transfert FRET [Tramier 2002], [Larson 2003]. D'autres informations telles que la fraction de protéine marquée ou la distance inter moléculaire peuvent aussi être intéressantes et être quantifiées. Ces expériences quantitatives ont grandement gagné en popularité avec la découverte de la GFP et de ses dérivés qui couvrent tout le spectre visible.

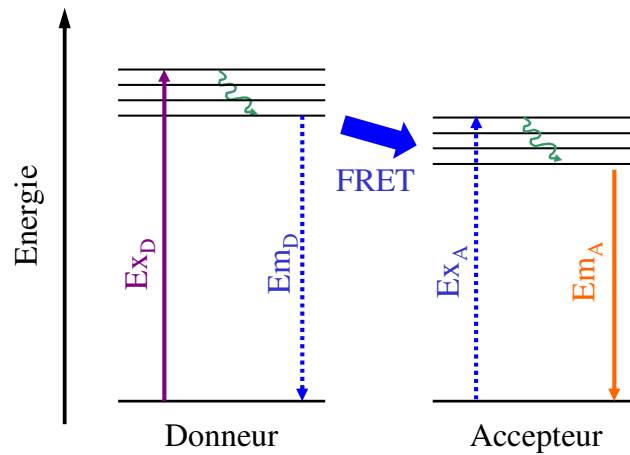


Figure 4-4 : schéma de principe du FRET dans un diagramme énergétique.

Intéressons nous plus précisément à la théorie du FRET. Le couplage des dipôles de transitions (dipôle d'émission pour le donneur et dipôle d'absorption pour l'accepteur) des deux fluorophores provoque une désexcitation du donneur et une excitation de l'accepteur. Le transfert va dépendre du recouvrement des spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur, de l'orientation relative des moments des dipôles, de l'indice de réfraction, et bien sur de la distance entre donneur et accepteur. C'est Theodor Förster qui le premier prédit que l'efficacité de ce transfert variait comme l'inverse de la puissance 6 de la distance entre les deux fluorophores [Förster 1948], ce qui fut démontré expérimentalement en 1967 [Stryer 1967]. L'efficacité E du transfert FRET est donnée par :

$$E = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$$

où R_0 est le rayon de Förster et r est la distance entre donneur et accepteur.

Lorsque donneur et accepteur sont séparés d'une distance égale au rayon de Förster, 50% de l'énergie est transférée grâce au FRET.

Cette grandeur R_0 est définie en Angstrom par :

$$R_0 = 0,211 \times [k^2 n^{-4} Q_D J]^{\frac{1}{6}}$$

avec J l'intégrale de recouvrement spectral qui traduit le degré de recouvrement entre les spectres

de fluorescence du donneur et d'absorption de l'accepteur : $J = \frac{\int \epsilon_A(\lambda) f_D(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int f_D(\lambda) d\lambda}$ (figure 4-5),

n l'indice de réfraction, Q_D le rendement quantique de fluorescence du donneur en l'absence d'accepteur, κ^2 le facteur d'orientation des dipôles (qui dépend du moment de transition de l'émission du donneur et du moment de transition de l'absorption de l'accepteur, et varie de 0 à 4), $\varepsilon_A(\lambda)$ le spectre d'absorption de l'accepteur et $f_D(\lambda)$ le spectre d'émission du donneur [Padilla-Parra 2008]. On attribue à κ^2 la valeur universelle de 2/3 ; cette valeur est rigoureusement exacte si on considère que donneur et accepteur sont orientés aléatoirement et tournent rapidement et de manière isotrope pendant le temps de vie de l'état excité du donneur [Jares-Erijman 2003]. Le rayon de Försrter vaut pour les couples les plus utilisés quelques dizaines d'Angström [Patterson 2000].

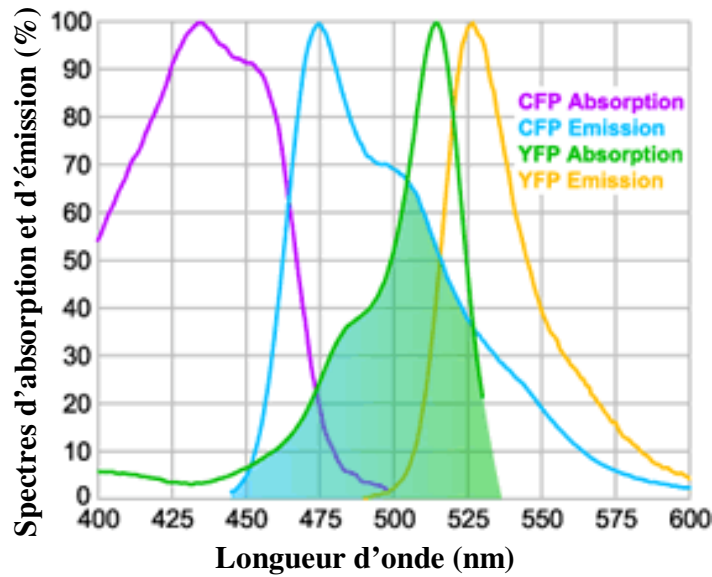


Figure 4-5 : recouvrement entre les spectres d'émission du donneur (CFP) et d'absorption de l'accepteur (YFP). D'après [Semrock 2007].

Il est également possible de relier l'efficacité du transfert au temps de vie ou à l'intensité de fluorescence du donneur :

$$E = 1 - \frac{I_F}{I_D} = 1 - \frac{\tau_F}{\tau_D}$$

où l'indice D indique la présence uniquement du donneur et F la présence du couple FRET (donneur et accepteur).

Les techniques de mesure de FRET sont nombreuses et variées [Jares-Erijman 2003]. Nous n'allons nous intéresser ici qu'aux techniques les plus directes et les plus utilisées. Un certain nombre de méthodes sont basées sur les mesures d'intensité : lorsqu'un transfert FRET se produit, l'intensité de fluorescence du donneur diminue alors que celle de l'accepteur augmente. Mais ces mesures sont gênées par des artefacts expérimentaux dus au recouvrement des spectres d'excitation et des spectres de détection des deux fluorophores. Il existe des algorithmes de correction performants, mais ils nécessitent plusieurs acquisitions en changeant les longueurs d'onde d'excitation et de détection, et des références sont indispensables [Berney 2003], [Elangovan 2003]. Une méthode alternative, qui permet de s'affranchir des schémas complexes de correction repose sur le photoblanchiment de l'accepteur : on compare les intensités mesurées avant et après photoblanchiment. Mais cette technique est destructive et une seule mesure par cellule est possible [Mochizuki 2001].

La mesure du temps de vie de fluorescence semble être la technique la plus commune pour quantifier le FRET [Wallrabe 2005]. Le « quenching » du fluorophore donneur conduit à un

déclin plus rapide de l'état excité, qui peut être mis en évidence par un dispositif de microscopie de fluorescence ayant une résolution picoseconde. Et la mesure du temps de vie de fluorescence conserve ses avantages, à savoir notamment son indépendance vis-à-vis de la concentration du fluorophore et du chemin optique suivi par la fluorescence. La quantification de la réduction du temps de vie de fluorescence moyen du donneur fournit une mesure relative du FRET dans l'échantillon. Avec une analyse fine des déclin mesurés, notamment en utilisant des modèles multi-exponentiels, il est même possible de retrouver complètement tous les paramètres du FRET (efficacité, distance d'interaction entre les deux fluorophores, et rapport entre donneur et accepteur dans le complexe FRET) [Pelet 2006].

Pour réaliser des mesures de FRET, un certain nombre de paires de fluorophores est utilisé [Wallrabe 2005] : les deux fluorophores doivent avoir des rendements quantiques intéressants (autour de 50%), des bandes spectrales d'excitation suffisamment séparées. Le recouvrement entre les spectres d'émission du donneur et d'absorption de l'accepteur doit être de l'ordre de 30% pour que le transfert d'énergie soit efficace, et une séparation raisonnable des spectres d'émission du donneur et de l'accepteur est nécessaire [Sekar 2003]. Jusqu'à présent, la paire donneur-accepteur la plus populaire et la plus utilisée est la paire CFP/YFP [Wallrabe 2005, où 24 papiers dans lesquels cette paire est utilisée sont cités], ce qui en fait la paire de référence.

Pour nos expériences, nous nous sommes servis de cette paire, qui est donc bien connue et pour laquelle les constructions moléculaires sont maîtrisées. Si on revient à la problématique biologique qui nous intéresse, lors de l'homodimérisation de l'APP à la membrane plasmique, si chacun des précurseurs qui se dimérise est marqué avec un des deux fluorophores du couple FRET, la distance sera assez faible pour permettre le transfert. Dès lors, nous pourrions faire ressortir l'homodimérisation par une diminution du temps de vie de fluorescence du donneur du couple, en l'occurrence la CFP. Ainsi nous allons mesurer le temps de vie de la fluorescence de la CFP au début de l'expérience (mesure « Contrôle »), puis nous allons ajouter le cholestérol dans le milieu pour augmenter la quantité de cholestérol à la membrane plasmique et ainsi espérer mettre en évidence l'augmentation de l'homodimérisation de l'APP (figure 4-6).

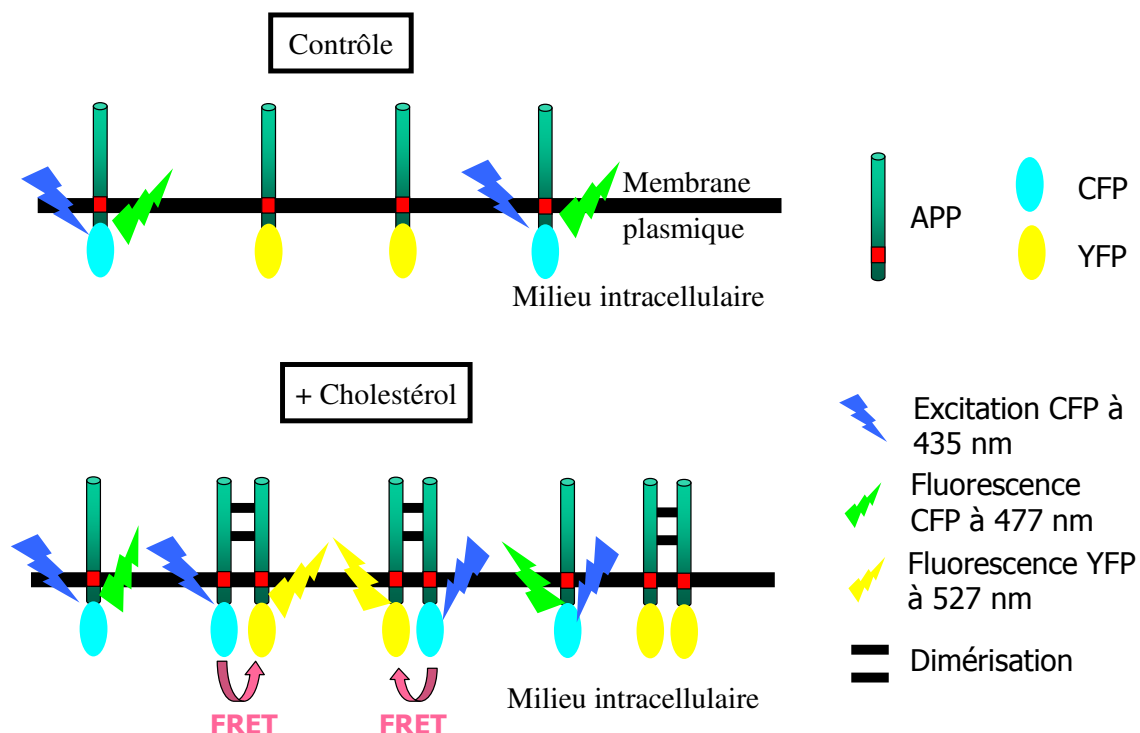


Figure 4-6 : schéma de principe des mesures. En haut : mesure contrôle. Il y a très peu de dimérisation de l'APP, donc peu de FRET. En bas : en ajoutant le cholestérol, on favorise l'homodimérisation de l'APP et donc le FRET.

II – Mesures sur des échantillons cellulaires

II.1 – Modèle cellulaire utilisé : lignée HEK-293 transfectée

Le but ultime de ce travail est de pouvoir faire ces mesures de temps de vie sur des neurones. Mais ces cellules sont délicates à obtenir (il faut récupérer le cerveau d'un embryon d'une rate gestante de neuf jours et en extraire les précurseurs neuronaux des zones du cerveau que l'on veut étudier). Il est impensable de les observer sur le microscope sans utiliser une enceinte dans laquelle température et pression de CO₂ sont finement contrôlées.

Ainsi, pour d'une part valider le modèle proposé par les neurobiologistes, et d'autre part réaliser l'optimisation de notre montage TIRFLIM avec des échantillons cellulaires vivants, nous avons travaillé avec des cellules HEK-293. Cette lignée de cellules a été générée par transformation de cultures de cellules de rein embryonnaire humain avec un adénovirus [Graham 1977] (HEK est l'acronyme de Human Embryonic Kidney, et 293 est le numéro de l'expérience au cours de laquelle Graham trouva cette lignée). Ces cellules sont très largement utilisées en biologie cellulaire car elles sont faciles à cultiver et à transfecter. De plus, pour l'application qui nous concerne, ces cellules possèdent un grand nombre de propriétés communes avec les neurones immatures [Shaw 2002].

Nous cultivons nous-mêmes au laboratoire ces cellules, et nous réalisons également les transfections. Une transfection est l'introduction d'ADN exogène dans des cellules eucaryotes (c'est-à-dire possédant un noyau) : lorsque la transfection est réussie, les brins d'ADN introduits sont pris en charge par les différents mécanismes cellulaires jusqu'au noyau, siège de la transcription. Dès lors, la cellule exprime la protéine codée par le brin d'ADN introduit. Au cours de ce travail nous avons réalisé diverses transfections, permettant à la cellule d'exprimer de l'APP ou des récepteurs cannabinoïdes de type 1 (CB1R) liés à des protéines fluorescentes (CFP, GFP, YFP, mCherry). Les récepteurs cannabinoïdes sont des récepteurs membranaires présents dans les neurones et dans les cellules HEK-293 qui ne jouent a priori aucun rôle dans la synthèse du peptide amyloïde, et qui ne peut pas se dimériser avec l'APP : on l'utilise ici comme un témoin négatif pour le FRET.

II.2 – Premières mesures sur la CFP

Pour travailler dans de bonnes conditions, il nous faut déterminer la quantité d'ADN nécessaire à l'expression d'une quantité de CFP suffisante pour faire de l'imagerie de fluorescence, et d'une quantité de YFP relativement élevée (au moins égale à celle de CFP) pour permettre le processus de FRET. Nous avons observé des cellules HEK dans différentes conditions de transfection (tableau 4-1). Nous avons voulu mesurer le temps de vie de fluorescence de la CFP fixée sur l'APP, en présence d'APP-YFP ou de CB1R-YFP, sans cholestérol. Nous obtenons ainsi un temps de vie de fluorescence de référence, un « contrôle » dans les deux conditions. Nous avons également regardé l'évolution de la mesure lorsque l'on change le rapport entre la quantité de protéines marquées à la CFP et la quantité de protéines marquées à l'YFP, en prenant garde de toujours transfecter la même quantité totale d'ADN (3 µg dans notre cas).

	APP-CFP	APP-YFP	CB1-YFP
A-CFP 1,5 / A-YFP 1,5	1,5 µg	1,5 µg	
A-CFP 1,5 / C-YFP 1,5	1,5 µg		1,5 µg
A-CFP 1 / A-YFP 2	1 µg	2 µg	
A-CFP 1 / A-YFP 2	1 µg		2 µg

Tableau 4-1 : les différentes conditions de transfection avec les quantités d'ADN ajoutées correspondantes. Les valeurs représentent la quantité d'ADN ajoutée dans chaque puits de transfection. Chacun des puits contient environ 1 million de cellules.

Nous rapportons dans le tableau 4-2 les valeurs des paramètres pour les acquisitions réalisées dans cette partie. Le gain de l'intensificateur est ajusté suivant le niveau du signal de fluorescence de chaque cellule. Tous les résultats sont obtenus en TIRF, et la profondeur de pénétration du champ évanescant est estimée entre 160 et 190 nm pour toutes ces mesures. Pour imager proprement la CFP, nous utilisons pour l'excitation un filtre centré à 438 nm avec une largeur de 24 nm, et pour la détection, un filtre centré à 483 nm avec une largeur de 32 nm.

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	250	0	800	750 à 850

Tableau 4-2 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme Aref, et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

La figure 4-7 montre une image représentative des images de fluorescence de la CFP obtenues en TIRF en intensité et en temps de vie de fluorescence.

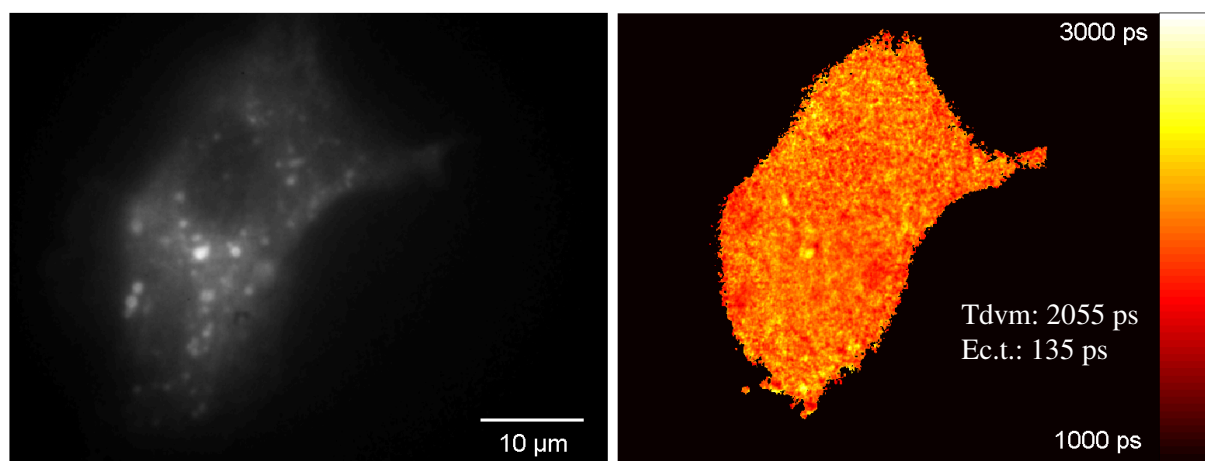


Figure 4-7 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence de la CFP d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-CFP et APP-YFP.

Nous avons réalisé une dizaine de mesures dans chacune des conditions de transfection (figure 4-8 et tableau 4-3). Il est intéressant de remarquer que nous obtenons une bonne reproductibilité sur les échantillons : nous avons des valeurs centrées autour de 2040 ps et comprises entre 1950 et 2150 ps. Nous estimons que, pour chaque transfection, les différences de durées de vie moyenne sont dues à la variabilité de ces échantillons biologiques. Concernant l'écart type pour chacune des mesures, la valeur obtenue reflète le niveau de signal de fluorescence (plus le signal est faible, plus l'ajustement par la méthode des moindres carrés est délicat et donc plus l'écart type est élevé), mais aussi dans une moindre mesure l'inhomogénéité de la cellule. Si on compare les mesures réalisées pour différents rapports entre les quantités de CFP et de YFP, on constate qu'avec 1,5 µg de chaque ADN, nous avons un meilleur signal de fluorescence (ce qui se traduit par un écart type pour le temps de vie plus faible sur chacune des images), et les temps de vie trouvés sont moins disparates.

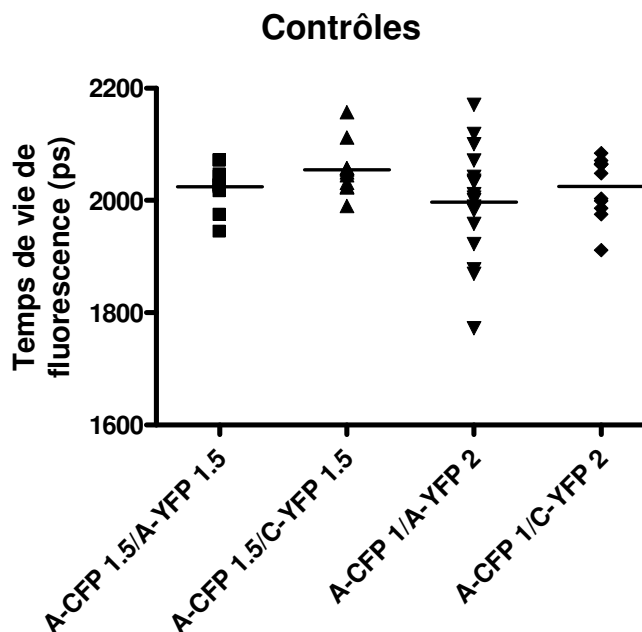


Figure 4-8 : résultats des temps de vie de fluorescence mesurés sur différentes cellules pour les 4 conditions de transfection.

Lorsqu'on transfecte avec deux fois plus d'YFP que de CFP, les temps de vie de fluorescence de la CFP sont très légèrement plus courts. Ceci pourrait s'expliquer par un FRET de base plus important entre CFP et YFP lorsqu'il y a deux fois plus d'accepteurs que de donneurs. De même, il semblerait que le temps de vie de fluorescence soit un peu plus court lorsque l'on transfecte avec APP-CFP et APP-YFP, que lorsqu'on transfecte avec APP-CFP et CB1R-YFP. On peut supposer qu'avec une transfection APP-APP, il y a (même sans ajout de cholestérol) une certaine quantité d'APP qui s'homodimérise, et donc plus de FRET de base qu'avec une transfection APP-CB1R. Mais aux vues des faibles différences obtenues dans les deux cas ci-dessus, il faudrait sans doute augmenter le nombre d'expériences pour aboutir à une telle conclusion de manière certaine.

	A-CFP 1.5/A-YFP 1.5		A-CFP 1.5/C-YFP 1.5		A-CFP 1/A-YFP 2		A-CFP 1/C-YFP 2	
Nombre de mesures	11		11		17		11	
	Moy (ps)	Ec.t. (ps)	Moy (ps)	Ec.t. (ps)	Moy (ps)	Ec.t. (ps)	Moy (ps)	Ec.t. (ps)
Moyenne	2024	154	2055	170	1997	187	2025	182
Ecart type	38	30	45	29	98	31	54	40

Tableau 4-3 : nombre de mesures, moyennes et écarts types obtenus pour chacune des conditions de transfection.

Ces mesures ayant été réalisées, nous avons maintenant une idée assez précise des valeurs de temps de vie prises par la CFP attachée à l'APP en milieu cellulaire. Nous observons ensuite l'influence du cholestérol sur ce temps de vie. Pour cela, nous regardons des cellules transfectées avec APP-CFP et APP-YFP, et des cellules « contrôles » transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP avant et après ajout de cholestérol dans le milieu. Pour mener à bien cette étude, nous sélectionnons dans chacun des puits une cellule bien adhérente à la lamelle de fond du puits, et avec des caractéristiques morphologiques nous permettant d'affirmer qu'elle est bien vivante. Nous vérifions également que cette cellule possède un niveau de fluorescence convenable pour être imagée, et nous réalisons une première mesure du temps de vie de fluorescence dans ces conditions. Ensuite, nous ajoutons du cholestérol (plus précisément un complexe "méthyl- β -cyclodextrin/cholesterol" qui augmente le cholestérol à la membrane plasmique de la cellule) dans le milieu de culture pour aboutir à une concentration en cholestérol de 1,4 μ M/L dans le puits de la lame Labteck observée. Cette valeur (qui correspond à une augmentation de 40% du

cholestérol à la membrane plasmique après 30min de traitement) a été déterminée par Jack-Christophe Cossec et les neurobiologistes qui ont constaté par d'autres méthodes d'analyse qu'une telle concentration de cholestérol modifiait l'endocytose de l'APP. Nous mesurons alors le temps de vie de fluorescence à différents instants après l'ajout de cholestérol pour voir l'évolution au cours du temps. Nous réalisons ces acquisitions respectivement 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 12 min, et 15 min après l'ajout de cholestérol.

Dans le premier cas d'une transfection avec APP-CFP et APP-YFP, les résultats figurent dans le tableau 4-4.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	1928	167	1940	150
cellule 2	2178	204	1949	179
cellule 3	2048	160	2032	145
cellule 4	2155	187	2095	170
cellule 5	2072	181	1970	165
cellule 6	1920	156	2014	131
cellule 7	1995	167	1876	157
cellule 8	2029	147	1977	150
cellule 9	1982	138	1867	123
cellule 10	2090	168	1982	158
Moyenne	2040		1970	
Ecart type	87		69	

Tableau 4-4 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 10 cellules transfectées avec APP-CFP et APP-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

On constate une petite tendance à la diminution du temps de vie de fluorescence (70 ps en moyenne). Sur l'histogramme de la figure 4-9, nous pouvons considérer que les variations de temps de vie de fluorescence dans les gammes $[-100 ; 0]$ et $[0 ; 100]$ ne sont pas véritablement interprétables en terme de FRET. Elles correspondent sans doute d'une part à des changements métaboliques dans la cellule au cours des 15 minutes d'acquisitions, notamment dus à l'exposition au laser, et d'autre part d'une manière moins importante à l'erreur dans la reproductibilité de la mesure avec notre dispositif. Par contre, des diminutions de temps de vie supérieures à 100 ps pourraient être consécutives à du FRET.

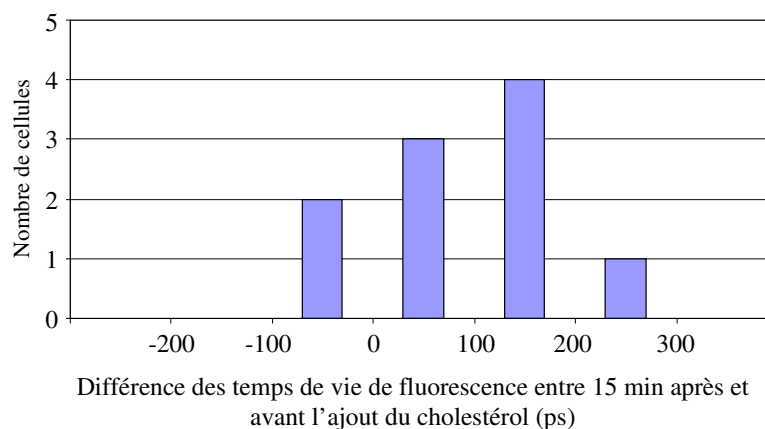


Figure 4-9 : histogramme de l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol pour chaque cellule individuellement. Sur l'axe des abscisses est reportée la différence de temps de vie mesurée : (temps de vie 15 minutes après l'ajout de cholestérol)-(temps de vie avant l'ajout de cholestérol). Une variation positive correspond à une diminution du temps de vie de fluorescence. L'effectif pour chacune des gammes de 100 ps est reporté sur l'axe des ordonnées.

Dans le second cas d'une transfection avec APP-CFP et CB1R-YFP, les résultats sont consignés dans le tableau 4-5. On constate une diminution plus importante du temps de vie de fluorescence de la CFP en moyenne (environ 160 ps). Mais à y regarder de plus près, (tableau 4-5 et figure 4-10), pour certaines cellules la variation n'est pas significative, mais pour 3 cellules, nous avons des diminutions du temps de vie très importantes (232 ps pour la cellule 5, 413 ps pour la cellule 6, 483 ps pour la cellule 7).

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	1991	222	2063	255
cellule 2	2094	193	2099	230
cellule 3	2050	141	1958	126
cellule 4	2129	159	2155	129
cellule 5	2012	191	1780	179
cellule 6	1991	162	1578	231
cellule 7	2038	139	1555	169
Moyenne	2043		1884	
Ecart type	52		248	

Tableau 4-5 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 7 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

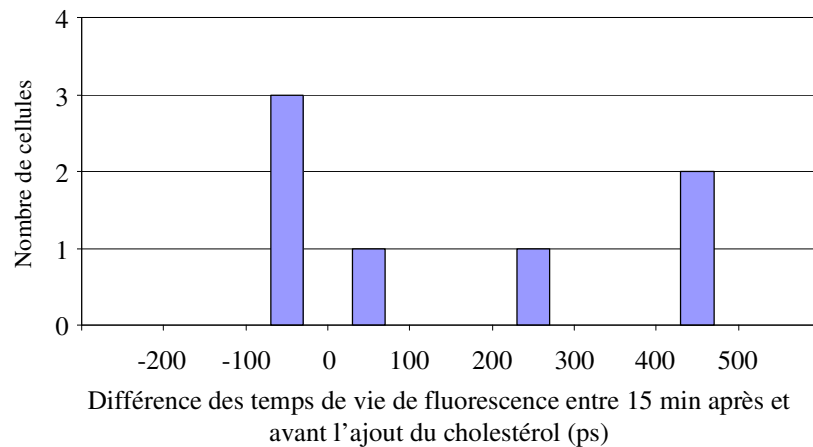


Figure 4-10 : histogramme de l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol. Sur l'axe des abscisses est reportée la différence de temps de vie mesurée : (temps de vie 15 minutes après l'ajout de cholestérol)-(temps de vie avant l'ajout de cholestérol). Une variation positive correspond à une diminution du temps de vie de fluorescence. L'effectif pour chacune des gammes de 100 ps est reporté sur l'axe des ordonnées.

Il semble y avoir une population qui a un temps de vie stable, et l'autre qui connaît une grande diminution, bien que toutes ces cellules proviennent de la même transfection. Or dans ces conditions, nous n'avons pas de dimerisation possible entre APP et CB1R, donc ces diminutions de temps de vie ne sont pas imputables aux phénomènes que nous étudions : l'ajout de cholestérol ne devrait pas augmenter le FRET. Nous suspectons donc qu'un processus physicochimique atténue la fluorescence de la CFP, et nous pensons au photoblanchiment.

Nous réalisons des mesures complémentaires avec la même transfection (APP-CFP 1,5 μg / CB1R-YFP 1,5 μg) dans les mêmes conditions, et d'autres sans l'ajout de cholestérol (on fait juste les 8 mesures à 0 min, 2 min, 4 min, 6 min, 8 min, 10 min, 12 min et 15 min) pour confirmer ces premiers résultats. Il est important de bien vérifier que ce n'est pas le cholestérol qui, par des processus qui ne seraient pas ceux qui nous intéressent, induit cette baisse.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol		Différence (ps)
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	
cellule 1	2038	139	1555	169	483
cellule 2	2055	132	1788	155	267
cellule 3	2025	150	1813	189	212
cellule 4	2035	120	1763	174	272
	Sans cholestérol t0		t0 + 15 min		
cellule 5	2031	144	2000	87	31
cellule 6	1973	126	1825	142	148
Moyenne	2026		1791		
Ecart type	28		143		

Tableau 4-6 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 6 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après ou sans ajout de cholestérol à t0 et t0 + 15 minutes.

Dans tous les cas, nous constatons une diminution du temps de vie de fluorescence de la CFP. Pour les deux cellules sans ajout de cholestérol nous obtenons une diminution non significative (31 ps) et une diminution assez importante (148 ps). Avec l'ajout de cholestérol, nous avons à chaque fois des diminutions supérieures à 200 ps. Il semble donc que nous ayons une diminution de temps de vie qui n'est pas due à l'homodimérisation de l'APP, ni à l'ajout de cholestérol.

II.3 - Mise en évidence du photoblanchiment de la CFP

Nous décidons donc d'étudier l'évolution du temps de vie de fluorescence de la CFP suivant l'exposition de la cellule au rayonnement.

Pour commencer, nous réalisons (toujours avec une transfection APP-CFP 1,5 µg / CB1R-YFP 1,5 µg) moins de mesures au cours du temps : nous relevons le temps de vie de fluorescence moyen de la cellule à l'instant initial, puis 10 minutes après et 20 minutes après (tableau 4-7).

	Avant cholestérol		20 min après cholestérol		Différence (ps)
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	
cellule 1	1928	132	1937	140	-9
cellule 2	1938	95	1922	78	16
	Sans cholestérol t0		t0 + 20 min		
cellule 3	2056	133	2028	119	28
cellule 4	1932	133	1892	109	40
Moyenne	1963		1945		
Ecart type	62		59		

Tableau 4-7 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 4 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 20 minutes après ou sans ajout de cholestérol à t0 et t0 + 20 minutes.

Dans ces conditions, nous n'avons pas de diminution significative du temps de vie, ce qui conforte notre hypothèse de photoblanchiment.

Pour en être sûr, nous relevons les temps de vie de fluorescence de la CFP pour différentes puissances laser, et en exposant la cellule de manière continue au laser pendant 5 et 10 minutes (tableau 4-8).

Puissance (en μW)		t0		t0 + 5min		t0 + 10 min		Différence sur 10 min
		Moy (ps)	Ec.ty (ps)	Moy (ps)	Ec.ty (ps)	Moy (ps)	Ec.ty (ps)	
50-100	Cellule 1	2094	419	2061	393	2064	389	30
	Cellule 2	2192	336	2185	324	2163	304	29
200-250	Cellule 3	2162	216	2088	222	2068	222	94
	Cellule 4	2233	231	2174	211	2145	214	88
350-400	Cellule 5	2208	164	2052	128	2111	114	97
	Cellule 6	2178	142	2112	122	2088	131	90
450-500	Cellule 7	2061	193	1969	180	1927	177	134
500-550	Cellule 8	2087	142	2015	124	2019	141	68
	Cellule 9	2010	199	2054	198	1932	178	78
	Cellule 10	2064	116	2042	122	1880	132	184
	Cellule 11	1982	100	1895	123	1914	114	68
	Cellule 12	1885	130	1712	175	1692	164	193
	Cellule 13	1873	160	1865	160	1817	179	56
700-750	Cellule 14	2141	137	966	138	786	116	1355
	Cellule 15	2130	107	1982	93	1985	104	145
1100-1150	Cellule 16	2124	170	1847	134	1759	166	365

Tableau 4-8 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 16 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Les puissances sont celles incidentes sur l'échantillon. Les mesures sont effectuées après 5 et 10 minutes d'exposition continue au rayonnement.

Il semble que, grossièrement, la différence de temps de vie augmente quand la puissance laser augmente. Mais cette diminution est assez aléatoire : des valeurs très différentes sont trouvées suivant les cellules, qui pourtant ont toutes subi la même transfection.

Ces mesures nous permettent de conclure que c'est bien le photoblanchiment qui nous gêne. Nous rejoignons ici des résultats publiés sur le photoblanchiment de la CFP et son influence sur la mise en évidence de FRET par FLIM [Tramier 2006] : le photoblanchiment entraîne une baisse du temps de vie de fluorescence qui en plus varie de cellule à cellule.

A la lumière de ces expériences, il apparaît que nous pouvons minimiser grandement l'influence du photoblanchiment, voire nous en affranchir en réduisant l'exposition des cellules au rayonnement. Pour cela, nous suggérons d'éclairer nos échantillons avec une puissance incidente inférieure à 450 μW , puisque dans ces conditions, une exposition continue durant plus de cinq minutes n'entraîne pas de diminution de temps de vie significative (voir tableau 4-8). De plus, nous proposons de réduire le nombre de mesures au cours du temps, et même de réduire le nombre d'acquisitions pour une mesure, c'est-à-dire changer l'algorithme d'échantillonnage du déclin de fluorescence.

II.4 - Réduction du temps d'acquisition

II.4.1 - Algorithme développé au laboratoire

Pour ce point, nous essayons de manière empirique de trouver un algorithme qui échantillonne proprement le déclin de fluorescence, et qui donne des résultats comparables à ceux obtenus avec l'algorithme A_{ref} , tout en réduisant le nombre d'images acquises. Nous développons donc un nouvel algorithme A_{e} , avec neuf acquisitions au lieu des treize de A_{ref} (tableau 4-9).

	Aref	A9
1ère acquisition	$t_0 + 10000$	$t_0 + 10000$
2ème acquisition	$t_0 + 8000$	$t_0 + 8000$
3ème acquisition	$t_0 + 6000$	$t_0 + 6000$
4ème acquisition	$t_0 + 5000$	$t_0 + 4000$
5ème acquisition	$t_0 + 4000$	$t_0 + 3000$
6ème acquisition	$t_0 + 3000$	$t_0 + 2000$
7ème acquisition	$t_0 + 2500$	$t_0 + 1500$
8ème acquisition	$t_0 + 2000$	$t_0 + 750$
9ème acquisition	$t_0 + 1500$	$t_0 + 0$
10ème acquisition	$t_0 + 1000$	
11ème acquisition	$t_0 + 750$	
12ème acquisition	$t_0 + 350$	
13ème acquisition	$t_0 + 0$	

Tableau 4-9 : position des différentes acquisitions pour les 2 algorithmes Aref et A9. t_0 est le début du déclin.

Nous avons retraité 10 expériences de mesure de temps de vie (images de cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP 1,5 μg / APP-YFP 1,5 μg précédemment traitées avec l'algorithme A_{ref}) pour voir les modifications que ce nouvel algorithme provoque. En moyenne, sur ces 10 images de temps de vie autour de 2 ns, nous constatons un décalage (augmentation ou diminution suivant les cas) de 10 ps en valeur absolue du temps de vie entre les deux mesures. L'écart type quant à lui reste quasiment inchangé, avec une très légère augmentation inférieure à 10 ps. Nous présentons ici les résultats obtenus avec les deux algorithmes précités sur la cellule de la figure 4-11.

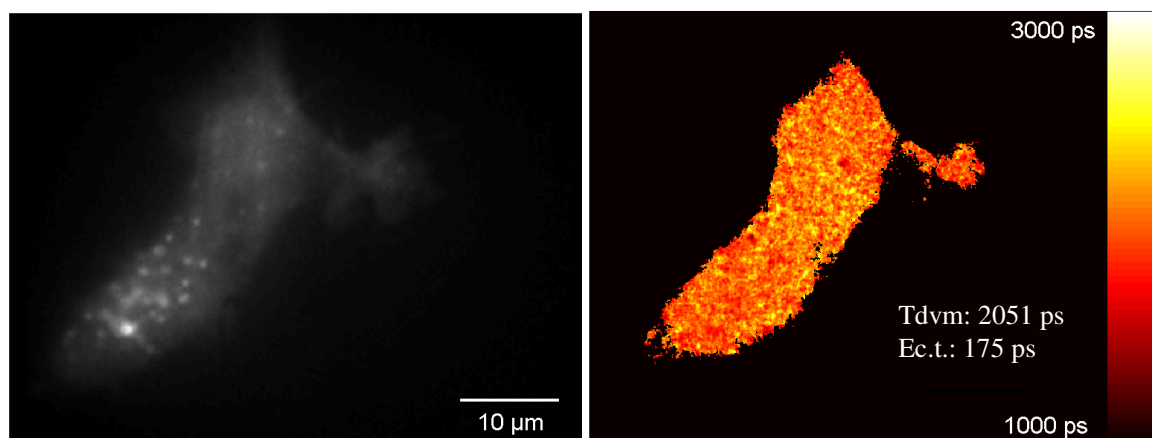


Figure 4-11 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-CFP et APP-YFP. La carte FLIM a été obtenue avec l'algorithme Aref.

Les deux histogrammes représentant la répartition des pixels en fonction du temps de vie de fluorescence obtenus pour chacun des algorithmes (figure 4-12) témoignent de la faible différence provoquée par le changement d'algorithme. Dans le cas rapporté ici, en passant de 13 à 9 acquisitions, nous obtenons une diminution du temps de vie moyen de 16 ps.

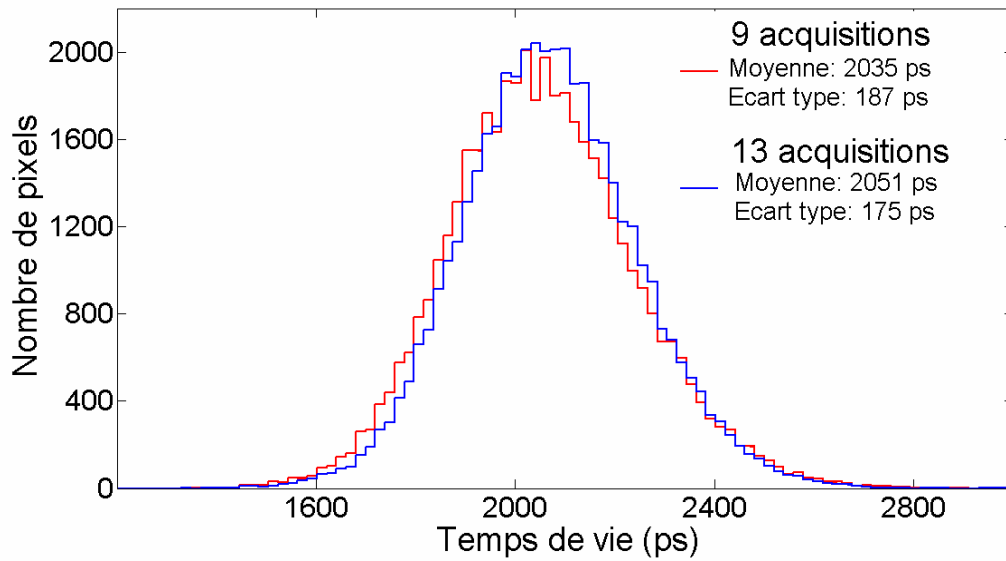


Figure 4-12 : histogrammes des temps de vie calculés pour toute la carte pour chacun des algorithmes.

Nous nous sommes également focalisés sur un pixel particulier de l'image pour voir ce que ce changement d'algorithme modifie sur le déclin de fluorescence (figure 4-13). Comme on peut le constater, les modifications sont vraiment minimales.

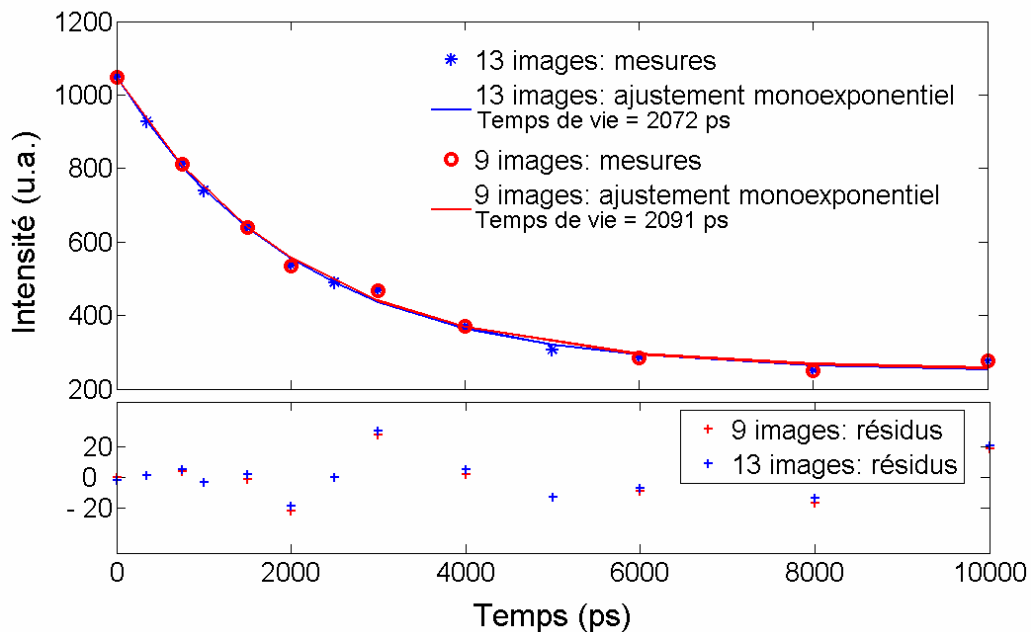


Figure 4-13 : déclins mesurés pour un pixel particulier (le même) de la carte FLIM de la figure 4-11.

Une fois que nous savons qu'avec ce nouvel algorithme, nous ne modifions pas le temps de vie mesuré, nous nous intéressons au paramètre essentiel dans l'objectif d'une diminution du photoblanchiment : le temps total d'acquisition. Pour l'algorithme A_{ref} à 13 images, 34 s sont nécessaires pour avoir une carte FLIM, alors qu'avec A_9 , 22 s suffisent.

Bien entendu, cet algorithme n'est sans doute pas l'algorithme optimum, mais nous avons essayé de trouver une solution rapide, dont nous savions quelle ne modifiait pas le résultat. En repartant de A_{ref} et en enlevant certaines images, il était facile de comparer ces deux algorithmes sur toutes les images déjà acquises. Cet algorithme A_9 nous donne donc des valeurs tout à fait comparables à celles obtenues avec A_{ref} en réduisant d'un tiers le temps d'acquisition (et donc d'exposition des

échantillons) nécessaire. Dans la suite, nous allons utiliser essentiellement cet algorithme qui a prouvé sa fiabilité et sa robustesse. Cependant, nous nous intéressons aussi à une autre méthode de détermination du temps de vie, appelée RLD (pour Rapid Lifetime Detremination) qui, si elle est maîtrisée peut encore grandement réduire le temps d'acquisition.

II.4.2 - Détermination rapide du temps de vie de fluorescence : RLD

La solution la mieux adaptée pour réduire considérablement le temps d'acquisition et le temps de traitement nécessaire à l'obtention d'une image FLIM est sans doute la technique de détermination du temps de vie de fluorescence rapide ou RLD (pour Rapid Lifetime Detremination) [Munro 2005], [Moore 2004], [Chan 2001], [Sharman 1999], [Ballew 1989].

Cette technique a été proposée pour la première fois par Ashworth en 1983 [Woods 1984]. En travaillant avec un modèle de déclin de fluorescence monoexponentiel, l'évolution de l'intensité au cours du temps s'écrit :

$$I(t) = a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)$$

avec a l'amplitude, constante au cours du déclin, qui dépend de la puissance de l'excitation, de la concentration en fluorophores, et du rendement quantique du fluorophore, et τ le temps de vie de fluorescence. (Nous nous affranchissons ici d'une éventuelle composante continue, qui dans notre cas disparaît quand nous réalisons le seuillage sur nos images avant traitement). Dans une telle expression, il y a deux inconnues : a et τ . Dès lors, il suffit de réaliser deux acquisitions pour les obtenir. Concrètement, les signaux de fluorescence étant relativement faibles, les deux valeurs sont obtenus en intégrant le signal sur deux « portes ». Ainsi le temps de vie est évalué à partir du rapport des aires intégrées pour deux régions différentes sous la courbe du déclin (figure 4-14). Lorsque l'on travaille avec un système d'imagerie déclenchée qui permet d'ouvrir des « portes temporelles » (comme c'est notre cas grâce à l'intensificateur), cette intégration est réalisée directement par le détecteur, et le niveau d'intensité obtenue en chaque pixel pour chacune des images correspond à l'intégration sur une durée égale à la largeur de la « porte temporelle » ouverte (chaque porte est ouverte après une impulsion différente).

Cette technique RLD peut aussi être utilisée pour des déclins double-exponentiel, mais dans ce cas, il y a plus d'inconnues (4) donc au moins quatre acquisitions sont nécessaires, et le traitement est un peu plus complexe. Cependant, cela reste très avantageux par rapport aux techniques d'ajustement par la méthode des moindres carrés [Sharman 1999].

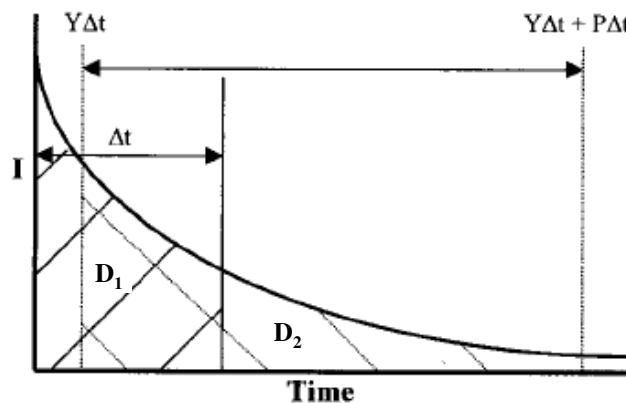


Figure 4-14 : principe de la mesure de temps de vie de fluorescence par RLD [Chan 2001].

Sur ce schéma, le déclin de fluorescence est représenté, et les deux aires utilisées pour calculer le temps de vie de fluorescence sont hachurées.

Au mieux, l'écart type relatif du RLD est juste 30 à 40 % moins bon que pour une méthode de mesure du temps de vie de fluorescence utilisant un ajustement du déclin de fluorescence par la méthode des moindres carrés, mais l'acquisition et les calculs sont beaucoup plus rapides (on peut gagner plus d'un facteur 10 en temps). Ainsi la vitesse et la précision de la RLD couplée à la facilité d'acquisition en font un outil attractif pour l'analyse en temps réel. Plusieurs laboratoires ont d'ailleurs développé des dispositifs d'imagerie utilisant cette méthode pour diverses applications [Wang 1991], [Agronskaia 2003], [Requejo-Isidro 2004].

Il y a de nombreuses manières de réaliser la détermination de temps de vie de fluorescence rapide. En effet, le principe est à chaque fois le même, mais les deux portes peuvent être de largeurs différentes, elles peuvent se recouvrir, être contiguës, ou être séparées d'un certain temps.

Définissons les notations utilisées dans la figure 4-14 et qui vont nous servir dans la suite : Δt est la largeur temporelle de la première porte ; P est le « facteur d'échelle » de la deuxième porte : cette dernière a donc une largeur $P\Delta t$; enfin Y est le décalage relatif de la deuxième porte par rapport à la première : lorsque $Y < 1$, les deux portes se recouvrent, lorsque $Y = 1$, les deux portes sont contiguës et lorsque $Y > 1$, les deux portes sont séparées par un fossé. Pratiquement, la première porte est ouverte de 0 à Δt , et la seconde est ouverte de $Y\Delta t$ à $Y\Delta t + P\Delta t$. En notant D_1 et D_2 les valeurs d'intensité intégrée respectivement au cours de l'ouverture de la première porte et de la deuxième porte, nous avons :

$$D_1 = \int_0^{\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt$$

$$D_2 = \int_{Y\Delta t}^{Y\Delta t + P\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt$$

Puis nous pouvons exprimer leur rapport en fonction du temps de vie cherché τ :

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{\int_{Y\Delta t}^{Y\Delta t + P\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt}{\int_0^{\Delta t} a \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) dt}$$

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{-a\tau \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]_{Y\Delta t}^{Y\Delta t + P\Delta t}}{-a\tau \left[\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right]_0^{\Delta t}}$$

$$\frac{D_2}{D_1} = \frac{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}(P+Y)\right) - \exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}Y\right)}{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}\right) - 1}$$

Lorsque $P=1$, c'est-à-dire lorsque les deux portes ont la même largeur Δt , nous avons facilement accès à τ :

$$\frac{D_2}{D_1} = \exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau} Y\right) \frac{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}\right) - 1}{\exp\left(-\frac{\Delta t}{\tau}\right) - 1}$$

$$\text{d'où : } \frac{\Delta t}{\tau} = -\frac{1}{Y} \ln\left(\frac{D_2}{D_1}\right)$$

$$\text{et donc } \tau = \frac{\Delta t \cdot Y}{\ln\left(\frac{D_1}{D_2}\right)}$$

Nous allons toujours nous placer dans ce cas là, pour lequel le traitement est immédiat. En effet, notre système de détection, plus précisément notre intensificateur, ne nous permet pas de manière simple et pratique d'ouvrir deux portes de largeurs différentes. Nous nous sommes concentrés sur deux cas largement étudiés dans la littérature : $Y=1$ (les deux portes sont contiguës) et $Y=1/2$ (les deux portes se recouvrent pour moitié). Pour ces deux cas, des expressions de l'amplitude figurent dans la référence [Sharman 1999].

Mais en ajustant Y et P , de meilleurs résultats peuvent être obtenus. Les valeurs optimales de ces deux paramètres varient suivant le bruit de la source et le système de détection. En général, un recouvrement des deux intervalles ($Y < 1$) et une deuxième porte plus large améliorent les performances [Munro 2005], [Moore 2004].

Cependant, pour une petite gamme de valeurs du rapport $\frac{\Delta t}{\tau}$, les résultats obtenus avec la RLD « simple » ($P=1$) sont tout à fait satisfaisants en terme de précision et d'écart type [Moore 2004]. Ainsi lorsque le temps de vie de fluorescence que l'on cherche à mesurer est grossièrement connu, et qu'il est possible d'ouvrir des portes 2 à 3 fois plus longues que le temps de vie mesuré, la grande simplicité d'acquisition et de traitement du RLD simple en font un outil de choix. Les acquisitions avec un recouvrement des deux portes sont même préférées, car le signal collecté au début du déclin est bien plus intense que dans la queue [Sharman 1999].

En ce qui nous concerne, l'intensificateur dont nous disposons possède un mode configuré pour faire de la RLD. Ce mode, « User 1 » permet d'ouvrir des portes de 5 ns à 20 MHz. Nous avons vérifié la largeur effective de ces portes à 15 MHz, qui est en fait de 4,8 ns (figure 4-15). D'après ce que nous venons de voir, cette largeur de porte est optimale pour mesurer des temps de vie compris entre $4,8/2 = 2,4$ et $4,8/3 = 1,6$ ns, ce qui correspond parfaitement aux temps de vie de fluorescence de la CFP que nous avons mesurée précédemment.

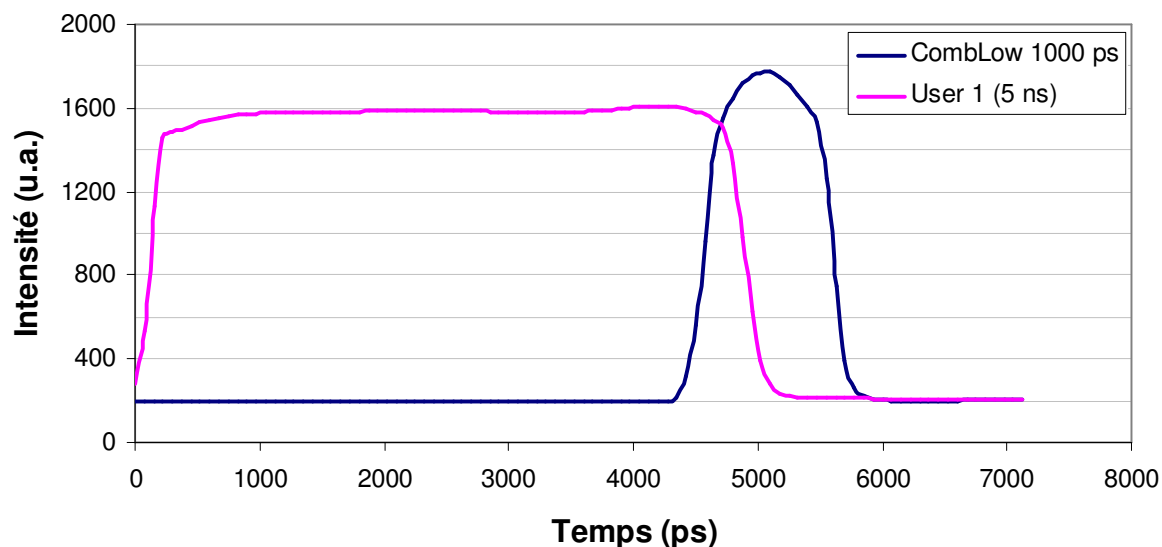


Figure 4-15 : mesure de la largeur des portes en mode User 1. On trouve une largeur de 4800 ps. Comparaison du positionnement de la porte du mode User 1 par rapport à la porte de 1000 ps du mode CombLow. La porte de 4800 ps s'ouvre beaucoup plus tôt, il faut donc décaler le début de l'acquisition.

Comme dans la partie précédente, nous avons mené des études sur des échantillons stables pour voir l'influence des différents paramètres sur l'acquisition. Nous avons fait des essais avec les deux algorithmes de RLD simple présentés ci-dessus : $P = Y = 1$ qui correspond à deux portes contiguës de même largeur et $P = 1, Y = 1/2$ pour lequel les deux portes de même largeur se chevauchent de 50%. Nous n'obtenons des résultats cohérents que pour ce dernier algorithme avec recouvrement des portes. Ceci peut sans doute s'expliquer par le faible signal collecté dans la queue du déclin, qui doit être noyé dans le bruit et qui ne nous permet donc pas de calculer des temps de vie de manière correcte. Nous pensons donc utiliser un algorithme avec une première acquisition à t_0 , et la suivante à $t_0 + 2400$ ps.

Nous avons constaté que le positionnement du début de l'acquisition était ici aussi très important, et que d'ailleurs, avec les portes de 5 ns, le début du déclin se situait plusieurs centaines de picosecondes avant celui observé avec les portes du mode CombLow. Ceci est essentiellement dû à un décalage temporel entre les portes de ces deux modes que nous avons pu mettre en évidence (figure 4-15). Ainsi, il est également essentiel dans le cas de la RLD de repérer précisément le maximum d'intensité pour positionner le début de l'acquisition, et nous avons constaté que les meilleurs résultats en termes de valeurs et d'écart type sont obtenus lorsque la première porte est ouverte 500 ps après le maximum repéré.

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	100	0	800	580
	RLDc	10	100	0	4800	530

Tableau 4-10 : valeurs des différents paramètres d'acquisition utilisés pour comparer les valeurs obtenues avec l'algorithme Aref, et en RLDc.

Comme pour caractériser notre montage dans la partie précédente, nous avons observé dans les meilleures conditions (tableau 4-10), deux solutions de rhodamine B, l'une diluée dans l'eau et l'autre diluée dans de l'éthanol. Comme les niveaux de fluorescence sont importants, dans les deux cas, le temps d'exposition de la caméra est réglé sur 100 ms, et les valeurs de gain sont assez faibles. Nous avons comparé les temps de vie de fluorescence mesurés avec l'algorithme « multi-

portes » de référence A_{ref} et ceux obtenus avec la technique de RLD avec recouvrement des deux portes à 50 % (appelée aussi RLDc). Les tableaux 4-11 et 4-12 présentent les résultats trouvés. Tout d'abord, on constate que les temps de vie absolus mesurés ne sont pas exactement les mêmes que ceux mesurés dans la partie précédente sur les mêmes échantillons. Ceci peut s'expliquer par le fait que certains paramètres expérimentaux qui influent sur cette mesure (la température, la viscosité des solvants, la concentration en colorant de la solution) ne sont pas maîtrisés et n'avaient probablement pas les mêmes valeurs.

		Rhodamine B dans EtOH			
		MP Aref		RLDc	
		Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
Zone 1		2154	33	2171	25
Zone 2		2163	33	2175	25
Zone 3		2150	33	2179	25
Zone 4		2153	33	2173	26
Zone 5		2160	33	2174	26
Moyenne		2156		2174	
Ecart type		5		3	

Tableau 4-11 : mesures de temps de vie de fluorescence d'une solution de rhodamine B diluée dans de l'éthanol avec les deux modes d'acquisition multi-portes et RLD.

		Rhodamine B dans eau			
		MP Aref		RLDc	
		Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
Zone 1		1559	20	1532	22
Zone 2		1566	20	1529	22
Zone 3		1567	20	1532	22
Zone 4		1568	20	1529	22
Zone 5		1561	20	1531	22
Moyenne		1564		1531	
Ecart type		4		2	

Tableau 4-12 : mesures de temps de vie de fluorescence d'une solution de rhodamine B diluée dans de l'eau avec les deux modes d'acquisition multi-portes et RLD.

Les résultats obtenus montrent une très grande reproductibilité (pour 5 mesures, l'écart type sur l'ensemble des mesures moyennes est inférieure à 5 ps), et les valeurs de temps de vie de fluorescence trouvées avec la méthode RLDc sont en accord avec ceux obtenus grâce à notre méthode de référence. La différence entre les deux est de l'ordre de 30 ps.

Nous avons également essayé cette méthode sur des échantillons biologiques. Nous avons observé des cellules HEK-293 co-transfectées avec APP-YFP et CB1R-mCherry. Pour ces mesures, le signal de fluorescence étant plus faible, nous travaillons avec des temps d'acquisition sur la caméra de 250 ms, et des valeurs de gain plus élevées (tableau 4-13). Comme précédemment, nous pouvons remarquer que, en passant de l'acquisition multi-portes à la RLDc, il faut diminuer le gain de l'intensificateur de 50 V.

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	250	0	800	700-750
	RLDc	10	250	0	4800	750-800

Tableau 4-13 : valeurs des différents paramètres d'acquisition utilisés pour comparer les valeurs de temps de vie de fluorescence dans les cellules obtenues avec l'algorithme Aref, et en RLDc.

Ces deux fluorophores ont des temps de vie de fluorescence qui sont en limite de la gamme « optimale » que l'on peut mesurer en RLD avec des portes de 4,8 ns. Ainsi en se plaçant dans les conditions les plus défavorables, nous avons une idée de l'erreur qui peut être induite par cette technique en bord de bande.

	APP YFP				CB1 mCherry			
	MP Aref		RLDc		MP Aref		RLDc	
	Moy (ps)	Ec.t.(ps)	Moy (ps)	Ec.t.(ps)	Moy (ps)	Ec.t.(ps)	Moy (ps)	Ec.t.(ps)
Cellule 1	2294	228	2466	197	1364	64	1408	72
Cellule 2	2264	232	2477	176	1447	100	1470	112
Cellule 3	2461	215	2754	226	1357	97	1405	105
Cellule 4	2606	255	2750	224	1324	60	1346	56
Cellule 5	2505	258	2636	252	1306	51	1354	52
Moyenne	2426	238	2617	215	1360	74	1397	79
Ecart type	145		141		54		50	

Tableau 4-14 : mesures de temps de vie de fluorescence de la YFP et de la mCherry dans 5 cellules transfectées avec APP-YFP et CB1R-mCherry. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avec les modes d'acquisition multi-portes Aref et RLDc.

Nous constatons (tableau 4-14) que dans les deux cas, sur des échantillons biologiques, l'écart type de chacune des mesures et l'écart type sur les moyennes chutent, toujours pour les mêmes raisons (diminution de la quantité de signal de fluorescence, variabilité entre les échantillons). Pour les temps de vie longs (mesure sur YFP), il apparaît que l'acquisition RLDc surestime de manière assez importante (quasiment 200 ps) le temps de vie de fluorescence, ce qui est assez problématique. Par contre, pour les temps de vie courts (mesure sur mCherry), les résultats sont conformes à ceux obtenus avec l'acquisition multi-portes.

Enfin, dans ces conditions, le temps nécessaire à l'acquisition ne dépasse pas 5 secondes.

En conclusion, nous avons ici réussi à diminuer considérablement le temps d'acquisition, nous permettant ainsi de réduire le temps d'exposition de nos échantillons au rayonnement. Les résultats trouvés sont en parfait accord avec ceux obtenus avec l'algorithme de référence sur la gamme [1350 ps -2200 ps]. Pour des temps de vie plus longs, nous surestimons de manière assez importante le temps de vie en RLDc. Pour des temps de vie courts (1000 ps ou moins), on doit vraisemblablement avoir le même problème... C'est pourquoi, pour tenter de mettre en évidence du FRET de manière certaine, et de réussir à mesurer précisément les variations de temps de vie de fluorescence du donneur lors de ce transfert, nous préférons dans un premier temps utiliser l'algorithme à 9 portes.

II.5 - Mesures sur un témoin de FRET positif

En parallèle de notre travail sur la réduction du temps d'acquisition, nous avons pu, grâce aux neurobiologistes, obtenir des témoins positifs de FRET. Il s'agit de sondes (constructions moléculaires) qui ont, à chaque extrémité, un des deux fluorophores du couple FRET (CFP et YFP) séparés d'une distance connue. En insérant entre ces deux protéines un certain nombre d'acides aminés, il est possible de calculer l'éloignement et d'en déduire l'efficacité du transfert entre ces deux fluorophores.

Nous avons transfecté des cellules HEK-293 avec deux sondes : Cy 37 (CFP et YFP sont dans ce cas séparées par 37 acides aminés, ce qui correspond à une efficacité de FRET de 60%), et Cy 24 (CFP et YFP sont séparés par 24 acides aminés, ce qui assure une efficacité de 80%). Pour pouvoir comparer avec les mesures de temps de vie réalisées sur les cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP et APP-YFP et se placer dans les mêmes conditions, nous utilisons ici l'algorithme A_{ref} (tableau 4-15).

CCD			HRI		
Paramètre	Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	Aref	10	250	0	800
			0	800	750 à 850

Tableau 4-15 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme A_{ref} , et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

Nous avons rapporté ci-dessous une image représentative de ce que l'on obtient avec la transfection Cy 24 (figure 4-16).

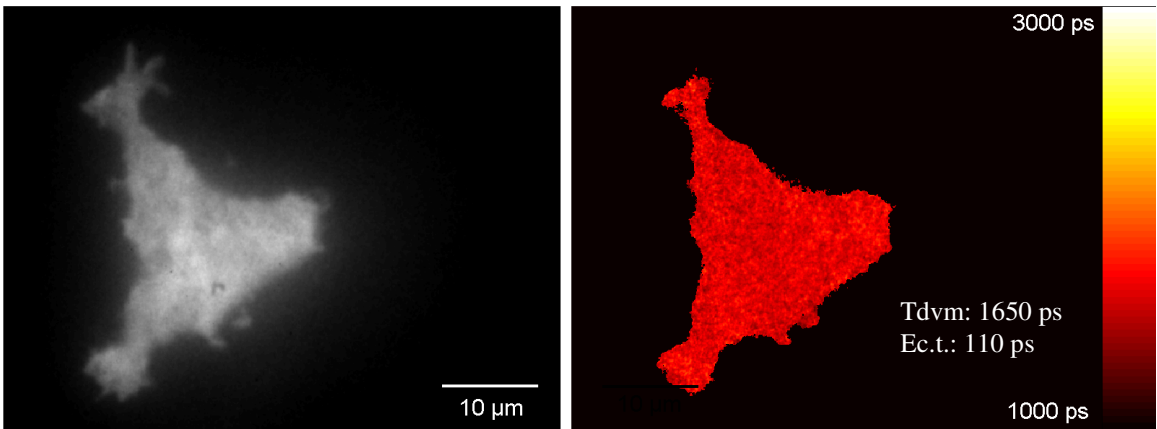


Figure 4-16 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence de la CFP d'une cellule HEK-293 transfectée avec la sonde Cy 24, témoin positif de FRET avec une efficacité de 80%.

Les valeurs numériques obtenues avec chacune des sondes figurent dans les tableaux 4-16 et 4-17.

Transfection Cy37			Transfection Cy24		
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)		Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
Cellule 1	1731	67	Cellule 1	1723	88
Cellule 2	1769	66	Cellule 2	1656	59
Cellule 3	1705	78	Cellule 3	1664	36
Cellule 4	1899	89	Cellule 4	1683	64
Cellule 5	1648	73	Cellule 5	1650	51
Cellule 6	1777	76	Cellule 6	1697	64
Cellule 7	1765	63	Cellule 7	1643	50
Cellule 8	1656	70	Cellule 8	1604	48
Cellule 9	1746	72	Cellule 9	1617	46
Cellule 10	1713	70	Cellule 10	1624	45
Cellule 11	1791	70	Moyenne	1656	
Moyenne	1745		Ecart type	37	
Ecart type	69				

A gauche : Tableau 4-16 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 11 cellules transfectées avec la sonde Cy 37 (60% FRET).
A droite : Tableau 4-17 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 10 cellules transfectées avec la sonde Cy 24 (80% de FRET).

Dans un premier temps, si on compare ces résultats à ceux obtenus avec des cellules transfectées avec APP-CFP / CB1R-YFP (1,5 μ g de chaque ADN), pour lesquelles nous obtenons un temps de vie moyen de fluorescence de 2055 ps (tableau 4-3), nous avons pour les deux sondes des valeurs nettement plus courtes. Avec la sonde Cy 37 (60% de FRET), nous trouvons une moyenne sur les 11 acquisitions réalisées qui est 310 ps plus basse, et avec la seconde sonde Cy 24 (80% de FRET), la moyenne (cette fois sur 10 acquisitions) est 399 ps plus basse. Ainsi nous pouvons très nettement mettre en évidence des différences de temps de vie de fluorescence entre des échantillons sans FRET et des échantillons avec une efficacité de 60% et plus du FRET.

Ensuite, nous sommes apparemment capables de faire la distinction entre des efficacités de FRET différentes de 20%. Dans ce cas, la différence sur la moyenne des temps de vie est inférieure à 100 ps, et vaut 89 ps. Pour pouvoir être catégoriques, cette différence étant relativement faible, il faut augmenter le nombre d'échantillons pour avoir des statistiques correctes, mais une telle mesure est tout à fait envisageable.

A la lumière de ces résultats, nous sommes relativement confiants, car nous estimons être capables de mettre en évidence un accroissement de FRET supérieur à 20% dans les cellules. Ainsi, si l'augmentation de la quantité de cholestérol à la membrane dans les cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP et APP-YFP provoque une hausse du FRET entre CFP et YFP dans ces proportions, nous devrions le mesurer avec notre dispositif.

II.6 - Mesures sur APP-CFP dans les nouvelles conditions

Nous réalisons une nouvelle série d'expériences en exploitant les résultats que nous venons de présenter. Pour ne pas photoblanchir la CFP, nous exposons nos échantillons à une puissance laser incidente inférieure à 450 μ W, et nous ne mesurons le temps de vie de fluorescence qu'en quatre instants : avant l'ajout du cholestérol, 5 minutes, 10 minutes et 15 minutes après. De plus, nous utilisons l'algorithme A_9 (tableau 4-18). Dans un premier temps, nous n'utilisons pas la RLDC, puisque avec une acquisition multi-porte et un ajustement du déclin par la méthode des moindres carrés, nous obtenons des mesures plus précises. Or comme nous ne connaissons pas l'augmentation de l'efficacité du FRET qui peut être induite par l'ajout de cholestérol, nous voulons être sûrs de ne pas passer à côté. Si avec cet algorithme, nous arrivons à mettre en évidence une différence de temps de vie de fluorescence de la CFP, nous essaierons alors la RLDC.

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	A9	10	250	0	800	750-850

Tableau 4-18 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme A_9 , et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

Nous commençons par regarder le contrôle, c'est-à-dire les cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP / CB1R-YFP (1,5 μ g de chaque ADN). Avec cette transfection, l'ajout de cholestérol ne doit pas augmenter le FRET, et le temps de vie de fluorescence de la CFP doit rester stable. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 4-19 et dans la figure 4-17. Dans ces conditions de transfection, nous avons une diminution moyenne de 32 ps.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	1950	189	1895	178
cellule 2	1948	221	1999	220
cellule 3	2076	187	1989	171
cellule 4	2067	187	2029	165
Moyenne	2010		1978	
Ecart type	71		58	

Tableau 4-19 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 4 cellules transfectées avec APP-CFP et CB1R-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

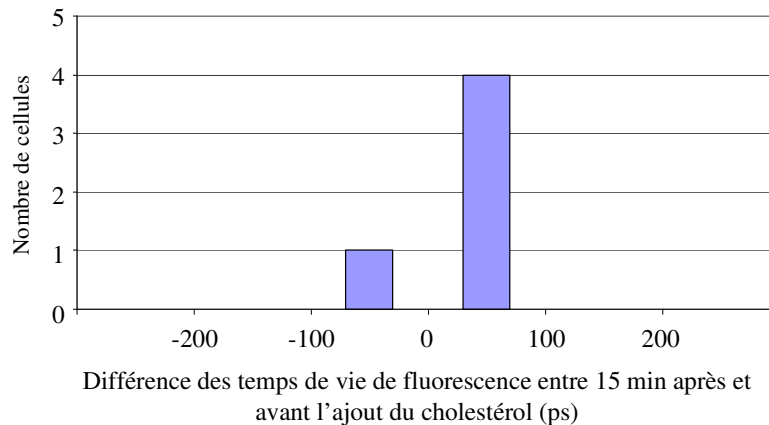


Figure 4-17 : histogramme relatant l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol pour une transfection APP-CFP / CB1R-YFP.

Nous mesurons alors l'évolution du temps de vie de la CFP après l'ajout de cholestérol sur des cellules HEK-293 transfectées avec APP-CFP / APP-YFP, et nous espérons obtenir une diminution du temps de vie supérieure à 32 ps, au moins de l'ordre de 100 ps.

	Avant cholestérol		15 min après cholestérol	
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
cellule 1	2166	157	2129	147
cellule 2	2123	127	2123	135
cellule 3	1983	138	1977	123
cellule 4	2006	118	2029	125
cellule 5	2164	158	2069	132
Moyenne	2088		2065	
Ecart type	88		64	

Tableau 4-20 : mesures de temps de vie de fluorescence de la CFP dans 5 cellules transfectées avec APP-CFP et APP-YFP. Sont rapportés dans ce tableau les temps de vie mesurés avant l'ajout de cholestérol et 15 minutes après.

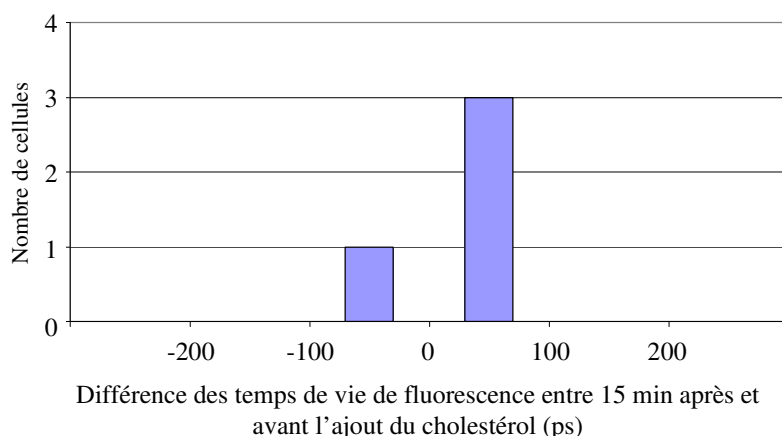


Figure 4-18 : histogramme relatant l'évolution du temps de vie de la CFP entre avant et 15 minutes après l'ajout de cholestérol pour une transfection APP-CFP / APP-YFP.

Malheureusement, les résultats obtenus (tableau 4-20 et figure 4-18), ne reflètent pas de diminution significative du temps de vie de fluorescence de la CFP. Nous obtenons une baisse moyenne de 23 ps, ce qui est même inférieure à la valeur obtenue avec la transfection précédente. Nous ne pouvons donc pas conclure à une augmentation du FRET, ni par conséquent à une augmentation de l'homodimérisation de l'APP...

III – Conclusions et perspectives

Le dispositif de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne résolue en temps a été développé pour être utilisé pour des problématiques biomédicales qui requièrent de hautes résolutions spatiales et temporelles. Durant cette thèse, nous avons essentiellement travaillé sur l'homodimérisation d'une protéine, l'APP, qui joue un rôle dans la formation des plaques séniles dans la maladie d'Alzheimer, et nous avons cherché à mesurer l'influence du cholestérol sur cette homodimérisation. Malheureusement, en cherchant à mettre en évidence un transfert de FRET entre CFP et YFP, nous n'avons pas réussi à obtenir de résultats concluants d'un point de vue biologique.

Cependant, toutes ces expériences ont permis d'améliorer grandement les performances de notre dispositif. Faire de l'imagerie de fluorescence résolue en temps de la CFP dans des échantillons vivants dans des conditions physiologiques nous a obligé à pousser notre dispositif à ses limites. En effet, il nous a fallu optimiser la puissance d'excitation et les temps d'acquisition pour ne pas être gênés par le photoblanchiment de cette protéine fluorescente. Le signal de fluorescence étant dans ces conditions assez faibles, nous avons dû travailler sur les paramètres d'acquisition pour obtenir des images en intensité et en durée de vie exploitables.

Notre système d'imagerie réalisant maintenant des performances intéressantes, nous devons dorénavant concentrer l'essentiel du travail sur les échantillons pour pouvoir mettre en évidence les phénomènes que nous souhaitons observer.

En premier lieu, nous émettons l'hypothèse que nous n'avons pas pu montrer du FRET jusqu'à présent à cause des conditions d'observation des échantillons. Pour l'instant, sur notre dispositif, nous ne disposons pas d'une enceinte thermostatée avec un contrôle de la concentration en dioxyde de carbone. Cette absence peut ralentir l'activité de la cellule et nous empêcher de voir les mécanismes cellulaires que nous voulons mettre en évidence. L'ajout d'une telle enceinte, qui est prévu, est une évolution indispensable à notre dispositif, d'autant plus si nous voulons pouvoir observer des neurones.

Une autre piste que nous allons suivre est l'utilisation du couple de fluorophores GFP/mCherry pour faire du FRET. Les neurobiologistes sont maintenant capables de produire des fragments d'ADN codant pour APP-GFP et APP-mCherry. En faisant des mesures de temps de vie de fluorescence sur la GFP pour mettre en évidence le FRET, nous travaillons dans des conditions beaucoup plus favorables : le signal de fluorescence est plus intense, cette protéine fluorescente souffre beaucoup moins du photoblanchiment. Une comparaison entre les couples CFP/YFP et GFP/mCherry pour la mise en évidence du FRET par FLIM a été réalisée [Tramier 2006] et arrive à la conclusion que la paire GFP/mCherry est plus adaptée.

En plus de l'utilisation de ce nouveau couple, les neurobiologistes ont réussi à modifier génétiquement l'APP pour que cette protéine s'homodimérise de manière plus « stable », en créant des liaisons supplémentaires et plus fortes (APP-GFP mutée).

		CCD			HRI	
Paramètre		Nombre d'images	Temps d'exposition (ms)	Gain (u.a.)	Largeur des portes (ps)	Gain (V)
Valeur	A9	10	250	0	800	600-700

Tableau 4-21 : valeurs des différents paramètres d'acquisition. Nous utilisons l'algorithme A9, et nous faisons varier la valeur du gain suivant le signal de fluorescence.

Nous avons réalisé des premières mesures préliminaires de temps de vie sur des cellules HEK-293 transfectées avec d'une part APP-GFP (toujours 1,5 μ g d'ADN par puits de transfection d'1 million de cellules), et d'autre part APP-GFP mutée (1,5 μ g aussi). Dans ces conditions, le signal de fluorescence étant plus important (nous excitions toujours avec une puissance moyenne inférieure à 500 μ W), nous avons besoin d'un gain pour l'intensificateur bien plus faible. Les autres paramètres d'acquisition restent les mêmes (tableau 4-21). Une image obtenue est reportée figure 4-19.

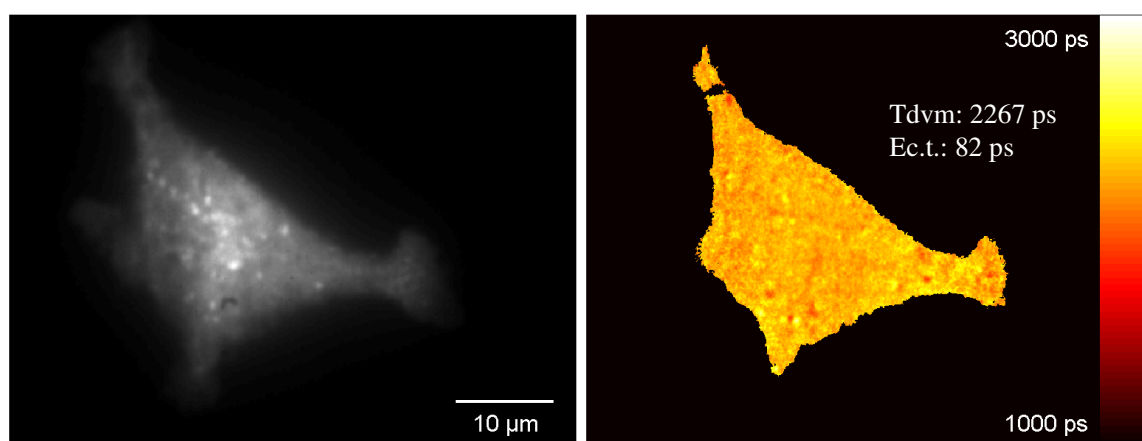


Figure 4-19 : images en intensité (à gauche) et en durée de vie (à droite) de fluorescence de la GFP d'une cellule HEK-293 transfectée avec APP-GFP.

Ainsi nous avons obtenu les premières valeurs de temps de vie de fluorescence de la GFP (tableaux 4-22 et 4-23). Le signal de fluorescence étant plus important, on constate pour chaque

image des écarts types plus faibles, inférieurs à 100 ps. Avec l'APP mutée ou non, nous obtenons quasiment les mêmes valeurs de temps de vie moyennes (respectivement 2340 ps et 2335 ps), avec une reproductibilité très intéressante. Ces temps de vie sont plus longs que ceux obtenus avec la CFP, ce qui posera peut être des problèmes pour faire de la RLD avec les portes de 4,8 ns possibles avec notre intensificateur.

APP-GFP			APP-GFP muté		
	Moyenne (ps)	Ecart type (ps)		Moyenne (ps)	Ecart type (ps)
Cellule 1	2323	83	Cellule 1	2299	110
Cellule 2	2314	70	Cellule 2	2294	112
Cellule 3	2267	82	Cellule 3	2311	181
Cellule 4	2353	248	Cellule 4	2326	101
Cellule 5	2356	89	Cellule 5	2376	146
Cellule 6	2285	83	Cellule 6	2405	75
Cellule 7	2362	138	Cellule 7	2342	73
Cellule 8	2385	72	Cellule 8	2353	121
Cellule 9	2407	83	Cellule 9	2343	106
Cellule 10	2338	125	Cellule 10	2338	99
Cellule 11	2351	109	Cellule 11	2321	137
Cellule 12	2340	109	Cellule 12	2312	81
Moyenne	2340		Moyenne	2335	
Ecart type	39		Ecart type	32	

A gauche : Tableau 4-20 : mesures de temps de vie de fluorescence de la GFP dans 12 cellules transfectées avec APP-GFP.

A droite : Tableau 4-21 : mesures de temps de vie de fluorescence de la GFP dans 12 cellules transfectées avec APP-GFP mutée.

Ensuite, si nous n'obtenons pas de résultats satisfaisants avec ce nouveau couple et cette mutation, il faudra revoir l'approche que nous avons mise en place pour cette problématique.

Pour mettre en évidence cette homodimérisation de l'APP, il peut être envisageable de faire des mesures en anisotropie de fluorescence plutôt qu'en FRET. Il semble d'ailleurs dans la littérature que cette technique soit répandue pour observer les phénomènes d'homodimérisation [Tramier 2008].

Comme nous souhaitons apprécier l'influence du cholestérol sur la production du peptide amyloïde, une autre solution pourrait être d'essayer de montrer non pas l'homodimérisation de l'APP, mais l'hétérodimérisation de l'APP avec les enzymes (les β - et γ - secrétases) responsables de son clivage. En marquant l'APP et l'enzyme avec deux fluorophores d'un couple FRET, il est envisageable de mettre en évidence une augmentation de cette hétérodimérisation due à l'ajout de cholestérol par une baisse du temps de vie de fluorescence du donneur du couple FRET.

Enfin, pour clore ce chapitre, nous présentons les premières images que nous avons réalisées avec notre dispositif sur des cellules nerveuses de l'hippocampe (zone principalement touchée par la maladie d'Alzheimer), obtenues à partir d'embryons de rate gestante (figure 4-20). Le prélèvement et la culture primaire de neurones se fait à l'Institut Curie dans l'équipe de Sandrine Humbert. Les neurones ont été mis en contact avec de la Cholera toxin (toxine Cholérique en français) marquée à l'Alexa 488 (maximum d'excitation à 495 nm et maximum d'émission à 519 nm). En TIRF, nous distinguons précisément les axones et les dendrites, et nous sommes capables de mesurer les temps de vie de fluorescence sur ces structures fines. Tout ceci est très encourageant pour la suite !

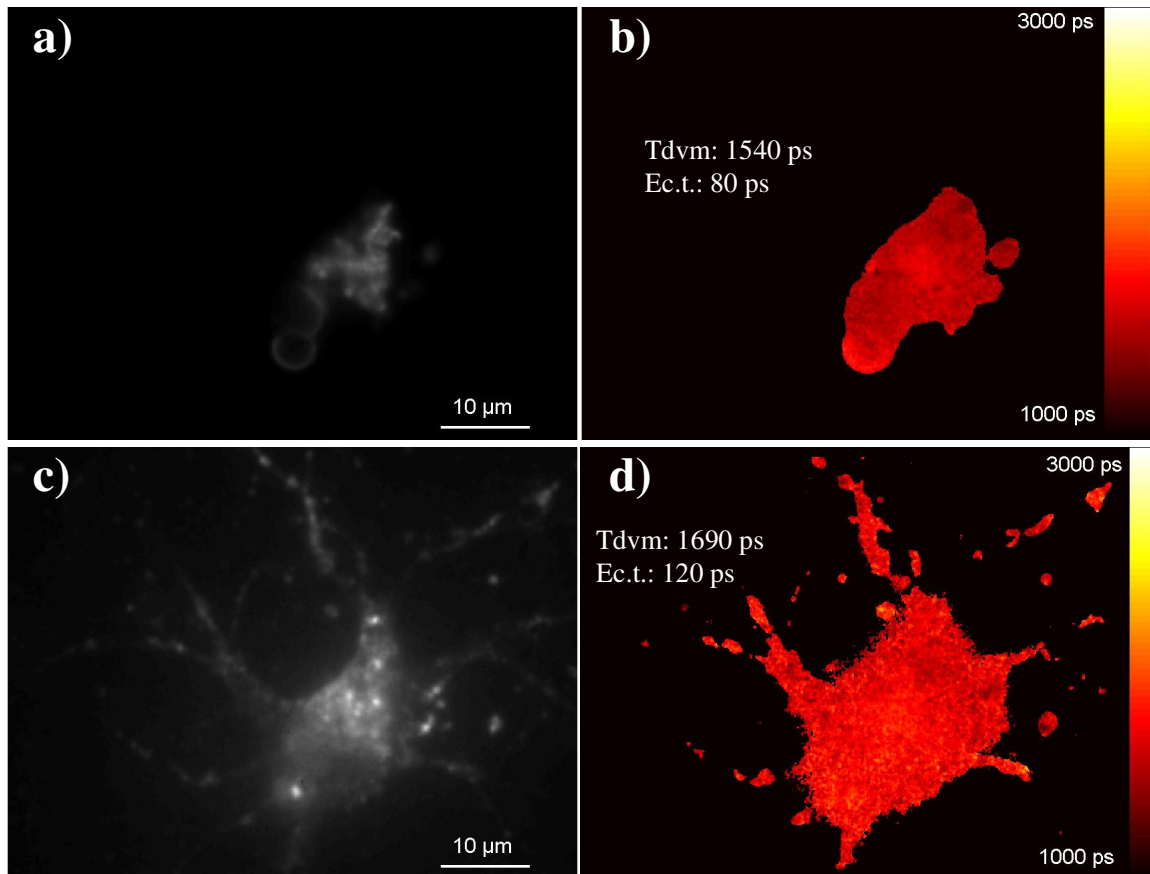


Figure 4-20 : images en intensité (a,c) et carte des temps de vie (b,d) d'un neurone en présence de toxine Cholérique marquée à Alexa 488. Comparaison des résultats obtenus en épifluorescence (a,b) et en TIRF (b,d). Images obtenues par Viviane Devauges.

Conclusion

L'objectif de ce travail était de faire de l'imagerie de fluorescence résolue en temps, avec une technique d'imagerie en champ large qui permette d'avoir une résolution axiale comparable à la résolution de la microscopie confocale. Nous souhaitions que ce dispositif ne limite pas l'utilisateur dans le choix des fluorophores, et qu'il puisse être utilisé pour des applications biomédicales diverses. Ce manuscrit rapporte les choix technologiques que nous avons faits et les développements réalisés pour parvenir à construire un tel dispositif d'imagerie dans son intégralité.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au dispositif d'excitation de la fluorescence nécessaire à la mesure de temps de vie de fluorescence. Nous avons opté pour une solution basée sur une source laser impulsionnelle émettant dans l'infrarouge et élargie spectralement par des effets non linéaires dans une fibre optique, pour couvrir un spectre large et permettre d'exciter des fluorophores variés. L'oscillateur laser devait répondre aux contraintes temporelles (impulsions ps, cadence de quelques MHz) imposées par la mesure de temps de vie dans le domaine temporel, et émettre à une longueur d'onde qui permette un élargissement important dans le domaine visible. Nous avons donc construit une source laser impulsionnelle (impulsions de 8,8 ps) solide pompée par diode avec verrouillage des modes en phase passif, émettant à 914 nm. Mais malheureusement sa puissance moyenne trop faible (87 mW) ne nous a pas permis de l'utiliser pour générer un spectre large. Nous avons alors utilisé une autre source infrarouge développée par l'équipe, émettant des impulsions de 15 ps à une cadence de 4 MHz à une longueur d'onde de 1064 nm, pour générer de nouvelles longueurs d'ondes par effets non linéaires dans des fibres optiques microstructurées. Ces fibres hautement biréfringentes, conçues par les chercheurs du XLim, avaient une géométrie de cœur particulière, qui modifiait le guidage et le profil de dispersion. Ainsi, un effet non linéaire particulier, le mélange à quatre ondes intermodal était privilégié, et initiait l'élargissement spectral. Là aussi nous avons obtenu des résultats intéressants, mais cette source n'était pas assez robuste pour être utilisée en l'état sur un montage d'imagerie. Au même moment, une source commerciale supercontinuum, basée sur une architecture comparable (un oscillateur impulsionnel infrarouge injecté dans une fibre hautement non linéaire) et avec des caractéristiques en accord avec notre application est arrivée sur le marché. Nous nous la sommes par conséquent procurée, l'avons caractérisée spectralement, temporellement, pour cerner son comportement et pour pouvoir l'utiliser comme source d'excitation sur le montage de microscopie.

En parallèle, nous avons développé un dispositif d'imagerie résolue en temps. Pour pouvoir faire de l'imagerie en champ large avec une résolution axiale convenable, nous avons choisi de nous intéresser à la technique de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne (ou TIRF). Ainsi, en utilisant un objectif à forte ouverture numérique, nous avons été capables d'exciter le champ évanescent à l'interface entre la lamelle et l'échantillon, et ainsi d'atteindre une résolution axiale sublongueur d'onde. Pour réaliser les mesures de temps de vie de fluorescence, nous avons associé cette technique à un système de détection déclenché utilisant un intensificateur relayé optiquement sur une caméra. Nous avons caractérisé ce dispositif d'imagerie avec des échantillons non biologiques (mire, billes de latex fluorescentes, solutions de colorants), pour connaître d'une part les résolutions spatiales accessibles, mais aussi l'influence des différents paramètres de détection (temps d'intégration, nombre d'images, algorithme) sur la mesure de

temps de vie de fluorescence. Nous avons ensuite confronté ce dispositif à des échantillons biologiques : nous avons observé des cellules HEK-293, marquées avec des fluorophores variés (GFP, CFP, YFP, mCherry), pour valider l'accordabilité conférée au système par la source supercontinuum.

Enfin, nous avons utilisé les spécificités de ce montage pour tenter de répondre à une problématique biomédicale. En partenariat avec des neurobiologistes de l'ESPCI, nous nous sommes intéressés à l'influence du cholestérol sur une protéine impliquée dans la maladie d'Alzheimer. La résolution axiale de notre dispositif nous a permis d'imager uniquement la membrane, pour chercher à mettre en évidence un transfert de FRET par une diminution du temps de vie de fluorescence du donneur. Des problèmes expérimentaux, tels que le photoblanchiment, nous ont poussé à améliorer notre dispositif pour réaliser des mesures de temps de vie interprétables sur des cellules dans des conditions physiologiques.

Au final, nous disposons maintenant d'un dispositif d'imagerie performant : nous pouvons mesurer les temps de vie de fluorescence de fluorophores variés, excitables à partir de 450 nm et ayant des temps de vie jusqu'à 20 ps, et localisés dans la membrane cellulaire. De plus, notre montage commence véritablement à être valorisé par les applications neurobiologiques que nous avons développées. Les premiers résultats obtenus sur les échantillons biologiques ne nous ont pas permis de conclure, mais ils sont encourageants concernant la capacité de ce système à réaliser rapidement des mesures de temps de vie dans des conditions physiologiques. Il reste cependant certaines améliorations à apporter à ce dispositif pour en faire un outil de routine, dont tous les aspects soient maîtrisés. Ce développement va continuer, pour pouvoir notamment mesurer et maîtriser la profondeur de pénétration du champ évanescent, exploiter les propriétés particulières de polarisation du champ évanescent, ou encore réduire le temps d'acquisition et de traitement nécessaire à l'obtention d'une carte de temps de vie de fluorescence. Et bien entendu, il reste un gros travail au niveau des applications en collaboration avec les neurobiologistes qui, grâce à ce montage TIRFLIM peuvent étudier des processus membranaires auxquels aucun autre dispositif d'imagerie ne leur donne accès.

Bibliographie

[Aalten 2007] P. Aalten, F. Verhey, M. Boziki, R. Bullock, E. Byrne, V. Camus, M. Caputo, D. Collins, P. De Deyn, K. Elina, G. Frisoni, C. Holmes, C. Hurt, A. Marriott, P. Mecocci, F. Nobili, P. Ousset, E. Reynish, E. Salmon, M. Tsolaki, B. Vellas, P. Robert, “Neuropsychiatric syndromes in dementia: results from the European Alzheimer Disease Consortium: part I”, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **24**, p 457-463.

[Aalten 2008] P. Aalten, F. Verhey, M. Boziki, R. Bullock, E. Byrne, V. Camus, M. Caputo, D. Collins, P. De Deyn, K. Elina, G. Frisoni, C. Holmes, C. Hurt, A. Marriott, P. Mecocci, F. Nobili, P. Ousset, E. Reynish, E. Salmon, M. Tsolaki, B. Vellas, P. Robert, “Consistency of neuropsychiatric syndromes across dementia; results from the European Alzheimer Disease Consortium, part II”, *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **25**, p 1-8.

[Abney 1992] J. Abney, B. Scalettar, N. Thompson, “Evanescent interference patterns for fluorescence microscopy”, *Biophysical Journal* **61**, p542-552.

[Agrawal 1995] G. Agrawal, *Nonlinear fiber optics*, 2nd edition, édition Academic Pr.

[Agronskaia 2003] A. Agronskaia, L. Tertoolen, H. Gerritsen, “High frame rate fluorescence lifetime imaging”, *Journal of Physics D: Applied Physics* **36**, p 1655-1662.

[Allersma 2006] M. Allersma, M. Bittner, D. Axelrod, R. Holz, “Motion matters: secretory granule motion adjacent to the plasma membrane and exocytosis”, *Molecular Biology of the Cell* **17**, p 2424-2438.

[Alzheimer 1906] A. Alzheimer, “Über einen eigenartigen schweren Erkrankungsprozeß der Hirnrinde”, *Neurologisches Centralblatt* **23**, p 1129–1136.

[Ambrose 1961] E. Ambrose, “The movement of fibrocytes”, *Experimental Cell Research* **8**, p 54-73.

[Atkins 2004] P.W. Atkins, J. De Paula, *Chimie Physique*, édition De Boeck Université.

[Auksoorius 2008] E. Auksoorius, B. Boruah, C. Dunsby, P. Lanigan, G. Kennedy, M. Neil, P. French, “Stimulated emission depletion microscopy with a supercontinuum source and fluorescence lifetime imaging”, *Optics Letters* **33**, p 113-115.

[Axelrod 1981] D. Axelrod, “Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence”, *Journal of Cell Biology* **89**, p 141-145.

[Axelrod 1984] D. Axelrod, T. Burghardt, N. Thompson, “Total internal reflection fluorescence”, *Annual Review of Biophysics and Bioengineering* **13**, p247-268.

[Axelrod 2001] D. Axelrod, “Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology”, *Traffic* **2**, p764-774.

[Axelrod 2005] D. Axelrod, M. Davidson, “Total internal reflection fluorescence microscopy: Introduction and theoretical aspects”,
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/tirf/tirfintro.html>

- [Baldeck 1987] P. Baldeck, R. Alfano, "Intensity effects on the stimulated four photon spectra generated by picosecond pulses in optical fibers", *Journal of Lightwave Technology* **LT-5**, p 1712-1715.
- [Balembois 2003] F. Balembois, cours de Physique des Lasers de deuxième année de l'Ecole Supérieure d'Optique.
- [Ballew 1989] R. Ballew, J. Demas, "An error analysis of the rapid lifetime determination method for the evaluation of single exponential decays", *Analytical Chemistry* **61**, p 30-33.
- [Banerjee 2004] P. Banerjee, *Nonlinear optics: theory, numerical modelling, and applications*, edition Marcel Dekker Inc.
- [Barad 1997] Y. Barad, H. Eisenberg, M. Horowitz, Y. Silberberg, "Nonlinear scanning laser microscopy by third harmonic generation", *Applied Physics Letters* **70**, p 922-924.
- [Barnes 2003] W. Barnes, A. Dereux, T. Ebbesen, "Surface plasmon subwavelength optics", *Nature* **424**, p 824-830.
- [Barzda 2001] V. Barzda, C. de Grauw, J. Vroom, F. Kleima, R. VanGrondelle, H. VanAmerongen, H. Gerritsen, "Fluorescence lifetime heterogeneity in aggregates of LHCII revealed by timeresolved microscopy", *Biophysical Journal* **81**, p 538-546.
- [Beauregard 1972] O. Costa de Beauregard, "La réflexion totale comme filtre d'états de polarisation", *Nouvelle Revue d'Optique Appliquée* **3**, p191-197.
- [Becherer 2003] U. Becherer, T. Moser, W. Stühmer, M. Oheim, "Calcium regulates exocytosis at the level of single vesicles", *Nature Neuroscience* **6**, p 846-853.
- [Becker 2004] W. Becker, A. Bergmann, M. Hink, K. König, K. Benndorf, C. Biskup, "Fluorescence lifetime imaging by time-correlated single-photon counting", *Microscopy Research and Technique* **63**, p 58-66.
- [Becquerel 1859] H. Becquerel, *Recherches sur les divers effets lumineux qui résultent de l'action de la lumière sur les corps*, édition Mallet Bachelier.
- [Behne 2002] M. Behne, J. Meyer, K. Hanson, N. Barry, S. Murata, D. Crumrine, R. Clegg, E. Gratton, W. Holleran, P. Elias, "NHE1 regulates the stratum corneum permeability barrier homeostasis. Microenvironment acidification assessed with fluorescence lifetime imaging", *Journal of Biological Chemistry* **277**, p 47399-47406.
- [Berney 2003] C. Berney, G. Danuser, "FRET or no FRET: a quantitative comparison", *Biophysical Journal* **84**, p 3992-4010.
- [Betzig 2006] E. Betzig, G. Patterson, R. Sougrat, O. Lindwasser, S. Olenych, J. Bonifacino, M. Davidson, J. Lippincott-Schwartz, H. Hess, "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution", *Science* **313**, p 1642-1645.
- [Bewersdorf 1998] J. Bewersdorf, R. Pick, S. Hell, "Multifocal multiphoton microscopy", *Optics Letters* **23**, p 655-657.
- [Blandin 2006] P. Blandin, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, S. Lévêque-Fort, M. Fontaine-Aupart, "Diode-pumped passively mode-locked Nd:YVO4 laser at 914 nm", *Optics Letters* **31**, p 214-216.
- [Blandin 2008] P. Blandin, F. Druon, M. Hanna, S. Lévêque-Fort, C. Lesvigne, V. Couderc, P. Leproux, A. Tonello, P. Georges, "Picosecond polarized supercontinuum generation controlled by intermodal four-wave mixing for fluorescence lifetime imaging microscopy", *Optics Express*, papier accepté.

- [Böhmer 2001] M. Böhmer, F. Pampaloni, M. Wahl, H. Rahn, R. Erdmann, J. Enderlein, "Time-resolved confocal scanning device for ultrasensitive fluorescence detection", *Review of Scientific Instruments* **72**, p 4145-4152.
- [Born 1975] M. Born, E. Wolf, *Principles of optics*, edition Pergamon Press.
- [Boselec 2002] Boston Electronics Corporation, "What is time correlated single photon counting?", brochure présentant cette technique sur matériel Becker & Hickl.
- [Broderick 1999] N. Broderick, T. Monro, P. Bennett, D. Richardson, "Nonlinearity in holey optical fibers: measurement and future opportunities", *Optics Letters* **24**, p 1599-1601.
- [Brossel 1952] J. Brossel, A. Kastler, J. Winter, "Création optique d'une inégalité de population entre les sous-niveaux Zeeman de l'état fondamental des atomes", *Le Journal de Physique et le Radium* **13**, p 668-668.
- [Bruchez 1998] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels", *Science* **281**, p 2013-2016.
- [Bruno 2008] A. Bruno, M. Alfè, A. Ciajolo, C. de Lisio, P. Minutolo, "Time-resolved fluorescence polarization anisotropy of multimodal samples: the asphaltene case", *Applied Physics B* **90**, p 61-67.
- [Buist 1997] A. Buist, M. Müller, E. Gijssbers, G. Brakenhoff, T. Sosnowski, T. Norris, J. Squier, "Double-pulse fluorescence lifetime measurements", *Journal of Microscopy* **186**, p 212-220.
- [Burmeister 1998] J. Burmeister, L. Olivier, W. Reichert, G. Truskey, "Application of total internal reflection fluorescence microscopy to study cell adhesion to biomaterials", *Biomaterials* **19**, p 307-325.
- [Byun 2007] K. Byun, S. Yoon, D. Kim, S. Kim, "Experimental study of sensitivity enhancement in surface plasmon resonance biosensors by use of periodic metallic nanowires", *Optics Letters* **32**, p 1902-1905.
- [Castaing 2007] M. Castaing, E. Herault, F. Balembois, P. Georges, C. Varona, P. Loiseau, G. Aka, "Diode-pumped Nd:YAG laser emitting at 899 nm and below", *Optics Letters* **32**, p 799-801.
- [Castaing 2008] M. Castaing, F. Balembois, P. Georges, T. Georges, K. Schaffers, J. Tassano, "Diode-pumped Nd:YVO₄/Yb:S-FAP laser emitting at 985 and 492.5 nm", *Optics Letters* **33**, p 1234-1236.
- [Chalfie 1994] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. Ward, D. Prasher, "Green Fluorescent Protein as a marker for gene expression", *Science* **263**, p 802-805.
- [Chan 2001] S. Chan, Z. Fuller, J. Demas, B. DeGraff, "Optimized gating scheme for rapid lifetime determinations of single-exponential luminescence lifetimes", *Analytical Chemistry* **73**, p 4486-4490.
- [Chen 2004] Y. Chen, A. Periasamy, "Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization", *Microscopy Research and Technique* **63**, p 72-80.
- [Coen 2001] S. Coen, A. Chau, R. Leonhardt, J. Harvey, J. Knight, W. Wadsworth, P. Russell, "White-light supercontinuum generation with 60-ps pump pulses in a photonic crystal fiber", *Optics Letters* **26**, p 1356-1358.
- [Coen 2002] S. Coen, A. Chau, R. Leonhardt, J. Harvey, J. Knight, W. Wadsworth, P. Russell, "Supercontinuum generation by stimulated Raman scattering and parametric four-wave mixing in photonic crystal fibers", *Journal of the Optical Society of America* **19**, p 753-764.

- [Coherent 2004] Coherent Inc, “Chameleon: widely tunable, hands-free, modelocked Ti:Sapphire lasers”, http://www.coherent.de/fileadmin/redakteur/pdf/Chameleon_XR.pdf.
- [Cole 2000] M. Cole, *Fluorescence Lifetime Imaging for Biomedical Applications*, University of London Imperial college of Science, Technology and Medicine.
- [Cole 2001] M. Cole, J. Siegel, S. Webb, R. Jones, K. Dowling, M. Dayel, D. Parsons-Karavassilis, P. French, M. Lever, L. Sucharov, M. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson, “Time-domain whole-field fluorescence lifetime imaging with optical sectioning”, *Journal of Microscopy* **203**, p 246-257.
- [Conchello 2005] J. Conchello, J. Lichtman, “Optical sectioning microscopy”, *Nature Methods* **2**, p 920-931.
- [Conibear 2000] P. Conibear, C. Bagshaw, “A comparison of optical geometries for combined flash photolysis and total internal reflection fluorescence microscopy”, *Journal of Microscopy* **200**, p 218-229.
- [Connelly 2001] J. Connelly, S. Botchway, L. Kunz, D. Pattison, A. Parker, A. MacRobert, “Time-resolved fluorescence imaging of photosensitizer distributions in mammalian cells using a picosecond laser line-scanning microscope”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A* **142**, p 169-175.
- [Cox 2004] G. Cox, C. Sheppard, “Practical limits of resolution in confocal and non-linear microscopy”, *Microscopy Research and Technique* **63**, p 18-22.
- [Crystal Fibre 2008] Crystal Fibre A/S, “Non linear Photonic Crystal Fibers /Supercontinuum”, <http://www.crystal-fibre.com/products/nonlinear.shtm>
- [Cubeddu 1993] R. Cubeddu, G. Canti, P. Taroni, G. Valentini, “Time-gated fluorescence imaging for the diagnosis of tumors in a murine model”, *Photochemistry and Photobiology*, **57**, p 480-485.
- [Cubeddu 1999] R. Cubeddu, A. Pifferi, P. Taroni, A. Torricelli, G. Valentini, F. Rinaldi, E. Sorbellini, “Fluorescence lifetime imaging: an application to the detection of skin tumors”, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **5**, p 923-929.
- [Cubeddu 2002] R. Cubeddu, D. Comelli, C. D’Andrea, P. Taroni, G. Valentini, “Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine”, *Journal of Physics D: Applied Physics* **35**, p R61-R76.
- [Czeranowsky 2002] C. Czeranowsky, M. Schmidt, E. Heumann, G. Huber, S. Kutovoi, Y. Zavartsev, “Continuous wave diode pumped intracavity doubled Nd: GdVO₄ laser with 840 mW output power at 456 nm”, *Optics Communications* **205**, p 361-365.
- [Dahan 2001] M. Dahan, T. Laurence, F. Pinaud, D. Chemla, A. Alivisatos, M. Sauer, S. Weiss, “Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots”, *Optics Letters* **26**, p 825-827.
- [Delaère 1991] P. Delaère, C. Duickaerts, Y. He, F. Piette, J. Hauw, “Subtypes and differential laminar distributions of β A4 deposits in Alzheimer’s disease: relationship with the intellectual status of 26 cases”, *Acta Neuropathologica* **81**, p 328-335.
- [Delanoë-Ayari 2004] H. Delanoë-Ayari, R. Al Kurdi, M. Vallade, D. Gulino-Debrac, D. Riveline, “Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins”, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, p 2229-2234.
- [Delsart 2008] C. Delsart, *Lasers et optique non linéaire*, cours de Physique des Lasers, édition Ellipses.
- [Deniset-Besseau 2007] A. Deniset-Besseau, S. Lévêque-Fort, M. Fontaine-Aupart, G. Roger, P. Georges, “Three-dimensional time-resolved fluorescence imaging by multifocal multiphoton microscopy for a photosensitizer study in living cells”, *Applied Optics* **46**, p 8045-8051.

- [Deniset-Besseau 2008] A. Deniset-Besseau, Thèse de doctorat de l'Université Paris XI, "Imagerie 3D résolue en temps pour l'aide au diagnostic médical : développement d'un système de microscopie de fluorescence multipoints sous excitation à deux photons".
- [Denk 1990] W. Denk, J. Strickler, W. Webb, "Two-photon laser scanning fluorescence microscopy", *Science* **248**, p 73-76.
- [Dickson 1996] R. Dickson, D. Norris, Y. Tzeng, W. Moerner, "Three-dimensional imaging of single molecules solvated in pores of poly(acrylamide) gels", *Science* **274**, p 966-969.
- [Dowling 1997] K. Dowling, S. Hyde, J. Dainty, P. French, J. Hares, "2-D fluorescence lifetime imaging using a time-gated image intensifier", *Optics Communications* **135**, p 27-31.
- [Druon 2001] F. Druon, Thèse de doctorat de l'Université Paris XI, "Nouvelles sources laser d'impulsions brèves pompées par diode".
- [Dudley 2002] J. Dudley, L. Provino, N. grossard, H. Maillotte, R. Windeler, B. Eggleton, S. Coen, "Supercontinuum generation in air-silica microstructured fibers with nanosecond and femtosecond pulse pumping", *Journal of the Optical Society of America B* **19**, p 765-771.
- [Dudley 2006] J. Dudley, G. Genty, S. Coen, "Supercontinuum generation in photonic crystal fiber", *Reviews of Modern Physics* **78**, p 1135-1184.
- [Duncan 1982] M. Duncan, J. Reintjes, T. Manuccia, "Scanning coherent anti-Stokes Raman microscope", *Optics Letters* **7**, p 350-352.
- [Duyckaerts 2003] C. Duyckaerts, D. Dickson, Chapitre "Neuropathology of Alzheimer's disease" (p 47-65) de l'ouvrage *Neurodegeneration: the molecular pathology of dementia and movement disorders*, édition Neuropath Press.
- [Dyba 2002] M. Dyba, S. Hell, "Focal spots of size $\lambda/23$ open up far-field fluorescence microscopy at 33 nm axial resolution", *Physical Review Letters* **88**, article 163901.
- [Economou 1969] E. Economou, "Surface plasmons in thin films", *Physical Review* **182**, p 539-554.
- [Egner 2004] A. Egner, S. Verrier, A. Goroshkov, H. Söling, S. Hell, "4Pi-microscopy of the Golgi apparatus in live mammalian cells", *Journal of Structural Biology* **147**, p 70-76.
- [Egner 2005] A. Egner, S. Hell, "Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections", *TRENDS in Cell Biology* **15**, p207-215.
- [Egner 2007] A. Egner, C. Geisler, C. Von Middendorff, H. Bock, D. Wenzel, R. Medda, M. Andresen, A. Stiel, S. Jakobs, C. Eggeling, A. Schönle, S. Hell, "Fluorescence nanoscopy in whole cells by asynchronous localization of photoswitching emitters", *Biophysical Journal* **93**, p 3285-3290.
- [Elangovan 2002] M. Elangovan, R. Day, A. Periasamy, "Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell", *Journal of Microscopy* **205**, p 3-14.
- [Elangovan 2003] M. Elangovan, H. Wallrabe, Y. Chen, R. Day, M. Barroso, A. Periasamy, "Characterization of one- and two-photon excitation fluorescence resonance energy transfer microscopy", *Methods* **29**, p 58-73.

- [Elson 2002] D. Elson, J. Siegel, S. Webb, S. Lévêque-Fort, M. Lever, P. French, K. Lauritsen, M. Wahl, R. Erdmann, "Fluorescence lifetime system for microscopy and multiwell plate imaging with a blue picosecond diode laser", *Optics Letters* **27**, p 1409-1411.
- [Eustache 2006] F. Eustache, B. Giffard, G. Rauchs, G. Chetelat, P. Piolino, B. Desgranges, "Alzheimer's disease and human memory", *Revue Neurologique* **162**, p 929-939.
- [Evenett 2006] P. Evenett, "Principles of light microscopy", présentation à l'école d'été Nanobio à Cargèse.
- [Fianium 2008] site de la société Fianium, <http://www.fianium.com/products.htm>.
- [Fiolka 2008] R. Fiolka, Y. Belyaev, H. Ewers, A. Stemmer, "Even illumination in total internal reflection fluorescence microscopy using laser light", *Microscopy Research and Technique* **71**, p 45-50.
- [Forget 2003] S. Forget, Thèse de doctorat de l'Université Paris XI, "Source laser picoseconde à haute cadence dans l'ultraviolet".
- [Förster 1948] T. Förster, "Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz", *Annalen der Physik* **437**, p 55-75.
- [Fragola 2003] A. Fragola, Thèse de doctorat de l'Université Paris VI, "Microscopie de fluorescence en champ proche sans ouverture : applications en physique et en biologie".
- [Frank 2007] J. Frank, A. Elder, J. Swartling, A. Venkitaraman, A. Jeyasekharan, C. Kaminski, "A white light confocal microscope for spectrally resolved multidimensional imaging", *Journal of Microscopy* **227**, p 203-215.
- [Fratiglioni 2004] L. Fratiglioni, S. Paillard Borg, B. Winblad, "An active and socially integrated lifestyle in late life might protect against dementia", *Lancet Neurology* **3**, p 343-353.
- [Freund 1986] I. Freund, M. Deutsch, "Second harmonic microscopy of biological tissue", *Optics Letters* **11**, p 94-96.
- [FRM 2006] Fondation de la Recherche Médicale, "Le point sur la maladie d'Alzheimer", *Recherche et Santé* **105**, <http://www.frm.org/nos-dossiers/fiches-sante/le-point-sur-la-maladie-dalzheimer-3.htm>.
- [Gardeazábal Rodríguez 2008] P. Gardeazábal Rodríguez, E. Sepulveda, B. Dubertret, V. Lorient, "Axial coding in full-field microscopy using three-dimensional structured illumination implemented with no moving parts", *Optics Letters* **33**, p 1617-1619.
- [Gaft 2005] M. Gaft, R. Reisfeld, G. Panczer, Introduction du livre *Modern Luminescence Spectroscopy of Minerals and Materials*, edition Springer.
- [Garini 2005] Y. Garini, B. Vermolen, I. Young, "From micro to nano : recent advances in high-resolution microscopy", *Current Opinion in Biotechnology* **16**, p 3-12.
- [Gaviola 1926] Z. Gaviola, "Ein Fluorometer, Apparat zur Messung von Fluoreszenzabklingungszeiten", *Zeitschrift für Physik* **42**, p 853-861.
- [Geisler 2007] C. Geisler, A. Schönle, C. Von Middendorff, H. Bock, C. Eggeling, A. Egner, S. Hell, "Resolution of $\lambda/10$ in fluorescence microscopy using fast single molecule photo-switching", *Applied Physics A* **88**, p 223-226.
- [Georges 2004] P. Georges, Cours "Lasers solides pompés par diode", et "Lasers femtosecondes". de troisième année de l'Ecole Supérieure d'Optique.

- [Gerhard 2006] C. Gerhard, F. Druon, P. Georges, V. Couderc, P. Leproux, “Stable mode-locked operation of a low repetition rate diode-pumped Nd:GdVO₄ laser by combining quadratic polarisation switching and a semiconductor saturable absorber mirror”, *Optics Express* **14**, p 7093-7098.
- [Gerritsen 1997] H. Gerritsen, R. Sanders, A. Draaijer, C. Ince, Y. Levine, “Fluorescence lifetime imaging of oxygen in living cells”, *Journal of Fluorescence* **7**, p 11-15.
- [Glenner 1984] G. Glenner, C. Wong, “Alzheimer’s disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein”, *Biochemical and Biophysical Research Communication* **120**, p 885-890.
- [Goodman 1996] J.W. Goodman, *Introduction to Fourier optics, second edition*, édition McGraw-Hill.
- [Göppert-Mayer 1931] M. Göppert-Mayer, “Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen“, *Annalen der Physik* **401**, p 273-294.
- [Gouvernement 2007] Portail du Gouvernement, “Le plan Alzheimer 2008-2012”, http://www.premier-ministre.gouv.fr/chantiers/sante_1113/plan_alzheimer_2008_2012_1117/
- [Graham 1977] F. Graham, J. Smiley, W. Russell, R. Nairn, “Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5”, *Journal of General Virology* **36**, p 59-74.
- [Grailhe 2006] R. Grailhe, F. Merola, J. Ridard, S. Couvignou, C. Le Poupon, J. Changeux, H. Laguitton-Pasquier, “Monitoring protein interactions in the living cell through the fluorescence decays of the cyan fluorescent protein”, *Chemphyschem* **7**, p 1442-1454.
- [Grant 2005] D. Grant, D. Elson, D. Schimpf, C. Dunsby, J. Requejo-Isidro, E. Auksoorius, I. Munro, M. Neil, P. French, E. Nye, G. Stamp, P. Courtney, “Optically sectioned fluorescence lifetime imaging using a Nipkow disk microscope and a tunable ultrafast continuum excitation source”, *Optics Letters* **30**, p 3353-3355.
- [Guillon 2008] M. Guillon, K. Dholakia, D. McGloin, “Optical trapping and spectral analysis of aerosols with a supercontinuum laser source”, *Optics Express* **16**, p 7655-7664.
- [Guiot 2001] E. Guiot, Thèse de doctorat de l’Université Paris XI, “Microscopie de fluorescence par excitation à deux photons : application à des études de corrélation et de déclins de fluorescence dans les milieux biologiques”.
- [Gustafsson 1995] M. Gustafsson, D. Agard, J. Sedat, “Sevenfold improvement of axial resolution in 3D widefield microscopy using two objective lenses”, *Proceeding SPIE* **2412**, p 147-156.
- [Gustafsson 1996] M. Gustafsson, D. Agard, J. Sedat, “3D widefield microscopy with two objective lenses: experimental verification of improved axial resolution”, *Proceeding SPIE* **2655**, p 62-66.
- [Gustafsson 1999] M. Gustafsson, D. Agard, J. Sedat, “T⁵M: 3D widefield light microscopy with better than 100nm axial resolution”, *Journal of Microscopy* **195**, p 10-16.
- [Gustafsson 1999] M. Gustafsson, “Extended resolution fluorescence microscopy”, *Current Opinion in Structural Biology* **9**, p 627-634.
- [Gustafsson 2000] M. Gustafsson, “Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy”, *Journal of Microscopy* **198**, p 82-87.

- [Gustafsson 2005] M. Gustafsson, "Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, p 13081-13086.
- [Haeberlé 2006] O. Haeberlé, "Improving the resolution in fluorescence microscopy", présentation à l'école d'été Nanobio à Cargèse.
- [Hamamatsu 2006] Hamamatsu Photonics K.K., "EM-CCD technical note".
- [Harrick 1973] N. Harrick, G. Loeb, "Multiple internal reflection fluorescence spectrometry", *Analytical Chemistry* **45**, p 687-691.
- [He 2006] R. He, G. Chang, H. Wu, C. Lin, K. Chiu, Y. Su, S. Chen, "Enhanced live cell membrane imaging using surface plasmon-enhanced total internal reflection fluorescence microscopy", *Optics Express* **14**, p 9307-9316.
- [Hecht 2002] *Optique, 4^{ème} édition*, édition Pearson Education.
- [Heintzmann 2006] R. Heintzmann, G. Ficz, "Breaking the resolution limit in light microscopy", *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* **5**, p 289-301.
- [Hell 1992] S. Hell, E. Stelzer, "Properties of a 4Pi confocale fluorescence microscope", *Journal of the Optical Society of America A* **9**, p 2159-2166.
- [Hell 1994] S. Hell, E. Stelzer, S. Lindek, C. Cremer, "Confocal microscopy with an increased detection aperture type-B 4Pi confocal microscopy", *Optics Letters* **19**, p 222-224.
- [Hell 1994] S. Hell, J. Wichmann, "Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy", *Optics Letters* **19**, p 780-782.
- [Hell 1996] S. Hell, K. Bahlmann, M. Schrader, A. Soini, H. Malak, I. Gryczynski, J. Lakowicz, "Three-photon excitation in fluorescence microscopy", *Journal of Biomedical Optics* **1**, p 71-74.
- [Hell 2004] S. Hell, M. Dyba, S. Jakobs, "Concepts for nanoscale resolution in fluorescence microscopy", *Current Opinion in Neurobiology* **14**, p 599-609.
- [Hell 2007] S. Hell, "Far-field optical nanoscopy", *Science* **316**, p1153-1158.
- [Hell 2008] Site web *Department of NanoBiophotonics, Max Planck Society*, <http://www.mpibpc.gwdg.de/groups/hell/>
- [Hellen 1987] E. Helle, D. Axelrod, "Fluorescence emission at dielectric and metal-film interfaces", *Journal of the Optical Society of America B* **4**, p 337-350.
- [Helmchen 2005] F. Helmchen, W. Denk, "Deep tissue two-photon microscopy", *Nature Methods* **2**, p 932-940.
- [Herault 2005] E. Herault, F. Balembois, P. Georges, "491 nm generation by sum-frequency mixing of diode pumped neodymium lasers", *Optics Express* **13**, p 5653-5661.
- [Herault 2006] E. Herault, F. Balembois, P. Georges, "Nd:GdVO₄ as a three-level laser at 879 nm", *Optics Letters* **31**, p 2731-2733.
- [Herault 2007] E. Herault, Thèse de doctorat de l'Université Paris XI, "Nouveaux concepts pour des sources laser bleues à bas de cristaux dopés Néodyme".

- [Herman 2003] P. Herman, H.J. Lin, J. Lakowicz, “Lifetime-Based Imaging”, Chapitre 9 du livre *Biomedical Photonics Handbook*, CRC Press LLC.
- [Herschel 1845], J. Herschel, “On a case of superficial colour presented by homogeneous liquid internally colourless”, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* **135**, p 143-145.
- [Hess 2006] S. Hess, T. Girirajan, M. Mason, “Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy”, *Biophysical Journal* **91**, p 4258-4272.
- [Hönninger 1999] C. Hönninger, R. Paschotta, F. Morier-Genoud, M. Moser, U. Keller, „Q-switching stability limits of continuous-wave passive mode locking”, *Journal of the Optical Society of America B* **16**, p 46-56.
- [Hopkins 2000] J.M. Hopkins, W. Sibbett, “Lasers à impulsions ultracourte”, *Pour la Science* **277**.
- [Huang 2008] B. Huang, W. Wang, M. Bates, X. Zhuang, “Imaging by stochastic optical reconstruction microscopy”, *Science* **319**, p 810-813.
- [Imbert 1972] C. Imbert, “Calculation and experimental proof of the transverse shift induced by total internal reflection of a circular polarized light beam”, *Physical Review D* **5**, p 787-796.
- [Inserm 2007] Expertise collective, *Maladie d'Alzheimer : Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux*, <http://ist.inserm.fr/basisrapports/alzheimer.html>
- [Invitrogen 2007] Invitrogen – Molecular probes, *The Handbook – A Guide to Fluorescent Probes and Labelling Technologies*, 10^{ème} édition, téléchargeable sur le site : <http://probes.invitrogen.com/handbook/>.
- [James 1983] F. James, “The conservation of energy, theories of absorption and resonating molecules, 1851-1854: G G Stokes, A J Angström and W Thomson”, *Notes and Records of The Royal Society of London* **38**, p 79-107.
- [Jares-Erijman 2003] E. Jares-Erijman, T. Jovin, “FRET imaging”, *Nature Biotechnology* **21**, p 1387-1395.
- [Jozefowski 2007] L. Józefowski, J. Fiutowski, T. Kawalec, H. Rubahn, “Direct measurement of the evanescent-wave polarization state”, *Journal of the Optical Society of America B* **24**, p 624-628.
- [Kaminskii 1990] A. Kaminskii, *Laser Crystals: their physics and properties, Second edition*, édition Springer-Verlag, Berlin.
- [Kang 1987] J. Kang, H. Lemaire, A. Unterbeck, J. Salbaum, C. Masters, K. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, B. Müller-Hill, “The precursor of Alzheimer’s disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor”, *Nature* **325**, p 733-736.
- [Karadaglic 2008] D. Kardaglic, T. Wilson, “Image formation in structured illumination wide-field fluorescence microscopy”, *Micron* (à paraître).
- [Kastler 1950] A. Kastler, “Quelques suggestions concernant la production optique et la détection optique d’une inégalité de population des niveaux de quantification spatiale des atomes. Applications à l’expérience de Stern et Gerlach et à la résonance magnétique”, *Le Journal de Physique et le Radium* **11**, p 255.
- [Keller 1996] U. Keller, K. Weingarten, F. Kärtner, D. Kopf, B. Braun, I. Jung, R. Fluck, C. Hönninger, N. Matuschek, J. Aus der Au, “Semiconductor saturable absorber mirrors (SESAM’s) for femtosecond to nanosecond pulse generation in solid-state lasers”, *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics* **2**, p 435-453.

- [Keller 2006] U. Keller, A. Tropper, "Passively modelocked surface-emitting semiconductor lasers", *Physics Reports* **429**, p 67-120.
- [Keller 2007] J. Keller, A. Schönle, S. Hell, "Efficient fluorescence inhibition patterns for RESOLFT microscopy", *Optics Express* **15**, p 3361-3371.
- [Kentech 2003] Kentech Instruments Ltd, "Operations manual for high rate imager".
- [Kentech 2008] Kentech Instruments Ltd, site internet de l'entreprise: <http://www.kentech.co.uk/index.html?/imagers.html&2>.
- [Kenworthy 2001] A. Kenworthy, "Imaging protein-protein interactions using fluorescence energy transfer microscopy", *Methods* **24**, p 289-296.
- [Keyes 1964] R. Keyes, T. Quist, "Injection luminescent pumping of $\text{CaF}_2:\text{U}^{3+}$ with GaAs diode lasers", *Applied Physics Letters* **4**, p 50-52.
- [Khan 2000] S. Khan, D. Pierce, R. Vale, "Interactions of the chemotaxis signal protein CheY with bacterial flagellar motors visualized by evanescent wave microscopy", *Current Biology* **10**, p 927-930.
- [Klar 2000] T. Klar, S. Jakobs, M. Dyba, A. Egner, S. Hell, "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission", *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**, p 8206-8210.
- [Knight 1996-97] J. Knight, T. Birks, P. Russell, D. Atkin, "All-silica single-mode optical fiber with photonic crystal cladding", *Optics Letters* **21**, p 1547-1549; **22**, p 484-485.
- [König 1999] K. König, H. Schneckenburger, R. Hibst, "Time-gated in vivo autofluorescence imaging of dental caries", *Cellular and Molecular Biology* **45**, p 233-239.
- [Kou 1988] E. Kou, T. Tamir, "Incidence angles for optimized ATR excitation of surface plasmons", *Applied Optics* **27**, p 4098-4103.
- [Krishnan 2003] R. Krishnan, H. Saitoh, H. Terada, V. Centonze, B. Herman, "Development of a multiphoton fluorescence lifetime imaging microscopy system using a streak camera", *Review of Scientific Instruments* **74**, p 2714-2721.
- [Kuhn 2005] J. Kuhn, T. Pollard, "Real-time measurements of actin filament polymerization by total internal reflection fluorescence microscopy", *Biophysical Journal* **88**, p 1387-1402.
- [Kumar 2007] S. Kumar, C. Dunsby, P. De Beule, D. Owen, U. Anand, P. Lanigan, R. Benninger, D. Davis, M. Neil, P. Anand, C. Benham, A. Naylor, P. French, "Multifocal multiphoton excitation and time correlated single photon counting detection for 3-D fluorescence lifetime imaging", *Optics Express* **15**, p 12548-12561.
- [Laisney 2004] M. Laisney, B. Giffard, F. Eustache, "Semantic memory in Alzheimer's disease: contributions of semantic priming", *Psychologie et Neuropsychiatrie du Vieillissement* **2**, p 107-115.
- [Lakowicz 1984] J. Lakowicz, G. Laczko, H. Cherek, E. Gratton, M. Limkeman, "Analysis of fluorescence decay kinetics from variable-frequency phase shift and modulation data", *Biophysical Journal* **46**, p 463-477.
- [Lakowicz 1986] J. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, edition Plenum Press.

- [Lakowicz 1992] J. Lakowicz, H. Szmacinski, K. Nowaczyk, M. Johnson, "Fluorescence lifetime imaging of calcium using Quin-2", *Cell Calcium* **13**, p 131-147.
- [Lang 2000] T. Lang, I. Wacker, I. Wunderlich, A. Rohrbach, G. Giese, T. Soldati, W. Almers, "Role of actin cortex in the subplasmalemmal transport of secretory granules in PC-12 cells", *Biophysical Journal* **78**, p 2863-2877.
- [Larson 2003] D. Larson, Y. Ma, V. Vogt, W. Webb, "Direct measurement of Gag-Gag interaction during retrovirus assembly with FRET and fluorescence correlation spectroscopy", *Journal of Cell Biology* **162**, p 1233-1244.
- [Ledesma 2006] M. Ledesma, C. Dotti, "Amyloid excess in Alzheimer's disease: What is cholesterol to be blamed for?", *Federation of European Biochemical Societies Letters* **580**, p 5525-5532.
- [Leica 2006] Leica Microsystems, "Leica TCS SP5, the only broadband confocal, technical documentation", <http://www.leica-microsystems.com/>.
- [Lesvigne 2007] C. Lesvigne, V. Couderc, A. Tonello, P. Leproux, A. Barthélémy, S. Lacroix, F. Druon, P. Blandin, M. Hanna, P. Georges, "Visible supercontinuum generation controlled by intermodal four-wave mixing in microstructured fiber", *Optics Letters* **32**, p 2173-2175.
- [Leterrier 2006] C. Leterrier, J. Lainé, M. Darmon, H. Boudin, J. Rossier, Z. Lenkei, "Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of Type 1 Cannabinoid Receptors", *Journal of Neuroscience* **26**, p 3141-3153.
- [Leutenegger 2006] M. Leutenegger, H. Blom, J. Widengren, C. Eggeling, M. Gösch, R. Leitgeb, T. Lasserer, "Dual-color total internal reflection fluorescence cross-correlation spectroscopy", *Journal of Biomedical Optics* **11**, n° 040502.
- [Lévêque-Fort 2004] S. Lévêque-Fort, M. Fontaine-Aupart, G. Roger, P. Georges, "Fluorescence-lifetime imaging with a multifocal two-photon microscope", *Optics Letters* **29**, p 2884-2886.
- [Lévêque-Fort 2005] S. Lévêque-Fort, D. Papadopoulos, S. Forget, F. Balembois, P. Georges, "Fluorescence lifetime imaging with a low-repetition-rate passively mode-locked diode-pumped Nd:YVO4 oscillator", *Optics Letters* **30**, p 168-170.
- [Lichtman 2005] J. Lichtman, J. Conchello, "Fluorescence Microscopy", *Nature Methods* **2**, p 910-919.
- [Liebsch 2000] G. Liebsch, I. Klimant, B. Frank, G. Holst, O. Wolfbeis, "Luminescence lifetime imaging of oxygen, pH, and carbon dioxide distribution using optical sensors", *Applied Spectroscopy* **54**, p 548-559.
- [Magde 1999] D. Magde, G. Rojas, P. Seybold, "Solvent dependence of the fluorescence lifetimes of xanthene dyes", *Photochemistry and Photobiology* **70**, p 737-744.
- [Mahler 2008] B. Mahler, P. Spinicelli, S. Buil, X. Quelin, J. Hermier, B. Dubertret, "Towards non-blinking colloidal quantum dots", *Nature Materials* **7**, p 659-664.
- [Maillart 2004] E. Maillart, K. Brengel-Pesce, D. Capela, A. Roget, T. Livache, M. Canva, Y. Levy, T. Soussi, "Versatile analysis of multiple macromolecular interactions by SPR imaging: application to p53 and DNA interaction", *Oncogene* **23**, p5543-5550.
- [Maimann 1960] T. Maimann, "Stimulated optical radiation in ruby", *Nature* **187**, p 493-494.
- [Maréchal 1970] A. Maréchal, M. Françon, *Diffraction, structure des images*, édition Masson.

- [Mashanov 2003] G. Mashanov, D. Tacon, A. Knight, M. Peckham, J. Molloy, “Visualizing single molecules inside living cells using total internal reflection fluorescence microscopy”, *Methods* **29**, p 142-152.
- [Mattheyses 2004] A. Mattheyses, A. Hoppe, D. Axelrod, “Polarized fluorescence resonance energy transfer microscopy”, *Biophysical Journal* **87**, p 2787-2797.
- [Mattheyses 2006] A. Mattheyses, K. Shaw, D. Axelrod, “Effective elimination of laser interference fringing in fluorescence microscopy by spinning azimuthal incidence angle”, *Microscopy Research and Technique* **69**, p 642-647.
- [McKhann 1984] G. McKhann, D. Drachman, M. Folstein, R. Katzman, D. Price, E. Stadlan, “Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: report of the NINCDS-ADRDA work group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer’s disease”, *Neurology* **19**, p 939-944.
- [McNally 1999] J. McNally, T. Karpova, J. Cooper, J. Conchello, “Three-dimensionnal imaging by deconvolution microscopy”, *Methods* **19**, p 373-385.
- [Merzlyak 2007] E. Merzlyak, J. Goedhart, D. Shcherbo, M. Bulina, A. Shcheglov, A. Fradkov, A. Gaintzea, K. Lukyanov, S. Lukyanov, T. Gadella, D. Chudakov, “Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime”, *Nature Methods* **4**, p 555-557.
- [Michalet 2005] X. Michalet, F. Pinaud, L. Bentolila, J. Tsay, S. Doose, J. Li, G. Sundaresan, A. Wu, S. Gambhir, S. Weiss, “Quantum Dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics”, *Science* **307**, p 538-544.
- [Minsky 1988] M. Minsky, “Memoir on inventing the confocal scanning microscope”, *Scanning* **10**, p 128-138.
- [Mochizuki 2001] N. Mochizuki, S. Yamashita, K. Kurokawa, Y. Ohba, T. Nagai, A. Miyawaki, M. Matsuda, “Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1”, *Nature* **411**, p 1065-1068.
- [Mogilevtsev 1998] D. Mogilevtsev, T. Birks, P. Russell, “Group-velocity dispersion in photonic crystal fibers”, *Optics Letters* **23**, p 1662-1664.
- [Molec Expr 2008] site web de Molecular Expression, page “Pioneers in the Optical Science”, <http://micro.magnet.fsu.edu/optics/timeline/people/index.html>.
- [Moog 1982] R. Moog, M. Ediger, S. Boxer, M. Fayer, “Viscosity dependence of the rotational reorientation of rhodamine B in mono- and polyalcohols – Picosecond transient gating experiments”, *Journal of Physical Chemistry* **86**, p 4694-4700.
- [Moore 2004] C. Moore, S. Chan, J. Demas, B. DeGraff, “Comparison of methods for rapid evaluation of lifetimes of exponential decays”, *Applied Spectroscopy* **58**, p 603-607.
- [Morgan 1996] C. Morgan, A. Mitchell, “Fluorescence lifetime imaging: an emerging technique in fluorescence microscopy”, *Chromosome Research* **4**, p 261-263.
- [Mozaz 2006] M. Mozaz, M. Garaigordobil, L. Gonzalez Rothi, J. Anderson, G. Crucian, K. Heilman, “Posture recognition in Alzheimer’s disease”, *Brain and Cognition* **62**, p 241-245.
- [Muller 1995] M. Muller, R. Ghauharali, K. Visscher, G. Brakenhoff, “Double-pulse fluorescence lifetime imaging in confocal microscopy”, *Journal of Microscopy* **177**, p 171-179.

- [Munro 2005] I. Munro, J. McGinty, N. Galletly, J. Requejo-Isidro, P. Lanigan, D. Elson, C. Dunsby, M. Neil, M. Lever, G. Stamp, P. French, "Toward the clinical application of time-domain fluorescence lifetime imaging", *Journal of Biomedical Optics* **10**, 051403.
- [Munter 2007] L. Munter, P. Voigt, A. Harmeier, D. Kaden, K. Gottschalk, C. Weise, R. Pipkorn, M. Schaefer, D. Langosch, G. Multhaupt, "GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of A β 42", *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal* **26**, p 1702-1712.
- [Murdoch 1987] B. Murdoch, H. Chenery, V. Wilks, R. Boyle, "Language disorders in dementia of the Alzheimer type", *Brain and Language* **31**, p 122-137.
- [Muskens 2008] O. Muskens, A. Lagendijk, "Broadband enhanced backscattering spectroscopy of strongly scattering media", *Optics Express* **16**, p 1222-1231.
- [Nair 2006] D. Nair, M. Jose, T. Kuner, W. Zschratter, R. Hartig, "FRET-FLIM at nanometer spectral resolution from living cells", *Optics Express* **14**, p 12217-12229.
- [Neil 1997] M. Neil, R. Juskaitis, T. Wilson "Method of obtaining optical sectioning by using structured light in a conventional microscope" *Optics Letters* **22**, p 1905-1907.
- [Nielsen 2001] T. Nielsen, M. Fricke, D. Hellweg, P. Andresen, "High efficiency beam splitter for multifocal multiphoton microscopy", *Journal of Microscopy* **201**, p 368-376.
- [Nikon 2008] Site web de Nikon Microscopy U, page "TIRF Microscopy: Introduction and Applications", <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/tirf/tirfintro.html>
- [O'Connor 1984] D. O'Connor, D. Philips, *Time-Correlated Single Photon Counting*, edition Academic Press.
- [Oheim 1998] M. Oheim, D. Loeke, W. Stühmer, R. Chow, "The last few milliseconds in the life of a secretory granule: Docking, dynamics and fusion visualized by total internal reflection fluorescence microscopy (TIRFM)", *European Biophysics Journal* **27**, p 83-98.
- [Oheim 2005] M. Oheim, F. Schapper, "Non-linear evanescent-field imaging", *Journal of Physics D* **38**, R185-R197.
- [Ohsugi 2006] Y. Ohsugi, K. Saito, M. Tamura, M. Kinjo, "Lateral mobility of membrane-binding proteins in living cells measured by total internal reflection fluorescence correlation spectroscopy", *Biophysical Journal* **91**, p 3456-3464.
- [Olympus 2008] Olympus, brochure "Research inverted system microscope IX71/IX81; IX2 series", sur le site http://www.olympusamerica.com/seg_section/product.asp?product=1023.
- [Padilla-Parra 2008] S. Padilla-Parra, N. Audugé, M. Coppey-Moisán, M. Tramier, "Quantitative FRET analysis by fast acquisition time domain FLIM at high spatial resolution in living cells", *Biophysical Journal*, papier accepté.
- [Papadopoulos 2003] D. Papadopoulos, S. Forget, M. Delaigue, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, "Passively mode-locked diode-pumped Nd:YVO₄ oscillator operating at an ultralow repetition rate", *Optics Letters* **28**, p 1838-1840.
- [Paschotta 2008] R. Paschotta, Article sur le SESAM dans *Encyclopedia of Laser Physics and Technology*, http://www.rp-photonics.com/semiconductor_saturable_absorber_mirrors.html
- [Patterson 2000] G. Patterson, D. Piston, G. Barisas, "Förster distances between green fluorescent protein pairs", *Analytical Biochemistry* **284**, p 438-440.

- [Pelet 2006] S. Pelet, M. Previte, P. So, "Comparing the quantification of Förster resonance energy transfer measurement accuracies based on intensity, spectral and lifetime imaging", *Journal of Biomedical Optics* **11**, 034017.
- [Periasamy 1995] A. Periasamy, X. Wang, P. Wodnicki, G. Gordon, S. Kwon, P. Diliberto, B. Herman, "High-speed fluorescence microscopy: lifetime imaging in the biomedical sciences", *Microscopy and Microanalysis* **1**, p 13-23.
- [Periasamy 1996] A. Periasamy, P. Wodnicki, X. Wang, S. Kwon, G. Gordon, B. Herman, "Time-resolved fluorescence lifetime imaging microscopy using a picosecond pulsed tunable dye laser system", *Review of Scientific Instruments* **67**, p 3722-3731.
- [Perry 2003] R. Perry, J. Hodges, "Dissociation between top-down attentional control and the time course of visual attention as measured by attentional dwell time in patients with mild cognitive impairment", *European Journal of Neuroscience* **18**, p 221-226.
- [Pettersson 2002] A. Pettersson, M. Engardt, L. Wahlund, "Activity level and balance in subjects with mild Alzheimer's disease", *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* **13**, p 213-216.
- [Picoquant 2006] PicoQuant GmbH, "Photo counting instrumentation", http://www.picoquant.com/getfs.htm?products/lsm_kit/lsm_kit.htm
- [Picoquant 2008] site de la société PicoQuant GmbH, <http://www.picoquant.com/lightsources.htm>
- [Pochynyuk 2007] O. Pochynyuk, A. Staruschenko, V. Bugaj, L. LaGrange, J. Stockand, "Quantifying RhoA facilitated trafficking of the epithelial Na⁺ channel toward the plasma membrane with total internal reflection fluorescence-fluorescence recovery after photobleaching", *Journal of Biological Chemistry* **282**, p 14576-14585.
- [Reich 1993] R. Reich, R. Mountain, W. McGonagle, J. Huang, J. Twichell, B. Kosicki, E. Savoye, "Integrated electronic shutter for back-illuminated charge-coupled-devices", *IEEE Transactions on Electron Devices* **40**, p 1231-1237.
- [Requejo-Isidro 2004] J. Requejo-Isidro, J. McGinty, I. Munro, D. Elson, N. Galletly, M. Lever, M. Neil, G. Stamp, P. French, P. Kellett, J. Hares, A. Dymoke-Bradshaw, "High-speed wide-field time-gated endoscopic fluorescence-lifetime imaging", *Optics Letters* **29**, p 2249-2251.
- [Rittweger 2007] E. Rittweger, B. Rankin, V. Westphal, S. Hell, "Fluorescence depletion mechanisms in super-resolving STED microscopy", *Chemical Physics Letters* **442**, p 483-487.
- [Rück 2002] A. Rück, M. Kress, F. Dolp, N. Akgün, T. Meier, R. Steiner, "New microscopic techniques to investigate intracellular localization and reactions of photosensitizers - Laser scanning fluorescence lifetime imaging (LS-FLIM)", *Medical Laser Application* **17**, p 41-47.
- [Rück 2003] A. Rück, F. Dolpa, C. Happa, R. Steinera, M. Beilb, "Fluorescence lifetime imaging (FLIM) using ps pulsed diode lasers in laser scanning microscopes", *Proceedings of SPIE* **4962**, p 160-167.
- [Ruckstuhl 2004] T. Ruckstuhl, S. Seeger, "Attoliter detection volumes by confocal total-internal-reflection fluorescence microscopy", *Optics Letters* **29**, p 569-571.
- [Rulkov 2005] A. Rulkov, M. Vyatkin, S. Popov, J. Taylor, V. Gapontsev, "High brightness picosecond all-fiber generation in 525-1800 nm range with picosecond Yb pumping", *Optics Express* **13**, p 377-381.
- [Russell 2003] P. Russell, "Photonic crystal fibers", *Science* **299**, p 358-362.

- [Rust 2006] M. Rust, M. Bates, X. Zhuang, "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)", *Nature Methods* **3**, p 793-796.
- [Sala 1980] K. Sala, G. Kenney-Wallace, G. Hall, "CW autocorrelation measurements of picosecond laser pulses", *IEEE Journal of Quantum Electronics* **16**, p 990-996.
- [Sambamurti 2004] K. Sambamurti, A. Granholm, M. Kindy, N. Bhat, N. Greig, D. Lahiri, J. Mintzer, "Cholesterol and Alzheimer's disease: clinical and experimental models suggest interactions of different genetic, dietary and environmental risk factors", *Current Drug Targets* **5**, p 517-528.
- [Sanders 1994] R. Sanders, H. Gerritsen, A. Draaijer, P. Houpt, Y. Levine, "Fluorescence lifetime imaging of free calcium in single cells", *Bioimaging* **2**, p 131-138.
- [Sanders 1995] R. Sanders, A. Draaijer, H. Gerritsen, P. Houpt and Y. Levine, "Quantitative pH imaging in cells using confocal fluorescence lifetime imaging microscopy", *Analytical Biochemistry* **227**, p 302-308.
- [Sandison 1995] D. Sandison, D. Piston, R. Williams, W. Webb, "Quantitative comparison of background rejection, signal-to-noise ratio, and resolution in confocal and full-field laser scanning microscopes", *Applied Optics* **34**, p 3576-3588.
- [Schaefer 2004] L. Schaefer, D. Schuster, J. Schaffer, "Structured illumination microscopy: artefacts analysis and reduction utilizing a parameter optimization approach", *Journal of Microscopy* **216**, p 165-174.
- [Schlatter 2005] A. Schlatter, L. Krainer, M. Golling, R. Paschotta, D. Ebling, U. Keller, "Passively mode-locked 914-nm Nd:YVO₄ laser", *Optics Letters* **30**, p 44-46.
- [Schneckenburger 2003] H. Schneckenburger, K. Stock, W. Strauss, J. Eickholz, R. Sailer, "Time-gated total internal reflection fluorescence spectroscopy (TG-TIRFS): application to the membrane marker laurdan", *Journal of Microscopy* **211**, p 30-36.
- [Schneckenburger 2004] H. Schneckenburger, K. Stock, M. Lyttek, W. Strauss, R. Sailer, "Fluorescence lifetime imaging (FLIM) of rhodamine 123 in living cells", *Photochemical and Photobiological Sciences* **3**, p 127-131.
- [Schneckenburger 2005] H. Schneckenburger, "Total internal reflection fluorescence microscopy: technical innovations and novel applications", *Current Opinion in Biotechnology* **16**, p 13-18.
- [Schrader 1998] M. Schrader, S. Hell, H. VanDerVoort, "Three-dimensional super-resolution with a 4Pi confocal microscope using image restoration", *Journal of Applied Physics* **84**, p 4033-4042.
- [Schreiber 2003] T. Schreiber, J. Limpert, H. Zellmer, A. Tünnerman, K. Hansen, "High average power supercontinuum generation in photonic crystal fibers", *Optics Communications* **228**, p 71-78.
- [Seefeldt 2003] M. Seefeldt, A. Heuer, R. Menzel, "Compact white-light source with an average output power of 2.4 W and 900 nm spectral bandwidth", *Optics Communications* **216**, p 199-202.
- [Sekar 2003] R. Sekar, A. Periasamy, "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations", *Journal of Cell Biology* **160**, p 629-633.
- [Semrock 2007] Semrock Inc, Note technique sur le FRET, http://www.semrock.com/TechNotes/TN_BrightLineFRET.htm
- [Semrock 2008] site internet de l'entreprise Semrock: <http://www.semrock.com/>.

- [Seubert 1992] P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, F. Esch, M. Lee, H. Dovey, D. Davis, S. Sinha, M. Schiossmacher, J. Whaley, C. Swindlehurst, R. McCormack, R. Wolfert, D. Selkoe, I. Lieberburg, D. Schenk, "Isolation and quantification of soluble Alzheimer's β -peptide from biological fluids", *Nature* **359**, p 325-327.
- [Sharman 1999] K. Sharman, A. Periasamy, H. Ashworth, J. Demas, N. Snow, "Error analysis of the rapid lifetime determination method for double-exponential decays and new windowing schemes", *Analytical Chemistry* **71**, p 947-952.
- [Shaw 2002] G. Shaw, S. Morse, M. Ararat, F. Graham, "Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells", *FASEB Journal (Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology)* **16**, p 869-871.
- [Shimonura 1962] O. Shimonura, F. Johnson, Y. Saiga, "Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*", *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, p 223-239.
- [Shobab 2005] L. Shobab, G. Hsiung, H. Feldman, "Cholesterol in Alzheimer's disease", *Lancet Neurology* **4**, p 841-852.
- [Siegel 2003] J. Siegel, K. Suhling, S. Lévêque-Fort, S. Webb, D. Davis, D. Phillips, Y. Sabharwal, P. French, "Wide-field time resolved fluorescence anisotropy imaging (TR-FAIM): Imaging the rotational mobility of a fluorophore", *Review of Scientific Instruments* **74**, p 182-192.
- [Simons 1998] M. Simons, P. Keller, B. De Strooper, K. Beyreuther, C. Dotti, K. Simons, "Cholesterol depletion inhibits the generation of β -amyloid in hippocampal neurons", *Proceeding of the National Academy of Sciences* **95**, p 6460-6464 (Neurobiology).
- [Smith 2005] T. Smith, M. Gee, C. Scholes, "Time-resolved evanescent wave-induced fluorescence anisotropy measurements", dans *Reviews in Fluorescence 2005*, C. Geddes, J. Lakowicz,   dition Springer.
- [Soloviev 2007] V. Soloviev, J. McGinty, K. Tahir, M. Neil, A. Sardini, J. Hajnal, S. Arridge, P. French, "Fluorescence lifetime tomography of live cells expressing enhanced green fluorescent protein embedded in a scattering medium exhibiting background autofluorescence", *Optics Letters* **32**, p 2034-2036.
- [Soper 1994] S. Soper, B. Legendre, "Error analysis of simple algorithms for determining fluorescence lifetimes in ultradilute dye solutions", *Applied Spectroscopy* **48**, p 400-405.
- [Spence 1991] D. Spence, P. Kean, W. Sibbett, "60-fsec generation from a self-mode-locked Ti:sapphire laser", *Optics Letters* **16**, p 42-44.
- [Spring 2006] K. Spring, M. Parry-Hill, M. Davidson, "Light diffraction through a periodic grating", site web Molecular Expressions
<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/imageformation/gratingdiffraction/index.html>
- [Stankov 1988] K. Stankov, J. Jethwa, "A new mode-locking technique using a nonlinear mirror", *Optics Communication* **66**, p 41-46.
- [Starr 2001] T. Starr, N. Thompson, "Total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy: combined surface reaction and solution diffusion", *Biophysical Journal* **80**, p 1575-1584.
- [Steyer 1999] J. Steyer, W. Almers, "Tracking single secretory granules in live chromaffin cells by evanescent-field fluorescence microscopy", *Biophysical Journal* **76**, p 2262-2271.
- [Stout 1989] A. Stout, D. Axelrod, "Evanescent field excitation of fluorescence by epi-illumination microscopy", *Applied Optics* **28**, p 5237-5242.

- [Stryer 1967] L. Stryer, R. Haugland, "Energy transfer: a spectroscopic ruler", *Proceeding of the National Academy of Sciences of USA* **58**, p 719-726.
- [Subtil 1999] A. Subtil, I. Gaidarov, K. Kobylarz, M. Lampson, J. Keen, T. McGraw, "Acute cholesterol depletion inhibits clathrin-coated pit budding", *Proceeding of the National Academy of Sciences* **96**, p 6775-6780 (Cell Biology).
- [Suhling 1996] K. Suhling, D. McLoskey, D. Birch, "Multiplexed single-photon counting - II - The statistical theory of time-correlated measurements", *Review of Scientific Instruments* **67**, p 2238-2246.
- [Suhling 2002] K. Suhling, J. Siegel, D. Phillips, P. French, S. Lévêque-Fort, S. Webb, D. Davis, "Imaging the environment of green fluorescent protein", *Biophysical Journal* **83**, p 3589-3595.
- [Suhling 2005] K. Suhling, P. French, D. Philips, "Time-resolved fluorescence microscopy", *Photochemical and Photobiological Sciences* **4**, p 13-22.
- [Sund 1999] S. Sund, J. Swanson, D. Axelrod, "Cell membrane orientation visualized by polarized total internal reflection fluorescence", *Biophysical Journal* **77**, p 2266-2283.
- [Taboury 2003] J. Taboury, cours d'Optique Physique de deuxième année de l'Ecole Supérieure d'Optique.
- [Tadrous 2000] P. Tadrous, "Methods for imaging the structure and function of living tissues and cells: 2. Fluorescence lifetime imaging", *Journal of Pathology* **191**, p 229-234.
- [Tellinghuisen 1994] J. Tellinghuisen, P. Goodwin, W. Ambrose, J. Martin, R. Keller, "Analysis of fluorescence lifetime data for single rhodamine molecules in flowing sample streams", *Analytical Chemistry* **66**, p 64-72.
- [Thompson 1981] N. Thompson, T. Burghardt, D. Axelrod, "Measuring surface dynamics of biomolecules by total internal reflection fluorescence with photobleaching recovery or correlation spectroscopy", *Biophysical Journal* **33**, p 435-454.
- [Thompson 1983] N. Thompson, D. Axelrod, "Immunoglobulin surface-binding kinetics studied by total internal reflection with fluorescence correlation spectroscopy", *Biophysical Journal* **43**, p 103-114.
- [Thorlabs 2008] Thorlabs GmbH, catalogue des produits disponibles en ligne: http://www.thorlabs.com/NewGroupPage9.cfm?ObjectGroup_ID=139
- [Toomre 2001] D. Toomre, D. Manstein, "Lighting up the cell surface with evanescent wave microscopy", *TRENDS in Cell Biology* **11**, p 298-303.
- [Török 1997] P. Török, T. Wilson, "Rigorous theory for axial resolution in confocal microscopes", *Optics Communications* **137**, p 127-135.
- [Tramier 2002] M. Tramier, I. Gautier, T. Piolot, S. Ravalet, K. Kemnitz, J. Coppey, C. Durieux, V. Mignotte, M. Coppey-Moisán, "Picosecond-hetero-FRET microscopy to probe protein-protein interactions in live cells", *Biophysical Journal* **83**, p 3570-3577.
- [Tramier 2006] M. Tramier, M. Zahid, J. Mevel, M. Masse, M. Coppey-Moisán, "Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells", *Microscopy Research and Technique* **69**, p 933-939.
- [Tramier 2008] M. Tramier, M. Coppey-Moisán, "Fluorescence anisotropy imaging microscopy for homo-FRET in living cells", *Methods in Cell Biology* **85**, p 395-414.

- [Trebino 1993] R. Trebino, D. Kane, "Using phase retrieval to measure the intensity and phase of ultrashort pulses: frequency-resolved optical gating", *Journal of the Optical Society of America A* **10**, p 1101-1111.
- [Universalis 2005] Articles se rapportant aux différents personnages cités.
- [Urayama 2003] P. Urayama, W. Zhong, J. Beamish, F. Minn, R. Sloboda, K. Dragnev, E. Dmitrovsky, M. Mycek, "A UV-visible-NIR fluorescence lifetime imaging microscope for laser based biological sensing with picosecond resolution", *Applied Physics B* **76**, p 483-496.
- [Vale 1996] R. Vale, T. Funatsu, D. Pierce, L. Romberg, Y. Harada, T. Yanagida, "Direct observation of single kinesin molecules moving along microtubules", *Nature* **380**, p 451-453.
- [Valeur 2002] B. Valeur, *Molecular Fluorescence*, edition Wiley-VCH.
- [Ventelon 2007] C. Ventelon, R. Heintzmann, J. Mertz, "Dynamic speckle illumination microscopy with wavelet prefiltering", *Optics Letters* **32**, p 1417-1419.
- [Wakelin 2002] S. Wakelin, C. Bagshaw, "A prism combination for near isotropic fluorescence excitation by total internal reflection", *Journal of Microscopy* **209**, p 143-148.
- [Wallrabe 2005] H. Wallrabe, A. Periasamy, "Imaging protein molecules using FRET and FLIM microscopy", *Current Opinion in Biotechnology* **16**, p 19-27.
- [Wang 1991] X. Wang, T. Uchida, D. Coleman, S. Minami "A two-dimensional fluorescence lifetime imaging-system using a gated image intensifier", *Applied Spectroscopy* **45**, p 360-366.
- [Wang 1992] X. Wang, A. Periasamy, B. Herman, D. Coleman, "Fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) - instrumentation and applications", *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **23**, p 369-395.
- [Wang 1994] M. Wang, D. Axelrod, "Time-lapse total internal reflection fluorescence video of acetylcholine receptor cluster formation on myotubes", *Developmental Dynamics* **201**, p 29-40.
- [Webb 2002] S. Webb, Y. Gu, S. Lévêque-Fort, J. Siegel, M. Cole, K. Dowling, R. Jones, P. French, M. Neil, R. Juskaitis, L. Sucharov, T. Wilson, M. Lever, "A wide-field time-domain fluorescence lifetime imaging microscope with optical sectioning", *Review of Scientific Instruments* **73**, p 1898-1907.
- [Webb 2003] S. Webb, "Development and application of widefield fluorescence lifetime imaging", in *Imperial College of Sciences, Technology and Medicine*, University of London.
- [Weis 1982] R. Weis, K. Balakrishnan, B. Smithy, H. McConnell, "Stimulation of fluorescence in a small contact region between rat basophil leukemia cells and planar lipid membrane targets by coherent evanescent radiation", *Journal of Biological Chemistry* **257**, p 6440-6445.
- [Weiss 2000] S. Weiss, "Measuring conformational dynamics of biomolecules by single molecule fluorescence spectroscopy", *Nature Structural Biology* **7**, p 724-729.
- [Westphal 2005] V. Westphal, S. Hell, "Nanoscale resolution in the focal plane of an optical microscope", *Physical Review Letters* **94**, article 143903.
- [Willig 2006] K. Willig, R. Kellner, R. Medda, B. Hein, S. Jakobs, S. Hell, "Nanoscale resolution in GFP-based microscopy", *Nature Methods* **3**, p 721-723.
- [Willig 2007] K. Willig, B. Harke, R. Medda, S.W. Hell, "STED microscopy with continuous wave beams", *Nature Methods* **4**, p915.

- [Wilson 1984] T. Wilson, C. Sheppard, *Theory and practice of scanning optical microscopy*, edition Academic Press.
- [Wilson 2003] T. Wilson, “Confocal microscopy”, Chapitre 10 du livre *Biomedical Photonics Handbook*, edition CRC Press LLC.
- [Woods 1984] R. Woods, S. Scypinski, L. Cline Love, H. Ashworth, “Transient digitizer for the determination of microsecond luminescence lifetimes”, *Analytical Chemistry* **56**, p 1395-1400.
- [Youn 1995] H. Youn, E. Terpetschnig, H. Szmajnski, J. Lakowicz, “Fluorescence energy transfer immunoassay based on a long-lifetime luminescent metal-ligand complex”, *Analytical biochemistry* **232**, p 24-30.
- [Zavelani-Rossi 1998] M. Zavelani-Rossi, G. Cerullo, V. Magni, “Mode locking by cascading of second order nonlinearities”, *IEEE Journal of Quantum Electronics* **34**, p 61-70.
- [Zeller 2000] P. Zeller, P. Peuser, “Efficient, multiwatt, continuous-wave laser operation on the $^4F_{3/2}$ – $^4I_{9/2}$ transitions of Nd:YVO₄ and Nd:YAG”, *Optics Letters* **25**, p 34-36.
- [Zhang 2001] J. Zhang, Y. Ma, S. Taylor, R. Tsien, “Genetically encoded reporters of protein kinase A activity reveal impact of substrate tethering”, *Proceeding of the National Academy of Sciences* **98**, p 14997-15002.
- [Zhu 2004] Z. Zhu, T. Brown, “Polarization properties of supercontinuum spectra generated in birefringent photonic crystal fibers”, *Journal of the optical Society of America B* **21**, p 249-257.
- [Zhuang 2003] X. Zhuang, M. Rief, “Single-molecule folding”, *Current Opinion in Structural Biology* **13**, p 88-97.
- [Zipfel 2003] W. Zipfel, R. Williams, W. Webb, “Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences”, *Nature Biotechnology* **21**, p 1369-1377.

Communications

LISTES DES PUBLICATIONS

Articles publiés dans des revues avec comité de lecture

P. Blandin, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart

“Diode-pumped passively mode-locked Nd:YVO₄ laser at 914 nm“

Optics Letters **31**, 214-216 (2006)

C. Lesvigne, V. Couderc, A. Tonello, P. Leproux, A. Barthelemy, S. Lacroix, F. Druon, P. Blandin, M. Hanna, P. Georges

“Visible supercontinuum generation controlled by intermodal four-wave mixing in microstructured fiber”

Optics Letters **32**, 2173-2175 (2007)

C. Gerhard, F. Druon, P. Blandin, M. Hanna, F. Balembois, P. Georges, F. Falcoz

“Efficient versatile-repetition-rate picosecond source for material processing applications”

Applied Optics **47**, 967-974 (2008)

P. Blandin, F. Druon, M. Hanna, S. Lévêque-Fort, C. Lesvigne, V. Couderc, P. Leproux, A. Tonello, P. Georges

“Picosecond polarized supercontinuum generation controlled by intermodal four-wave mixing for fluorescence lifetime imaging microscopy”

Optics Express **16**, 18844-18849 (2008)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, S. Lécart, J. Cossec, M.C. Potier, Z. Lenkei, F. Druon, P. Georges

“Time-gated total internal reflection fluorescence microscopy with a supercontinuum excitation source”

Applied Optics **48**, (2009)

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

Avec publication des actes

P. Blandin, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart

"Laser Nd:YVO₄ impulsionnel à 914 nm pompé par diode"

Poster : Colloque sur les Lasers et l'Optique Quantique (COLOQ 9), Dijon (Septembre 2005)

P. Blandin, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart

"914 nm diode-pumped passively mode-locked based on Nd :YVO₄"

Conférence orale : Advanced Solid State Photonics (ASSP), Lake Tahoe, (Février 2006)

P. Blandin, F. Druon, M. Hanna, C. Lesvigne, V. Couderc, P. Leproux, P. Georges

“Supercontinuum generation in a highly birefringent photonic crystal fiber seeded by a low-repetition rate picosecond infrared laser“

Conférence orale: SPIE Europe Optics and Optoelectronics, Prague (Avril 2007)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, S. Lécart, P. Zeller, Z. Lenkei, F. Druon, P. Georges

"Development of a TIRF-FLIM microscope for biomedical applications"

Conférence orale: European Conference on Biomedical Optics (ECBO), Munich (Juin 2007)

COMMUNICATIONS À DES CONGRES

Sans publication des actes

P. Blandin, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart
 "Impulsions picoseconde à 914 nm à partir d'un laser Nd:YVO4 pompé par diode"
Poster: Journées Nationales des Cristaux pour l'Optique (JNCO), Valpré-Ecully (Décembre 2005)

P. Blandin, F. Druon, F. Balembois, P. Georges, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart
 "First picosecond Nd:YVO4 diode pumped solid state laser at 914 nm"
Conférence orale: Conference on Laser and Electro-Optic (CLEO), Long Beach (Mai 2006)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart, P. Georges, R. Briandet
 "Total Internal Reflection Fluorescence for fluorescence lifetime imaging"
Poster: European Optical Society (EOS) Meeting, Paris (Octobre 2006)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, R. Briandet, M.P. Fontaine-Aupart, P. Georges
 "Développement d'un dispositif de microscopie TIRF pour l'imagerie de durée de vie de fluorescence »
Poster : Journée SFO Photonique et Science du Vivant, Paris (Novembre 2006)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, F. Druon, M.P. Fontaine-Aupart, P. Georges
 "Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps"
Poster : Colloque Bouyssi jeunes chercheurs de l'Université Paris Sud 11 (Février 2007)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, F. Druon, M. Hanna, V. Couderc, P. Georges, R. Briandet, Z. Lenkei, M.P. Fontaine-Aupart
 "Fluorescence lifetime imaging in TIRF microscopy"
Conférence orale: Focus On Microscopy (FOM), Valence (Avril 2007)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, S. Lécart, F. Druon, P. Georges, P. Zeller, Z. Lenkei
 "Développement d'un dispositif de microscopie TIRF résolu en temps pour l'observation de récepteurs membranaires"
Conférence orale : Optdiag : Diagnostique et Imagerie Optiques en Médecine, Paris (Mai 2007)

P. Blandin, F. Druon, M. Hanna, S. Lévêque-Fort, M.P. Fontaine-Aupart, C. Lesvignes, V. Couderc, P. Leproux, P. Georges
 "Supercontinuum generation in a highly birefringent photonic crystal fiber seeded by a low-repetition rate picosecond infrared laser"
Poster: International Quantum Electronics Conference (IQEC), Munich (Juin 2007)

C. Gerhard, F. Druon, P. Blandin, M. Hanna, F. Balembois, P. Georges
 "Efficient versatile-repetition-rate ps source for material processing applications"
Conférence orale: Conference on Laser and Electro-Optic (CLEO Europe), Munich (juin 2007)

J.C. Cossec, A. Simon, P. Blandin, S. Lécart, R. Moldrich, C. Leterrier, J. Rossier, S. Lévêque-Fort, Z. Lenkei, M.C. Potier
 "Effects of cholesterol on APP trafficking in HEK cells"
Poster: Molecular Mechanisms of Neurodegeneration , Antigua et Barbuda (décembre 2007)

P. Blandin, S. Lévêque-Fort, S. Lécart, F. Druon, P. Georges, J.C. Cossec, M.C. Potier, Z. Lenkei
 "FRET Detection in the Plasma Membrane Using Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy"
Conférence orale: Conference on Laser and Electro-Optic (CLEO), San Jose (mai 2008)

V. Devauges, P. Blandin, S. Lévêque-Fort, S. Lécart, F. Druon, P. Georges, J.C. Cossec, M.C. Potier
“FRET detection using Total Internal Reflection Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy and supercontinuum excitation”

Poster: Symposium “Optical Microscopy in Good Shape”, Paris (mai 2008)

K. Balaa, Y. Goulam-Houssen, V. Devauges, P. Blandin, S. Lévêque-Fort, E. Fort
“Quantitative total internal reflection fluorescence microscopy”

Conférence orale : European Optical Society (EOS) Annual Meeting, Paris (septembre 2008)

Développement instrumental pour la microscopie de fluorescence résolue en temps: applications biomédicales

Résumé :

Pour certaines problématiques biomédicales, notamment en neurobiologie, l'imagerie des échantillons exige des résolutions spatiale et temporelle élevées, et seules des techniques de microscopie optique innovantes vont permettre d'imager la cellule dans des conditions physiologiques. Pour répondre à ces contraintes nous avons développé en intégralité un dispositif de microscopie de fluorescence en réflexion totale interne et résolue en temps. En effet, l'imagerie de fluorescence résolue en temps (FLIM) permet, en complément des informations de localisation et de topologie apportées par la microscopie conventionnelle, une analyse dynamique de processus moléculaires et métaboliques au sein des cellules. Associée à la technique de microscopie en réflexion totale interne, qui confère au système d'imagerie une résolution axiale sub-longueur d'onde tout en acquérant des images en champ large, la technique FLIM permet d'analyser l'activité membranaire des cellules en s'affranchissant de la fluorescence des autres entités de la cellule.

Ce travail s'est articulé autour de trois axes principaux : l'étude et le développement d'un dispositif d'excitation de la fluorescence basé sur un oscillateur laser solide picoseconde dont le spectre est élargi par effets non linéaires dans des fibres optiques microstructurées ; le développement et la caractérisation d'un dispositif de microscopie de fluorescence par onde évanescente (TIRF) couplé à une détection résolue en temps en plein champ ; et l'application de ce dispositif à l'étude d'un précurseur membranaire du peptide amyloïde impliqué dans la maladie d'Alzheimer.

Instrumental development for fluorescence lifetime imaging microscopy: biomedical applications

Abstract :

For several biomedical issues, including neurobiology, imaging with high spatial and temporal resolution in a physiologically relevant cellular context is necessary. To address these requirements, we have developed an original setup which associates total internal reflection fluorescence (TIRF) and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM).

Indeed, FLIM allows a dynamic analysis of molecular and metabolic processes within cells. Combined with TIRF microscopy, which provides a sub-wavelength axial resolution, FLIM enables to analyze the activity of cell membrane, with efficient fluorescent background rejection.

The first aim of this project was to develop a fluorescence excitation source dedicated to lifetime measurement in time domain. We worked on a solution based on a solid state picosecond laser, and we used microstructured optical fibers to enlarge the spectrum by non linear effects. The second aspect of this work was the development and the characterization of the time-gated total internal reflection fluorescence microscope, which allows to measure fluorescence lifetime in wide field. Then, we used this setup to study using FRET probes the homodimerization of amyloid precursor protein (APP), which plays a crucial role in Alzheimer disease.